



**FRET-basierte Untersuchungen zur ligandenselektiven
Beeinflussung der Rezeptorkonformationen durch orthosterische
und allosterische Liganden am Beispiel des muskarinischen
M₂ Acetylcholinrezeptors**

**FRET-based analysis of the ligandselective influence of orthosteric
and allosteric ligands on the change of receptor conformation of
the muscarinic M₂ acetylcholine receptor**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

vorgelegt von

Julia Bätz

aus

Coburg

Würzburg, 2012

Eingereicht am: 05.07.2012

Mitglieder des Promotionskomitees

Vorsitzende: Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe

1. Betreuer: PD Dr. Carsten Hoffmann

2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas D. Müller

3. Betreuer: Prof. Dr. Klaus Mohr

4. Betreuer: Prof. Dr. Martin J. Lohse

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren.....	1
1.1.1 Kristallstruktur.....	1
1.1.2 Phylogenetische Unterteilung.....	1
1.1.3 Rezeptoraktivierung.....	2
1.1.4 Signalweiterleitung	3
1.1.4.1 Signalweiterleitung über heterotrimere G-Proteine	3
1.1.4.1.1 Unterscheidung von G-Proteinen anhand funktioneller Merkmale	4
1.1.4.2 Arrestine als Effektorproteine	5
1.1.4.2.1 Definition.....	5
1.1.4.2.2 β -Arrestine als Signaltransduktoren	5
1.1.5 Rezeptordesensibilisierung	6
1.1.6 Rezeptorinternalisierung.....	6
1.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren	7
1.2.1 Charakterisierung der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren	7
1.2.1.1 Klassifikation und Unterteilung in Subtypen.....	7
1.2.1.2 Kristallstruktur	7
1.2.1.3 Endogener Ligand und orthosterische Bindestelle.....	9
1.2.1.4 G-Protein Aktivierung und Modulation nachgeschalteter Signalwege	9
1.2.1.5 Rezeptorinternalisierung.....	10
1.2.2 Physiologische Charakterisierung	11
1.2.2.1 Expressionsmuster im humanen Organismus.....	11
1.2.2.2 mAChR-vermittelte Effekte im zentralen Nervensystem	11
1.2.2.3 Effekte mAChR-vermittelter Signalübertragung in peripheren Organen und Geweben	12
1.2.3 Pharmakologische Bedeutung.....	12
1.2.3.1 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren als Zielstruktur in der Arzneimitteltherapie	12
1.2.3.2 Ausblick auf zukünftige Entwicklungen in der cholinergen Therapie	13
1.3 Allosterie.....	13
1.3.1 Begriffsbestimmung.....	13
1.3.1.1 Allosterisches ternäres Komplexmodell	14
1.3.1.2 Allosterisches Zwei-Zustands Modell	16
1.3.2 Funktionelle Selektivität.....	16
1.3.3 Methoden zur Detektion allosterischer Modulation	17
1.3.3.1 Radioligandenbindungsstudien	17
1.3.3.2 Funktionelle Experimente	18
1.3.4 Vergleich allosterischer und orthosterischer Liganden hinsichtlich ihrer Bedeutung für die pharmakologische Therapie	19
1.3.4.1 Anwendungsbeispiele allosterischer Liganden in der pharmakologischen Therapie ...	20
1.3.5 Allosterische Modulation des muskarinischen M ₂ Acetylcholinrezeptors.....	20
1.3.5.1 Allosterische Bindestelle.....	20
1.3.5.2 Allosterische Modulatoren	21
1.3.5.2.1 Typische allosterische Liganden	21
1.3.5.2.2 Atypische allosterische Liganden	22
1.3.6 Bitopische Liganden	22
1.3.6.1 Mögliche Bindungsstadien bitopischer Liganden an GPCR.....	23
1.3.6.2 Bitopische Liganden der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren	24
1.4 Fluoreszenzmessungen.....	26
1.4.1 Allgemeine Grundlagen zur Fluoreszenz	26
1.4.1.1 Fluoreszenzmarker.....	26

