

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. Martin J. Lohse

**Vergleichende Pharmakologie der Subtypen von menschlichen β -
adrenergen Rezeptoren – Charakterisierung von stabil in CHO-
Zellen transfizierten Rezeptoren**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Michael R. Leitz

aus

Marktredwitz

Würzburg 2006

Eingereicht am: 17.02.2006

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

Koreferent: Prof. Dr. med. U. Walter

Dekan: Prof. Dr.med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 24.07.2006

Der Promovend ist Arzt.

Diese Doktorarbeit ist meinen Eltern gewidmet – für so Vieles.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Beta-Adrenerge Rezeptorsystem	2
1.1.1	Signalübertragung	2
1.1.2	Organverteilung	3
1.1.3	Liganden	5
1.1.4	Indikationsspektrum von β -AR-Liganden	5
1.2	Pharmakologische Charakterisierung von β -AR und Liganden	6
1.3	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	8
2	Materialien und Methoden	9
2.1	Materialien	9
2.2	Molekularbiologische Methoden	10
2.2.1	Herstellung von kompetenten E.coli.....	10
2.2.2	Transformation kompetenter Bakterien	10
2.2.3	Kultur von transformierten E.coli	11
2.2.4	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	11
2.2.5	Agarosegelelektrophorese, Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen ..	12
2.2.6	Mengenbestimmung von DNA	12
2.2.7	Restriktionsverdau von DNA.....	13
2.2.8	Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten	13
2.2.9	Polymerasekettenreaktion	14
2.2.10	cDNA der menschlichen β -AR	14
2.3	Zellkultur	16
2.3.1	Erzeugung von stabilen CHO-Zelllinien – Stabile Transfektion	16
2.3.2	Transiente Transfektion	17
2.3.3	Membranpräparation für Bindungsstudien	17
2.3.4	Membranpräparation für Adenylylcyclase-Versuche	18
2.3.5	Quantifizierung von Proteinen	18
2.4	Biochemische Assays	19
2.4.1	ELISA	19
2.4.2	Radioligandenbindung	19
2.4.3	Reinigung von [α - 32 P]ATP	21
2.4.4	Stimulation der Adenylylcyclase	21
2.5	Verwendete Puffer und Lösungen	23
3	Ergebnisse.....	26
3.1	Herkunft der verwendeten Konstrukte.....	26
3.1.1	β_1 - und β_2 -AR	26
3.1.2	β_3 und β_3 -FLAG-AR	26
3.2	Pharmakologische Charakterisierung der Zelllinien.....	27
3.2.1	Charakterisierung der untransfizierten CHO-Zelllinien.....	27
3.2.2	Untersuchungen an stabil mit FLAG-markiertem β_3 -AR transfizierten CHO-Zellen..	27
3.2.3	Charakterisierung der stabil mit β -Rezeptoren transfizierten Zelllinien in Sättigungsexperimenten.....	30
3.2.4	Vergleichende pharmakologische Charakterisierung der stabil transfizierten Zelllinien.....	33

3.3	Funktionelle Untersuchungen	36
3.3.1	Funktionelle Charakterisierung der stabil transfizierten Zelllinien.....	36
3.3.2	Untersuchungen zu funktionelle Eigenschaften der in den Bindungsexperimenten verwendeten Substanzen.....	40
3.3.3	Inverser Agonismus und Rezeptorexpression.....	43
4	Diskussion	46
4.1	CHO-Zellen als Expressionssystem für β -AR.....	46
4.2	Pharmakologische Charakterisierung	48
4.2.1	Sättigungsbindung	48
4.2.2	Verdrängungsbindung.....	49
4.2.2.1	β_1 - und β_2 -Rezeptoren.....	49
4.2.2.2	β_3 -Rezeptoren	52
4.3	Funktionelle Charakterisierung.....	54
4.3.1	Endogene β -adrenerge Agonisten und Isoprenalin	54
4.3.2	β -adrenerge Agonisten.....	56
4.3.3	β -adrenerge Antagonisten	58
4.3.4	Inverser Agonismus und Rezeptorexpression.....	60
5	Zusammenfassung	64
6	Literaturverzeichnis	65
7	Tabellenverzeichnis	76
8	Abbildungsverzeichnis.....	77
9	Abkürzungsverzeichnis	78

*Die Wissenschaft – richtig verstanden – heilt Menschen
von ihrem unangebrachten Stolz, denn sie zeigt ihnen ihre Grenzen...*

Albert Schweitzer

1 Einleitung

Für das Überleben eines höher organisierten Vielzellers (beispielsweise des Homo sapiens sapiens) ist das Zusammenwirken und die Möglichkeit der wechselseitigen Beeinflussung von Zellen und Zellverbänden des Gesamtorganismus von entscheidender Bedeutung. Dazu ist oft eine Informationsvermittlung über große Distanzen notwendig, die unter anderem durch Botenstoffe in Form von kleinen Molekülen geleistet wird. Um eine Reaktion auszulösen, müssen sich die verwendeten Botenstoffe der Zelle mitteilen. Dies geschieht über Interaktion mit spezialisierten Proteinen der Zelle, die als Rezeptoren eine spezifische Reizantwort dadurch ermöglichen, dass nur Zellen mit dem „passenden“ Rezeptor für einen bestimmten Botenstoff in der Lage sind, das Informationssignal zu verarbeiten.

Diese Rezeptoren sind von ihrer Molekularstruktur her so beschaffen, dass nur ein bestimmter Botenstoff an einer bestimmten Rezeptorpopulation binden und eine Wirkung im Sinn einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins mit konsekutiver Aktivierung einer Signalübertragungskaskade entfalten kann.

Die bisher bekannten Rezeptorproteine werden in fünf Klassen eingeteilt: G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, Rezeptoren mit intrinsischer enzymatischer Aktivität, Tyrosinkinase-aktivierende Rezeptoren und nukleäre Rezeptoren. Im menschlichen Genom findet sich Erbinformation für ca. 1500 unterschiedliche G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, das sind ca. 5% des humanen Genoms [1]. Trotz in den Grundmerkmalen übereinstimmender Struktur mit sieben Transmembran-Domänen und Signalübertragung u.a. über heterotrimere Guanin-Nukleotid bindende Proteine, finden sich G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in so unterschiedlichen Funktionen wie der Lichtrezeption oder der Vermittlung einer „Fight and Flight“ - Reaktion über Katecholamine. Viele Körperfunktionen werden in entscheidendem Maß von dieser Rezeptor-Superfamilie beeinflusst, was sich auch in dem Umstand zeigt, dass ca. 50 % aller auf dem Markt befindlichen

Medikamente mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren interagieren [2]. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten adrenergen Rezeptoren gehören zu dieser Superfamilie. Bisher sind neun adrenerge Rezeptoren bekannt, die in drei Gruppen aufgeteilt werden: α_1 -Rezeptoren (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), α_2 -Rezeptoren (α_{2A-C}) und schließlich die drei β -adrenergen Rezeptoren (β_{1-3}) [3], deren pharmakologische Eigenschaften Gegenstand eingehender Untersuchung in dieser Arbeit sind.

1.1 Das Beta-Adrenerge Rezeptorsystem

Die β_1 - und β_2 -Subtypen sind pharmakologisch Ende der Sechziger Jahre charakterisiert [4] (der β_3 -Subtyp erst einige Zeit später [5]) und Ende der Achtziger kloniert worden [6-8]. Über das Vorhandensein eines postulierten β_4 -Subtypen wird diskutiert, ein Beweis konnte bisher nicht geführt werden (vgl. dazu [9-12]).

1.1.1 Signalübertragung

Die Bindung eines Liganden an einen β -AR induziert eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins und bewirkt die konsekutive Aktivierung von heterotrimeren GTP-bindenden Proteinen, die an den Rezeptor gekoppelt sind ([13], [14]). Alle β -adrenergen Rezeptoren sind über das stimulatorische G-Protein G_s an ihre Effektorsysteme gekoppelt. Nach dem Austausch von GDP durch GTP dissoziieren die G-Proteine in aktive α_s und $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Die aktivierten α_s -Untereinheiten interagieren mit verschiedenen Effektormolekülen; u.a. bewirken sie eine Aktivierung der Adenylylcyclase. Dieses Enzym wiederum katalysiert die Bildung einer großen Zahl von cAMP-Molekülen [15].

Erhöhte cAMP-Level führen ihrerseits zu einer gesteigerten Aktivität der Proteinkinase A [16], die nun eine ganze Reihe wichtiger Effektorproteine, wie z.B. im menschlichen Herzen Phospholamban [17], L-Typ Calcium-Kanäle [18] oder auch kontraktile Proteine [19] phosphoryliert. Während des Ablaufs dieser Signalübertragungskaskade wird das ursprüngliche Signal sehr stark amplifiziert; Stryer et. al errechneten einen Verstärkungsfaktor von 10^6 für die Aktivierung von Rhodopsin in der Retina [20].

Neben diesem „klassischen“ Signalübertragungsweg, dessen second messenger cAMP wir zur Bestimmung der agonistischen Aktivität einer Substanz in unseren funktionellen Experimenten gemessen haben, existieren noch alternative Systeme der Signalübertragung für die adrenergen Rezeptoren. Der β_2 -AR ist neben G_s auch an das inhibitorische G-Protein G_i gekoppelt [21], und je nach Zelltyp kann auch ein anderes Signalübertragungssystem wie z.B. die MAP-Kinase aktiviert werden. Für den β_3 -AR beschreiben Gauthier et. al [22] eine Kopplung an G_i und eine NO-Synthetase-abhängige Signalübertragung (NO: Stickstoffmonoxid) [23]. Die folgende Abbildung 1 soll einen Überblick vermitteln.

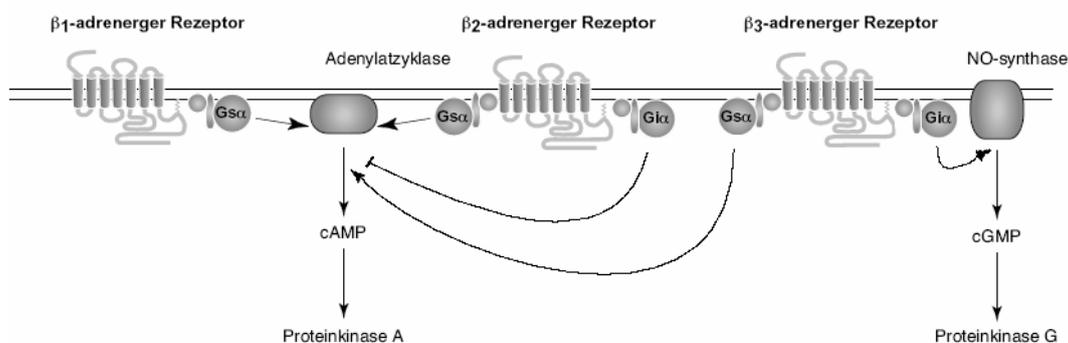


Abbildung 1: Exemplarische Darstellung der Signalübertragung durch β -AR-Subtypen (modifiziert nach [24]). β_1 -Rezeptoren sind an stimulatorische G-Proteine (G_s) gekoppelt, es resultiert die Aktivierung der Adenylatzyklase. Für den β_2 -Subtyp ist neben diesem Weg auch eine Kopplung an inhibitorische G-Proteine (G_i) mit hemmendem Einfluss auf die cAMP-Produktion beschrieben. β_3 -AR können einerseits die Adenylatzyklase aktivieren, andererseits ist eine Erhöhung der NO-Produktion beschrieben, vermutlich über einen G_i -abhängigen Weg.

Die „verschlungenen Pfade“ und Kreuzungen der Signalübertragungswege in ihrem komplexen Zusammenspiel genauer zu verstehen bleibt weiter eine der zentralen Herausforderungen in der Rezeptorphanakologie.

1.1.2 Organverteilung

Neben der Möglichkeit, durch unterschiedliche Signalwege bestimmte Wirkungen zu erzielen, hat die quantitative Verteilung der β -adrenergen Subtypen einen Einfluss

auf die durch Stimulation oder Hemmung der Rezeptoren erzielbaren Effekte. Der β_1 -Rezeptor ist der mit ca. 75-85 % der β -Rezeptoren im menschlichen Herz vorherrschende Subtyp [25], eine Stimulation vermittelt positive Inotropie, Dromotropie, Chronotropie, Bathmotropie und Lusitropie. Der β_2 -Subtyp findet sich als prädominanter Subtyp auf den glatten Muskelzellen mancher Blutgefäße, der Bronchien und des Uterus ([26-28]), wo eine Stimulation die Relaxation der Muskelzellen, d.h. eine Vasodilatation bzw. Bronchodilatation oder Tokolyse, bewirkt. In der folgenden Tabelle sind die hauptsächlichen Expressionsorte der verschiedenen β -adrenergen Subtypen zusammengestellt.

Tabelle 1: Organverteilung der β -adrenergen Subtypen und Effekte bei Aktivierung der Rezeptoren (modifiziert nach [29])

Organsystem		Vorherrschender β -AR-Subtyp	Wirkung
Kardiovaskuläres System			
	Sinusknoten	β_1	Pos. Chronotropie
	AV-Knoten	β_1	Pos. Dromotropie / Bathmotropie
	Purkinje-Fasern	β_1	Pos. Bathmotropie
	Arbeitsmyokard	β_1	Pos. Inotropie / Lusitropie
	Blutgefäße	β_2	Vasodilatation
	Thrombozytenaggregation	β_2	Hemmung
	Myokard	β_3	Neg. Inotropie (?)
Bronchialsystem			
	Glatte Muskulatur	β_2	Relaxation
	Drüsen	β_1, β_2	Sekretion
	Flimmerepithel	β_2	Beschleunigung Cilienschlag
	Mastzellen	β_2	Hemmung der Mediatorausschüttung
Magen-Darm-Trakt			
	Glatte Muskulatur	β_2	Relaxation. Motilitätsabnahme
	Gallenwege	β_2	Relaxation M. sphincter Oddi
	Pankreas	β_2	Insulinausschüttung
	Pankreas	β_1	Amylasesekretion
Urogenitalsystem			
	M. detrusor vesicae	β_2	Relaxation
	D.deferens	β_2	Relaxation
	Uterus	β_2	Relaxation
	Niere	β_1	Reninfreisetzung
Stoffwechsel			
	Fettgewebe	β_3	Lipolyse / Thermogenese
	Leber	β_2	Steigerung Glykogenolyse / Glukoneogenese
	Skelettmuskel	β_2	Glykogenolyse / Tremor / Aktivierung Na^+ -/ K^+ -ATPase

β_3 -Subtypen sind vor allem in weißem und braunem Fettgewebe exprimiert [30] und bewirken Lipolyse bzw. Thermogenese [31]. Neuere Untersuchungen, die nicht unumstritten sind, und auf die in der Diskussion näher eingegangen wird, beschreiben zusätzlich eine Rolle dieses Rezeptorsubtyps im kardiovaskulären System des Menschen ([22], [32]).

Aus dieser Übersicht wird die zentrale Stellung des β -adrenergen Systems für die Regulation einer Vielzahl von wichtigen Körperfunktionen deutlich.

1.1.3 Liganden

Die körpereigenen Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin können als natürliche aktivierende Liganden der β -AR gelten. Dabei ist in erster Linie das aus den sympathischen Nervenendigungen freigesetzte Noradrenalin von Bedeutung. Adrenalin wird aus dem Nebennierenmark abgegeben und spielt im physiologischen Kontext eine geringere Rolle. Dies wird z.B. dadurch deutlich, dass nach beidseitiger Adrenalectomie eine lebenslange Kortikoidsubstitution nötig wird, nicht jedoch die Gabe von Katecholaminen oder ihrer Vorstufen.

1.1.4 Indikationsspektrum von β -AR-Liganden

In der medizinischen Praxis werden β -AR-Liganden zur Therapie einer Vielzahl von Krankheiten eingesetzt: Das β -adrenerge System spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung der Herzfunktion (zusammengefasst bei [3]). Die Substanzen werden darüber hinaus in der Therapie der (chronischen) koronaren Herzkrankheit zur Reduktion des myokardialen Sauerstoffbedarfs ebenso eingesetzt wie in der Akuttherapie des Myokardinfarkts oder als Antiarrhythmika (z.B. Sotalol) [33]. β -adrenerge Antagonisten sind weiterhin in der Behandlung der Hypertonie angezeigt (zusammengefasst von [34]). Die Gabe von β -AR-Antagonisten gehört heute, knapp dreißig Jahre nach den ersten Arbeiten zu diesem Thema [35], zur Standardtherapie in der Behandlung der Herzinsuffizienz ([36], [37]). In diesen Indikationen ist vor allem die Blockade des β_1 -Subtyps erwünscht. β -adrenerge Antagonisten werden in der Neuropsychiatrie zur Therapie von Angststörungen und essentiellen Tremor eingesetzt, ebenso kommen sie zur Migräne-Prophylaxe oder bei der Behandlung des Glaukoms zum Einsatz.

Die durch β_2 -Stimulation vermittelte Entspannung von glatter Muskulatur spielt eine wichtige Rolle bei der Reduktion des bronchialen Widerstandes (zusammengefasst bei [27]). Damit stellen β -AR-Agonisten eine wichtige Substanzklasse in der Therapie des Asthma bronchiale dar, und zwar je nach eingesetztem Wirkstoff in der Akut- oder Langzeittherapie [38]. In der Pharmakotherapie des Schocks oder zur Kreislaufunterstützung in Anästhesie und Intensivmedizin kommen Katecholamine wie Noradrenalin, Dobutamin, Adrenalin und (selten) Dopamin zum Einsatz; neben ihrer Wirkung auf das α -adrenerge System (einen guten Überblick bietet [26]) werden die β -adrenerg vermittelten kardialen Wirkungen ausgenutzt. Adrenalin ist das klassische Medikament zur medikamentösen Reanimation [39], einschränkend muss hierbei bemerkt werden, dass nach der derzeitigen Datenlage sehr wahrscheinlich die α -adrenerge Wirkkomponente ausschlaggebend ist. Aufgrund einer aktuellen Studie [40] ist in diesem Zusammenhang eine Änderung der European Resuscitation Council (ERC)-Leitlinien zumindest denkbar. Eine weitere wichtige Indikation für β_2 -selektive Substanzen bildet die (Notfall-) Tokolyse [41].

Selektiv auf den β_3 -Subtyp wirkende Substanzen werden klinisch (noch) nicht eingesetzt. Allerdings weisen Berichte über reduzierte Insulinsensitivität [42], Neigung zu Adipositas [43] und Nicht-Insulin-abhängigem Diabetes mellitus [44] bei einer Missense-Mutation im menschlichen β_3 -AR möglicherweise auf eine klinisch wichtige Rolle des Rezeptors im Fettmetabolismus des Menschen hin.

Bereits aus dieser kurzen Zusammenfassung und Tabelle 1 lässt sich ersehen, wie breit das Indikationsspektrum der das β -adrenerge System modulierenden Pharmaka ist. Beinahe ausnahmslos finden sich Krankheiten mit hoher Prävalenz und sozioökonomischer Bedeutung, was das hohe Interesse von Medizinern, Wissenschaftlern und der Pharmaindustrie an (selektiv) wirksamen Substanzen erklärt.

1.2 Pharmakologische Charakterisierung von β -AR und Liganden

Konsequenterweise waren die pharmakologischen Eigenschaften von β_1 - und β_2 -AR in den letzten Jahrzehnten Gegenstand vieler Untersuchungen, und in

Bindungsstudien und funktionellen Untersuchungen wurden eine große Zahl an klinisch wertvollen Agonisten und Antagonisten charakterisiert. Jedoch sind diese Daten über eine Vielzahl von Arbeiten verstreut und durch nicht miteinander vergleichbare Methoden an unterschiedlichen, häufig nicht-menschlichen Geweben erhoben worden [45]. Wie später noch detaillierter ausgeführt wird, finden sich vor allem beim β_3 -AR zum Teil erhebliche Speziesunterschiede in den Bindungs- und Aktivitätskonstanten der Rezeptoren. Somit ist eine Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf den Menschen in jedem Fall kritisch zu bewerten. Nach der Klonierung der menschlichen β -adrenergen Rezeptorsubtypen wurde eine stabile Expression in eukaryonten Zellsystemen möglich [46], und damit in-vitro-Untersuchungen des menschlichen Rezeptorproteins. Jedoch beschränkten sich detaillierte Studien in diesen Zellsystemen immer auf die Charakterisierung eines bestimmten Rezeptorsubtyps [47-50]. Eine breit angelegte vergleichende Untersuchung zu Bindungsverhalten, Subtypselektivität und funktionellem Verhalten von β -AR-Agonisten und -Antagonisten an den menschlichen Rezeptoren wurde noch nicht vorgelegt, obwohl sehr viele dieser Substanzen schon seit Jahrzehnten im klinischen Gebrauch sind. Sicherlich gilt es zu bedenken, dass in rekombinanten Zellsystemen Faktoren wie beispielsweise Rezeptordichte, eine eventuelle Konkurrenz um G-Proteine oder auch das Fehlen anderer Rezeptorsysteme in der Zelle eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den menschlichen Organismus erschweren. Dennoch bleibt die Wichtigkeit dieser im Unterschied zu klinischen Studien labortechnisch erhobenen Daten in Bezug auf die Abschätzung von möglichen Vorteilen oder auch Gefahren von einzelnen Substanzen unbestritten. Hierzu zwei Beispiele mit Substanzen, die nicht zu unserer Testreihe gehörten: Im Jahr 1990 wurde eine Studie mit dem Betablocker Xamoterol vorzeitig abgebrochen, nachdem bei Patienten mit NYHA Klasse III und IV eine deutliche Mortalitätserhöhung zu verzeichnen war [51]. Die intrinsische sympathomimetische Aktivität der Substanz, die von verschiedenen Autoren in experimentellen Arbeiten ([52], [53], [54]) zu einem Zeitpunkt nach dem Erscheinen der o.g. Studie beschrieben wurde, wirkte sich bei den höhergradig herzinsuffizienten Patienten durch langfristige β_1 -Stimulation lebenslimitierend aus. Ganz ähnlich zeigte sich für Bucindolol, 2001 im Rahmen des Betablocker Evaluation of Survival Trial (BEST)

[55] klinisch getestet, bei hochgradiger Herzinsuffizienz (NHYA IV) kein Vorteil für die behandelten Patienten; es fand sich sogar ein Trend zur Mortalitätserhöhung im Vergleich zur Placebogruppe [56], so dass die Produktion der Substanz gestoppt wurde. Nach längerem wissenschaftlichen Diskurs scheint nun nachgewiesen, dass es sich bei der Substanz um einen β -adrenergen Partialagonisten handelt, was die klinischen Resultate erklären kann [57].

1.3 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die hier vorgelegte Arbeit verfolgt das Ziel, detaillierte pharmakologische Charakteristika von klinisch und experimentell häufig genutzten Substanzen an allen drei menschlichen β -Rezeptorsubtypen zusammenzustellen.

Durch die Veröffentlichung der Daten wird dem Wissenschaftler eine Referenz an die Hand gegeben, die vergleichbare Informationen über wichtige β -AR Liganden unter standardisierten Bedingungen in einem identischen zellulären Hintergrund liefert.

Für den Kliniker kann, ähnlich wie in den angeführten Beispielen, durch die erhobenen Daten die Interpretation der Ergebnisse klinischer Studien erleichtert oder gar erst ermöglicht werden, wie später z.B. für Formoterol und Salmeterol dargestellt. Teilweise müssen auch die Ergebnisse früherer Studien neu bewertet werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

(-)-Adrenalin, (-)-Noradrenalin, CGP-20712 ((±)-2-hydroxy-5-[2-[[2-hydroxy-3-[4-[1-methyl-4-(trifluoromethyl)-1H-imidazol-2-yl]phenoxy]propyl]amino]ethoxy]-benzamid), (-)-Isoprenalin, Metoprolol, Propranolol, und Terbutalin wurden von Sigma Chemical Co. bezogen. Atenolol, Bisoprolol, BRL-37344 ((R*,R*)-(±)-4-[2-[(2-(3-chlorophenyl)-2-hydroxyethyl)amino]propyl]phenoxyessigsäure), CGP-12177(4-[3-[(1,1-dimethylethyl)amino]2-hydroxypropoxy]-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-on)), SR 59230A (1-(2-ethylphenoxy)-3-[[[(1S)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl]amino]-(2S)-2-propanol]), Pindolol, Formoterol und Salbutamol stammen von der Firma Tocris. Folgende Substanzen waren jeweils von: Carvedilol, Böhringer; Fenoterol, ICN; Alprenolol, Astra-Zeneca; ICI-118551 ((±)-1-[2,3-(dihydro-7-methyl-1H-inden-4-yl)oxy]-3-[(1-methylethyl)amino]-2-butanol), RBI. Salmeterol wurde von Dr. H. Krohn (GlaxoSmithKline) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Broxaterol wurde freundlicherweise von Prof. M. De Amici (Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi di Milano, Italien) synthetisiert. (-)-3-¹²⁵I-Cyanopindolol (¹²⁵I-CYP) wurde von Amersham Biosciences geliefert (spezifische Aktivität, 2200 Ci/mmol). [α -³²P]ATP stammte von Perkin-Elmer LifeScience. Die Medien für die Zellkultur und fetales Kälberserum stammten von PanBiotech. Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), L-Glutamin and G-418 wurden bei Gibco-Life Technologies eingekauft. Die „Chinese Hamster Ovary“ Zellen (CHO-K1) stammten von American Type Culture Collection. Der pcDNA3-Vektor wurde von Invitrogen geliefert (Produktnr. V79020), ebenso wie die DH5 α TM-Zellen. Der pBluescript[®] II-(-)-Vektor stammte von Stratagene (Produktnr. 212208). Rinderserumalbumin stammte von Sigma Chemical Co. Dort wurden auch folgende Materialien geordert: ANTI-FLAG[®]M2 Monoclonaler Mausantikörper (Produktnr. F3165), Anti-Maus IgG Peroxidase Ziegenantikörper (Produktnr. A3682), SIGMAFASTTMOPD - (o-Phenylendiamin-dihydrochlorid) Tabletten (Produktnr. P9187), DOWEX-1 Cl—form; 1*2-200, Alumina-Säulen (WN-6), cAMP (A-6885), GTP (G-8752), ATP (A-2383), Chloroquin (C-6628), IBMX (I-5879) und DEAE-Dextran (D-9885). Wir

verwendeten weiterhin Chromatographie-Säulen von Bio-Rad Laboratories (Cat.Nr. 731-1550) und einen Dephosphorylierungskit (Cat.No. 1758250) und den Rapid DNA Ligation Kit (Cat.No.1635379) von Roche Diagnostics. Wenn nicht anders angegeben, wurde eine Beckman Avanti J-25 Zentrifuge verwendet, als Ultrazentrifuge diente das Beckman-Modell LE 70, als Tischzentrifuge das Modell 5417 von Eppendorf. Für alle Versuche wurde vollentsalztes Wasser benutzt (weiter als H₂O bezeichnet). Wir benutzen weiterhin den QIAquick Gel Extraction Kit[®] (Cat.No 28704) und die Qiagen Plasmid Midi[®]- und Maxi[®]- Kits (Cat.No. 12143, 12163) und den Qiaprep Spin Miniprep Kit[®] (Cat.No 27104). Alle anderen Materialien stammten aus den bei Klotz et al. (1998) bereits beschriebenen Quellen [58].

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Herstellung von kompetenten E.coli

DH5 α -Bakterienzellen wurden in 250 ml LB-Medium bei Raumtemperatur bis zu einer OD_{600nm} von 0.3 bis 0.6 kultiviert. Die Bakterienlösung wurde bei 5,000 rpm in einem Beckman JA-14-Rotor abzentrifugiert, das entstehende Pellet auf Eis in 25 ml eiskalten TSB-Puffer aufgenommen. Es wurden Aliquots von 100 μ l in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C für Transformationsansätze gelagert. Die Transformationseffizienz wurde mittels eines (leeren) Kontrollvektors nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{CFU}{\mu g} = \frac{CFU_{aufKontrollplatte}}{ng_{pcDNA3}} \times \frac{10^3 ng}{\mu g} \times \text{Verdünnungsfaktor beim Ausplattieren}$$

2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

100 μ l kompetente Bakterien vom Typ DH5 α wurden auf Eis aufgetaut und 4 μ l des Ligationsansatzes (150-200 ng DNA) zugegeben, und die Zellsuspension anschließend durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten auf Eis wurden die Zellen einer Hitzeschock-Prozedur (45 sec bei 42°C) unterzogen, um so die Aufnahme des ligierten Plasmids zu erleichtern. Anschließend wurde wiederum zwei Minuten auf Eis inkubiert und 900 μ l LB-Medium zugesetzt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C im Schüttler, die den transformierten Bakterien die Möglichkeit zur Ausbildung der mit dem Plasmid übertragenen Antibiotikaresistenz

gibt (im Falle des pcDNA3-Vektors eine Ampicillinresistenz durch β -Lactamase), wurde die Bakteriensuspension kurz zentrifugiert, das entstehende Pellet in 100 μ l Medium resuspendiert, und je eine ampicillinhaltige (Ampicillinkonzentration 100 μ g/ml) Agarplatte mit 1, 10 und 89 μ l ausplattiert. Zum Koloniewachstum wurden die Agarplatten über Nacht in einen Bakterienbrutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ (dies ist die Standardkonzentration, Abweichungen werden entsprechend angegeben) inkubiert.

2.2.3 Kultur von transformierten E.coli

Durch Ausplattieren auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten und Inkubation über Nacht bei 37°C erhielten wir isolierte Kolonien. Mit diesen Einzelzellkulturen wurden Vorkulturen in je 2 ml ampicillinhaltigem LB-Medium angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 37°C auf einem Rotationsschüttler mit 180-200 rpm inkubiert. Ein Teil der Vorkultur (Inokulation 1:100) wird zum Animpfen von Hauptkulturen (500 ml in Erlenmeyerkolben) verwendet, welche ebenfalls über Nacht bei 37°C geschüttelt wurden.

2.2.4 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Methode basiert auf der alkalischen Lyse der Zellen mit anschließender chromatographischer Reinigung über eine Anionenaustauschersäule bzw. Isopropanol-Fällung der DNA. Zur Gewinnung von kleineren Mengen DNA („Mini-Prep“) wurden 2 ml der zu präparierenden Bakterienvorkultur zentrifugiert (1 min, 14,000 rpm in einer Tischzentrifuge bei RT), der Überstand verworfen, und das Pellet in 250 μ l P1-Puffer resuspendiert. Zur alkalischen Lyse der Zellen wurden 250 μ l NaOH-haltiger P2-Puffer zugegeben und vorsichtig gemischt. Zur Neutralisation werden danach 300 μ l P3-Puffer zugesetzt, wieder vorsichtig gemischt und 10 Minuten bei 14,000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß übertragen, zur Fällung der DNA mit Isopropanol versetzt, bei -80°C für 10 Minuten inkubiert und anschließend bei 4°C und 14,000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde jeweils mit 70% und 95% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 μ l H₂O gelöst. Um größere Mengen DNA („Maxi-Prep“) zu gewinnen, wurde jeweils am Vortag eine Hauptkultur inokuliert, über Nacht inkubiert (37°C, 225 rpm) und schließlich bei 6,000 xg, 4°C für 15

Minuten zentrifugiert. Zunächst wurde mit dem Bakterienpellet analog zur obigen Beschreibung verfahren (Resuspension in 10 ml P1, Zugabe von 10 ml P2, mischen, 5 min Inkubation bei Raumtemperatur, Zugabe von 10 ml P3, mischen). Danach wurde 20 min auf Eis inkubiert und zur Abtrennung der Plasmid-DNA 30 min bei 20,000 xg, 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dieser wurde noch einmal 15 min bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand aus diesem Zentrifugationsschritt dann auf Anionenaustauschersäulen, die vorher mit QBT-Puffer equilibriert wurden, gegeben. Die Säulen wurden zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen, danach die DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Es schloss sich eine Isopropanol-Fällung der DNA (10.5 ml Isopropanol) bei Raumtemperatur an, durch Zentrifugation für 30 min (4°C, 15,000 xg) erhält man ein Pellet, das nach Waschen mit 70 % und 100 % Ethanol getrocknet und in ca. 1 ml H₂O aufgenommen wird.

2.2.5 Agarosegelelektrophorese, Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

PCR-Produkte bzw. restriktionsenzymverdaute DNA wurden in einem 1%igen Agarosegel (1 g Agarose auf 100 ml TAE-Puffer) mittels Elektrophorese in einer Gelkammer aufgetrennt (ca. 45 min bei 100 mV Potentialdifferenz). Das Agarosegel enthielt 0.04 % Ethidiumbromid (20 µl/100 ml), das sich durch Interkalation in die DNA einlagert. Durch UV-Strahlung kann Ethidiumbromid und damit die DNA sichtbar gemacht werden. Die Größe der DNA-Fragmente wurde anhand des Vergleichs mit DNA-Größenstandards (1kp DNA-Leiter, New England Biolabs: 0.5 µg pro Geltasche) bewertet und die entsprechenden DNA-Banden auf einer UV-Lichtquelle aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiagen Gel Extraction Kit[®] nach dem entsprechenden Protokoll aufgereinigt.

2.2.6 Mengenbestimmung von DNA

Durch photometrische Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm kann die DNA-Konzentration der Proben bestimmt werden. Dazu wurde die zu bestimmende DNA in einer Verdünnung von z.B. 1:200 in einem Photometer gegen H₂O gemessen. Da eine Einheit der Optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260nm}) bei Doppelstrang-DNA 50ng/µl entspricht, ergibt sich die DNA-Konzentration in µg/µl

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

Bei einer zweiten Wellenlänge von 280 nm misst man die Proteinkontamination. Der Reinheitsgrad der DNA wird durch Bestimmung des Quotienten OD_{260nm}/OD_{280nm} kontrolliert, er lag für unsere Messungen immer > 1.8 .

2.2.7 Restriktionsverdau von DNA

Im Reaktionsansatz (20 μ l) wurden ca. 1 μ g DNA, 10-20 U des entsprechenden Restriktionsenzym, 2 μ l eines geeigneten Puffers, und, wenn vom Enzym benötigt, 2 μ l gereinigtes Rinderserumalbumin gemischt und mit vollentsalztem Wasser auf ein Endvolumen von 20 μ l gebracht. Idealerweise findet der Restriktionsverdau unter den für die eingesetzten Enzyme optimalen Bedingungen statt. Wenn ein Verdau mit zwei unterschiedlichen Enzymen erforderlich war, wurden gegebenenfalls die Bedingungen (Ionenkonzentrationen der Pufferlösungen, Temperatur, Anwesenheit von BSA) so verändert, dass beide Enzyme arbeiten können, wenn auch nicht mit maximaler Umsatzrate. Durch Erhöhung der Enzymkonzentration im Ansatz oder Verlängerung der Inkubationszeit kann in diesen Fällen trotzdem ein vollständiger Verdau der DNA erreicht werden.

2.2.8 Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten

Vor der eigentlichen Ligation wurden die Enden des Vektors dephosphoryliert, um Religationen des Vektors unwahrscheinlicher zu machen und so den Einbau des einzusetzenden DNA-Stücks zu erleichtern. Der mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaute Vektor wurde gereinigt und 1 pmol der DNA in einem Endvolumen von 9 μ l mit 0.9 μ l des 10x Dephosphorylierungspuffers und einer Einheit Shrimp Alkalischer Phosphatase für 10 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgt eine vollständige Inaktivierung des Enzyms durch Inkubation bei 65°C für 15 min.

Die Ligationsreaktion findet in einem Endvolumen von 21 μ l statt. Verschiedene molare Verhältnisse von Vektor und zu insertierender DNA (1:1; 1:3; 1:10) wurden verwendet und die DNA in 10 μ l Verdünnungspuffer aufgenommen. Die Gesamtmenge der zu ligierenden DNA lag bei 200 ng. Nach Zugabe von 10 μ l T4 DNA Ligationspuffer und gründlichem Mischen wurde 1 μ l (5 Units) T4 DNA Ligase zugefügt, erneut gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Menge der Religationen des Vektors abschätzen zu können, wurde ebenfalls eine

Kontrollreaktion des Vektors ohne einzufügende DNA durchgeführt. Nach der Ligationsreaktion schloss sich die Transformation von kompetenten Bakterien an.

2.2.9 Polymerasekettenreaktion

Die PCR fand in einem Endvolumen von 100 μl statt, es wurden 2 μl (4 U) Vent®-Polymerase (New England Biolabs), 10 μl Polymerasepuffer, 2 μl Mg^{++} (2 mM), 5 μl DMSO und je 4 μl einer 10 mM Lösung der vier Desoxynukleotidtriphosphate zugegeben. Entsprechend ihrer Konzentration wurde 150 ng der template DNA (β_3 -DNA, Exon1) eingesetzt. 200 pmol der sense und antisense-Primer (hergestellt durch MWG-Biotech AG) wurden zugesetzt und das Restvolumen mit H_2O auf 100 μl aufgefüllt. Um einer Verdampfung vorzubeugen, wurde das Reaktionsgemisch mit einer dünnen Schicht Mineralöl bedeckt und kurz nach Zugabe der Polymerase auf Eis in den Thermocycler (Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480) gebracht.

Die Denaturierung erfolgte bei 95°C für eine Minute, als Annealing-Temperatur wählten wir 42°C, die für zwei Minuten gehalten wurde. In einer ebenfalls zweiminütigen Extensionsphase bei 72°C wurde die Zielsequenz vervielfacht. Die PCR wurde nach 30 Zyklen durch Abkühlen auf 4°C gestoppt.

2.2.10 cDNA der menschlichen β -AR

Die Korrektheit der verwendeten cDNAs in pcDNA3-Expressionsvektoren der drei β -AR Subtypen wurde durch Sequenzierung und Vergleich mit dem entsprechenden GenBank-Eintrag sichergestellt. Die Aminosäuresequenzen entsprechen den veröffentlichten Sequenzen für den β_1 -AR (GenBank Eintrag J03019 [7]), den β_2 -AR (GenBank Eintrag Y00106 [59]) und den β_3 -AR (GenBank Eintrag X72861 [8]). Die verwendeten β -adrenergen Rezeptoren entsprechen der ursprünglich als Wildtyp bezeichneten Sequenz und wurden in folgenden Varianten verwendet: β_1 -Rezeptor 49-Ser, 389-Gly; β_2 -Rezeptor 16-Arg, 27-Gln, 164-Thr; β_3 -Rezeptor 64-Trp und sind somit eindeutig von anderen beschriebenen Polymorphismen abgrenzbar.

Genomische DNA des menschlichen β_1 - sowie β_2 -AR in einem pcDNA3-Vektor war bereits vorhanden. Das 1560 bp lange Fragment, das für den β_1 -AR codiert, war mittels der Restriktionsenzymstellen Hind III / Xba I in den pcDNA3-Vektor eingefügt worden. Das 1919 bp lange Exon des β_2 -AR war mittels Hind III / Xho I in den Expressionsvektor eingefügt worden.

Zur Herstellung eines β_3 -AR-Expressionsvektors wurde durch PCR der in einem PRC / CMV-Vektor vorhandene aminoterminal Teil des β_3 -Rezeptors mit 1,204 bp Länge, der dem ersten Exon des menschlichen β_3 -Rezeptors entspricht, amplifiziert. Im Gegensatz zu den anderen beiden β -AR besteht das Gen für den β_3 -AR aus zwei Exons. Das zweite Exon (0.7 kb) codiert sechs carboxyterminale Aminosäuren und enthält auch die gesamte mRNA der 3`-untranslatierten Region. Obwohl bis jetzt keine funktionellen Unterschiede zwischen den Rezeptoren, die die sechs zusätzlichen AS aus dem zweiten Exon enthalten und Rezeptoren ohne diese Aminosäuren, beschrieben wurden [60-62], entschieden wir uns, einen dem natürlich vorkommenden Rezeptor identische Aminosäuresequenz in unseren rekombinanten Rezeptoren zu generieren. Dazu wurde mit Hilfe geeigneter Primer die im zweiten Exon des menschlichen Gens codierten sechs carboxyterminalen Aminosäuren C-terminal hinzugefügt und Schnittstellen für Restriktionsenzyme geschaffen. Ebenso konnte mit dieser Technik eine Version der β_3 -AR DNA hergestellt werden, die die FLAG-Sequenz (das Oktapeptid DYKDDDDK [63]) aminoterminal enthält. Es waren zwei aufeinander folgende verlängernde PCR-Reaktionen notwendig, da die einzufügenden Sequenzen relativ lang waren. Zwischen den PCR-Reaktionen erfolgte jeweils die Reinigung des PCR-Produktes aus dem Agarosegel wie oben beschrieben. Im Einzelnen lauteten die Nukleotidsequenz der Primer wie folgt:

Erster N-terminaler Primer ohne FLAG-Epitop:

5` GCG TAT AGC GAG CTC CCC AAG CTT GGG ATG GCT CCG TGG CCT CAC 3`

Erster N-terminaler Primer mit FLAG-Epitop:

5` TAC AAG GAC GAT GAC GAT AAG GCT CCG TGG CCT CAC GAG AAC 3`

Zweiter N-terminaler Primer mit FLAG-Epitop (für die Version ohne FLAG-Epitop wurde der erste Primer nochmals benutzt, da keine weitere Verlängerung notwendig war):

5` GCG ATC GAG CTC CCC AAG CTT GGG ATG GAT TAC AAG GAC GAT GAC 3`

Bei den C-terminalen Primern war eine Unterscheidung zwischen FLAG-markierter und –unmarkierter Version unnötig.

Erster C-terminaler Primer:

5` TAA GAA ACT CCC CAA GAA GCC CCG TCG AGC CGT TGG CAA AGC 3`

Zweiter C-terminaler Primer:

5` CGC TAG GGG TAC CCG CTC TAG AGC CTA AGA AAC TCC CCA AGA AGC 3`

Das Fragment wurde dann über HindIII / XbaI- Schnittstellen in den Expressionsvektor pcDNA3 kloniert, und die beiden entstandenen Konstrukte wurden durch Dideoxy-Sequenzierung verifiziert.

Die Nukleotidabfolge der vier verwendeten Sequenzierungsprimer war:

5` CGT GTT CGT GAC TTC GCT GGC 3`

5` GCC CTA CGT GCT GCT GTC CTC C 3`

5` GCC AAT TCT GCC TTC AAC CCG 3`

5` GCT CGC AGC CAG TGG CGC CC 3`

2.3 Zellkultur

2.3.1 Erzeugung von stabilen CHO-Zelllinien – Stabile Transfektion

Chinese Hamster Ovary Zellen (CHO-K1 Zellen American Type Culture Collection, Rockville, Md., USA) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium und der Nährstofflösung F-12 (DMEM-F12), das mit Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml), L-Glutamin (2 mM) und 10 Vol. % sterilem fetalem Kälberserum versetzt wurde, bei 5 % CO₂ und 37°C kultiviert. Die CHO-Zellen wurden mit den pcDNA3-β₃ bzw.-β₁-Konstrukten mittels DNA-Ca₃(PO₄)₂-Präzipitation mit einer Modifikation der 1987 von Chen und Okayama [64] beschriebenen N₁-N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure (BBS) – Methode stabil transfiziert. Dazu wurden die Zellen einer Kulturplatte (Ø 8.5 cm) im Verhältnis 1:5 gesplittet. Der Transfektionsansatz besteht aus 20 µg der entsprechenden Plasmid-DNA, 450 µl H₂O, 50 µl 2.5 M CaCl₂ und 500 µl 2fach BBS, und wurde nach kräftigem Schütteln 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Zellen adhärent geworden sind (nach ca. vier Stunden), wurde der Ansatz zum Kulturmedium getropft. Die Zellen wurden über Nacht bei 2 % CO₂ bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte ein Wechsel des Mediums und die Zellen wurden bei 5 % CO₂, 37°C über Nacht inkubiert. Am darauf folgenden Tag begann die Selektion durch Zugabe von Geneticin (G-418) zum Medium in einer Konzentration von zunächst 3 mg/ml, die

im Lauf von zehn Tagen auf die Standardkonzentration von 0.2 mg/ml reduziert wurde. Die Zellen wurden weiterhin bei dieser Konzentration von Geneticin gehalten, um einen Selektionsdruck aufrechtzuerhalten. Jeweils zehn Zellklone mit β_1 -AR (Wildtyp), β_3 -AR (Wildtyp) und β_3 -AR (mit eingefügtem FLAG-Tag) wurden isoliert und vermehrt. Membranpräparationen der jeweiligen Klone wurden durch ^{125}I -CYP-Bindungsversuche auf Rezeptorexpression hin untersucht. Hierbei wurde eine Einzelpunktmessung mit ca. 60 pM ^{125}I -CYP durchgeführt und die spezifische Bindung (siehe unten) im Vergleich zum Hintergrund in untransfizierten CHO-Zellen gemessen. Stabil β_2 -AR exprimierende CHO-Zellen, die aus früheren Versuchen stammten, wurden ebenfalls in Kultur genommen.

2.3.2 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion wurde mittels DEAE (Diethylaminoethyl)-Dextran [65] durchgeführt. Die betreffenden Zellen wurden am Tag vor der Durchführung der Transfektion gesplittet, so dass das Protokoll bei ca. 50-70% Konfluenz durchgeführt wurden. Die folgenden Angaben beziehen sich jeweils auf eine Kulturschale mit 10 cm Durchmesser. In Reaktionsgefäße (Volumen 2 ml) wurden 8-10 μg der zu transfizierenden DNA (in 80 μl TBS-Puffer) gegeben, dazu wurden 160 μl DEAE-Dextran (Konzentration 10mg/ml in sterilem H_2O) pipettiert. Das Kulturmedium wurde von den entsprechenden Kulturschalen abgesaugt und jeweils 4ml frisches Medium zugegeben. Das oben beschriebene Transfektionsgemisch wurde dann unter leichtem Schwenken auf der Schale verteilt. Danach wurden 40 μl Chloroquin (Konzentration 10mM in sterilem phosphate buffered saline, PBS) zugegeben. Nach einer Inkubation von drei Stunden bei 37°C und 5% CO_2 wurde das Medium abgesaugt und 3 ml 10% DMSO (z.B. 5 ml DMSO in 45 ml PBS) zugegeben und für 60 sec bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde mit 5ml PBS gewaschen, schließlich wurden 10 ml Kompletmedium zugegeben und über Nacht bei 37°C bei 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag konnte mit den transient transfizierten Zellen gearbeitet werden.

2.3.3 Membranpräparation für Bindungsstudien

Nach zweimaligem Waschen der Zellkulturplatten mit eiskaltem PBS wurden die zu ca. 90% konfluenten Zellen mit Hilfe eines Gummischabers aus den Kulturschalen

entfernt und in eine Pufferlösung (5 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 7.4) überführt. Die gesamte Präparation fand auf Eis statt, um mögliche Schäden an den Membranproteinen zu minimieren. Die Zellen wurden durch Ultra-Turrax-Behandlung (30 Sekunden bei höchster Geschwindigkeit im UltraTurrax T25 von Janke & Kunkel) homogenisiert. In einem ersten Zentrifugationsschritt bei 3,000 xg, 10 min (Beckman JA 17 Rotor, 3,200 rpm) wurden noch intakte Zellen und Zellkerne entfernt. Nach der Ultrazentrifugation des Überstandes bei 30,000 xg, 40 min (Beckman Ti70 Rotor, 37,000 rpm) wurde das entstandene Pelett in ein entsprechendes Volumen 50 mM Tris-Puffer (pH 7.4) aufgenommen und in einem Glas-Teflonpotter homogenisiert. Die Membranen wurden nach der Präparation für die Bindungsstudien aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.4 Membranpräparation für Adenylylcyclase-Versuche

In vergleichbarer Weise wurde die Zellpräparation für die Adenylylcyclase-Versuche durchgeführt. Allerdings erfolgte die Homogenisation nur für 2 x 5 sec auf Eis. Die Zentrifugation beschränkt sich zur Gewinnung dieser „crude membranes“ auf einen Ultrazentrifugationsschritt bei 27,000 rpm für 20 min bei 4°C. Das entstehende Pellet wird in 50mM Tris-Puffer (pH 7.4) aufgenommen und mit einem Glaspotter homogenisiert.