1.4.1.1.1	Fluoreszenzproteine	26
1.4.1.1.2	Fluorescein arsenical hairpin binder (FIAsH)	27
1.4.1.2	Jablonski-Termschema	29
1.4.2	Förster-Resonanz-Energietransfer	31
1.4.2.1	Methoden der FRET-Messung in lebenden Zellen	35
1.4.2.2	Detektion ligandenselektiver Änderungen der Rezeptorkonformation mittels FRET	36
2.	Zielsetzung.....	38
3.	Material und Methoden.....	39
3.1	<i>Material.....</i>	<i>39</i>
3.1.1	Biologisches Material.....	39
3.1.1.1	Bakterienstämme.....	39
3.1.1.2	Eukaryotische Zelllinien.....	39
3.1.1.3	Enzyme.....	39
3.1.1.4	Plasmide und Primer	39
3.1.1.4.1	Plasmide.....	39
3.1.1.4.2	Plasmid-DNA	39
3.1.2	Verbrauchsmaterial, Reagenzien und Chemikalien	40
3.1.2.1	Plastikwaren und Verbrauchsmaterial.....	40
3.1.2.2	Reagenzien und Gebrauchsmaterial für die Mikroskopie	40
3.1.2.3	Kits.....	41
3.1.2.4	Reagenzien für die Zellkultur.....	41
3.1.2.5	Transfektionsreagenzien	41
3.1.2.6	Chemikalien.....	41
3.1.3	Rezeptorliganden	42
3.2	<i>Methoden.....</i>	<i>44</i>
3.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	44
3.2.1.1	Kultivierung prokaryotischer Zellen	44
3.2.1.2	Generierung kompetenter Bakterien	44
3.2.1.3	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> mittels KCM-Methode.....	44
3.2.1.4	Testung der kompetenten Zellen auf Transformationseffizienz	45
3.2.1.5	DNA-Präparation	45
3.2.1.5.1	Minipräparation.....	45
3.2.1.5.2	Midipräparation mit Hilfe von Qiagen-Säulen.....	45
3.2.1.5.3	DNA-Präparation mittels Qiagen Plasmid <i>Plus</i> Midi Kit	46
3.2.1.6	Bestimmung von DNA-Konzentration und –Reinheit	46
3.2.1.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	47
3.2.1.8	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen.....	47
3.2.1.9	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction, PCR</i>)	48
3.2.1.10	Restriktionsverdau.....	48
3.2.1.11	Ligation	48
3.2.2	Zellbiologische Methoden, Zellkultur.	49
3.2.2.1	Kultivierung von Zellen	49
3.2.2.2	Auftauen von Zellen.....	49
3.2.2.3	Einfrieren von Zellen.....	49
3.2.2.4	Testung von Zellen auf Mycoplasmenbefall	50
3.2.2.5	Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer	50
3.2.2.6	Beschichten von Deckgläschen mit Poly-D-Lysin	51
3.2.2.7	Generierung stabiler Zelllinien.....	51
3.2.2.8	Markierung („ <i>Labeln</i> “) von Zellen mit FIAsH.....	51
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden	52