2.3.5 Quantifizierung von Proteinen

Die Proteinkonzentrationsmessung erfolgte photometrisch nach Bradford [66]. Die Methode beruht darauf, dass sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G-250 in saurer Lösung bei Proteinbindung von 465 nach 595 nm verschiebt. In einer 1 ml - Einmalküvette wurden 200 µl Bradford-Reagenz, 745 µl Wasser, 50 µl 0.2 N NaOH (zur vollständigen Denaturierung der Proteine) und 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung kombiniert. Gleichzeitig wurde eine Eichreihe mit Rinderserumalbumin pipettiert, und nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die OD_{595nm} der Proben gemessen. Mit Hilfe der Eichreihe und des bekannten Verdünnungsfaktors ließ sich so die Proteinkonzentration der Probe feststellen.

2.4 Biochemische Assays

2.4.1 ELISA

Um die Expression des FLAG-markierten Rezeptors zu überprüfen, wurden COS7-Zellen transient mit der pcDNA3- β_3 -FLAG-Tag DNA transfiziert und mittels eines Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay untersucht.

Nach 24stündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurde mit PBS gewaschen, die Zellen abtrypsiniert und nach Abzentrifugation in Kulturmedium resuspendiert. In einer 96-well Platte wurden jeweils 15,000 Zellen/well ausgesät, die mit FLAG-markiertem oder Wildtyp-Rezeptor transfiziert waren, zusätzlich wurden mit „leerem“ pcDNA₃-Vektor transfizierte Zellen ausgesät. Die Zellen wurden 24-36 Stunden unter den genannten Bedingungen inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen (180 μ l/well) und mit 4 % Formaldehyd in PBS (50 μ l/well) für 15 min fixiert. Um unspezifische Bindung zu minimieren, erfolgte nach dreimaligem Waschen mit PBS eine einstündige Inkubation bei 37°C mit Kulturmedium, das mit 10 % fetalem Kälberserum versetzt war. Daraufhin wurden 50 μ l einer Lösung mit primärem Antikörper (ANTI-FLAG[®]M2 Monoklonaler Maus Antikörper, verdünnt 1:1,000) zugegeben und die Platten für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine zweistündige Inkubation mit 50 μ l einer Lösung des sekundären Antikörpers (Anti-Maus IgG Peroxidase Ziegenantikörper, verdünnt 1:2,000) bei 4°C, danach wurde wieder dreimal gewaschen und 200 μ l einer Entwicklungslösung (eine SIGMAFAST[™]OPD o-Phenylenediamine dihydrochloride Tablette in 25 ml 0.1M Zitrat/Phosphatpuffer mit pH 5.0, versetzt mit 20 μ l 30% H₂O₂) zugegeben. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l 2 M H₂SO₄ / 0.05 M Na₂SO₃-Lösung gestoppt und die Extinktion bei 492 nm in einem UV-Spektrometer gemessen. Die Auswertung dieser Versuche erfolgte mit der Software Excel[®].

2.4.2 Radioligandenbindung

Der Bindungsversuch wurde auf Eis pipettiert, als Versuchspuffer diente Tris/HCl 50 mM, pH 7.4. Zunächst wurde die Dissoziationskonstante K_D von ¹²⁵I-CYP an den

drei β -AR Subtypen in Sättigungsexperimenten gemäß dem nachfolgenden Pipettierschema bestimmt:

50 μ l 125 I-CYP in Tris/HCl-Puffer pH 7.4 (von ca. 0.5 -1,500 pM)
50 μ l Tris/HCl-Puffer pH 7.4 oder Alprenolol, Endkonzentration 100 μ M oder zu testende Substanz, Endkonzentration 100 μ M
50 μ l GTP, Endkonzentration 100 μ M
50 μ l Zellmembranen, etwa 20 μ g Protein

Das Inkubationsvolumen betrug 200 μ l/well in 96-well Mikrotiterplatten. Je nach Höhe der Rezeptorexpression wurden unterschiedliche Konzentrationen der aufgereinigten Zellmembranen verwendet (Werte um 20 μ g/50 μ l), da z.B. bei zu hoher Rezeptorkonzentration im Ansatz eine Sättigungsmessung nicht möglich ist. Weiterhin wurde 50 μ l GTP 400 μ M eingesetzt. Die Endkonzentration von 100 μ M führt zu einer kompletten Entkopplung der β -Rezeptoren von G_s und ermöglicht in Verdrängungsexperimenten mit Agonisten die Messung von monophasischen Kurven. Die für Agonisten angegebenen K_i -Werte drücken somit die niedrig-affine Bindung aus und enthalten keine Anteile von evtl. vorhandenen höher affinen Stadien des an G-Proteine gekoppelten Rezeptors. Für die Messung von reinen Antagonisten ist GTP nicht erforderlich, wurde aber zur Standardisierung des Assays auch in diesem Fall verwendet. Nun wurden entweder 50 μ l Assaypuffer (zur Bestimmung der totalen Bindung) oder 50 μ l Alprenolol 400 μ M (ein unselektiver β -AR-Rezeptorantagonist, der in der gewählten Konzentration alle β -AR-Bindungsstellen besetzt) zur Bestimmung der unspezifischen Bindung eingesetzt. Schließlich wurden ansteigende Konzentrationen von 125 I-CYP (für β_1 ca. 0.5 pM bis ca. 500 pM, β_2 ca. 0.5 pM bis ca. 300 pM, β_3 ca. 10mM bis ca. 1,500 pM) in sieben Konzentrationen, jeweils auf 50 μ l verdünnt, zugesetzt.

Die Verdrängungsexperimente liefen unter den gleichen Bedingungen ab, hier wurde eine konstante Konzentration von 125 I-CYP (β_1 und β_2 : ca. 15 pM; β_3 : ca. 35 pM) und die zu testenden Substanzen in sieben bis neun Verdünnungsstufen eingesetzt. Wenn

kein Anhaltspunkt für den K_i in der Literatur zu finden war, wurde vor der genauen Bestimmung ein approximativer Wert in 1:10-Verdünnungsschritten bestimmt.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 90 Minuten. Nach Einstellen des Äquilibrium wurde der Reaktionsansatz durch eine Absaugvorrichtung der Firma Skatron (Semi-automated cell harvester Type 7019) auf einen Glasfaserfilter (Whatman GF/C) abgesaugt und dreimal mit kaltem Tris 50mM (pH 7.4) gewaschen. Die einzelnen Filterplättchen wurden in einem γ -Counter (Wallac 1480 wizard 3'') für 60 sec gezählt. Die Bestimmung der K_D -Werte aus Sättigungsexperimenten erfolgte mit der unter MS-DOS operierenden Software SCTFIT [67] durch nicht lineare Regressionsanalyse. Die IC_{50} -Werte der Verdrängungsbindungsexperimente wurden mit der Windows-basierten Software Origin 6.1® (OriginLab Corporation) ermittelt und nach Cheng und Prussoff [68] in K_i -Werte umgewandelt. Bei den Sättigungsexperimenten wurden Dreifachwerte für jeden Messpunkt ermittelt, bei den Verdrängungsexperimenten Doppelwerte. Die angegebenen K_D bzw. K_i -Werte sind das geometrische Mittel aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten mit 95 % Konfidenzintervallen.

2.4.3 Reinigung von [α -³²P]ATP

Das gelieferte [α -³²P]ATP (ca. 4×10^6 cpm/ml) wurde durch Ionenaustauschchromatographie DOWEX-1 Cl—form; 1x2-200 aufgereinigt. Dazu wurden mit ca. 800 μ l gefüllte Säulen mit 5 ml H₂O gewaschen und anschließend die [α -³²P]ATP Lösung aufgetragen. Daraufhin wurde mit 2 x 5 ml einer 0.0316 N HCl-Lösung (pH 1.5) gespült. Im folgenden Schritt wurde das radioaktiv markierte ATP durch Zugabe von 3 x 1 ml 0.25 N HCl in drei Aliquots eluiert und jeweils 1 μ l 10 mM nicht radioaktives ATP hinzupipettiert. Nach dem Einstellen des pH-Wertes auf $pH \leq 7.0$ mit 50% Triethanolamin wurde das gereinigte [α -³²P]ATP in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

2.4.4 Stimulation der Adenylylcyclase

Die cAMP-Akkumulation wurde mit einer Modifikation der von Jakobs et al. [69] beschriebenen Methode bestimmt. Unmittelbar vor dem Assay wurden Zellmembranen nach dem oben beschriebenen Verfahren frisch präpariert. Der Inkubationsansatz (100 μ l) setzt sich aus 30 μ l in Tris-Puffer suspendiertes

Membranprotein (ca. 30-50 μg), 10 μl Testsubstanz und 50 μl REA-Mix zusammen. Dieser wurde hergestellt, indem zu 400 $\mu\text{l}/\text{ml}$ einer vorbereiteten Lösung (siehe Liste der verwendeten Puffer und Lösungen, REA-Mix 5x) 5.9 mg/ml Phosphokreatin und 0,8 mg/ml Kreatinkinase gegeben werden. Das restliche Volumen wurde nach Zugabe von gereinigtem [α - ^{32}P]ATP (ca. 4×10^6 cpm/ml, 0.2 mCi/Probe) mit Wasser aufgefüllt. Die Testsubstanzen wurden in fünf Verdünnungsstufen ($0.1 \times K_i$ bis $100 \times K_i$, jedoch maximale Konzentration von 1mM) eingesetzt. Nach gründlichem Mischen erfolgte eine 20minütige Inkubation bei 37°C . Zum Stoppen der Reaktion wurden die Proben auf Eis gestellt und jeweils 400 μl 125 mM ZnAc (frisch angesetzt) und 500 μl 144 mM Na_2CO_3 zu einer Probe gegeben und gründlich gemischt. In der anschließenden Inkubationszeit von 10 min bildete sich ein Zn_2CO_3 -Niederschlag, der durch einen Zentrifugationsschritt von 5 min bei 14,000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert wurde. 800 μl des Überstandes wurden auf Alumina-Säulen aufgetragen, die vorher mit 100 mM Tris pH 7.4 zweimal äquilibriert worden waren. Nach zwei Elutionsschritten mit jeweils 2 ml 100 mM Tris pH 7.4 wurde die Cerenkov-Strahlung der Proben ohne Szintillator in einem β -Counter (Beckman LS 1801) für 5 min gezählt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Origin 6.1[®].

2.5 *Verwendete Puffer und Lösungen*

LB-Medium (1,000 ml, autoklaviert)

1 % Trypton
0.5 % Hefeextrakt
1 % NaCl
pH eingestellt auf 7.4 mit 1 M NaOH

Ampicillinhaltiger LB-Agar (1,000 ml, nach Autoklavierung Zusatz von 100 mg/ml Ampicillin)

1 % Trypton
0.5 % Hefeextrakt
1.5 % Agar
1 % NaCl
pH eingestellt auf 7.4 mit 1M NaOH
Ampicillin-Endkonzentration 100 µg/ml

Agarosegel 1 %

100 ml TAE-Puffer auf 1 g Agarose und 20 µl EtBr

TBS-Puffer

25 mM Tris
137 mM NaCl
5 mM KCl
0.5 mM MgCl₂
0.7 mM CaCl₂
0.6 mM Na₂HPO₄
pH eingestellt auf 7.4 mit 1 M NaOH

TAE-Puffer 50x

Tris 242 g/l
Borsäure 57.1 g/l
37.2 g Na₂EDTA/l
pH eingestellt auf 8.5 mit 1 M NaOH

5/2 Puffer für Membranpräparation

2 mM EDTA
5 mM Tris/HCl
pH eingestellt auf 7.4 mit 1 M NaOH

Glycerol Stammlösung

10 mM Tris/HCl
10 mM MgCl
+ 50 % Glycerin

10x CMF-PBS für 1,000 ml

80 g NaCl

2 g KCl

21.68 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2 g KH_2PO_4

pH eingestellt auf 7.4 mit 1 M NaOH

BSA-Eichreihe, alkalisch

BSA-Stammlösung: 0.2 mg/ μl in 0,2 N NaOH

Eichreihe von 0, 2, 4, 6, 8, 10 jeweils auf 50 μl auffüllen

+ 750 μl H_2O

+ 200 μl Bradford-Reagenz

Probe:

5 μl Probe

45 μl NaOH

750 μl H_2O

200 μl Bradford-Reagenz

TSB-Puffer

LB-Medium

10 % (w/v) PEG 3,000

5 % (v/v) DMSO

20 mM MgSO_4

pH eingestellt auf 5.0 mit 1 M NaOH

REA-Mix (5x)

42.5 ml H_2O

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 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

2.5 ml 2.5 mM IBMX

Qiagen P1-Puffer:

100 mg/ml RNase A

50 mM Tris/HCl pH 8.0

10 mM EDTA

Qiagen QBT-Puffer:

50 mM MOPS pH 7.0

400 mM NaCl

0.15 % Triton X-100

Qiagen P2-Puffer:

0.2 M NaOH
1 % (w/v) EDTA

Qiagen QC-Puffer:

50 mM MOPS pH 7.0
750 mM NaCl
15 % Ethanol

Qiagen P3-Puffer:

3 M Kaliumacetat
pH eingestellt auf 5.5 mit 1 M NaOH

Qiagen QF-Puffer:

50 mM MOPS pH 7.0
1.25 M NaCl
15 % Ethanol

Dephosphorylierungspuffer 10x

0.5 M Tris/HCl
50 mM MgCl₂
pH eingestellt auf 8.5 mit 1 M NaOH

Für den Ligationspuffer 10x und Verdünnungspuffer 10x im Rapid Ligation Kit® macht Roche Diagnostics keine genauen Angaben zur Zusammensetzung.

3 Ergebnisse

3.1 Herkunft der verwendeten Konstrukte

3.1.1 β_1 - und β_2 -AR

cDNA des menschlichen β_1 - sowie β_2 -AR in einem pcDNA3-Vektor war bereits im Labor vorhanden. Die 1,560 bzw. 1,919 bp langen Fragmente, die für den β_1 - und β_2 -AR codieren, waren mittels Hind III / Xba I bzw. Hind III / Xho I in den pcDNA3-Vektor eingefügt worden [52],[70].

3.1.2 β_3 und β_3 -FLAG-AR

Die β_3 -cDNA wurde mittels PCR in einen Expressionsvektor (pcDNA3, CMV-Promotor) kloniert. Dabei konnte in einer zusätzlichen Version des Rezeptors das FLAG-Epitop (das Oktapeptid DYKDDDDK [63]) am aminoterminalen Ende des Rezeptors eingefügt werden (siehe Abbildung 2 auf der folgenden Seite). Die Bindungsversuche, die in der vorliegenden Arbeit dargestellt und diskutiert werden, sind am „Wildtyp- β_3 -Rezeptor“ durchgeführt worden, einer Version ohne FLAG-Epitop, dessen Aminosäuresequenz der von Emorine et. al veröffentlichten entspricht (GenBank Eintrag X72861 [8]), was durch Sequenzierung bestätigt wurde. Wie im Methodenteil erläutert, stellten wir eine Version der β_3 -AR DNA her, die die sechs carboxyterminalen AS, die vom zweiten Exon des menschlichen Gens codiert werden, enthält. Die Oberflächenexpression des mit dem FLAG-Epitop versehenen Rezeptors wurde mittels ELISA untersucht. An den entsprechenden Zellmembranen konnte β -adrenerge spezifische Bindung beim Screening der entstandenen stabilen Zelllinien nachgewiesen werden. Die beiden Versionen der β_3 -AR-DNA wurden anschließend via Sac I / Xba I in den Klonierungsvektor pBluescript®II (+) subkloniert und stehen nun für weitere Mutationsstudien zur Verfügung.

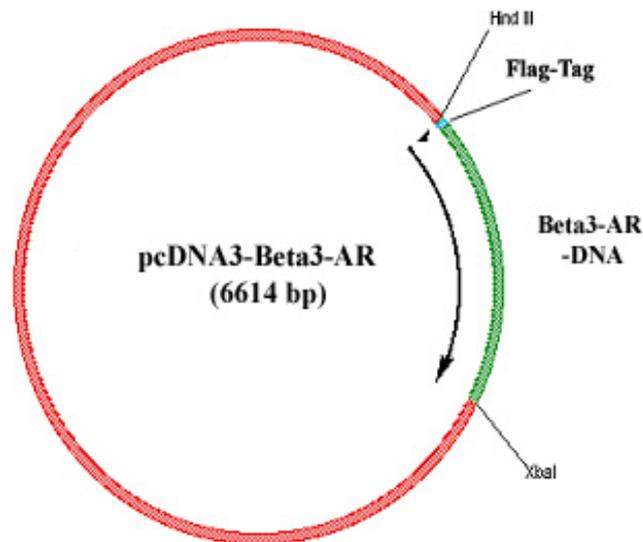


Abbildung 2 : Grafische Darstellung des rekombinanten Expressionsvektors. Die cDNA des β_3 -Rezeptors wurde über Hind III und Xba I –Restriktionsenzymststellen in den Vektor kloniert.

3.2 Pharmakologische Charakterisierung der Zelllinien

3.2.1 Charakterisierung der untransfizierten CHO-Zelllinien

Die für die stabile Transfektion benutzten CHO-Zellen exprimieren nur geringe Mengen an endogenen β -Rezeptoren: das Bindungssignal für ^{125}I -CYP auf untransfizierten Zellen unterschied sich kaum vom Signal für die unspezifische Bindung. Es ergaben sich Werte von < 15 fmol/mg Protein und damit nur etwa maximal 5% der Werte der transfizierten Zellen. Weiterhin konnte in untransfizierten Zellen keine Stimulation der Adenylylcyclase durch Isoprenalin nachgewiesen werden. Nach stabiler Transfektion mit den drei β -AR Subtypen konnten wir hohe spezifische Bindungswerte für ^{125}I -CYP und auch funktionelle Kopplung durch Rezeptor-vermittelte Stimulation der Adenylylcyclase nachweisen.

3.2.2 Untersuchungen an stabil mit FLAG-markiertem β_3 -AR transfizierten CHO-Zellen

An den stabil mit dem FLAG-Epitop markierten β_3 -AR exprimierenden Zellen führten wir keine Sättigungsbindungsexperimente durch, da diese Zelllinie für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet wurde. Allerdings

fürten wir zum Nachweis positiver Klone ein Screening durch, bei dem mit vergleichsweise geringen Mengen an eingesetztem ^{125}I -CYP (ca. 50 pM) spezifische Bindung an den Membranen nachgewiesen wurde. Diese Werte dürfen nicht mit den B_{max} -Werten nach vollständiger Charakterisierung der Zellen verwechselt werden, ein Schätzwert kann aber durch Extrapolation dieser Werte (bei einer Konzentration von 1,200 pM ^{125}I -CYP und einem K_D -Wert von 300pM) angegeben werden. Tabelle 2 stellt die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 2: Ergebnisse der Screening-Untersuchung an stabil mit FLAG-markiertem β_3 -AR transfizierten CHO-Zellen. Werte in fmol/mg Protein. Die Zellen weisen unterschiedlich hohe spezifische Bindung auf

Klon	Spezifische ^{125}I -CYP Bindung	B_{max} (extrapolierter Wert)
1	52.8	1,200
2	30.8	700
3	14.4	350

Um nachzuweisen, dass das FLAG-Epitop am aminoterminalen Teil des Rezeptors auf der Oberfläche der Zelle exprimiert und nachweisbar ist, führten wir einen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) durch. Als primären Antikörper verwendeten wir einen aus der Maus gewonnenen monoklonalen Antikörper gegen das FLAG-Epitop. Ein peroxidasegekoppelter Antikörper, der gegen Mausantikörper gerichtet war, diente zur Verstärkung und Sichtbarmachung des Signals. Aus Abbildung 3 wird das Ergebnis deutlich – es kommt zu einem ca. 75%igen Anstieg des Signals gegenüber Zellen, die mit dem unmarkierten Rezeptor transfiziert wurden. Diese zeigen dieselben Messwerte wie CHO-Zellen, die mit einem leeren Expressionsvektor als Negativkontrolle transfiziert wurden.

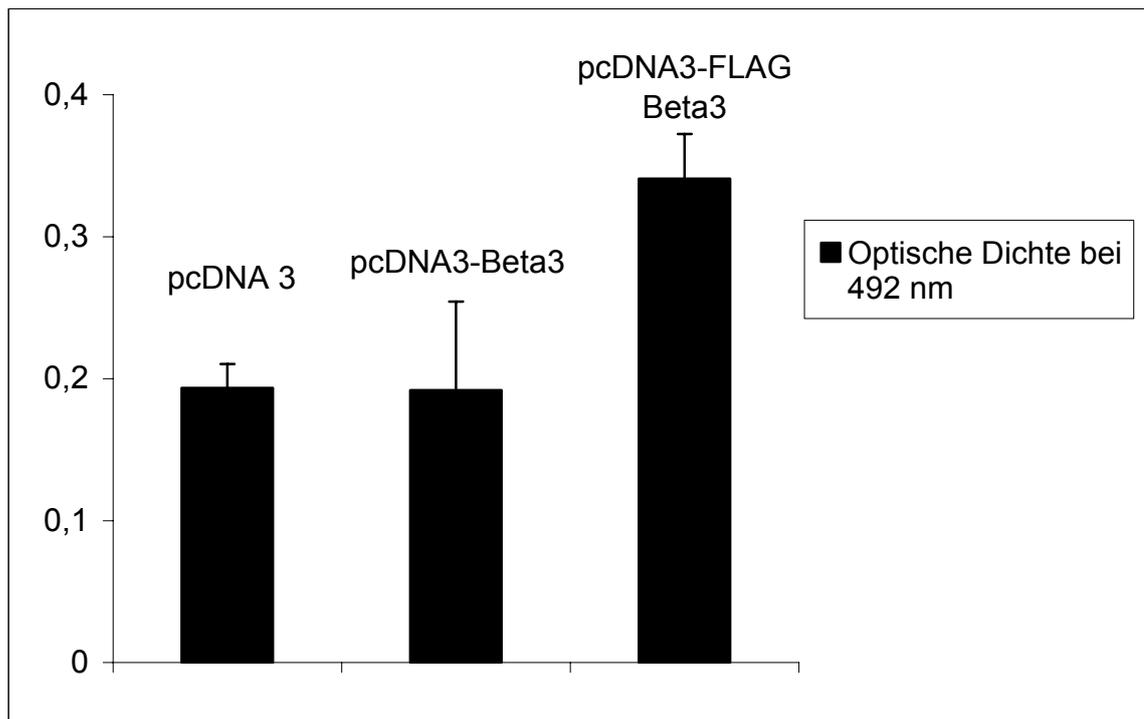


Abbildung 3: ELISA mit anti-FLAG-Antikörpern an transfizierten CHO-Zellen: mit leerem Expressionsvektor (pcDNA3, linke Säule, Extinktionswert 0.193), Expressionsvektor mit β 3-AR-DNA (mittlere Säule, Extinktionswert 0.192), und Expressionsvektor mit der FLAG-markierten Version des β 3-AR-DNA (rechte Säule, Extinktionswert 0.341). Primärer Antikörper M2-Anti-FLAG-AB, Sekundärer Antikörper HRP-Anti-mouse-AB. Messung der optischen Dichte bei 492 nm. Dargestellt ist das Ergebnis von drei Experimenten, jeweils mit Dreifachwerten. $p < 0.01$.

Das Ergebnis des ELISA zeigt, dass das FLAG-Epitop für die monoklonalen Antikörper zugänglich auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Durch Optimierung der Versuchsbedingungen ist es möglich, das Hintergrundsignal noch weiter abzusenken; für unseren Zweck, einen optischen Nachweis des rekombinanten Rezeptormoleküls an der Zelloberfläche zu führen, waren die Anforderungen an die Ergebnisse jedoch erfüllt. Bindungsversuche an den markierten Rezeptoren wiesen spezifische Bindung für β -adrenerge Liganden an den Zellmembranen nach, so dass man davon ausgehen kann, dass das Oktapeptid am aminoterminalen Teil des Rezeptors außerhalb der Zellmembran lokalisiert ist. Somit kann der mit dem FLAG-Epitop markierte Rezeptor für Versuche zum Trafficking oder zum Nachweis der

subzellulären Rezeptorlokalisierung z.B. in konfokalmikroskopischen Untersuchungen genutzt werden.

3.2.3 Charakterisierung der stabil mit β -Rezeptoren transfizierten Zelllinien in Sättigungsexperimenten

Zur Charakterisierung der stabil transfizierten Zelllinien wurden zunächst Sättigungsexperimente durchgeführt, um die auf den stabil transfizierten Klonen exprimierte Rezeptorzahl B_{\max} und die Affinität des Radioliganden ^{125}I -CYP zum jeweiligen Rezeptorsubtyp, ausgedrückt durch die Dissoziationskonstante K_D zu bestimmen. Wie im Methodenteil erläutert, wurden die Versuche mit ansteigenden Konzentrationen von ^{125}I -CYP durchgeführt. Die unspezifische Bindung des Radioliganden wurde in Gegenwart des unselektiven β -Antagonisten Alprenolol in hoher Konzentration zur Blockade der spezifischen Bindungsstellen gemessen. Aus den Messwerten für die totale und die unspezifische Bindung wurde mittels nichtlinearer Regression der Kurvenverlauf für die spezifische Bindung von ^{125}I -CYP an den jeweiligen Rezeptor errechnet und damit die B_{\max} - und K_D -Werte bestimmt. Für alle drei β -AR Subtypen konnten stabile Zelllinien mit vergleichbaren Expressionsniveaus von ca. 300 fmol/mg Protein erzeugt werden. Für jeden Rezeptorsubtyp wurden die angegebenen Werte in mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten bestimmt. Zusätzlich wurden für den β_1 - und β_2 -AR Zelllinien geschaffen, die sich um das ca. 30fache im Expressionslevel unterscheiden. Die Rezeptorexpression wurde routinemäßig kontrolliert und blieb über einen Zeitraum von 6-8 Wochen (ca. 15-25 Passagen in der Zellkultur) konstant.

In den folgenden Tabellen sind die K_D - und B_{\max} -Werte der drei Rezeptorsubtypen zusammengestellt. Für unterschiedliche Klone der β_1 -Rezeptoren wurden K_D -Werte zwischen 62 – 95 pM bestimmt.

Tabelle 3: Charakteristika der mit den β_1 -AR Subtypen stabil transfizierten CHO-Zellen. Jedes Sättigungsexperiment wurde mindestens dreimal wiederholt; jeder Messpunkt resultiert aus der Mittelung von Dreifachwerten.

Subtyp	Klon	K_D -Wert [pM]	95%-Konfidenzintervall [pM]	B_{\max} [fmol/mg Protein] \pm SD
β_1	1	61.9	41.8 – 90.7	$9,130 \pm 3,060$
	2	95.3	78.4 – 112.2	367 ± 75

Die K_D -Werte für β_2 -AR lagen zwischen 45 und 51 pM. Damit ist die Affinität von ^{125}I -CYP an β_1 - und β_2 -AR vergleichbar und erlaubt pharmakologische Untersuchungen mit relativ geringen Mengen an eingesetzter Radioaktivität.

Tabelle 4: Charakteristika der mit den β_2 -AR Subtypen stabil transfizierten CHO-Zellen. Jedes Sättigungsexperiment wurde mindestens dreimal wiederholt; jeder Messpunkt resultiert aus der Mittelung von Dreifachwerten.

Subtyp	Klon	K_D -Wert [pM]	95%-Konfidenzintervall [pM]	B_{\max} [fmol/mg Protein] \pm SD
β_2	1	47.9	43.2 – 53.2	40 ± 3
	2	44.6	42.1 – 47.1	282 ± 19
	3	50.7	49.0 – 52.4	$1,280 \pm 135$

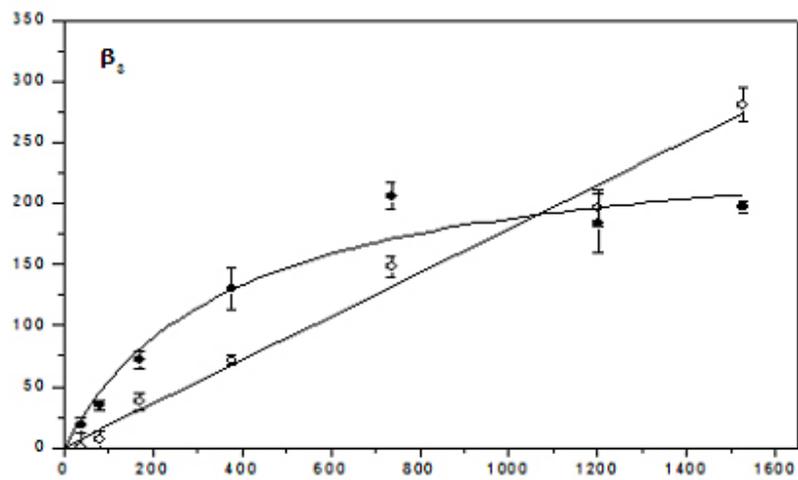
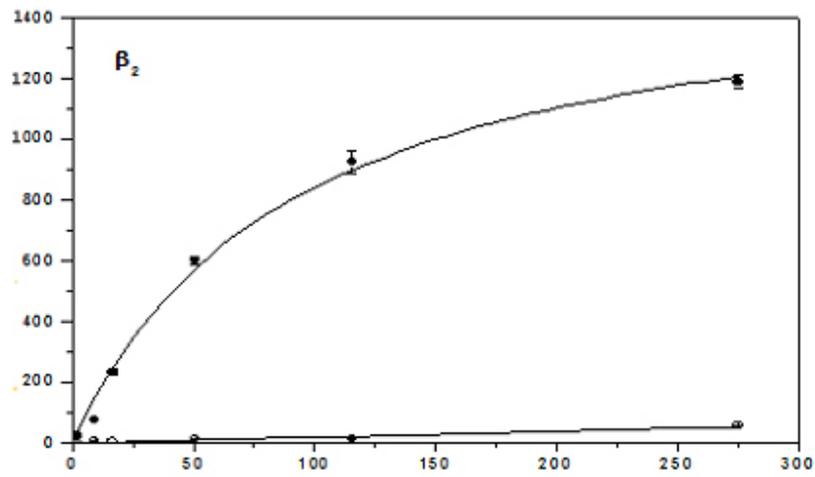
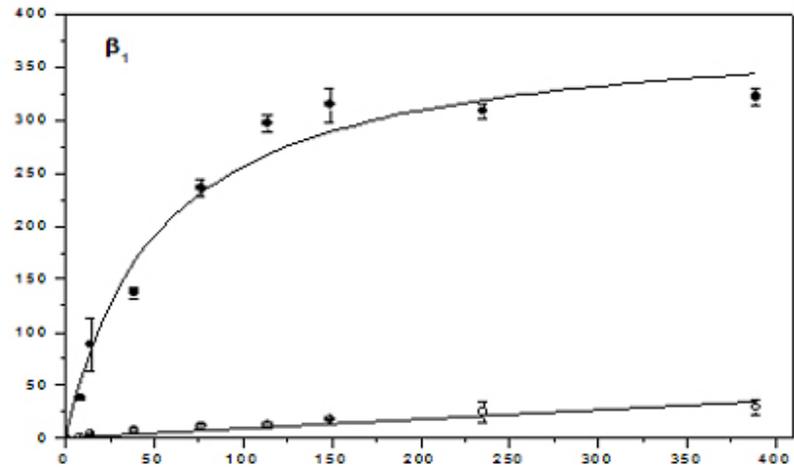
Am β_3 -Rezeptor fanden wir eine 3.5 – 6fach niedrigere Affinität als an den β_1 und β_2 Subtypen (K_D 210 – 360 pM) für ^{125}I -CYP.

Tabelle 5: Charakteristika der mit den β_3 -AR Subtypen stabil transfizierten CHO-Zellen. Jedes Sättigungsexperiment wurde mindestens dreimal wiederholt; jeder Messpunkt resultiert aus der Mittelung von Dreifachwerten.

Subtyp	Klon	K_D -Wert [pM]	95%-Konfidenzintervall [pM]	B_{\max} [fmol/mg Protein] \pm SD
β_3	1	209	126 – 346	341 ± 27
	2	360	321 – 399	377 ± 82

In der nachfolgenden Abbildung zeigt sich dieser Umstand im deutlichen Anstieg der unspezifischen Bindung beim β_3 -AR, da bei diesem Rezeptorsubtyp eine vergleichsweise große Menge Radioligand eingesetzt werden musste.

Bindung von ^{125}I -CYP [fmol/mg Protein]



Konzentration von ^{125}I -CYP [pM]

Abbildung 4: Sättigungsbindung an Zellmembranen von stabil transfizierten β -AR-Subtypen mit dem unselektiven β -AR-Antagonisten ^{125}I -CYP. In den Kurvenverläufen sind spezifische (\bullet) und unspezifische (\circ) Bindung abgebildet. Die Ergebnisse der dargestellten Einzelexperimente waren im Einzelnen: für den β_1 -AR ein K_D -Wert von 68 pM und ein B_{\max} -Wert von 380 fmol/mg Protein; für den β_2 -AR 59 pM und 1,350 fmol/mg Protein; für den β_3 -AR 310 pM und 250 fmol/mg Protein.

3.2.4 Vergleichende pharmakologische Charakterisierung der stabil transfizierten Zelllinien

Um das pharmakologische Profil der β -AR in stabil transfizierten CHO-Zellen genauer zu bestimmen, führten wir Verdrängungsexperimente durch. Neben den endogenen Agonisten Adrenalin und Noradrenalin wurde das Bindungsprofil für eine Reihe weiterer Agonisten und Antagonisten bestimmt. Dabei wurden sowohl experimentelle Substanzen wie z.B. CGP-20712 als auch im klinischen Alltag gebräuchliche Medikamente wie z.B. Salmeterol an den drei β -AR Subtypen untersucht. Die Ergebnisse der Verdrängungsexperimente sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Die endogenen Agonisten Adrenalin und Noradrenalin banden mit identischer Affinität an β_1 -AR. Am β_2 -AR dagegen band Adrenalin mit ca. 35fach höherer Affinität als Noradrenalin. Am β_3 -AR stellten wir dagegen eine sehr niedrige Bindungsaffinität des Rezeptors für Adrenalin fest. Noradrenalin ging eine Bindung mit ca. 30fach höherer Affinität als Adrenalin ein.

Bei den klinisch gebräuchlichen β -AR Agonisten zeigte nur Salmeterol und, in geringerem Ausmaß, Fenoterol eine Selektivität für den β_2 -AR. Salmeterol war im Vergleich der Affinität zwischen β_2 - und β_3 -AR die selektivste Substanz. Salbutamol und Terbutalin zeigten ein sehr ähnliches Bindungsprofil mit vergleichbarer Affinität für β_1 - und β_2 -AR und einer etwas niedrigeren Affinität für β_3 -AR. Auffällig waren sehr niedrige Affinitätswerte bei Terbutalin an allen drei Rezeptorsubtypen. Überraschenderweise zeigte sich bei Formoterol keine β_2 -Bindungsselektivität.

In der Gruppe der β -AR Antagonisten konnte bei Pindolol, Carvedilol und S-Propranolol keine Selektivität für den β_1 -AR gegenüber dem β_2 -Subtyp gefunden werden. Für den β_1 - gegenüber dem β_3 -Subtyp fand sich eine bis zu 145fache

Selektivität (Carvedilol). Atenolol, Bisoprolol und Metoprolol dagegen zeigten eine bis zu 63fache Selektivität für β_1 -AR gegenüber β_2 -AR. Alle drei Substanzen zeigten eine mehr als 160fache Selektivität für den β_1 -AR gegenüber dem β_3 Subtyp, wobei Bisoprolol mit über 400fach die größte Selektivität für β_1 -AR gegenüber β_3 -AR zeigte.

In der Gruppe der experimentellen Substanzen zeigte CGP-20712 die größte Selektivität für β_1 -AR gegenüber den β_2 - und β_3 - Subtypen und ICI-118551 die ausgeprägteste Selektivität für β_2 -AR gegenüber den anderen Subtypen. BRL-37344 war in unserer Studie die selektivste Substanz für den menschlichen β_3 -AR (90fach gegenüber β_1 und 20fach gegenüber β_2). Die höchste Affinität an diesem Rezeptorsubtyp hatten in unseren Versuchen die unselektiven Substanzen Alprenolol und Pindolol.

Tabelle 6: Übersicht der Bindungsdaten aus den Verdrängungsbindungsversuchen für Agonisten und Antagonisten an den humanen β -Rezeptor-Subtypen. Es wurden 50 bis 80 pM ^{125}I -CYP als Radioligand eingesetzt. Dem Reaktionsansatz wurde 100 μM GTP zugefügt. Die K_i -Werte wurden aus den IC_{50} -Werten mittels der Cheng-Prusoff-Gleichung [68] errechnet. Dargestellt sind die geometrischen Mittelwerte von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten; jeder Messpunkt repräsentiert den Mittelwert aus Dreifachbestimmungen .

Substanz	β_1 -adrenerger Rezeptor		β_2 -adrenerger Rezeptor		β_2 -adrenerger Rezeptor	
	K_i [nM]	95 % Konfidenzintervall	K_i [nM]	95 % Konfidenzintervall	K_i [nM]	95 % Konfidenzintervall
Noradrenalin	3,570	2,440 – 5,210	26,400	23,400 – 29,900	4,300	4,240 – 4,360
Adrenalin	3,970	2,840 – 5,530	735	510 – 1,050	126,000	116,000 – 136,000
Isoprenalin	224	145 – 343	458	377 – 556	1,570	1,370 – 1,810
Fenoterol	13,600	11,100 – 16,700	719	565 – 915	55,700	45,100 – 68,800
Salbutamol	2,440	1,770 – 3,380	2,170	1,600 – 2,950	53,700	37,100 – 77,700
Salmeterol	1,600	1,110 – 2,290	246	15,9 – 37,8	7,180	4,680 – 11,000
Formoterol	1,710	1,430 – 2,060	2,570	1,590 – 4,160	8,090	4,380 – 14,900
Terbutalin	31,300	19,000 – 51,600	15,400	11,900 – 20,000	79,800	40,400 – 157,000
BRL-37344	37,900	34,100 – 41,800	9,170	7,520 – 11,200	430	389 – 475
Alprenolol	5,8	4,5 – 7,5	12	0,83 – 1,8	35,0	15,2 – 80,8
Pindolol	2,6	1,3 – 5,2	4,8	3,8 – 6,1	44,1	30,9 – 63,0
Carvedilol	1,7	1,3 – 2,2	1,1	0,8 – 1,6	247	234 – 261
Atenolol	388	298 – 504	8,140	5,970 – 11,100	65,100	47,100 – 89,900
Bisoprolol	22,4	18,1 – 27,7	1,150	1,100 – 1,190	9,070	7,370 – 11,200
Metoprolol	47,0	27,3 – 81,0	2,960	2,090 – 4,190	10,100	8,130 – 12,400
S-Propranolol	1,8	1,2 – 2,8	0,8	0,6 – 1,0	186	134 – 259
CGP-20712	4,7	4,0 – 5,5	4,040	2,790 – 5,860	2,360	1,770 – 3,150
SR 59230A	16,4	14,0 – 19,2	61,9	30,2 – 127	122	39,2 – 383
CGP-12177	4,5	3,3 – 6,1	4,3	2,3 – 8,1	77,1	70,8 – 84,0
ICI-118551	49,5	40,0 – 61,4	0,7	0,4 – 1,1	611	531 – 703
Broxaterol	1,310	930 – 1,860	1,290	916 – 1,810	3,990	3,470 – 4,590

Bei fast allen Experimenten wurden Zellmembranen mit mittelhohem Rezeptorexpressionsniveau benutzt, d.h. im Falle des β_1 -Rezeptors 367 ± 75 fmol/ mg Protein, des β_2 -Rezeptors 282 ± 19 fmol/ mg Protein und des β_3 -AR 377 ± 82 fmol/ mg Protein. Vereinzelt wurden auch die hochexprimierenden Klone benutzt – was erwartungsgemäß ohne Einfluss auf die K_i -Werte blieb. Tabelle 7 soll dies anhand einiger Bindungsdaten für den β_1 -AR verdeutlichen.

Tabelle 7: Vergleich der gewonnenen Bindungsdaten von einigen Substanzen aus Einzelexperimenten an zwei unterschiedlich hoch exprimierenden Zellklonen des β_1 -AR. Klon 1 exprimiert den Rezeptor mit relativ hoher Dichte ($9,130 \pm 3,060$ fmol/mg Protein), Klon 2 dagegen deutlich niedriger (367 ± 75 fmol/ mg Protein). Es wird deutlich, dass die Höhe der Rezeptorexpression keinen Einfluss auf die Bindungskonstante K_i nimmt.

Substanz	Klon 1, K_i [nM]		Klon 2, K_i [nM]	
CGP-12177A	4.1	3.7	6.1	
S-Propranolol	2.5		1.2	2.1
ICI-118551	40.3	41.8	45.6	
Pindolol	1.4		2.7	4.7

3.3 Funktionelle Untersuchungen

3.3.1 Funktionelle Charakterisierung der stabil transfizierten Zelllinien

In den folgenden Versuchen untersuchten wir im cAMP-Akkumulationsassay die Stimulierbarkeit der Adenylylcyclase mittels Isoprenalin und den endogenen Agonisten Adrenalin und Noradrenalin. Dazu wurden jeweils frisch präparierte Membranen von stabil transfizierten CHO-Zellklonen mit vergleichbaren Expressionsniveaus benutzt. Alle Konzentrations-Wirkungskurven für diese Agonisten waren im Vergleich zu den jeweiligen Verdrängungskurven aus Bindungsexperimenten nach links verschoben. Allerdings entsprach die Reihenfolge der Bindungsaffinität der Substanzen an den drei Subtypen der Wirkstärke im cAMP-Akkumulationsversuch.

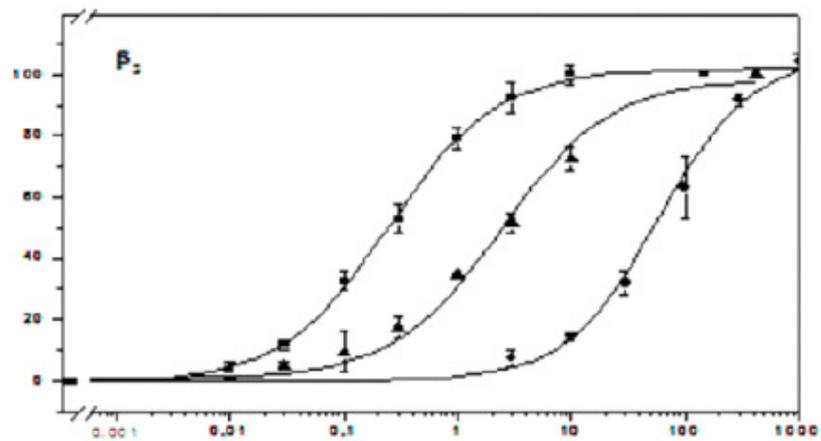
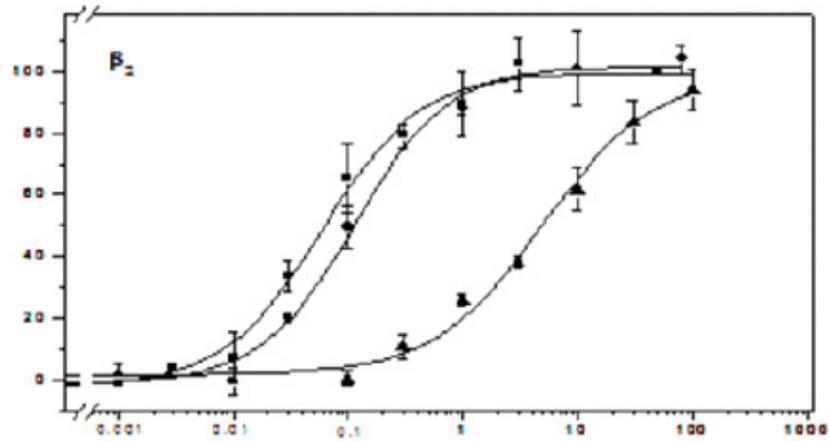
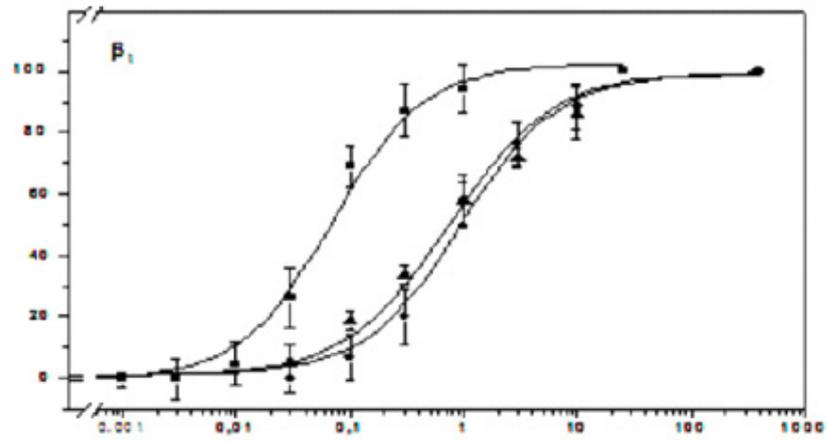
In der folgenden Tabelle 8 sind die entsprechenden Daten aus cAMP-Akkumulationsversuchen und Bindungsversuchen zusammengestellt (vgl. hierzu auch Abbildung 5 auf Seite 38 und Tabelle 6 auf Seite 35).

Tabelle 8: Ergebnisse des cAMP-Akkumulationsversuchs mit Adrenalin, Noradrenalin und Isoprenalin an stabil mit den drei β -AR-Subtypen transfizierten CHO-Zellen. Die dargestellten Werte entsprechen den Daten aus drei bis vier Experimenten ausgeführt in Doppelwerten (\pm SEM in Klammern). Zum Vergleich werden die entsprechenden Bindungswerte (95% Konfidenzintervall in Klammern) aufgelistet.

		β_1 -AR	β_2 -AR	β_3 -AR
Adrenalin	EC ₅₀ [nM]	950 (\pm 115)	115 (\pm 20)	58,300 (\pm 10,300)
	K _i [nM]	3,970 (2,840-5,530)	735 (510-1,050)	126,000 (116,000-136,000)
Noradrenalin	EC ₅₀ [nM]	750 (\pm 90)	4,900 (\pm 970)	2,250 (\pm 400)
	K _i [nM]	3,570 (2,440-5,210)	26,400 (23,400-29,900)	4,300 (4,240-4,360)
Isoprenalin	EC ₅₀ [nM]	64 (\pm 12)	60 (\pm 10)	250 (\pm 20)
	K _i [nM]	224 (145-343)	458 (377-556)	1570 (1,370-1,810)

Für den β_1 -AR ergab sich auch in den funktionellen Versuchen für den EC₅₀ die Reihenfolge Isoprenalin > Noradrenalin = Adrenalin, für den β_2 -AR Isoprenalin = Adrenalin >> Noradrenalin und für den β_3 -AR Isoprenalin > Noradrenalin > Adrenalin. Alle drei Substanzen waren jeweils volle Agonisten an allen Rezeptorsubtypen. Diese Umstände sind grafisch aus der auf der folgenden Seite dargestellten Abbildung 5 ersichtlich.

Adenylylcyklaseaktivität in % des Maximums



Agonistenkonzentration [μM]

Abbildung 5: Aktivität der Adenylylcyclase in Membranen von stabil transfizierten CHO-Zellen für die Substanzen Isoprenalin (■), Noradrenalin (▲), und Adrenalin (●). Die Adenylylcyclaseaktivität für die einzelnen β -AR-Subtypen ist in Prozent angegeben und bezieht sich auf den maximal mit der jeweiligen Substanz erreichten Wert, der mit Konzentrationen in Höhe des ca. 100fachen K_i -Wertes erreicht wurde. Die dargestellten Werte entsprechen den Daten aus drei bis vier Experimenten ausgeführt in Doppelwerten.

3.3.2 Untersuchungen zu funktionelle Eigenschaften der in den Bindungsexperimenten verwendeten Substanzen

Weiterhin charakterisierten wir alle in Tabelle 6 dargestellten Substanzen hinsichtlich ihrer maximalen Wirkung und klassifizierten sie als Agonisten, Antagonisten oder inverse Agonisten. Dazu wurden ebenfalls Zelllinien mit vergleichbarem Expressionslevel der drei β -AR Subtypen benutzt. Wir führten cAMP-Akkumulationsassays mit hohen Ligandenkonzentrationen durch, um den maximalen Effekt der Substanzen auf die Adenylylcyclase messen zu können. Die verwendeten Konzentrationen lagen beim ca. 100fachen-Wert für K_i bzw. maximal 1 mM. Wie man aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Isoprenalin, Adrenalin und Noradrenalin schließen kann, sollte bei diesen Ligandenkonzentrationen der volle Effekt auf die Adenylylcyclase sichtbar sein (vgl. Abbildung 5). Bei jedem Experiment wurde der maximale Effekt von Isoprenalin sowie die Basalwerte ohne Einfluss von Liganden bestimmt und als Referenzwerte für die maximale Wirkstärke der anderen Substanzen benutzt. Tabelle 9 informiert über die gemessenen absoluten Werte.