3.2.3.1 Membranpräparation	52
3.2.3.2 Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford	53
3.2.3.3 Radioligandenbindung	53
3.2.4 Fluoreszenz-basierte Messmethoden	54
3.2.4.1 FRET-Mikroskopie	54
3.2.4.2 Konfokalmikroskopie	55
3.2.4.2.1 Translokation von β -Arrestin2	55
3.2.4.2.2 Untersuchung der Rezeptorsensoren auf Membranständigkeit	56
3.2.4.3 Ca^{2+} -Messungen	56
4. Ergebnisse	58
4.1 <i>Transfektionsoptimierung</i>	58
4.1.1 Transfektionsoptimierung in CHO-K1 Zellen	58
4.1.2 Transfektionsoptimierung in HEK TSA-Zellen	59
4.2 <i>Generierung der Rezeptorsensoren</i>	60
4.2.1 Sensoren des muskarinischen M_2 Acetylcholinrezeptors mit FIAsH unterhalb von TM 5	61
4.2.2 Sensoren des muskarinischen M_2 Acetylcholinrezeptors mit FIAsH unterhalb von TM 6	62
4.3 <i>Charakterisierung der Rezeptorsensoren</i>	66
4.3.1 Bestimmung der K_D - und K_i -Werte mittels Radioligandenbindung	66
4.3.2 Funktionelle Charakterisierung mittels Messung der Ca^{2+} -Freisetzung	67
4.3.3 Vergleich der β -Arrestin2 Translokation	69
4.4 <i>Charakterisierung der verwendeten Liganden</i>	71
4.4.1 Orthosterische Liganden	71
4.4.2 Allosterische Modulatoren	73
4.4.2.1 Erarbeitung eines Messschemas zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungskurven	73
4.4.2.1.1 Überlegungen zur Konzentration des eingesetzten Orthosters	73
4.4.2.1.2 Vergleich zweier Messschemata zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungskurven	74
4.4.2.2 FRET-Messungen zur Generierung konzentrationsabhängiger Effektkurven	77
4.4.2.2.1 Vergleich der EC_{50} -Werte allosterischer Modulatoren in Abhängigkeit des eingesetzten orthosterischen Liganden	80
4.4.2.2.2 Vergleich der EC_{50} -Werte allosterischer Modulatoren abhängig von den verwendeten Rezeptorsensoren	81
4.4.3 Charakterisierung von Atropin	82
4.4.4 Bestimmung der Deaktivierungskinetik des muskarinischen M_2 Acetylcholinrezeptors mit verschiedenen orthosterischen und allosterischen Liganden	82
4.5 <i>Ligandenselektive Änderung der Rezeptorkonformation</i>	84
4.5.1 Einfluss orthosterischer Liganden	84
4.5.2 Selektive Konformationsänderung durch allosterische Liganden	89
4.5.3 Beeinflussung der Rezeptorkonformation durch Hybrid 1 und Hybrid 2	91
4.6 <i>Regulierung nachgeschalteter Signalwege</i>	92
4.6.1 β -Arrestin2 Translokation nach Rezeptorstimulation mit orthosterischen Liganden	92
4.6.2 Regulierung nachgeschalteter Signalwege durch allosterische Liganden des muskarinischen M_2 Acetylcholinrezeptors	93
4.6.2.1 Aktivierung des G_i -Proteins	94
4.6.2.2 β -Arrestin2 Translokation	95
4.7 <i>FRET-mikroskopische Charakterisierung von Derivaten der Hybridsubstanzen</i>	96
4.7.1 Verlängerung der Linkerkette	96
4.7.1.1 Iper-8-Phth	96
4.7.1.2 Naph-7-Iper und Naph-8-Iper	97

4.7.2 Entfernung des allosterischen Bausteins – Iperoxo-Hexamethonium	98
4.7.3 Verkürzung der Linkerkette - N-Butylperoxo	100
<i>4.8 Charakterisierung von mutierten Sensoren des muskarinischen</i>	
<i>M₂ Acetylcholinrezeptors mittels FRET-Mikroskopie</i>	<i>101</i>
4.8.1 Mutation der orthosterischen Bindestelle	101
4.8.2 Mutation der allosterischen Bindestelle.....	103
4.8.2.1 FRET-Messungen mit allosterisch mutierten Sensoren des muskarinischen	
M ₂ Acetylcholinrezeptors	104
5. Diskussion	107
5.1 Klonierung von Sensoren des muskarinischen M ₂ Acetylcholinrezeptors	107
5.2 Charakterisierung der M ₂ AChR-Sensoren hinsichtlich Ligandenaffinität und	
Funktionalität	108
5.2.1 Radioligandenbindungsstudien	108
5.2.2 Bestimmung der G-Protein Aktivierung.....	108
5.2.3 Translokation von β-Arrestin2	109
5.3 Charakterisierung der verwendeten Liganden.....	110
5.3.1 Superagonistisches Verhalten des orthosterischen Liganden Iperoxo	110
5.3.2 Charakterisierung der allosterischen Testliganden als negative allosterische Modulatoren	
.....	110
5.3.3 Vergleich der Kinetik der Rezeptordeaktivierung mit allosterischen Modulatoren und Atropin	
.....	113
5.4 Ligandenselektive Beeinflussung der Konformation des muskarinischen	
M ₂ Acetylcholinrezeptors.....	114
5.4.1 Einfluss orthosterischer Liganden	114
5.4.2 Beeinflussung der Rezeptorkonformation durch allosterische Liganden	118
5.4.3 Einfluss ausgewählter dualsterischer Liganden	118
5.5 Untersuchung der funktionellen Selektivität und nachgeschalteter Signalwege.....	119
5.5.1 Einfluss orthosterischer Liganden auf die β-Arrestin2 Translokation.....	119
5.5.2 Einfluss allosterischer Liganden auf die G-Protein Aktivierung und β-Arrestin2 Translokation	121
5.6 FRET-mikroskopische Untersuchung von mutierten Sensoren des muskarinischen	
M ₂ Acetylcholinrezeptors.....	122
5.6.1 Mutation der orthosterischen Bindestelle	122
5.6.2 Mutation der allosterischen Bindestelle.....	122
5.7 FRET-mikroskopische Untersuchungen von Analoga der Hybridsubstanzen	123
6. Zusammenfassung/Summary.....	125
6.1 Zusammenfassung	125
6.2 Summary	127
7. Abkürzungsverzeichnis	129
8. Anhang	134
8.1 Strukturformeln orthosterischer Liganden.....	134
9. Literaturverzeichnis.....	137

10. Eidesstattliche Erklärung/Affidavit	156
10.1 Eidesstattliche Erklärung.....	156
10.2 Affidavit.....	156
11. Publikationen/Konferenzbeiträge.....	157
11.1 Publikationen	157
11.2 Konferenzbeiträge.....	157
12. Danksagung	158
13. Curriculum Vitae	159

1. Einleitung

1.1 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Die Weiterleitung intra- oder extrazellulärer Stimuli erfolgt über Rezeptoren, die sowohl im Zytosol, als auch an der Zellmembran lokalisiert sind. In eukaryotischen Organismen werden membranständige Rezeptoren in ligandengesteuerte Ionenkanäle (ionotrope Rezeptoren) und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (*G Protein-coupled receptors*, GPCR, metabotrope Rezeptoren) untergliedert. Ca. 1200 Gene des humanen Genoms codieren für GPCR. Somit stellen diese die weitaus größte Rezeptorfamilie dar [1]. Sie reagieren auf sensorische Stimuli, wie beispielsweise Licht, Geruch und Geschmack, aber auch chemische Reize durch Pheromone, Hormone (z.B. Adrenalin, Glucagon), Proteine, Peptide, oder Neurotransmitter (z.B. Acetylcholin, Serotonin). Diese extrazellulären Reize werden von GPCR über GTP-bindende Proteine (G-Proteine) und andere Effektorproteine in das Zellinnere weitergeleitet und nachgeschaltete (*downstream*) Signalwege werden reguliert. Auf diese Weise greifen GPCR in eine Vielzahl physiologischer Prozesse ein, was sie zu wichtigen Zielstrukturen (*drug target*) der pharmakologischen Therapie macht. Die Wirkung von ca. 40% aller therapeutisch eingesetzten Pharmaka beruht auf einer Wechselwirkung mit GPCR [2].

1.1.1 Kristallstruktur

Die Kristallstruktur von GPCR konnte erstmals für Rhodopsin (Abb. 1, Seite 3) gelöst werden [3] (PDB entry: 1F88).

GPCR werden durch einen extrazellulären Aminoterminus (N-Terminus) und sieben α -helikale Transmembrandomänen (TM) aufgebaut. Im Zytosol liegt ein Carboxyterminus (C-Terminus) vor [4]. Die TM durchspannen gegen den Uhrzeigersinn angeordnet die Membran und sind abwechselnd durch drei intrazelluläre (*intracellular loop*, IL) und drei extrazelluläre (*extracellular loop*, EL) Rezeptorschleifen miteinander verbunden. Einige GPCR verfügen zudem über eine achte Helix, die sich im Zytosol an TM 7 anschließt und parallel zur Zellmembran orientiert ist [5]. Eine Disulfidbrücke zwischen konservierten Cysteinen in IL 2 und im extrazellulären Bereich von TM 3 stabilisiert die ringförmige Struktur der GPCR. Durch die ringförmige Anordnung der TM bildet sich eine Vertiefung im Inneren des Rezeptors, die bei manchen GPCR die Ligandenbindetasche beherbergt [6].

Andere GPCR, wie beispielsweise metabotrope Glutamatrezeptoren binden extrazelluläre Liganden über den N-Terminus. Diese Rezeptoren sind durch eine, verglichen mit anderen GPCR, deutlich verlängerte N-terminale Aminosäurekette charakterisiert, deren räumliche Anordnung an die Form einer Venus-Fliegenfalle erinnert [7]. Im intrazellulären Bereich verfügen GPCR über Bindestellen für G-Proteine und andere Signalmoleküle, die extrazelluläre Signale in das Zellinnere weiterleiten.

1.1.2 Phylogenetische Unterteilung

Es wurden verschiedene Ansätze entwickelt, um GPCR in unterschiedliche Klassen einzuteilen. So wurden sie beispielsweise anhand physiologischer oder struktureller Eigenschaften untergliedert. Die Art, extrazellulär Liganden zu binden, stellte ein weiteres Unterscheidungskriterium dar [8]. Eine Klassifizierung der GPCR anhand funktioneller Merkmale und Sequenzhomologie führte zu deren Einteilung in sechs Gruppen (A-F). In diesen Gruppen sind GPCR zusammengefasst, die sowohl in Wirbeltieren, als auch in wirbellosen Tieren exprimiert werden.