Tabelle 9: Basale bzw. Isoprenalin-stimulierte Adenylylcyclaseaktivität der verschiedenen Klone in den Tabellen 3-5. Werte in pmol/mg Membranprotein/min.

Klon	Basale Aktivität	Isoprenalin-stimulierte Aktivität
β_1 , Klon2	30.9 ± 4.5	65.4 ± 5.8
β_2 , Klon1	4.3 ± 0.5	11.1 ± 1
β_2 , Klon2	27.9 ± 2.8	36.0 ± 1.5
β_2 , Klon3	104.0 ± 4.5	138 ± 6.8
β_3 , Klon 2	26.0 ± 2.8	93.7 ± 6.0

Die in den Experimenten bestimmten Daten wurden in Prozent der mit Isoprenalin erreichbaren maximalen Stimulation ausgedrückt. Inverser Agonismus, also Reduktion der Adenylylcyclaseaktivität unter den unstimulierten basalen Wert, wurde in prozentualer Reduktion dieses Basalwertes ausgedrückt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind auf der folgenden Seite in Tabelle 10 zusammengefasst.

Funktionell betrachtet fallen die untersuchten Substanzen in vier verschiedene Kategorien. Die erste Gruppe mit Isoprenalin, Adrenalin, Noradrenalin, Formoterol und Fenoterol sind Agonisten an allen drei β -AR-Subtypen.

Die sogenannten β_2 -Agonisten Salbutamol, Terbutalin und Broxaterol waren Partialagonisten am β_2 - und β_3 -AR, und im Gegensatz zu Fenoterol und Formoterol Antagonisten am β_1 -AR. Ihre maximale Wirkstärke am β_3 -AR lag zwischen 42 und 87 %.

Das langwirkende in der Asthmatherapie eingesetzte Salmeterol war der einzige β_2 -AR-Agonist ohne agonistischen Effekt an den anderen β -AR-Subtypen. Hier zeigte sich sogar eine invers agonistische Wirkung.

Alle anderen untersuchten Substanzen waren Antagonisten oder inverse Agonisten an β_1 - und β_2 -AR und zeigten charakteristische Unterschiede in der Wirkung auf den β_3 -AR. Hier fand sich Partialagonismus (wie z.B. bei CGP-12177) bis hin zum inversem Agonismus (ICI-118551).

Tabelle 10: Maximale Adenylylcyclase-Stimulation an den menschlichen β -AR-Subtypen. Die Membranpräparation erfolgte aus Klonen mit vergleichbaren Rezeptorexpressionslevels (β_1 : 367 ± 75 fmol/mg, β_2 : 282 ± 19 fmol/mg, β_3 : 377 ± 82 fmol/mg Protein). Die Werte drücken die prozentualen Werte der durch Isoprenalin (25 μ M für β_1 , 50 μ M für β_2 , 130 μ M für β_3) maximal erreichten Stimulation aus. Inverser Agonismus wird durch prozentuale Reduktion der basalen Adenylylcyclaseaktivität ausgedrückt. Die eingesetzte Ligandenkonzentration betrug ca. 100fach K_i , maximal jedoch 1mM. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei bis zehn unterschiedlichen Experimenten mit Dreifachwertbestimmung.

Substanz	β_1 -AR	β_2 -AR	β_3 -AR
	Mittelwert \pm SEM	Mittelwert \pm SEM	Mittelwert \pm SEM
Isoprenalin	100	100	100
basal	0	0	0
Adrenalin	133 ± 8	110 ± 8	106 ± 7
Noradrenalin	123 ± 7	103 ± 9	122 ± 8
Fenoterol	66 ± 6	76 ± 5	110 ± 6
Formeterol	58 ± 6	91 ± 9	139 ± 12
Salbutamol	2 ± 5	33 ± 3	87 ± 6
Terbutalin	6 ± 16	41 ± 5	45 ± 4
Broxaterol	-11 ± 9	20 ± 11	42 ± 4
Salmeterol	-33 ± 8	44 ± 8	-13 ± 16
BRL-37344	-5 ± 4	-7 ± 2	28 ± 3
CGP-12177	-19 ± 13	-32 ± 10	36 ± 7
Pindolol	-25 ± 10	-34 ± 8	13 ± 4
Alprenolol	-24 ± 1	-1 ± 3	11 ± 3
SR 59230A	-19 ± 4	0 ± 3	5 ± 1
Atenolol	-23 ± 11	-26 ± 8	7 ± 7
Carvedilol	-28 ± 9	-30 ± 6	2 ± 6
Metoprolol	-24 ± 11	-34 ± 7	2 ± 4
Bisoprolol	-33 ± 9	-30 ± 5	-1 ± 7
Propranolol	-35 ± 6	-35 ± 10	-4 ± 3
CGP-20712	-25 ± 5	-30 ± 7	-20 ± 6
ICI-118551	-22 ± 6	-32 ± 11	-30 ± 3

3.3.3 Inverser Agonismus und Rezeptorexpression

Von verschiedenen Autoren [70-72] wurde bereits gezeigt, dass unterschiedlich hohe Rezeptorexpression von β_2 -AR die Agonist-induzierte Adenylylcyclasestimulation beeinflusst. Eines unserer Ziele war es herauszufinden, ob unterschiedlich hohe Rezeptorexpression auch einen Einfluss auf das Niveau des inversen Agonismus hat. Dazu führten wir cAMP-Akkumulationsversuche an Membranen von CHO-Zellen durch, die den menschlichen β_2 -AR in verschieden hohem Maße exprimierten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 auf Seite 44 zusammengestellt: Adrenalin war ein voller Agonist an allen drei β -AR-Subtypen und seine maximale Wirkung im Vergleich zu Isoprenalin war vom Rezeptorexpressionslevel über den gesamten untersuchten Bereich unabhängig. Der Partialagonist Fenoterol jedoch zeigte eine Abhängigkeit der maximalen Wirkung von der Höhe der Rezeptorexpression. Bei niedrigem Expressionslevel zeigte Fenoterol partialagonistische Eigenschaften. Mit ansteigender Rezeptorexpression fanden sich bis zu einem Plateauwert (unterhalb der durch Isoprenalin erreichbaren Wirkung) auch ansteigende Werte für die maximale Wirkung.

Ähnliche Variationen in der maximalen Wirkung konnten in unserer Arbeit auch bei Substanzen mit invers agonistischer Aktivität (wie z.B. Metoprolol oder Bisoprolol) beobachtet werden. Abbildung 6 auf Seite 45 stellt dieses Ergebnis grafisch dar.

Tabelle 11: Maximale Adenylylcyclase-Stimulation durch ausgewählte Substanzen an Membranen von CHO-Zellen mit unterschiedlich hohem β_2 -AR-Expressionslevel. Die Werte drücken die prozentualen Wert der durch Isoprenalin (50 μ M) maximal erreichten Stimulation aus. Inverser Agonismus wurde durch prozentuale Reduktion der basalen Adenylylcyclaseaktivität ausgedrückt. Die eingesetzte Ligandenkonzentration betrug ca. 100fach K_i , maximal jedoch 1mM. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei bis zehn unterschiedlichen Experimenten mit Dreifachwertbestimmung.

	β_2 -AR	β_2 -AR	β_2 -AR
	<u>40 \pm 3 fmol/mg Prot.</u>	<u>282 \pm 19 fmol/mg Prot.</u>	<u>1,260 \pm 135 fmol/mg Prot.</u>
Substanz	Mittelwert \pm SEM	Mittelwert \pm SEM	Mittelwert \pm SEM
Isoprenalin	100	100	100
Basalwert	0	0	0
Adrenalin	102 \pm 8	110 \pm 8	103 \pm 4
Noradrenalin	88 \pm 14	103 \pm 9	103 \pm 6
Fenoterol	53 \pm 8	76 \pm 5	88 \pm 4
CGP-12177	9 \pm 1	-32 \pm 10	-66 \pm 2
Propranolol	7 \pm 3	-35 \pm 10	-80 \pm 1
Metoprolol	6 \pm 4	-34 \pm 7	-88 \pm 1
Bisoprolol	5 \pm 1	-30 \pm 5	-86 \pm 2
Atenolol	3 \pm 4	-26 \pm 8	-63 \pm 2
ICI-118551	1 \pm 5	-32 \pm 12	-84 \pm 2
CGP-20712	0 \pm 1	-30 \pm 7	-72 \pm 2
Carvedilol	-7 \pm 3	-30 \pm 6	-75 \pm 2
Pindolol	-9 \pm 7	-34 \pm 8	-66 \pm 2

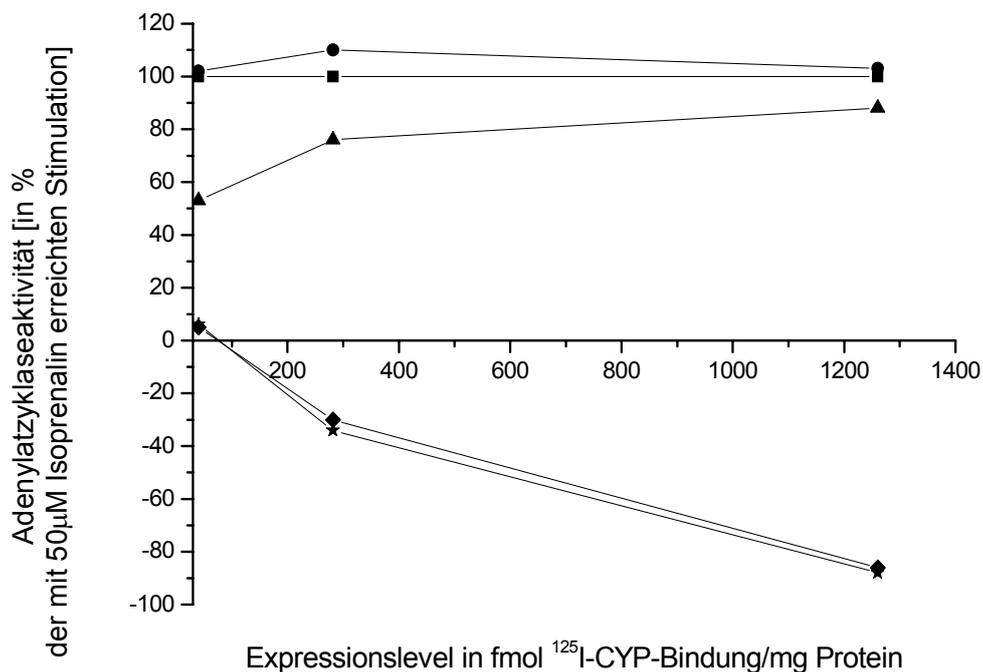


Abbildung 6: Einfluss von ansteigendem Rezeptorexpressionslevel auf die funktionellen Eigenschaften von β -AR-Liganden. Die Werte sind in Relation zu der durch Isoprenalin (50 μ M) (■) maximal erreichten Stimulation gesetzt. Die maximale Wirkstärke von Adrenalin (●) ändert sich über den untersuchten Bereich nicht. Bei dem Partialagonisten Fenoterol (▲) zeigt sich eine Abhängigkeit von den Rezeptorzahlen mit deutlich ansteigender maximaler Wirkstärke. Metoprolol (◆) und Bisoprolol (★) verhalten sich zunächst wie neutrale Antagonisten, bei höheren Rezeptorzahlen wird der inverse Agonismus deutlich, der durch die prozentuale Reduktion der basalen Adenylylaseaktivität ausgedrückt wird.

Inverse Agonisten zeigten bei vergleichsweise niedrigen Rezeptorzahlen eine neutral antagonistische Wirkung, und der inverse Agonismus trat mit ansteigendem Rezeptorexpressionsniveau immer deutlicher zutage. Somit stellte sich eine deutliche Abhängigkeit der maximalen Wirkung von der Anzahl der exprimierten Rezeptoren auch bei an β -AR invers agonistisch wirkenden Substanzen dar.

4 Diskussion

Detaillierte pharmakologische Untersuchungen von β -AR Liganden im Sinne von Bindungs- oder funktionellen Studien wurden lange Zeit in unterschiedlichen In-vitro-Modellen durchgeführt, z.B. in Organbadversuchen oder Gewebepräparationen aus unterschiedlichen Organen und vor allem durch Untersuchungen an nicht-menschlichem Gewebe. Durch die Anwendung unterschiedlichster Techniken in verschiedenen Spezies sind die Ergebnisse zum einen sehr schlecht vergleichbar, zum anderen stellt sich das Problem, dass in Gewebeproben kaum nur ein einziger Rezeptortyp vertreten ist. Eine methodisch einwandfreie, differenzierte Untersuchung von Subpopulationen, wie z.B. der β -adrenergen Subtypen, ist mit diesen Methoden nicht möglich, da auch Effekte anderer Rezeptoren oder Rezeptorsubtypen gemessen werden. Nach Klonierung der cDNA der Rezeptoren können die meisten dieser Probleme mit der Expression rekombinanter Rezeptoren umgangen werden – diese haben überzeugende Vorteile, die sie zu einem sehr guten Instrument zur Charakterisierung einzelner Rezeptoren vor einem zellbiologisch identischen Hintergrund machen. Es kann spezifisch ein bestimmter Rezeptorsubtyp exprimiert werden, den man in großer Zahl erhält und der damit einer Untersuchung relativ einfach zugänglich ist. In der vorliegenden Arbeit haben wir für alle drei bekannten Subtypen der β -AR des Menschen ein solches stabil transfiziertes Zellsystem geschaffen. Gleichzeitig führten wir eine umfassende pharmakologische Charakterisierung mit klinisch häufig verwendeten Agonisten und Antagonisten sowie mit ausgewählten experimentellen Substanzen durch.

4.1 CHO-Zellen als Expressionssystem für β -AR

Einwände hinsichtlich der Verwendbarkeit einer stabil transfizierten Zelllinie beziehen sich auf unphysiologisch hohe Expression, das Fehlen regulatorischer Prozesse und fehlende Interaktionsmöglichkeiten mit anderen Rezeptoren, die im physiologischen Zellverband vorhanden sind. 1988 konnte für CHW-Zellen (Chinese Hamster Fibroblasts), die mit menschlichem β_2 -AR transfiziert wurden, gezeigt werden, dass die transfizierten Rezeptoren in diesen Zellen die typischen funktionellen Charakteristika eines Adenylylcyclase gekoppelten Rezeptors

aufweisen, einschließlich der durch Agonisten induzierten Desensibilisierung [70]. Eine Arbeit aus dem Jahr 1991 verwendete, ebenso wie wir, CHO-Zellen für die Untersuchungen an β -AR [46], allerdings wurden neben den endogenen Agonisten nur drei Substanzen untersucht. CHO-Zellen haben sich für Untersuchungen an verschiedenen G-Protein gekoppelten Rezeptoren als gut geeignet erwiesen, wie z.B. Arbeiten mit den Subtypen der muskarinischen Rezeptoren (M_1 - M_5) [73], der α -Rezeptoren [74] und der Adenosinrezeptoren [75] gezeigt haben.

Die in CHO-Zellen gewonnenen, bereits publizierten K_D - und K_i -Werte stimmen gut mit früheren Untersuchungen von β -Rezeptoren in menschlichen A431-Zellen [76], und in mit menschlichem β_2 -Rezeptor transfizierten L-Zellen der Maus [77] oder TP_3 -Zellen von Kaninchen [78] überein. Ebenso sind die Daten gut vereinbar mit Untersuchungen an in *E. coli* exprimierten menschlichen β_2 -AR [79], zudem finden sich für den β_1 -AR qualitativ ähnliche Werte wie in transfizierten *Xenopus laevis* Oozyten [7] und im menschlichen Myokard [80]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bei β -adrenergen Rezeptoren zusätzliche Proteine, die in einer Gewebeprobe, nicht aber im rekombinanten Zellsystem vorhanden sein könnten, keine so große Rolle spielen wie z.B. für den Calcitonin-Receptor-Like Rezeptor gezeigt, bei dem Rezeptoren mit unterschiedlichen Charakteristika entstehen, abhängig davon, mit welchem RAMP (receptor-activity-modifying proteins) das Protein transportiert wird [81]. Bei der Expression von β_3 -AR in CHO-Zellen wurde berichtet, dass es zu adipozytenartigen Veränderungen in den Zellen kommt [82], die aber offensichtlich ohne Folgen für die Zellfunktion bleiben. Die bisher vorhandenen Werte für den β_3 -AR sind ebenfalls in CHO-Zellen entstanden [8]. Verschiedene andere Autoren verwenden ebenfalls diese Zelllinie für Untersuchungen an β -adrenergen Rezeptoren [50], [83], [84]. Schnabel et al. veröffentlichten eine Zusammenstellung der Bindungskonstanten einiger Betablocker an allen drei β -adrenergen Subtypen in COS-7-Zellen [85]. In dieser Arbeit finden sich neben anderen Problemen keine Affinitätsunterschiede zwischen β_2 und β_3 , was auf methodischen Mängeln beruhen mag, aber zumindest Zweifel an der Eignung von COS-7 Zellen für Bindungsversuche an β -AR weckt. CHO-Zellen können also nach der derzeitigen Studienlage als Standard für Untersuchungen an rekombinanten β -adrenergen Rezeptoren angesehen werden und sind als Wirtszellen für diese Rezeptoren gut

geeignet. Das pharmakologische Profil der Rezeptoren bleibt erhalten, da Bindungsverhalten und die Fähigkeit, die Adenylylcyclase zu stimulieren gegenüber den natürlich vorkommenden Rezeptoren nicht verändert wird. Stabil transfizierte CHO-Zelllinien, wie sie in dieser Arbeit für die drei bekannten β -adrenergen Rezeptorsubtypen vorgestellt werden, erlauben somit die Charakterisierung der verschiedenen adrenergen Rezeptoren und die Untersuchung verschiedenster pharmakologischer Wirkstoffe vor einem zellbiologisch identischen Hintergrund.

4.2 Pharmakologische Charakterisierung

4.2.1 Sättigungsbindung

Zur Zeit ist ^{125}I -CYP der einzige Radioligand, der zur Charakterisierung aller drei β -AR-Subtypen geeignet ist; das für Bindungsstudien an β_1 und β_2 -AR auch gerne verwendete $[^3\text{H}]$ CGP 12177A (z.B. [86] oder [87]) hat am β_3 -Rezeptorsubtyp eine zu geringe Affinität, ebenso wie $[^3\text{H}]$ Dihydroalprenolol, bei dem die bekannten Affinitätskonstanten an den β -adrenergen Rezeptoren im nanomolaren Bereich liegen, das also um ca. 100fach weniger affin ist als ^{125}I -CYP ([88], [89]). Um die größtmögliche Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten zu erreichen, haben wir uns in dieser Arbeit für die Verwendung von ^{125}I -CYP als Radioligand entschieden. Unsere Ergebnisse zur Affinität des Radioliganden ^{125}I -CYP an den drei untersuchten Rezeptorsubtypen stimmen gut mit anderen veröffentlichten Daten überein. Die K_D -Werte in den Tabellen 3 und 4 zeigen, dass die Affinität des Radioliganden ^{125}I -CYP für β_1 - und β_2 -AR vergleichbar ist. Somit stellt sich an den menschlichen Rezeptoren ein ähnliches Bild wie an den β_1 - und β_2 -adrenergen Subtypen der Ratte in früheren Untersuchungen [90] dar. In stabil mit der 49-Ser Variante des menschlichen β_1 -AR transfizierten HEK-293 Zellen konnte der K_D -Wert von ^{125}I -CYP zu 57 pM [91] bestimmt werden – was dem von uns bestimmten Wert bei Verwendung derselben Variante sehr nahe kommt (vgl. dazu Tabelle 1). In einer anderen Untersuchung wurde ein Wert von 17 pM für den β_1 -AR gemessen [46], der etwas niedriger ist als unsere Werte von 62 bzw. 95 pM für zwei unterschiedlich hoch exprimierenden Zellklone. Die in der angesprochenen Arbeit veröffentlichten K_D -Werte an β_2 -AR (31 pM) und β_3 -AR (230 pM) stimmen wiederum sehr gut mit unseren Ergebnissen überein.

Wir charakterisierten in unserer Arbeit Klone mit unterschiedlich hoher Rezeptordichte. Tabellen 3-5 und 7 im Ergebnisteil zeigen, dass die Höhe der Rezeptorexpression erwartungsgemäß keinen Einfluss auf den K_D -Wert hat, der ein Maß für die Affinität des Radioliganden am Rezeptor ist und somit von der absoluten Zahl der Rezeptoren unabhängig.

4.2.2 Verdrängungsbindung

4.2.2.1 β_1 - und β_2 -Rezeptoren

Das pharmakologische Profil der drei stabil in CHO-Zellen transfizierten menschlichen β -adrenergen Rezeptoren wurde durch Verdrängungsexperimente erstellt. Diese Versuche wurden in Gegenwart von 100 μ M GTP durchgeführt, und erfassen daher für Agonisten die niedrig-affine Bindung (zusammengefasst in Tabelle 6 auf Seite 35). Bei der angegebenen GTP-Konzentration kann man davon ausgehen, dass nur ein zu vernachlässigender Teil der Rezeptoren an G-Proteine gekoppelt ist, da GTP die Dissoziation der G-Proteine in α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten und die Entkopplung der Rezeptoren von den G-Proteinen bewirkt. Durch die fehlende Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein wird die gesamte Rezeptorpopulation in einen für Agonisten niedrig-affinen Zustand überführt. Fügt man dem Reaktionsansatz kein GTP hinzu, interagiert ein Teil der Rezeptoren mit G-Proteinen und führt sie in einen Zustand höher Affinität für Liganden über. Folglich zeigt die Bindungskurve in diesem Fall Komponenten aus hoch- und niedrig-affiner Bindung von Agonisten. Wegen der besseren Auswertbarkeit der Daten haben wir uns entschieden, die niedrig-affinen Bindungswerte zu bestimmen. Bei den Versuchen mit Antagonisten wurde ebenfalls GTP zugesetzt, um identische Reaktionsbedingungen zu erhalten, obwohl Antagonisten G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nicht von entkoppelten Rezeptoren unterscheiden können und daher ohnehin nur monophasische Bindungskurven zu beobachten sind.

Unsere Daten an den β_1 - und β_2 -Subtypen stimmen gut mit einzelnen Ergebnissen in verschiedenen Publikationen überein. Kürzlich wurden K_i -Werte für die niedrig-affine Bindung von 268 nM (Isoprenalin), 3600 nM (Noradrenalin) und 54 nM (Metoprolol) an der 49-Gly Variante des β_1 -AR publiziert [91]. Diese Werte in

HEK-293 Zellen stimmen hervorragend mit unseren Daten überein. Ebenfalls im Jahr 2002 veröffentlichte Del Carmine et al. eine Bindungsstudie von stabil in CHO-Zellen exprimierten menschlichen β_2 -AR [49]. Da in dieser Arbeit die Affinität in Abwesenheit von GTP bestimmt wurde (und damit auch hoch-affine Bindung von Agonisten miterfasst wurde), können die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe nicht direkt mit unseren verglichen werden. Es zeigt sich jedoch, dass die Reihenfolge von Isoprenalin > Adrenalin = Fenoterol > Salbutamol > Noradrenalin bezüglich der Affinität am β_2 -AR genau der von uns gefundenen Rangordnung entspricht. Die Bindungsdaten für Antagonisten (z.B. ICI 118551 mit einem K_D -Wert von 0.68 nM und S-Propranolol mit 0.43 nM) stimmen wiederum gut mit unseren Ergebnissen überein. Gille et. al [92] fanden in den Achtziger Jahren sehr ähnliche Werte für die Affinität von S-Propranolol an β_1 und β_2 -AR. Die Ergebnisse stammen interessanterweise aus funktionellen Experimenten mit einer Präparation von menschlichem Herzgewebe. Michel veröffentlichte 1991 eine Übersicht der in der Literatur verfügbaren Bindungsdaten an β_1 - und β_2 -AR [45]. Diese Daten wurden, wie eingangs bereits erwähnt, an unterschiedlichen Geweben, von unterschiedlichen Spezies und in unterschiedlichen Labors erhoben und können deswegen nicht direkt untereinander oder mit unseren Werten verglichen werden. Allerdings kann das qualitative pharmakologische Profil, das sich durch die Daten abzeichnet, als Anhaltspunkt gelten: Isoprenalin band an β_1 - und β_2 -Rezeptoren fast gleich stark; wir verzeichneten dabei eine geringgradig höherer Affinität für den β_1 -AR. Adrenalin zeigte eine etwas höhere Affinität für den β_2 -Rezeptor und Noradrenalin war etwa 10fach selektiv für den β_1 - gegenüber dem β_2 -Rezeptor.