- Klasse A: Rhodopsin-ähnliche GPCR
- Klasse B: Sekretinrezeptor-ähnliche GPCR
- Klasse C: metabotrope Glutamatrezeptoren
- Klasse D: fungale Pheromonrezeptoren
- Klasse E: cAMP Rezeptoren
- Klasse F: Frizzled/Smoothened Rezeptoren

Die GPCR der Klassen D und E existieren im humanen Organismus nicht, sondern werden in Hefen und Nematoden exprimiert.

Mit Hilfe phylogenetischer Untersuchungen der GPCR-Proteinsequenzen gelang im sogenannten GRAFS-System eine Unterscheidung der GPCR in fünf Hauptfamilien [8, 9]:

Glutamat-Familie	(15 GPCR)
Rhodopsin-Familie	(701 GPCR)
Adhäsions-Rezeptoren	(24 GPCR)
Frizzled/Taste2 Rezeptoren	(24 GPCR)
Sekretin-Familie	(15 GPCR)

Mit bisher 701 bekannten GPCR stellt die Rhodopsin-Familie die größte der Hauptfamilien dar. Bis auf wenige Ausnahmen sind die in der Rhodopsin-Familie zusammengefassten GPCR durch ein NSxxNPxxY-Motiv in TM 7 und ein E/DRY-Motiv im intrazellulären Bereich von TM 3 gekennzeichnet [8].

1.1.3 Rezeptoraktivierung

Eine aktivierungsabhängige Änderung der Rezeptorkonformation wurde an zahlreichen GPCR detektiert. Wie an Rhodopsin bzw. dem β_2 Adrenorezeptor (AR) gezeigt wurde, liegen GPCR in einem Gleichgewicht zwischen inaktiven und aktiven Konformationen vor [10, 11]. Die Bindung eines Liganden an GPCR führt zu einer ligandenspezifischen Konformationsänderung des Rezeptors, was den Austausch von Guanosin-5'-diphosphat (GDP) gegen Guanosin-5'-triphosphat (GTP) im GTP-bindenden Protein (G-Protein) katalysiert.

Agonisten verschieben das Gleichgewicht zwischen inaktiver und aktiver Rezeptorkonformation in Richtung der aktiven Rezeptorkonformation, während inverse Agonisten die inaktive Konformation begünstigen. Antagonisten dagegen beeinflussen das Gleichgewicht zwischen den unterschiedlichen Konformationen des Rezeptors nicht.

Am Beispiel des Rhodopsin wurde gezeigt, dass die aktivierungsabhängige Konformationsänderung von GPCR resultiert aus dem Aufbrechen des *ionic lock* und einem anschließenden *rotamer toggle switch* [9, 12-14]. *Ionic lock* bezeichnet eine Salzbrücke zwischen den Aminosäuren Glutamat und Arginin des E/DRY-Motivs in TM 3 und den Aminosäuren Glutamat und Threonin im zytoplasmatischen Bereich von TM 6. Diese Salzbrücke stabilisiert den Rezeptor in seiner inaktiven Konformation. Wird der *ionic lock* durch das Binden von Agonisten an GPCR aufgebrochen, kommt es zu einer im Uhrzeigersinn erfolgenden Auswärtsbewegung von TM 6 relativ zu TM 3 (*rotamer toggle switch*) [15, 16]. TM 6 neigt sich im extrazellulären Bereich TM 5 zu und wird in dieser Position durch Wechselwirkungen mit TM 5 und TM 7 stabilisiert [17]. Die Ligandenbindetasche im extrazellulären Bereich der TM-Region wird dadurch verengt [9]. Im zytoplasmatischen Bereich nimmt die Entfernung zwischen TM 5 und TM 6 zu, was in der Öffnung einer Bindetasche für das G-Protein resultiert [18]. Auch in Bereichen von TM 1 und TM 7, sowie im C-Terminus treten Konformationsänderungen auf [19].