Betrachtet man die klinisch häufig eingesetzte Substanzgruppe der β_2 -selektiven Agonisten, so ist auffällig, dass in der Literatur kaum eine Arbeit zu finden ist, die eine pharmakologische Charakterisierung im engeren Sinn, d.h. eine Bestimmung der Bindungsaffinitäten und der maximalen Wirkung ('efficacy' im englischsprachigen Raum) an den menschlichen β -AR Subtypen vornimmt. Dagegen weisen sehr viele Arbeiten eine selektive Wirkung dieser Substanzen in funktionellen Versuchen, z.B. an der Trachea von Meerschweinchen oder auch durch FEV₁-Messungen am Menschen nach, die die Grundlage für ihren Einsatz z.B. bei Asthmatikern darstellen [93-95]. Anhand der nun vorgelegten Daten können die β_2 -

selektiven Agonisten in zwei Gruppen unterteilt werden: Terbutalin und Salbutamol zeigten in unseren Versuchen keine subtypspezifische Bindungsselektivität. In tierexperimentellen Modellen fanden sich bereits Hinweise auf diesen Umstand (Rattenherz und -Lunge [96], Meerschweinchenherz und -muskulatur [97]). Betrachtet man die von uns gewonnenen Daten an menschlichen Rezeptoren, so ist davon auszugehen, dass die selektive Wirkung dieser Substanzen auch beim Menschen nicht durch unterschiedliches Bindungsverhalten, sondern vor allem durch unterschiedlich starke Aktivierung der einzelnen Subtypen resultiert. Dagegen zeigten zwei der klinisch häufig eingesetzten Substanzen, Fenoterol und Salmeterol, Bindungsselektivität für den β_2 -AR: Für Fenoterol fanden wir eine ca. 19fache β_2 -Selektivität, für Salmeterol konnten wir eine ca. 66fache Selektivität für β_2 nachweisen, ähnlich wie Roux et al. [98]. Für Formoterol hingegen konnte keine Bindungsselektivität für β_2 nachgewiesen werden, was zumindest teilweise die z.B. von Cazzola et al. [99] bei äquipotenter Dosierung klinisch beobachteten etwas ausgeprägteren kardialen Nebenwirkungen gegenüber Salmeterol erklären könnte.

Bei den β -AR Antagonisten konnten wir das bekannte pharmakologische Profil nachvollziehen: Pindolol, S-Propranolol und CGP 12177A diskriminierten nicht zwischen den β_1 - und β_2 -Subtypen, wohingegen Atenolol, Metoprolol und Bisoprolol in unterschiedlichem Ausmaß β_1 -Selektivität aufwiesen. Atenolol zeigte in unserer Arbeit eine β_1/β_2 -Selektivität von 21. Am stärksten selektiv war in unserer Untersuchung Metoprolol mit einer β_1/β_2 -Selektivität von 63, dicht gefolgt von Bisoprolol mit 51. Yoshikawa et al. finden für die beiden Substanzen ebenfalls sehr nahe beieinander liegende Selektivitätswerte in einer Studie an menschlichen Kardiomyozytenmembranen [100]. Andere Studien bescheinigen Bisoprolol eine stärker ausgeprägte β_1 -Selektivität als Metoprolol [87].

Bei den experimentellen Substanzen konnten CGP 20712A [101] und ICI 118551 [102] als β_1 - bzw. β_2 -selektive Antagonisten bestätigt werden. Der Vergleich mit Literaturdatenbanken erweckt den Eindruck, dass im Falle der β_1 - und β_2 -AR Speziesunterschiede hinsichtlich der Affinität der Rezeptor-Ligand-Interaktion möglicherweise eine eher untergeordnete Rolle spielen.

4.2.2.2 β_3 -Rezeptoren

Ganz anders verhält es sich jedoch am β_3 -Rezeptor, wie z.B. ein Vergleich der Bindungsdaten und funktionellen Ergebnisse zwischen dem β_3 -AR Subtypen der Ratte und des Menschen zeigt [47]. Eine direkte Übertragbarkeit der Daten zwischen den an tierischen Rezeptoren gewonnenen Daten auf den Menschen scheint nicht ohne weiteres möglich zu sein. Auch die Genstruktur des β_3 -AR unterscheidet sich durch das Vorkommen von Introns von der des β_1 oder β_2 -Subtyps [60]. Zudem weist der β_3 -AR keine Phosphorylierungsstellen für cAMP-abhängige Proteinkinasen oder β -adrenerge Rezeptorkinasen auf [103], was eine Erklärung für die relative Resistenz dieses Subtyps gegen homologe Desensibilisierung sein kann. Über das pharmakologische Profil des β_3 -AR ist im Vergleich zu den extensiven Untersuchungen an den beiden anderen Subtypen relativ wenig bekannt, so dass die in unserer Studie gewonnenen Werte die erste umfassendere Charakterisierung von β -adrenergen Liganden in Bindungs- und funktionellen Experimenten am β_3 -Subtyp darstellt, die auch direkt mit den Ergebnissen an β_1 und β_2 Rezeptoren verglichen werden können.

Am menschlichen β_3 -AR sahen wir eine überraschend niedrige Affinität für Adrenalin. Nach unseren Daten zeigt der β_3 -AR eine ca. 30fache höhere Affinität für Noradrenalin gegenüber Adrenalin. Diese niedrige Affinität von Adrenalin am β_3 -Rezeptor wurde schon früher beobachtet [47], wenngleich der Unterschied zwischen Adrenalin und Noradrenalin in dieser Arbeit nicht so auffällig war wie in unserer Untersuchung. Strosberg [104] stellte in einer Übersichtsarbeit zum β_3 -Rezeptor Bindungs- und funktionelle Daten aus verschiedenen Quellen [84], [105], [106] zusammen, die mit unterschiedlichen Methoden an CHO-Zellen gewonnen wurden. Auch in diesem Fall stellt sich das bereits eingangs erwähnte Problem der fehlenden Vergleichbarkeit der Daten. Qualitativ lassen sich jedoch die Ergebnisse mit den unsrigen vereinbaren.

Sowohl die klinisch gebräuchlichen β_1 -selektiven Rezeptorantagonisten als auch die unselektiven Substanzen Carvedilol und S-Propranolol binden mit ≥ 100 fach niedrigerer Affinität am β_3 -Subtyp verglichen mit β_1 . Pindolol und vor allem

Alprenolol (nur ca. 17fach selektiv für β_1 gegenüber β_3) zeigen in dieser Substanzgruppe die geringste Selektivität.

CGP 12177A zeigte eine gegenüber den β_1 - und β_2 -Subtypen ca. 18fach niedrigere Affinität für den β_3 -AR, auch dies in Übereinstimmung mit Literaturwerten. Die experimentelle Substanz SR 59230A war in unseren Versuchen vier bzw. siebenfach höher affin am β_1 -Rezeptor als an den β_2 - bzw. β_3 -Subtypen. Somit konnte die im Nagetiermodell beschriebene β_3 -Selektivität an menschlichen Rezeptoren nicht nachgewiesen werden. SR 59230A wurde in funktionellen Versuchen nur an Ratten ([107-109]) bzw. Meerschweinchen [110] untersucht, wobei die errechnete Selektivität je nach Assay und Tiermodell zwischen zehn- und 500fach schwankte. Hierbei muss noch einmal darauf hingewiesen werden, dass Speziesunterschiede am β_3 -AR offenbar eine größere Rolle spielen als an den anderen beiden AR-Subtypen (siehe dazu auch [111] und [112]). Allein De Ponti et al. [113] hat mit SR 59230A an Präparationen von menschlichen Darmabschnitten gearbeitet und eine β_3 -Selektivität beschrieben. Dabei scheint allerdings nicht abschließend geklärt, ob der beobachtete Effekt auf die Kolonmotilität des Menschen tatsächlich auf eine Interaktion mit dem β_3 -Subtyp zurückzuführen ist. Es muss somit kritisch hinterfragt werden, ob der im Tiermodell beobachtete β_3 -selektive Effekt tatsächlich auch beim Menschen erwartet werden kann. Zu ganz ähnlichen Ergebnissen wie wir kommt die Studie von Candelore et al. [114], die für SR 59230A ebenfalls höhere Affinitäten an β_1 und β_2 -AR als am β_3 -Subtyp feststellt. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse ist nicht zu übersehen; nach der derzeitigen Studienlage gibt es gute Gründe anzunehmen, dass die im Tiermodell β_3 -selektiv wirkende Substanz SR 59230A an den menschlichen Rezeptorsubtypen andere Eigenschaften besitzt. Die Verwendung rekombinanter humaner Rezeptoren in unserer Studie zeigt in diesem Fall einen neuen Aspekt im wissenschaftlichen Diskurs auf.

Für die experimentell häufig als selektiven β_3 -Agonisten eingesetzte Substanz BRL 37344 [115] stellten wir in den Bindungsversuchen in der Tat die höchste Selektivität für den β_3 -AR fest (ca. 90fach gegenüber β_1 und ca. 20fach gegenüber β_2). Vergleichbare Werte lieferten beispielsweise Yanagisawa et al. [116], ebenfalls an CHO-Zellen.

Für Broxaterol [117], eine ursprünglich als β_2 -Agonist zur Asthmatherapie entwickelte Substanz, konnte gezeigt werden, dass die Affinität für alle drei β -Rezeptoren etwa gleich ist. Eine Arbeit aus dem Jahr 1991 [118] zeigte in Herz- und Lungengewebe der Ratte unterschiedliche Affinitäten für die β_1 - und β_2 -AR Subpopulation, allerdings wurde hier mit [^3H]Dihydroalprenolol als Radioligand gearbeitet. Dagegen wurde in einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe ebenfalls mit ^{125}I -CYP als Radioligand kein wesentlicher Unterschied in den Affinitäten an den genannten Rezeptorsubtypen gefunden [75], dabei wurde jedoch nicht am β_3 -AR getestet.

4.3 Funktionelle Charakterisierung

Die funktionelle Kopplung der Rezeptoren wurde durch Messung der Adenylylcyclaseaktivität untersucht. Dazu wurden frische Membranpräparationen von allen drei β -AR-Subtypen mit vergleichbar hohem Rezeptorexpressionslevel (ca. 300 fmol/mg Membranprotein) verwendet. Aus Abbildung 5 (Seite 38) kann man erkennen, dass Wirkstoffkonzentrationen, die im Bereich des 100fachen K_i -Wertes der Substanz liegen, zumindest bei vollen Agonisten eine maximale Stimulation der Adenylylcyclase bewirken sollten. Die Daten aus Tabelle 10 (Seite 42) sind ein Maß für die maximale Wirkstärke der einzelnen Substanzen und sind zu Isoprenalin als Referenzwert in Relation gesetzt. Nach ihrer maximalen Wirkstärke an den verschiedenen β -Rezeptor-Subtypen kann man die untersuchten Substanzen in verschiedene Gruppen einteilen.

4.3.1 Endogene β -adrenerge Agonisten und Isoprenalin

Für die endogenen Agonisten und Isoprenalin wurden Dosis-Wirkungskurven gemessen, die in Abbildung 5 dargestellt sind. Aus diesen Daten kann gefolgert werden, dass der β_1 -AR nicht zwischen den endogenen Agonisten Noradrenalin und Adrenalin unterscheidet, während der β_2 -Rezeptor als „adrenerger“ und der β_3 -Rezeptor als „noradrenerger“ Rezeptor bezeichnet werden könnte. Da die Expression des menschlichen β_3 -Rezeptors vor allem in braunem (bei Stimulation Thermogenese [119]) und, in geringerem Maß, in weißem Fettgewebe (bei Stimulation Lipolyse [120]) nachweisbar ist, ist es vorstellbar, dass dieser Rezeptor der adrenergen

Stimulation weitgehend entkommt und in erster Linie auf sympathische Neurostimulation durch Noradrenalin reagiert [121]. Steinle et al. [122] beobachteten β_3 -Rezeptorexpression auf menschlichen Endothelzellen der Retina, die in Kultur genommen wurden. Dort bewirkte eine Stimulation mit der β_3 -selektiven Substanz BRL 37344 Zellmigration, die einen frühen Marker der Angiogenese darstellt. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte, dass sympathische Neurostimulation bei Gefäßerkrankungen des Auges eine Rolle spielen könnte.

Betrachtet man zusätzlich Ergebnisse von neueren Untersuchungen zum Nachweis der Existenz von β_3 -AR im menschlichem Herzmuskelgewebe, erscheint eine niedrige Affinität des Rezeptors für Adrenalin auch biologisch verständlich: u. a. Gauthier et al. [22] konnten nachweisen, dass β_3 -AR in menschlichem Herzmuskelgewebe exprimiert werden. Im Gegensatz zu der positiv inotropen, und chronotropen Wirkung der β_1 - und β_2 - Stimulation am Herzen [123], zeigte sich in dieser Arbeit beim β_3 -AR jedoch ein deutlicher, dosisabhängiger negativ inotroper Effekt bei Stimulation des Rezeptors. Diese Wirkung soll durch die Aktivierung eines NO-Synthase- (NO, nitric oxide = Stickstoffmonoxid) gekoppelten Signalübertragungswegs bewirkt werden [112]. Varghese et al. [124] kommen mit Untersuchungen an β_3 -AR-Knockout Mäusen zu demselben Ergebnis und schlagen einen negativem Feedback-Mechanismus vor, der bei gesunden Herzen einer adrenergen Überstimulation und den daraus resultierenden Folgen wie überhöhtem Sauerstoffverbrauch, Calciumüberladung der Zellen und schließlich Untergang der Kardiomyozyten, wie sie exemplarisch an β_1 -transgenen Mäusen [125] gesehen werden können, entgegenwirkt. Die genannten Ergebnisse sind jedoch umstritten, da z.B. in einer Studie von Heubach et al. [126] der eben beschriebene gegenregulierenden Effekt durch β_3 -AR nicht gefunden werden konnte. Die Ergebnisse am transgenen Mausmodell sind ebenfalls nicht schlüssig – in einer Arbeit konnte an β_3 -transgenen Mäusen positive Inotropie nachgewiesen werden [127], Tavernier et al. [128] finden dagegen einen deutlichen negativen inotropen Effekt bei β_3 -Stimulation dieser Tiere. Eine ältere Arbeit dieses Autors beschreibt einen positiv chronotropen Effekt nach Gabe von β_3 -adrenergen Agonisten als Folge eines Reflexkreises über Barorezeptoren [129] und nicht als Folge von β_3 -adrenerger Stimulation.

In der pathophysiologischen Situation der Herzinsuffizienz lässt sich nachweisen, dass die Menge der β_2 -AR ungefähr gleich bleibt [130], während β_1 -AR herunterreguliert werden [131]. Dagegen ließ sich eine Heraufregulierung von β_3 -AR im Herzmuskelgewebe von Herzinsuffizienten feststellen [132]. Weiterhin ist eine relative Resistenz von β_3 -AR gegenüber durch Agonisten induzierte Desensibilisierungsprozesse belegt [133]. Somit kann man vermuten, dass bei erhöhtem Sympathikotonus der negative inotrope Effekt der β_3 -AR verstärkt wird, was bei höhergradiger Herzinsuffizienz deletäre Folgen durch die resultierende systolische Dysfunktion haben könnte. In diesem Zusammenhang drängt sich die Frage nach einer Behandlungsmöglichkeit der Herzinsuffizienz durch spezifische β_3 -Antagonisten auf. Andererseits muss eine eventuelle zukünftige Therapie mit β_3 -Agonisten z.B. bei Adipositas auch die kardialen Wirkungen beachten. Hier hat man durch das in dieser Arbeit vorgestellte pharmakologische Modellsystem ein Werkzeug zur Testung von experimentellen Substanzen vorliegen, da, wie bereits dargestellt, eine Übertragung von tierexperimentell gewonnenen Daten auf den Menschen beim β_3 -AR nicht sinnvoll erscheint. Allerdings ist – wie oben kurz skizziert - die Rolle, die der β_3 -AR im kardiovaskulären System spielt, noch Gegenstand lebhafter Diskussionen, so dass sich keine endgültigen Schlüsse ziehen lassen.

4.3.2 β -adrenerge Agonisten

Von den untersuchten Substanzen sind vor allem β_2 -selektive Agonisten klinisch von Bedeutung. Sie werden als Bronchodilatoren in der Therapie des Asthma bronchiale als kurzwirksame Bedarfsmedikation in der Akutsituation appliziert (z.B. Fenoterol oder Salbutamol). Langwirksame Substanzen wie Formoterol oder Salmeterol dienen z.B. der Prophylaxe nächtlicher Asthmaanfälle. Die klinisch verwendeten β_2 -Rezeptoragonisten unterschieden sich sehr stark in ihrer maximalen Wirkung auf β_1 - und β_3 -Rezeptoren.

Fenoterol and Formoterol waren, abgesehen von den endogenen Agonisten und Isoprenalin, die einzigen Substanzen, die an allen Subtypen als Agonisten wirkten. Fenoterol wies eine deutliche Bindungselektivität für den β_2 -AR auf, die die

klinisch beobachteten β_2 -betonten Effekte bei Notfalltokolyse oder Asthma bronchiale gut erklärt.

Salmeterol wirkte in unseren Versuchen am β_1 -AR, und in einem geringeren Maß auch am β_3 -AR als inverser Agonist. Es ist damit die einzige Substanz, die sowohl eine Selektivität im Bindungsverhalten ((β_2/β_1) -Selektivität von 65) als auch in funktionellen Versuchen zeigte. In unseren Versuchen war Salmeterol ein Partialagonist am β_2 -AR, wie auch in Untersuchungen an Trachealpräparaten von Meerschweinchen [95] und an glatter Muskulatur des menschlichen Respirationstrakts [134] festgestellt wurde. Dieser auf Rezeptorebene gefundene Umstand passt sehr gut mit den Ergebnissen klinischer Studien zusammen, in denen bei Bronchialasthma ein geringerer maximaler protektiver Effekt für Salmeterol gefunden wurde als z.B. für Formoterol, das in unseren Versuchen am β_2 -AR ein voller Agonist war. Beispielsweise führten Palmquist et al. [135] 1999 eine klinische Studie an Asthmatikern durch und konnten für Formoterol einen deutlich höheren maximalen protektiven Effekt nachweisen als für Salmeterol; in der Formoterol-Gruppe traten auch in dieser Studie, wie oben erwähnt, häufiger kardiale Nebenwirkungen auf.

Dieser Zusammenhang kann auch die Ergebnisse einer niederländischen Studie erklären, die zeigte, dass unter Salmeterol-Dauertherapie der Effekt von kurzwirksamen β_2 -Agonisten (z.B. Fenoterol als „rescue medication“ im Anfall) wesentlich geringer ist als unter Dauertherapie mit Formoterol [136]. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der Partialagonist Salmeterol mit einer höheren Affinität an β_2 -AR bindet als der volle Agonist Fenoterol (vgl. dazu Tabelle 5 und 8). Formoterol dagegen wirkt selbst als voller Agonist, allerdings mit niedrigerer Affinität als Fenoterol.

Salbutamol und Terbutalin waren (Partial-)Agonisten am β_2 - und β_3 -Rezeptor, aber neutrale Antagonisten am β_1 , verhalten sich also funktionell selektiv. Betrachtet man die sehr niedrigen Bindungsaffinitäten von Salbutamol am β_3 -AR wird deutlich, dass im therapeutischen Bereich nur eine Stimulation der β_2 -AR stattfinden kann. Die klinisch messbare Summenwirkung als „ β_2 -selektiver“ Agonist wird durch die vorgelegten Daten gut interpretierbar. Terbutalin hingegen ist nur etwa 5fach

bindungsselektiv für den β_2 -AR gegenüber dem β_3 -AR, so dass man in therapeutischen (bezüglich der β_2 -adrenergen Wirkung) Dosierungen von einer zusätzlichen Aktivierung des β_3 -Subtyps ausgehen muss.

Eine funktionelle Selektivität, wie wir sie bei den letztgenannten Stoffe beobachten konnten, wurde schon für die experimentelle Substanz Broxaterol beschrieben [75], die bei gleicher Affinität für β_1 - und β_2 -AR nur den β_2 -AR aktiviert. Am β_1 -AR wirkt Broxaterol antagonistisch bis invers agonistisch. Wie wir in der vorliegenden Arbeit zeigen konnten, ist Broxaterol ein Partialagonist am β_3 -AR. Damit beschreiben wir eine experimentelle Substanz, deren pharmakologisches Profil im Hinblick auf die Entwicklung von Medikamenten von Interesse ist, da sich ein Wirkprofil als β_1 -AR-Antagonist, gepaart mit β_2 -AR- und zusätzlich β_3 -AR-Stimulation ergibt. Gegenüber Terbutalin und Salbutamol zeigt sich eine deutlich höhere Affinität für den β_3 -AR. In therapeutischen Dosen kann an diesem Subtyp somit eine Stimulation erfolgen. Neben einer selektiven β_2 -Wirkung z.B. beim Asthmatiker könnten damit evtl. günstige Auswirkungen auf den Fettstoffwechsel ausgelöst werden.

In der Literatur fanden wir trotz intensiver Suche keinen Hinweis auf ein ähnliches Verhalten anderer β_2 -Agonisten, wie wir sie für Terbutalin, Salbutamol, Salmeterol und auch Broxaterol beschreiben konnten. Da die Aktivität am β_1 -AR die kardialen Nebenwirkungen bei einer Therapie mit Sympathomimetika bestimmt, könnten unsere Daten von klinischer Bedeutung für die Verwendung der besprochenen Substanzen sein.

4.3.3 β -adrenerge Antagonisten

Bei weiterer Analyse der Daten aus Tabelle 10 fanden wir eine große Gruppe von Stoffen, die am β_1 - und β_2 -Rezeptor inversen Agonismus zeigen, sich aber in ihrer maximalen Wirkstärke am β_3 -AR unterscheiden.

Die experimentell eingesetzten Substanzen ICI 118551 und CGP 20712A zeigten inversen Agonismus an allen drei Rezeptorsubtypen.

Allein BRL 37344 verhielt sich ähnlich einem Antagonisten am β_1 - und β_2 -AR mit partiellem Agonismus am β_3 -AR. Damit konnten wir eine funktionelle Selektivität

für diesen Subtyp nachweisen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurde diese Substanz 1993 als Agonist an allen drei β -adrenergen Rezeptoren beschrieben [84]. Die Substanz wird häufig zur selektiven β_3 -Stimulation experimentell eingesetzt. Berichte über einen messbaren positiv inotropen und chronotropen Effekt an Meerschweinchenherzen [137] werden kontrovers diskutiert und könnten ebenso Folge von Barorezeptorreflexen [129] sein, ausgelöst durch die hypotensive Wirkung der Substanz über den β_2 -Antagonismus.

CGP 12177A wirkte am β_3 -AR als Partialagonist, an β_1 und β_2 als inverser Agonist. Dies entspricht dem etablierten pharmakologischen Profil. Pindolol, als Partialagonist bekannt, war in unseren Versuchen inverser Agonist am β_1 - und β_2 -AR, und zeigte nur 13% agonistische Aktivität im Vergleich zu Isoprenalin am β_3 -AR.

Alprenolol und die experimentelle Substanz SR 59230A zeigten ein ähnliches Aktivitätsprofil mit invers agonistischer Aktivität am β_1 -AR und neutral antagonistischem Verhalten am β_2 und β_3 . In der weiter oben angesprochenen Studie konnten Candelore et. al [114] ebenfalls keine nennenswerte stimulatorische Aktivität von SR 59230A an den drei Rezeptorsubtypen nachweisen. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der Affinitätsuntersuchungen können auch wir für SR 59230A am menschlichen β -AR keine β_3 -Selektivität oder agonistische Aktivität feststellen, was in deutlichem Kontrast zu den oben dargestellten Untersuchungen an Nagetieren steht.