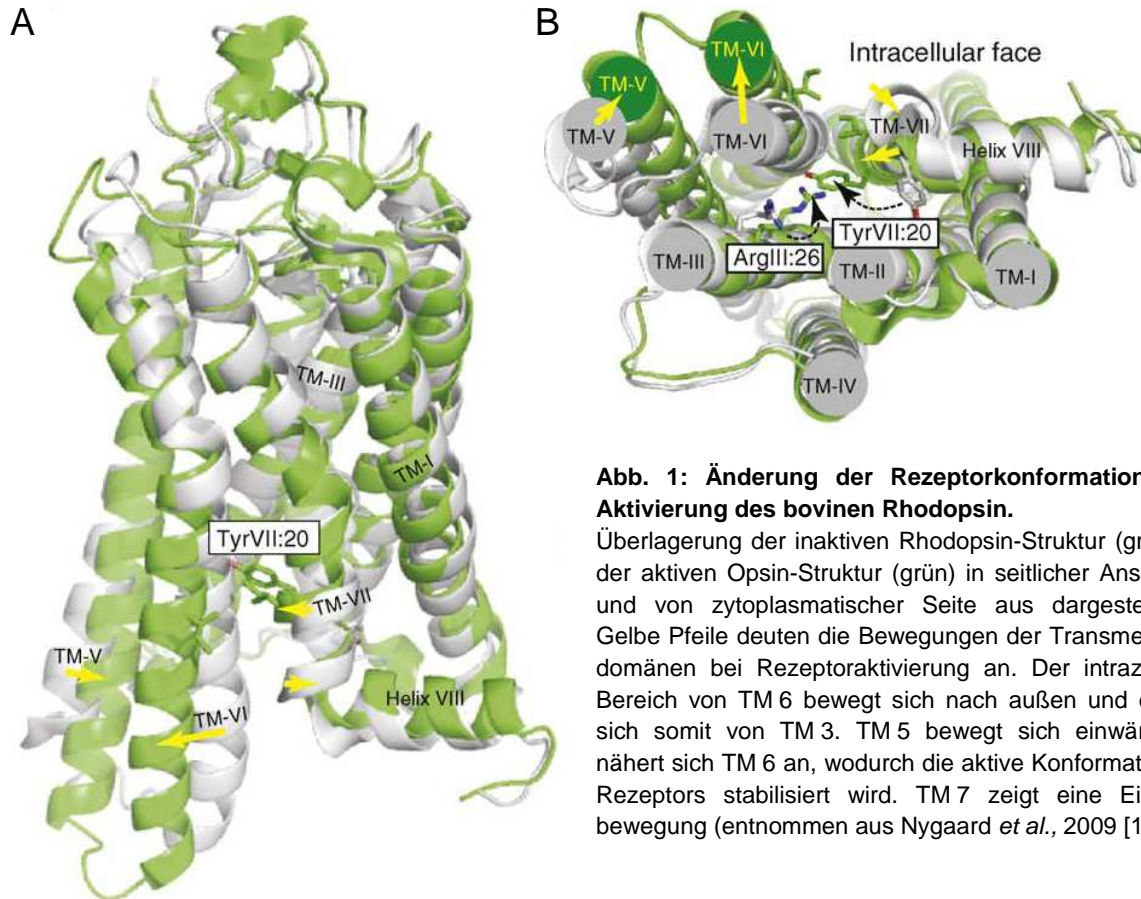


Abb. 1: Änderung der Rezeptorkonformation nach Aktivierung des bovinen Rhodopsin.

Überlagerung der inaktiven Rhodopsin-Struktur (grau) mit der aktiven Opsin-Struktur (grün) in seitlicher Ansicht (A) und von zytoplasmatischer Seite aus dargestellt (B). Gelbe Pfeile deuten die Bewegungen der Transmembrandomänen bei Rezeptoraktivierung an. Der intrazelluläre Bereich von TM 6 bewegt sich nach außen und entfernt sich somit von TM 3. TM 5 bewegt sich einwärts und nähert sich TM 6 an, wodurch die aktive Konformation des Rezeptors stabilisiert wird. TM 7 zeigt eine Einwärtsbewegung (entnommen aus Nygaard *et al.*, 2009 [18]).

1.1.4 Signalweiterleitung

1.1.4.1 Signalweiterleitung über heterotrimere G-Proteine

Nach GPCR-Aktivierung erfolgt die Signalweiterleitung in den intrazellulären Bereich hauptsächlich über die Aktivierung von G-Proteinen.