Die so genannten „cardioselektiven“ β -Blocker unterschieden sich kaum hinsichtlich der beobachteten invers agonistischen Wirkstärke am β_1 - und β_2 -AR, die mit der von Carvedilol vergleichbar war. Sowohl für Metoprolol [36] als auch Bisoprolol [138] zur Therapie der Herzinsuffizienz wurde in grossen prospektiven Studien eine Senkung der Mortalität festgestellt. Interessanterweise konnte nach dreimonatiger Therapie mit Metoprolol erneut eine erhöhte β_1 -Rezeptorexpression am insuffizienten Herzen festgestellt werden, also eine Umkehr der „down-regulation“ [139]. Neue klinische Studien versuchen nun, einen Vorteil der einen oder anderen Substanz zu demonstrieren. Ein direkter Vergleich in einer prospektiven, randomisierten, doppelblinden Multicenter-Studie zwischen zwei der

cardioselektiven Betablocker steht noch aus. Im Jahr 2003 hat allerdings COMET (Carvedilol Or Metoprolol European Trial) erstmals eine Verlängerung des Überlebens unter Therapie mit Carvedilol im Vergleich zur Behandlung mit Metoprolol bei NYHA II-IV-Patienten postuliert [140], nachdem in vorangegangenen, kleineren Studien schon Hinweise auf ein günstigeres Verhalten von Carvedilol gesehen wurden. Metra et. al fanden z.B. eine relativ gesehen höhere Verbesserung der kardialen Leistungsfähigkeit unter Carvedilol gegenüber Metoprolol bei Herzinsuffizienten mit einer linksventrikulären Ejektionsfraktion von $\leq 35\%$ [141]. Die beobachteten Effekte beruhen wohl kaum auf der höheren Affinität von Carvedilol am β_1 -AR. Als Begründung wird angeführt, dass die Substanz auch als β_2 - und α_1 -Blocker wirkt [142]. Zudem ist eine antioxidative Wirkung [143] und die Erhöhung der Insulinsensitivität [144] nachgewiesen worden. Abgesehen von diesen pharmakologischen Unterschieden ist die Unterdosierung der Vergleichssubstanz Metoprolol in der Studie ein methodischer Fehler, der die Ergebnisse und Schlussfolgerungen in Frage stellt.

4.3.4 Inverser Agonismus und Rezeptorexpression

Die Vorstellung, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor könnte nur im aktivierten oder im nicht aktivierten Zustand vorliegen, ist eine unzulässige Vereinfachung. Die folgende Abbildung (nach Milligan et al. [145] und Engelhardt [24]) soll verdeutlichen, dass es sich eher um ein kontinuierliches Spektrum zwischen voll aktivem und inaktivem Zustand handelt.

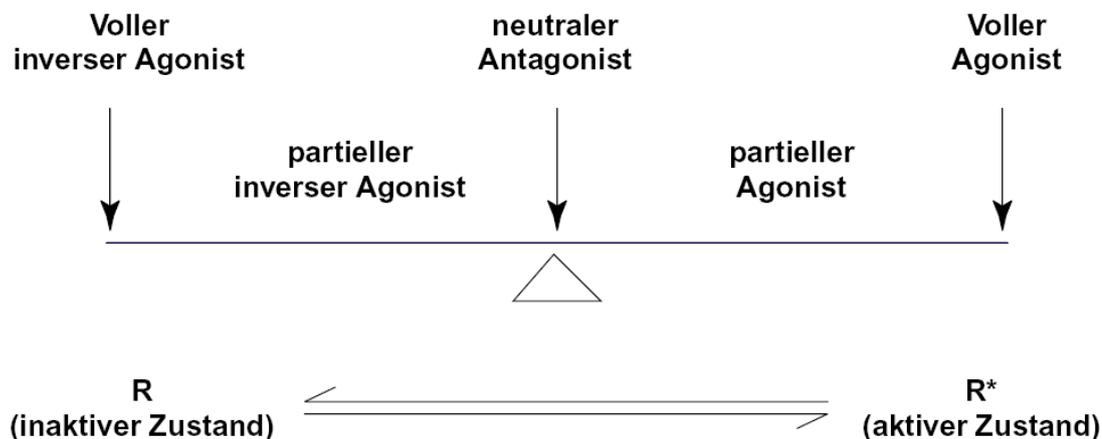


Abbildung 7: Unterschiedliche Aktivitätszustände eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Mehrere unterschiedliche Rezeptorkonformationen liegen zwischen dem nicht-signalgebenden Zustand (R) und der maximalen Aktivierung (R*). (Partielle) Agonisten bewirken eine Verschiebung in Richtung Aktivierung, (partielle) inverse Agonisten bewirken eine Drosselung des Rezeptorsignals. Neutrale Antagonisten beeinflussen dieses Gleichgewicht nur insofern, als sie Bindungsstellen für Agonisten besetzt halten.

Konstitutive Aktivität wird als Fähigkeit des Rezeptors, seine nachgeschaltete Signalkaskade auch ohne die Bindung eines Agonisten aktivieren zu können, definiert. Für den β_2 -AR wurde 1994 nach Überexpression in Zellkultur spontane Aktivität nachgewiesen [146], eine Punktmutation im β_1 -AR erzeugte einen konstitutiv aktiven Rezeptor [48]. In unseren Versuchen hatten wir mit dem hoch exprimierenden β_1 -AR-Klon ein konstitutiv aktives System zur Verfügung, in dem inverser Agonismus gemessen werden konnte. Da man annimmt, dass inverse Agonisten eine inaktive Konformation des Rezeptors wahrscheinlicher machen [147] und somit ein konstitutiv aktives Rezeptorsignal supprimieren, tritt ihr Effekt durch eine höhere Zahl an spontan aktiven und damit signalübertragenden Rezeptoren bei höheren absoluten Rezeptorzahlen deutlicher oder überhaupt erst messbar zutage. Eine Kontamination mit endogenen Agonisten, die konstitutive Aktivität vortäuschen, und zu einer Fehlklassifizierung von kompetitiven Antagonisten als inverse Agonisten führen, kann im vorliegenden System ausgeschlossen werden. Bei Verwendung eines entsprechend sensitiven Assays (wie in unseren Versuchen) ist

zur Identifikation von inversen Agonisten z.B. eine konstitutiv aktive Mutante des Rezeptors nicht vonnöten. Wir konnten für alle drei humanen β -adrenergen Rezeptoren spontane Aktivität nachweisen. Viele der getesteten „Antagonisten“ verhielten sich im Assay als inverse Agonisten, ähnlich wie in einer Untersuchung an 23 α_1 -Rezeptor-„Antagonisten“ durch Rossier et al. [148]. Ausgehend von der Rezeptortheorie gibt es Gründe anzunehmen, dass neutrale Antagonisten eher die Ausnahme und nicht die Regel sind [149]. Dadurch ergibt sich die Forderung nach klaren Begrifflichkeiten in der Diskussion um Rezeptorliganden, beispielsweise sind viele der klinisch eingesetzten „ β -Blocker“ durchaus nicht „ β -Rezeptor-Antagonisten“, wie manchmal unter Umgehung des ersten Begriffs formuliert wird, sondern inverse Agonisten.

Wir untersuchten in diesem Zusammenhang auch den Einfluss der Expressionshöhe von β_2 -adrenergen Rezeptoren auf das Niveau des inversen Agonismus. Für agonistische Aktivität ist eine deutliche Abhängigkeit von der Höhe der Rezeptorexpression nachgewiesen [72]. In unseren Versuchen konnten wir diesen Zusammenhang auch für inverse Agonisten zeigen. Für die Klassifizierung von Substanzen als Antagonisten oder inverse Agonisten ist demnach unbedingt die Einbeziehung der Höhe der Rezeptorexpression in die Ergebnisse zu fordern. Ein Beispiel - Carmine et. al [49] untersuchten, wie bereits oben beschrieben, die maximalen Wirkstärken einiger Substanzen an β_2 -AR, die in CHO-Zellen exprimiert wurden. Insgesamt findet sich in unserer Studie ein identisches Aktivitätsmuster, allerdings mit unterschiedlichen absoluten Werten. Diese Unterschiede in der maximalen Wirkstärke könnte ihre Ursache in verschieden hoher Rezeptorexpression haben. Wie man Tabelle 11 und Abbildung 6 entnehmen kann, steigt die maximale Wirkstärke von Fenoterol mit steigender Rezeptorexpression an. Del Carmine et al. führten Adenylylcyclaseversuche mit Zellen durch, die 8.4 pmol Rezeptoren/mg Membranprotein exprimieren, während in unseren Versuchen Zellen mit einem Expressionslevel von etwa 0.3 pmol Rezeptoren/mg Membranprotein verwendet wurden, so dass die Unterschiede in der maximalen Wirkstärke durch diesen Umstand erklärbar sind.

Was ist aber die Bedeutung des Konzepts des inversen Agonismus im klinischen Bereich? Dies soll am Beispiel der β -adrenergen Rezeptoren im menschlichen Herzen, deren chronische Stimulation in der Pathogenese der Herzinsuffizienz eine große Rolle spielt (siehe dazu [150]), verdeutlicht werden. β_1 -adrenerge Rezeptoren im menschlichen Herzen werden, obwohl sie ca. 70 % der β -AR dieses Organs stellen, absolut gesehen nur in geringen Mengen exprimiert (zwischen 50 und 90 fmol/mg Membranprotein) [123]. In unserem stabil transfizierten Zellsystem haben wir also eine ca. 150fache Überexpression des β_1 -AR (Tabelle 3, hochexprimierender Klon). Somit kann man vermutlich davon ausgehen, dass die spontane Signalgebung des β_1 -AR beim Gesunden vernachlässigbar ist. Beim Herzinsuffizienten aber könnte sich selbst diese geringe, durch spontane Aktivität des β_1 -AR verursachte, chronische Stimulation negativ auswirken und zu einer Progression der Erkrankung beitragen. Experimentell konnten Jahns et al. [151] eine verminderte kardiale Funktion bei Anwesenheit von β_1 -AR-Autoantikörpern nachweisen, obwohl diese eine nur sehr schwach ausgeprägte sympathomimetische Aktivität besaßen. Am Menschen führte eine Entfernung dieser Antikörper durch Immunadsorption [152] zur klinischen Besserung. Beide Effekte waren deutlich, obwohl in der Herzinsuffizienz die β_1 -AR-Level, ausgehend von einem bereits relativ niedrigen Ausgangswert, noch herunterreguliert sind, wie oben beschrieben. Grosse klinische Studien mit den Partialagonisten Xamoterol [51] oder Bucindolol [55] wurden vorzeitig abgebrochen, da eine Erhöhung der Mortalität feststellbar war. Diese Daten deuten darauf hin, dass eine auch nur minimale chronische Stimulation des β -adrenergen Systems in der Herzinsuffizienz deletäre Folgen haben könnte. Im Unterschied zu Xamoterol oder auch Bucindolol konnten klinische Studien mit den inversen Agonisten Metoprolol [36] und Bisoprolol [138] eine deutliche Mortalitätssenkung zeigen. Die Herabsetzung der spontanen Signalgebung der β -adrenergen Rezeptoren durch inverse Agonisten stellt somit trotz geringer physiologischer β_1 -AR-Expression im Herzen ein wichtiges Therapieprinzip dar, das mit reinen Antagonisten nicht erreicht werden kann.

5 Zusammenfassung

Seit langem werden auf das β -adrenerge System wirkende Pharmaka, v.a. β_1 -Antagonisten und β_2 -Agonisten, therapeutisch eingesetzt, allerdings sind die pharmakologischen Eigenschaften dieser Stoffe an den drei bekannten β -adrenergen Subtypen teilweise nur unzureichend untersucht. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, vergleichbare pharmakologische Daten für Agonisten (Adrenalin, Noradrenalin, Isoprenalin, Fenoterol, Salbutamol, Salmeterol, Terbutalin, Formoterol, Broxaterol) und Neutrale und Inverse Antagonisten (Propranolol, Alprenolol, Atenolol, Metoprolol, Bisoprolol, Carvedilol, Pindolol, BRL 37344, CGP 20712, SR 59230A, CGP 12177, ICI 118551) an allen drei Subtypen von β -adrenergen Rezeptoren in einem zellbiologisch identischen Hintergrund zu gewinnen. Dazu stellten wir stabil transfizierte CHO-Zelllinien her, die die einzelnen humanen β -adrenergen Subtypen in vergleichbarer Menge exprimierten. Nach der pharmakologischen Charakterisierung der einzelnen Rezeptorsubtypen erfolgte die Affinitätsmessung von klinisch häufig eingesetzten wie auch experimentell verwendeten Substanzen mit dem unselektiven β -adrenergen Antagonisten ^{125}I -CYP als Radioligand. Darüber hinaus untersuchten wir die β -adrenerg vermittelte Stimulation der Adenylylcyclase in isolierten Membranen dieser Zelllinien. Alle untersuchten Substanzen zeigten charakteristische Bindungs- und funktionale Eigenschaften. Wir konnten nachweisen, dass einige β_2 - bzw. β_3 -Agonisten an den anderen Subtypen inversen Agonismus zeigen. Zusätzlich konnten β_1 -Antagonisten mit agonistischer Aktivität an β_2 - und β_3 -AR gefunden werden. Die gewonnenen Daten können somit helfen, klinisch beobachtete Effekte, wie z.B. die unerwünschten Wirkungen der entsprechenden Medikamente, besser zu verstehen. Insbesondere die Ergebnisse am β_3 -AR sind als Referenz und Ausgangspunkt weiterer Studien an diesem noch relativ wenig untersuchten Rezeptor wertvoll.

6 Literaturverzeichnis

1. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-51

2. Howard AD, McAllister G, Feighner SD, Liu Q, Nargund RP, Van der Ploeg LH, Patchett AA. 2001. Orphan G-protein-coupled receptors and natural ligand discovery. *Trends Pharmacol Sci* 22: 132-40
3. Brodde OE, Michel MC. 1999. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 51: 651-90
4. Lands AM, Arnold A, McAuliff JP, Luduena FP, Brown TG, Jr. 1967. Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines. *Nature* 214: 597-8
5. Harms HH, Zaagsma J, Van der Wal B. 1974. Beta-adrenoceptor studies. III. On the beta-adrenoceptors in rat adipose tissue. *Eur J Pharmacol* 25: 87-91
6. Dixon RA, Kobilka BK, Strader DJ, Benovic JL, Dohlman HG, Frielle T, Bolanowski MA, Bennett CD, Rands E, Diehl RE, et al. 1986. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature* 321: 75-9
7. Frielle T, Collins S, Daniel KW, Caron MG, Lefkowitz RJ, Kobilka BK. 1987. Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7920-4
8. Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, Strosberg AD. 1989. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 245: 1118-21
9. Kaumann AJ, Preitner F, Sarsero D, Molenaar P, Revelli JP, Giacobino JP. 1998. (-)-CGP 12177 causes cardiostimulation and binds to cardiac putative beta 4-adrenoceptors in both wild-type and beta 3-adrenoceptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 53: 670-5
10. Kaumann AJ, Molenaar P. 1997. Modulation of human cardiac function through 4 beta-adrenoceptor populations. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355: 667-81
11. Granneman JG. 2001. The putative beta4-adrenergic receptor is a novel state of the beta1-adrenergic receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280: E199-202
12. Kaumann AJ, Engelhardt S, Hein L, Molenaar P, Lohse M. 2001. Abolition of (-)-CGP 12177-evoked cardiostimulation in double beta1/beta2-adrenoceptor knockout mice. Obligatory role of beta1-adrenoceptors for putative beta4-adrenoceptor pharmacology. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363: 87-93
13. Bourne HR. 1997. How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9: 134-42
14. Gether U, Kobilka BK. 1998. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 273: 17979-82
15. Ross EM, Gilman AG. 1980. Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. *Annu Rev Biochem* 49: 533-64
16. Francis SH, Corbin JD. 1994. Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Annu Rev Physiol* 56: 237-72
17. Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG. 1994. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res* 75: 401-9

18. Zhao XL, Gutierrez LM, Chang CF, Hosey MM. 1994. The alpha 1-subunit of skeletal muscle L-type Ca channels is the key target for regulation by A-kinase and protein phosphatase-1C. *Biochem Biophys Res Commun* 198: 166-73
19. Kunst G, Kress KR, Gruen M, Uttenweiler D, Gautel M, Fink RH. 2000. Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res* 86: 51-8
20. Stryer L. 1988. *Biochemistry*. New York: Freeman
21. Xiao RP, Ji X, Lakatta EG. 1995. Functional coupling of the beta 2-adrenoceptor to a pertussis toxin-sensitive G protein in cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 47: 322-9
22. Gauthier C, Tavernier G, Charpentier F, Langin D, Le Marec H. 1996. Functional beta3-adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest* 98: 556-62
23. Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL, Le Marec H. 1998. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 102: 1377-84
24. Engelhardt S. 2001. *Transgene Mausmodelle zur Charakterisierung der Funktion kardialer beta-adrenerger Rezeptoren*. Dissertation thesis. Bayer. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg. 108 pp.
25. Brodde OE. 1993. Beta-adrenoceptors in cardiac disease. *Pharmacol Ther* 60: 405-30
26. Guimaraes S, Moura D. 2001. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev* 53: 319-56
27. Kotlikoff MI, Kamm KE. 1996. Molecular mechanisms of beta-adrenergic relaxation of airway smooth muscle. *Annu Rev Physiol* 58: 115-41
28. Molinoff PB. 1984. Alpha- and beta-adrenergic receptor subtypes properties, distribution and regulation. *Drugs* 28 Suppl 2: 1-15
29. Forth W. 1996. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag
30. Krief S, Lonnqvist F, Raimbault S, Baude B, Van Spronsen A, Arner P, Strosberg AD, Ricquier D, Emorine LJ. 1993. Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *J Clin Invest* 91: 344-9
31. Arch JR, Ainsworth AT, Cawthorne MA, Piercy V, Sennitt MV, Thody VE, Wilson C, Wilson S. 1984. Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature* 309: 163-5
32. Gauthier C, Langin D, Balligand JL. 2000. Beta3-adrenoceptors in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci* 21: 426-31
33. Manoach M, Tribulova N. 2001. Sotalol: the mechanism of its antiarrhythmic-defibrillating effect. *Cardiovasc Drug Rev* 19: 172-82
34. Berkin KE, Ball SG. 2001. Essential hypertension: the heart and hypertension. *Heart* 86: 467-75
35. Waagstein F, Hjalmarson A, Varnauskas E, Wallentin I. 1975. Effect of chronic beta-adrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy. *Br Heart J* 37: 1022-36

36. 1999. Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 353: 2001-7
37. Krum H. 2003. Beta-blockers in chronic heart failure: what have we learned? What do we still need to know? *Curr Opin Pharmacol* 3: 168-74
38. Waldeck B. 2002. Beta-adrenoceptor agonists and asthma--100 years of development. *Eur J Pharmacol* 445: 1-12
39. Robertson C, Steen P, Chamberlain D, Bossaert L, Carli P, Ekstrom L, Hapnes SA, Holmberg S, Koster R, Lindner K, Perales N, Juchems R, Adgey J, Dick W, Kette F, Kloeck W, Callanan V. 2000. [Advanced emergency life support measures in resuscitation. Guidelines of the European Resuscitation Council 1998]. *Anaesthetist* 49: 121-9
40. Wenzel V, Krismer AC, Arntz HR, Sitter H, Stadlbauer KH, Lindner KH. 2004. A comparison of vasopressin and epinephrine for out-of-hospital cardiopulmonary resuscitation. *N Engl J Med* 350: 105-13
41. Kovacs L, Herczeg J. 1978. [Tokolysis using Berotec aerosol]. *Zentralbl Gynakol* 100: 106-9
42. Widen E, Lehto M, Kanninen T, Walston J, Shuldiner AR, Groop LC. 1995. Association of a polymorphism in the beta 3-adrenergic-receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N Engl J Med* 333: 348-51
43. Clement K, Vaisse C, Manning BS, Basdevant A, Guy-Grand B, Ruiz J, Silver KD, Shuldiner AR, Froguel P, Strosberg AD. 1995. Genetic variation in the beta 3-adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N Engl J Med* 333: 352-4
44. Walston J, Silver K, Bogardus C, Knowler WC, Celi FS, Austin S, Manning B, Strosberg AD, Stern MP, Raben N, et al. 1995. Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta 3-adrenergic-receptor gene. *N Engl J Med* 333: 343-7
45. Michel M. 1991. β -adrenergic receptors. In *Receptor Data For Biological Experiments*, ed. HN Doods, Van Meel, J.C.A., pp. 19-22. New York, London, Toronto: Ellis Horwood
46. Tate KM, Briend-Sutren MM, Emorine LJ, Delavier-Klutchko C, Marullo S, Strosberg AD. 1991. Expression of three human beta-adrenergic-receptor subtypes in transfected Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem* 196: 357-61
47. Liggett SB. 1992. Functional properties of the rat and human beta 3-adrenergic receptors: differential agonist activation of recombinant receptors in Chinese hamster ovary cells. *Mol Pharmacol* 42: 634-7
48. Lattion A, Abuin L, Nenniger-Tosato M, Cotecchia S. 1999. Constitutively active mutants of the beta1-adrenergic receptor. *FEBS Lett* 457: 302-6
49. Del Carmine R, Ambrosio C, Sbraccia M, Cotecchia S, Ijzerman AP, Costa T. 2002. Mutations inducing divergent shifts of constitutive activity reveal different modes of binding among catecholamine analogues to the beta(2)-adrenergic receptor. *Br J Pharmacol* 135: 1715-22
50. Candelore MR, Deng L, Tota L, Guan XM, Amend A, Liu Y, Newbold R, Cascieri MA, Weber AE. 1999. Potent and selective human beta(3)-adrenergic receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 649-55

51. 1990. Xamoterol in severe heart failure. The Xamoterol in Severe Heart Failure Study Group. *Lancet* 336: 1-6
52. Engelhardt S, Grimmer Y, Fan GH, Lohse MJ. 2001. Constitutive activity of the human beta(1)-adrenergic receptor in beta(1)-receptor transgenic mice. *Mol Pharmacol* 60: 712-7
53. Bohm M, Mittmann C, Schwinger RH, Erdmann E. 1990. Effects of xamoterol on inotropic and lusitropic properties of the human myocardium and on adenylate cyclase activity. *Am Heart J* 120: 1381-92
54. Willette RN, Aiyar N, Yue TL, Mitchell MP, Disa J, Storer BL, Naselsky DP, Stadel JM, Ohlstein EH, Ruffolo RR, Jr. 1999. In vitro and in vivo characterization of intrinsic sympathomimetic activity in normal and heart failure rats. *J Pharmacol Exp Ther* 289: 48-53
55. 2001. A trial of the beta-blocker bucindolol in patients with advanced chronic heart failure. *N Engl J Med* 344: 1659-67
56. Anderson JL, Krause-Steinrauf H, Goldman S, Clemson BS, Domanski MJ, Hager WD, Murray DR, Mann DL, Massie BM, McNamara DM, Oren R, Rogers WJ. 2003. Failure of benefit and early hazard of bucindolol for Class IV heart failure. *J Card Fail* 9: 266-77
57. Maack C, Bohm M, Vlaskin L, Dabew E, Lorenz K, Schafers HJ, Lohse MJ, Engelhardt S. 2003. Partial agonist activity of bucindolol is dependent on the activation state of the human beta1-adrenergic receptor. *Circulation* 108: 348-53
58. Klotz KN, Hessling J, Hegler J, Owman C, Kull B, Fredholm BB, Lohse MJ. 1998. Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357: 1-9
59. Schofield PR, Rhee LM, Peralta EG. 1987. Primary structure of the human beta-adrenergic receptor gene. *Nucleic Acids Res* 15: 3636
60. Granneman JG, Lahners KN, Chaudhry A. 1993. Characterization of the human beta 3-adrenergic receptor gene. *Mol Pharmacol* 44: 264-70
61. Nantel F, Bonin H, Emorine LJ, Zilberfarb V, Strosberg AD, Bouvier M, Marullo S. 1993. The human beta 3-adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. *Mol Pharmacol* 43: 548-55
62. Nantel F, Marullo S, Krief S, Strosberg AD, Bouvier M. 1994. Cell-specific down-regulation of the beta 3-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 269: 13148-55
63. Hopp TP, Prickett, K.S., Price, V.L., Libby, R.T., Conlon, P.J. 1988. A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Biotechnology*: 1204-10
64. Chen C, Okayama H. 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7: 2745-52
65. Rigby PG. 1969. Prolongation of survival of tumour-bearing animals by transfer to "immune" RNA with DEAE-dextran. *Nature* 221: 968-9
66. Bradford MM. 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
67. De Lean A, Hancock AA, Lefkowitz RJ. 1982. Validation and statistical analysis of a computer modeling method for quantitative analysis of

- radioligand binding data for mixtures of pharmacological receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 21: 5-16
68. Cheng Y, Prusoff WH. 1973. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22: 3099-108
 69. Jakobs KH, 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
 70. Bouvier M, Hnatowich M, Collins S, Kobilka BK, Deblasi A, Lefkowitz RJ, Caron MG. 1988. Expression of a human cDNA encoding the beta 2-adrenergic receptor in Chinese hamster fibroblasts (CHW): functionality and regulation of the expressed receptors. *Mol Pharmacol* 33: 133-9
 71. Lohse MJ. 1992. Stable overexpression of human beta 2-adrenergic receptors in mammalian cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 345: 444-51
 72. Whaley BS, Yuan N, Birnbaumer L, Clark RB, Barber R. 1994. Differential expression of the beta-adrenergic receptor modifies agonist stimulation of adenylyl cyclase: a quantitative evaluation. *Mol Pharmacol* 45: 481-9
 73. Brann MR, Buckley NJ, Jones SV, Bonner TI. 1987. Expression of a cloned muscarinic receptor in A9 L cells. *Mol Pharmacol* 32: 450-5
 74. Kobilka BK, Matsui H, Kobilka TS, Yang-Feng TL, Francke U, Caron MG, Lefkowitz RJ, Regan JW. 1987. Cloning, sequencing, and expression of the gene coding for the human platelet alpha 2-adrenergic receptor. *Science* 238: 650-6
 75. Conti P, Dallanoce C, De Amici M, De Micheli C, Klotz KN. 1998. Synthesis of new delta 2-isoxazoline derivatives and their pharmacological characterization as beta-adrenergic receptor antagonists. *Bioorg Med Chem* 6: 401-8
 76. Delavier-Klutchko C, Hoebbeke J, Strosberg AD. 1984. The human carcinoma cell line A431 possesses large numbers of functional beta-adrenergic receptors. *FEBS Lett* 169: 151-5
 77. Fraser CM, Chung FZ, Venter JC. 1987. Continuous high density expression of human beta 2-adrenergic receptors in a mouse cell line previously lacking beta-receptors. *J Biol Chem* 262: 14843-6
 78. Emorine LJ, Marullo S, Delavier-Klutchko C, Kaveri SV, Durieu-Trautmann O, Strosberg AD. 1987. Structure of the gene for human beta 2-adrenergic receptor: expression and promoter characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6995-9
 79. Marullo S, Delavier-Klutchko C, Eshdat Y, Strosberg AD, Emorine L. 1988. Human beta 2-adrenergic receptors expressed in Escherichia coli membranes retain their pharmacological properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 7551-5
 80. Bristow MR, Hershberger RE, Port JD, Minobe W, Rasmussen R. 1989. Beta 1- and beta 2-adrenergic receptor-mediated adenylate cyclase stimulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium. *Mol Pharmacol* 35: 295-303
 81. McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM. 1998. RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature* 393: 333-9

82. Gros J, Gerhardt CC, Strosberg AD. 1999. Expression of human (beta)3-adrenergic receptor induces adipocyte-like features in CHO/K1 fibroblasts. *J Cell Sci* 112 (Pt 21): 3791-7
83. Konkar AA, Vansal SS, Shams G, Fraundorfer PF, Zheng WP, Nikulin VI, De Los Angeles J, Fertel RH, Miller DD, Feller DR. 1999. Beta-adrenoceptor subtype activities of trimetoquinol derivatives: biochemical studies on human beta-adrenoceptors expressed in chinese hamster ovary cells. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 875-83
84. Blin N, Camoin L, Maigret B, Strosberg AD. 1993. Structural and conformational features determining selective signal transduction in the beta 3-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 44: 1094-104
85. Schnabel P, Maack C, Mies F, Tyroller S, Scheer A, Bohm M. 2000. Binding properties of beta-blockers at recombinant beta1-, beta2-, and beta3-adrenoceptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 36: 466-71
86. Pauwels PJ, Van Gompel P, Leysen JE. 1991. Human beta 1- and beta 2-adrenergic receptor binding and mediated accumulation of cAMP in transfected Chinese hamster ovary cells. Profile of nebivolol and known beta-adrenergic blockers. *Biochem Pharmacol* 42: 1683-9
87. Smith C, Teitler M. 1999. Beta-blocker selectivity at cloned human beta 1- and beta 2-adrenergic receptors. *Cardiovasc Drugs Ther* 13: 123-6
88. Leysen JE, Gommeren W, Eens A, de Chaffoy de Courcelles D, Stoof JC, Janssen PA. 1988. Biochemical profile of risperidone, a new antipsychotic. *J Pharmacol Exp Ther* 247: 661-70
89. Andre C, Vauquelin G, De Backer JP, Strosberg AD. 1981. Identification and chemical characterisation of beta-adrenergic receptors in intact turkey erythrocytes. *Biochem Pharmacol* 30: 2787-95
90. Neve KA, McGonigle P, Molinoff PB. 1986. Quantitative analysis of the selectivity of radioligands for subtypes of beta adrenergic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 238: 46-53
91. Levin MC, Marullo S, Muntaner O, Andersson B, Magnusson Y. 2002. The myocardium-protective Gly-49 variant of the beta 1-adrenergic receptor exhibits constitutive activity and increased desensitization and down-regulation. *J Biol Chem* 277: 30429-35
92. Gille E, Lemoine H, Ehle B, Kaumann AJ. 1985. The affinity of (-)-propranolol for beta 1- and beta 2-adrenoceptors of human heart. Differential antagonism of the positive inotropic effects and adenylate cyclase stimulation by (-)-noradrenaline and (-)-adrenaline. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 331: 60-70
93. Ullman A, Svedmyr N. 1988. Salmeterol, a new long acting inhaled beta 2 adrenoceptor agonist: comparison with salbutamol in adult asthmatic patients. *Thorax* 43: 674-8
94. Lofdahl CG, Svedmyr N. 1989. Formoterol fumarate, a new beta 2-adrenoceptor agonist. Acute studies of selectivity and duration of effect after inhaled and oral administration. *Allergy* 44: 264-71
95. Linden A, Bergendal A, Ullman A, Skoogh BE, Lofdahl CG. 1993. Salmeterol, formoterol, and salbutamol in the isolated guinea pig trachea: differences in maximum relaxant effect and potency but not in functional antagonism. *Thorax* 48: 547-53

96. Minneman KP, Hegstrand LR, Molinoff PB. 1979. The pharmacological specificity of beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat heart and lung in vitro. *Mol Pharmacol* 16: 21-33
97. Johansson LH, Eliasson EL, Persson H, Rosengren E. 1990. An analysis of the beta 2-adrenoceptor selectivity in three series of beta-adrenoceptor agonists. *Pharmacol Toxicol* 66: 203-8
98. Roux FJ, Grandordy B, Douglas JS. 1996. Functional and binding characteristics of long-acting beta 2-agonists in lung and heart. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1489-95
99. Cazzola M, Imperatore F, Salzillo A, Di Perna F, Calderaro F, Imperatore A, Matera MG. 1998. Cardiac effects of formoterol and salmeterol in patients suffering from COPD with preexisting cardiac arrhythmias and hypoxemia. *Chest* 114: 411-5
100. Yoshikawa T, Port JD, Asano K, Chidiak P, Bouvier M, Dutcher D, Roden RL, Minobe W, Tremmel KD, Bristow MR. 1996. Cardiac adrenergic receptor effects of carvedilol. *Eur Heart J* 17 Suppl B: 8-16
101. Dooley DJ, Bittiger H, Reymann NC. 1986. CGP 20712 A: a useful tool for quantitating beta 1- and beta 2-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 130: 137-9
102. Bilski AJ, Halliday SE, Fitzgerald JD, Wale JL. 1983. The pharmacology of a beta 2-selective adrenoceptor antagonist (ICI 118,551). *J Cardiovasc Pharmacol* 5: 430-7
103. Emorine LJ, Feve B, Pairault J, Briend-Sutren MM, Marullo S, Delavier-Klutchko C, Strosberg DA. 1991. Structural basis for functional diversity of beta 1-, beta 2- and beta 3-adrenergic receptors. *Biochem Pharmacol* 41: 853-9
104. Strosberg AD. 1997. Structure and function of the beta 3-adrenergic receptor. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 421-50
105. Mejean A, Guillaume JL, Strosberg AD. 1995. Carazolol: a potent, selective beta 3-adrenoceptor agonist. *Eur J Pharmacol* 291: 359-66
106. Dolan JA, Muenkel HA, Burns MG, Pellegrino SM, Fraser CM, Pietri F, Strosberg AD, Largis EE, Dutia MD, Bloom JD, et al. 1994. Beta-3 adrenoceptor selectivity of the dioxolane dicarboxylate phenethanolamines. *J Pharmacol Exp Ther* 269: 1000-6
107. Manara L, Badone D, Baroni M, Boccardi G, Cecchi R, Croci T, Giudice A, Guzzi U, Landi M, Le Fur G. 1996. Functional identification of rat atypical beta-adrenoceptors by the first beta 3-selective antagonists, aryloxypropanolaminotetralins. *Br J Pharmacol* 117: 435-42
108. Nisoli E, Tonello C, Landi M, Carruba MO. 1996. Functional studies of the first selective beta 3-adrenergic receptor antagonist SR 59230A in rat brown adipocytes. *Mol Pharmacol* 49: 7-14
109. Tonello C, Dioni L, Briscini L, Nisoli E, Carruba MO. 1998. SR59230A blocks beta3-adrenoceptor-linked modulation of upcoupling protein-1 and leptin in rat brown adipocytes. *Eur J Pharmacol* 352: 125-9
110. Arch JR, Kaumann AJ. 1993. Beta 3 and atypical beta-adrenoceptors. *Med Res Rev* 13: 663-729
111. Granneman JG, Lahners KN. 1994. Analysis of human and rodent beta 3-adrenergic receptor messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* 135: 1025-31

112. Gauthier C, Leblais V, Kobzik L, Trochu JN, Khandoudi N, Bril A, Balligand JL, Le Marec H. 1998. The negative inotropic effect of beta3-adrenoceptor stimulation is mediated by activation of a nitric oxide synthase pathway in human ventricle. *J Clin Invest* 102: 1377-84
113. De Ponti F, Gibelli G, Croci T, Arcidiaco M, Crema F, Manara L. 1996. Functional evidence of atypical beta 3-adrenoceptors in the human colon using the beta 3-selective adrenoceptor antagonist, SR 59230A. *Br J Pharmacol* 117: 1374-6
114. Candelore MR, Deng L, Tota L, Guan XM, Amend A, Liu Y, Newbold R, Cascieri MA, Weber AE. 1999. Potent and selective human beta(3)-adrenergic receptor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 649-55
115. Muzzin P, Seydoux J, Giacobino JP, Venter JC, Fraser C. 1988. Discrepancies between the affinities of binding and action of the novel beta-adrenergic agonist BRL 37344 in rat brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 156: 375-82
116. Yanagisawa T, Sato T, Yamada H, Sukegawa J, Nunoki K. 2000. Selectivity and potency of agonists for the three subtypes of cloned human beta-adrenoceptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Tohoku J Exp Med* 192: 181-93
117. Chiarino D, Fantucci M, Carenzi A, Della Bella D, Frigeni V, Sala R. 1986. New isoxazole derivatives with a potent and selective beta 2-adrenergic activity. *Farmaco [Sci]* 41: 440-53
118. Sala R, Moriggi E, Della Bella D, Carenzi A. 1991. The specific binding of broxaterol, a new beta 2-selective agonist, to beta-adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 203: 17-23
119. Arch JR, Ainsworth AT, Cawthorne MA, Piercy V, Sennitt MV, Thody VE, Wilson C, Wilson S. 1984. Atypical beta-adrenoceptor on brown adipocytes as target for anti-obesity drugs. *Nature* 309: 163-5
120. Lonnqvist F, Krief S, Strosberg AD, Nyberg S, Emorine LJ, Arner P. 1993. Evidence for a functional beta 3-adrenoceptor in man. *Br J Pharmacol* 110: 929-36
121. Giacobino JP. 1995. Beta 3-adrenoceptor: an update. *Eur J Endocrinol* 132: 377-85
122. Steinle JJ, Booz GW, Meininger CJ, Day JN, Granger HJ. 2003. Beta 3-adrenergic receptors regulate retinal endothelial cell migration and proliferation. *J Biol Chem* 278: 20681-6
123. Brodde OE, Michel MC. 1999. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 51: 651-90
124. Varghese P, Harrison RW, Lofthouse RA, Georgakopoulos D, Berkowitz DE, Hare JM. 2000. beta(3)-adrenoceptor deficiency blocks nitric oxide-dependent inhibition of myocardial contractility. *J Clin Invest* 106: 697-703
125. Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. 1999. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7059-64
126. Heubach JF, Rau T, Eschenhagen T, Ravens U, Kaumann AJ. 2002. Physiological antagonism between ventricular beta 1-adrenoceptors and alpha 1-adrenoceptors but no evidence for beta 2- and beta 3-adrenoceptor function in murine heart. *Br J Pharmacol* 136: 217-29

127. Kohout TA, Takaoka H, McDonald PH, Perry SJ, Mao L, Lefkowitz RJ, Rockman HA. 2001. Augmentation of cardiac contractility mediated by the human beta(3)-adrenergic receptor overexpressed in the hearts of transgenic mice. *Circulation* 104: 2485-91
128. Tavernier G, Toumaniantz G, Erfanian M, Heymann MF, Laurent K, Langin D, Gauthier C. 2003. beta3-Adrenergic stimulation produces a decrease of cardiac contractility ex vivo in mice overexpressing the human beta3-adrenergic receptor. *Cardiovasc Res* 59: 288-96
129. Tavernier G, Galitzky J, Bousquet-Melou A, Montastruc JL, Berlan M. 1992. The positive chronotropic effect induced by BRL 37344 and CGP 12177, two beta-3 adrenergic agonists, does not involve cardiac beta adrenoceptors but baroreflex mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 1083-90
130. Brodde OE. 1991. Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 43: 203-42
131. Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB. 1982. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307: 205-11
132. Moniotte S, Kobzik L, Feron O, Trochu JN, Gauthier C, Balligand JL. 2001. Upregulation of beta(3)-adrenoceptors and altered contractile response to inotropic amines in human failing myocardium. *Circulation* 103: 1649-55
133. Liggett SB, Freedman NJ, Schwinn DA, Lefkowitz RJ. 1993. Structural basis for receptor subtype-specific regulation revealed by a chimeric beta 3/beta 2-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3665-9
134. Scott MG, Swan C, Jobson TM, Rees S, Hall IP. 1999. Effects of a range of beta2 adrenoceptor agonists on changes in intracellular cyclic AMP and on cyclic AMP driven gene expression in cultured human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 128: 721-9
135. Palmqvist M, Ibsen T, Mellen A, Lotvall J. 1999. Comparison of the relative efficacy of formoterol and salmeterol in asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 244-9
136. van Veen A, Weller FR, Wierenga EA, Jansen HM, Jonkers RE. 2003. A comparison of salmeterol and formoterol in attenuating airway responses to short-acting beta2-agonists. *Pulm Pharmacol Ther* 16: 153-61
137. Kozlovski VI, Chlopicki S, Gryglewski RJ. 2003. Effects of two beta3-agonists, CGP 12177A and BRL 37344, on coronary flow and contractility in isolated guinea pig heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 41: 706-13
138. Lechat P. 1990. Beta-blockade treatment in heart failure: the cardiac insufficiency bisoprolol study (CIBIS) project. CIBIS Committees and Investigators. Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study. *J Cardiovasc Pharmacol* 16 Suppl 5: S158-63
139. Sigmund M, Jakob H, Becker H, Hanrath P, Schumacher C, Eschenhagen T, Schmitz W, Scholz H, Steinfath M. 1996. Effects of metoprolol on myocardial beta-adrenoceptors and Gi alpha-proteins in patients with congestive heart failure. *Eur J Clin Pharmacol* 51: 127-32
140. Poole-Wilson PA, Swedberg K, Cleland JG, Di Lenarda A, Hanrath P, Komajda M, Lubsen J, Lutiger B, Metra M, Remme WJ, Torp-Pedersen C,

- Scherhag A, Skene A. 2003. Comparison of carvedilol and metoprolol on clinical outcomes in patients with chronic heart failure in the Carvedilol Or Metoprolol European Trial (COMET): randomised controlled trial. *Lancet* 362: 7-13
141. Metra M, Giubbini R, Nodari S, Boldi E, Modena MG, Dei Cas L. 2000. Differential effects of beta-blockers in patients with heart failure: A prospective, randomized, double-blind comparison of the long-term effects of metoprolol versus carvedilol. *Circulation* 102: 546-51
142. Gilbert EM, Abraham WT, Olsen S, Hattler B, White M, Mealy P, Larrabee P, Bristow MR. 1996. Comparative hemodynamic, left ventricular functional, and antiadrenergic effects of chronic treatment with metoprolol versus carvedilol in the failing heart. *Circulation* 94: 2817-25
143. Yue TL, Cheng HY, Lysko PG, McKenna PJ, Feuerstein R, Gu JL, Lysko KA, Davis LL, Feuerstein G. 1992. Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 92-8
144. Jacob S, Rett K, Wicklmayr M, Agrawal B, Augustin HJ, Dietze GJ. 1996. Differential effect of chronic treatment with two beta-blocking agents on insulin sensitivity: the carvedilol-metoprolol study. *J Hypertens* 14: 489-94
145. Milligan G, Bond RA, Lee M. 1995. Inverse agonism: pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy? *Trends Pharmacol Sci* 16: 10-3
146. Chidiac P, Hebert TE, Valiquette M, Dennis M, Bouvier M. 1994. Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists. *Mol Pharmacol* 45: 490-9
147. Samama P, Pei G, Costa T, Cotecchia S, Lefkowitz RJ. 1994. Negative antagonists promote an inactive conformation of the beta 2-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* 45: 390-4
148. Rossier O, Abuin L, Fanelli F, Leonardi A, Cotecchia S. 1999. Inverse agonism and neutral antagonism at alpha(1a)- and alpha(1b)-adrenergic receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 56: 858-66
149. Kenakin T. 2001. Inverse, protean, and ligand-selective agonism: matters of receptor conformation. *Faseb J* 15: 598-611
150. Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. 2003. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 93: 896-906
151. Jahns R, Boivin V, Siegmund C, Inselmann G, Lohse MJ, Boege F. 1999. Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure. *Circulation* 99: 649-54
152. Muller J, Wallukat G, Dandel M, Bieda H, Brandes K, Spiegelsberger S, Nissen E, Kunze R, Hetzer R. 2000. Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 101: 385-91

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Organverteilung der β -adrenergen Subtypen und Effekte bei Aktivierung der Rezeptoren	4
Tabelle 2: Ergebnisse der Screening-Untersuchung an stabil mit FLAG-markiertem β_3 -AR transfizierten CHO-Zellen.	28
Tabelle 3: Charakteristika der mit den β_1 -AR Subtypen stabil transfizierten CHO-Zellen.	31
Tabelle 4: Charakteristika der mit den β_2 -AR Subtypen stabil transfizierten CHO-Zellen.	31
Tabelle 5: Charakteristika der mit den β_3 -AR Subtypen stabil transfizierten CHO-Zellen.	31
Tabelle 6: Übersicht der Bindungsdaten aus den Verdrängungsbindungsversuchen für Agonisten und Antagonisten an den humanen β -Rezeptor-Subtypen.....	34
Tabelle 7: Vergleich der gewonnenen Bindungsdaten von einigen Substanzen aus Einzelexperimenten an zwei unterschiedlich hoch exprimierenden Zellklonen des β_1 -AR.....	36
Tabelle 8: Ergebnisse des cAMP-Akkumulationsversuchs mit Adrenalin, Noradrenalin und Isoprenalin an stabil mit den drei β -AR-Subtypen transfizierten CHO-Zellen	37
Tabelle 9: Basale bzw. Isoprenalin-stimulierte Adenylylcyclaseaktivität der verschiedenen Klone in Tabelle 3-5.	40
Tabelle 10: Maximale Adenylylcyclase-Stimulation an den menschlichen β -AR-Subtypen.	42
Tabelle 11: Maximale Adenylylcyclase-Stimulation durch ausgewählte Substanzen an Membranen von CHO-Zellen mit unterschiedlich hohem β_2 -AR-Expressionslevel.	44

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Exemplarische Darstellung der Signalübertragung durch β -AR-Subtypen (modifiziert nach [24]).....	3
Abbildung 2 : Grafische Darstellung des rekombinanten Expressionsvektors.....	27
Abbildung 3: ELISA mit anti-FLAG-Antikörpern an transfizierten CHO-Zellen ...	29
Abbildung 4: Sättigungsbindung an Zellmembranen von stabil transfizierten β -AR-Subtypen mit dem unselektiven β -AR-Antagonisten ^{125}I -CYP.	33
Abbildung 5: Aktivität der Adenylylcyclase in Membranen von stabil transfizierten CHO-Zellen für die Substanzen Isoprenalin (■), Noradrenalin (▲), und Adrenalin (●).	39
Abbildung 6: Einfluss von ansteigendem Rezeptorexpressionslevel auf die funktionellen Eigenschaften von β -AR-Liganden	45
Abbildung 7: Unterschiedliche Aktivitätszustände eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors.	61

9 Abkürzungsverzeichnis

^{125}I -CYP - ^{125}Jod -Cyanopindolol

AS - Aminosäure(n)

ATP - Adenosintriphosphat

B_{max} - auf den stabil transfizierten Klonen exprimierte Rezeptorzahl

cDNA - copyDNA

CHO - K1-Chinese Hamster Ovary

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

GTP - Guanosintriphosphat

K_D - Affinitätskonstante, Maß für die Affinität eines Liganden

LB-Medium - Liquid Broth Medium zur Kultivierung von E. coli

MAP-Kinase - Mitogen activated protein kinase

mRNA - messenger RNA

PBS - Phosphate buffered saline

PCR – Polymerase chain reaction

β -AR - β -adrenerge(r) Rezeptor(en) ($\beta_1, \beta_2, \beta_3$ -Subtypen entsprechend)

Danksagung

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Karl-Norbert Klotz für die Ratschläge, Unterstützung und Geduld bei der Betreuung der Arbeit bedanken. Gleiches gilt für Dr. Carsten Hoffmann als meinem direkten Betreuer, der bei allen Problemen jederzeit ein kompetenter Ansprechpartner war und maßgeblich zu meiner Motivation beigetragen hat. Frau Martina Fischer und Frau Sonja Kachler danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Prof. Dr. Martin Lohse als Inhaber des Lehrstuhls für Pharmakologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Überlassung des Themas, sein Verständnis für das ausgeprägte Fernweh eines jungen Medizinstudenten und die Unterstützung bei der Realisierung der daraus geborenen Ideen. Die wissenschaftliche Tätigkeit am Institut für Pharmakologie war in vielerlei Hinsicht eine lehrreiche Zeit, die ich nicht missen möchte.

Lebenslauf

Michael Richard LEITZ

Meisenweg 12, 58769 Nachrodt, NRW

Geboren am 30.12.1975 in Marktredwitz

Ausbildung:

Grundschule	1982-86 in Marktredwitz
Gymnasium	1986-95 in Marktredwitz, Abitur 1995

Zivildienst

1995-96	BRK Rettungsdienst
---------	--------------------

Universitäre Ausbildung

1996-2004	Studium der Humanmedizin in Würzburg, Sydney und München
2001/02	Forschungsaufenthalt an der Tufts University School of Medicine, Boston

Berufliche Tätigkeit

Seit 2004	Tätigkeit als Assistenzarzt an der Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie des Klinikums Dortmund Mitte bei Prof. Dr. D. Löhlein, derzeit in der Chirurgischen Intensivmedizin
-----------	--

Gez.

Michael Leitz

Nachrodt, den 17.02.2006