Heterotrimere G-Proteine setzen sich aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit zusammen [20]. Die β - und γ -Untereinheiten sind über N-terminale *coiled coil* Wechselwirkungen miteinander verknüpft und bilden eine funktionelle Einheit, die auch während der Signalweiterleitung nicht aufgelöst wird. Die Untereinheiten sind mittels Myristoylierung am N-Terminus der α -Untereinheit und Isoprenylierung der γ -Untereinheit in der Zellmembran verankert [21-23]. Die $G\alpha$ -Untereinheit setzt sich aus zwei unterschiedlichen Domänen zusammen. Während eine Domäne das GTP bindet (*G domain*) und hydrolysiert, fungiert die zweite Domäne als eine Art „Deckel“, durch den das GTP im Inneren der $G\alpha$ -Untereinheit fixiert wird [24]. Durch die Aktivierung eines GPCR wird das an die $G\alpha$ -Untereinheit gebundene GDP freigesetzt und GTP wird stattdessen gebunden. Dabei kommt es zu einer Konformationsänderung der α -Untereinheit [25]. Der aktivierte Rezeptor nimmt hier die Rolle eines GTP-Austauschfaktors (*GTP Exchange factor, GEF*) für das G-Protein ein. Der Austausch von GDP gegen GTP stimuliert die Dissoziation der α - und der $\beta\gamma$ -Untereinheiten des G-Proteins. Alternativ wird auch eine aktivierungsabhängige Umorientierung der G-Protein Untereinheiten zueinander ohne nachfolgende Dissoziation voneinander diskutiert [26].

Sowohl α -, als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit können im Intrazellulärraum unabhängig voneinander unterschiedliche Signalkaskaden regulieren [27, 28]. Durch die intrinsische GTPase Aktivität der α -Untereinheit wird das gebundene GTP unter Freiwerden eines Phosphatrestes zu GDP und H_2O hydrolysiert, die Untereinheiten reassoziieren wieder miteinander und die

Regulation nachgeschalteter Signalkaskaden wird terminiert. Das G-Protein geht wieder in seinen inaktiven Zustand über [29, 30].

Es existieren zwei unterschiedliche Modelle, um die Wechselwirkung zwischen GPCR und G-Protein zu beschreiben:

Beim **collision coupling** Modell erfolgt die Bindung eines G-Proteins an einen Rezeptor nach Agonist-Aktivierung [31]. Dagegen postuliert das **precoupling** Modell, dass Rezeptor und G-Protein auch in Abwesenheit eines Agonisten einen stabilen Komplex bilden [31, 32]. Entsprechend dieses Modells wird die Konformation des Rezeptor–G-Protein Komplexes durch Agonistbindung verändert. Dies induziert eine Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden.

Sowohl das *collision coupling*, als auch das *precoupling* Modell können mit Hilfe des ternären Komplexmodells (*ternary complex model*, TCM) beschrieben werden [11].

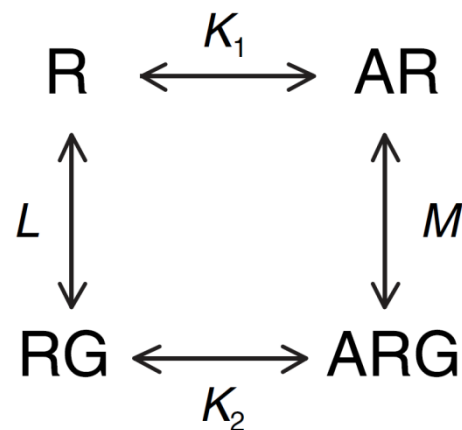


Abb. 2: Ternäres Komplexmodell zur Beschreibung der Wechselwirkungen zwischen Rezeptor, Agonist und G-Protein.

Mit unterschiedlichen Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten (K_1 , L , M , K_2) gehen Agonist (A), Rezeptor (R) und G-Protein (G) stabile Komplexe (AR, RG und ARG = ternärer Komplex) ein. Das ternäre Komplexmodell geht dabei davon aus, dass der Rezeptor nur in einem inaktiven oder voll aktiven Zustand vorliegt, Zwischenstadien werden hier nicht berücksichtigt (entnommen aus Vauquelin und Liefde, 2005 [11]).

1.1.4.1.1 Unterscheidung von G-Proteinen anhand funktioneller Merkmale

Bislang wurden mit Hilfe von Klonierungs- und Sequenzierungstechniken 23 α -, 6 β - und 12 γ -Untereinheiten identifiziert [33, 34], die eine Vielzahl unterschiedlicher G-Proteine bilden und unterschiedliche, nachgeschaltete Signalwege aktivieren können. Mittels Analyse der Homologie von Aminosäuresequenzen identifizierter $G\alpha$ -Untereinheiten wird eine Einteilung der G-Proteine in vier verschiedene Familien vorgenommen [35]. Jede dieser Familien ist in der Lage, unterschiedliche Signalwege zu modulieren. Die G-Proteine werden entsprechend der durch die $G\alpha$ -Untereinheit vermittelten Effekte wie folgt in die jeweiligen Familien unterteilt [36-39]:

- G_s-Familie:** Aktivierung der Adenylylzyklase → gesteigerte Bildung von cAMP
- G_{i/o}-Familie:** Hemmung der Adenylylzyklase → gehemmt Bildung von cAMP
Stimulation von PDE6 → Abbau von cGMP
- G_q-Familie:** Stimulation der Phospholipase C β → Bildung von IP₃ und DAG
→ Freisetzung von Ca²⁺
- G_{12/13}-Familie:** Stimulation von RhoA-Proteinen → Stimulation von Rho-Kinasen

1.1.4.2 Arrestine als Effektorproteine

1.1.4.2.1 Definition

Bislang konnten in Wirbeltieren vier verschiedene Formen von Arrestinen identifiziert werden. Zwei visuelle Arrestine (Arrestin1 und Arrestin4), deren Expression hauptsächlich auf die Retina (Stäbchen- und Zapfenzellen) begrenzt ist, und die β -Arrestine, β -Arrestin1 und 2, die ubiquitär im Organismus exprimiert werden [40]. Funktionell ergibt sich somit eine Einteilung der Arrestine in sensorische (Arrestin1 und Arrestin4) und nicht-visuelle Arrestine (β -Arrestin1 und 2). Im unstimulierten Zustand liegen visuelle Arrestine und β -Arrestin1 im Zellkern und im Zytoplasma vor, während β -Arrestin2 nur im Zytoplasma lokalisiert ist [41-43].

In Anwesenheit eines Agonisten und nach Rezeptorphosphorylierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) werden Arrestine zum agonistgebundenen, aktivierten Rezeptor an die Zellmembran rekrutiert [44], wo sie den phosphorylierten Rezeptor binden. Die Interaktion zwischen GPCR und Arrestin erfolgt in zwei aufeinander folgenden Schritten: In einem ersten Schritt „erkennt“ Arrestin die aktivierte Konformation des Rezeptors (*activation sensor*), anschließend bilden sich Wechselwirkungen zwischen den Phosphatresten des phosphorylierten Rezeptors und dem *phosphorylation sensor* des Arrestin [45]. Dadurch ändert sich die Konformation des Arrestin und zusätzliche Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Arrestin werden ermöglicht [46, 47]. Durch die Bindung der Arrestine an den aktivierten Rezeptor wird dieser von dem jeweils gebundenen G-Protein entkoppelt, wodurch die Regulation G-Protein-vermittelter Signalwege terminiert wird [48]. Ob ein Rezeptor anschließend desensibilisiert oder internalisiert wird, oder ob β -Arrestin-vermittelt nachgeschaltete Signalwege reguliert werden, ist von der Konformationsänderung des Rezeptors und des Arrestin, sowie von dem Phosphorylierungsmuster des GPCR abhängig [49-52].

1.1.4.2.2 β -Arrestine als Signaltransduktoren

β -Arrestinen, die unter anderem bei der Desensibilisierung von GPCR eine Rolle spielen, kommt eine immer größere Bedeutung als Signaltransduktoren und Adapterproteine bei der Modulation G-Protein unabhängiger Signalkaskaden zu [53]. Durch Bindung von β -Arrestin an phosphorylierte Rezeptoren können diese weitere Signalwege, beispielsweise durch die Aktivierung der Tyrosinkinase Src (*sarcoma tyrosin kinase*), oder der MAPKinase (*mitogen-activated protein kinase*) [54, 55] regulieren. β -Arrestine fungieren hierbei als Adapterproteine, durch die Rezeptorsubstrate zu aktivierten GPCR rekrutiert werden, was eine Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Substrat ermöglicht [40].

So konnte gezeigt werden, dass β -Arrestin2 bei der GPCR-vermittelten Regulation des MAPKinase Signalwegs eine Rolle als Gerüstprotein, das Bildung von Proteinkomplexen vermittelt (*Scaffold*-Protein), einnimmt [56]. Darüber hinaus konnte die Beteiligung von β -Arrestin1 an der Aktivierung von *extracellular signal regulated kinases* (ERK1 und ERK2) nachgewiesen werden [57, 58]. Einen detaillierten Überblick über die β -Arrestin-vermittelte, G-Protein unabhängige Regulation von Signalkaskaden bietet ein Review von Lefkowitz und Shenoy [51].

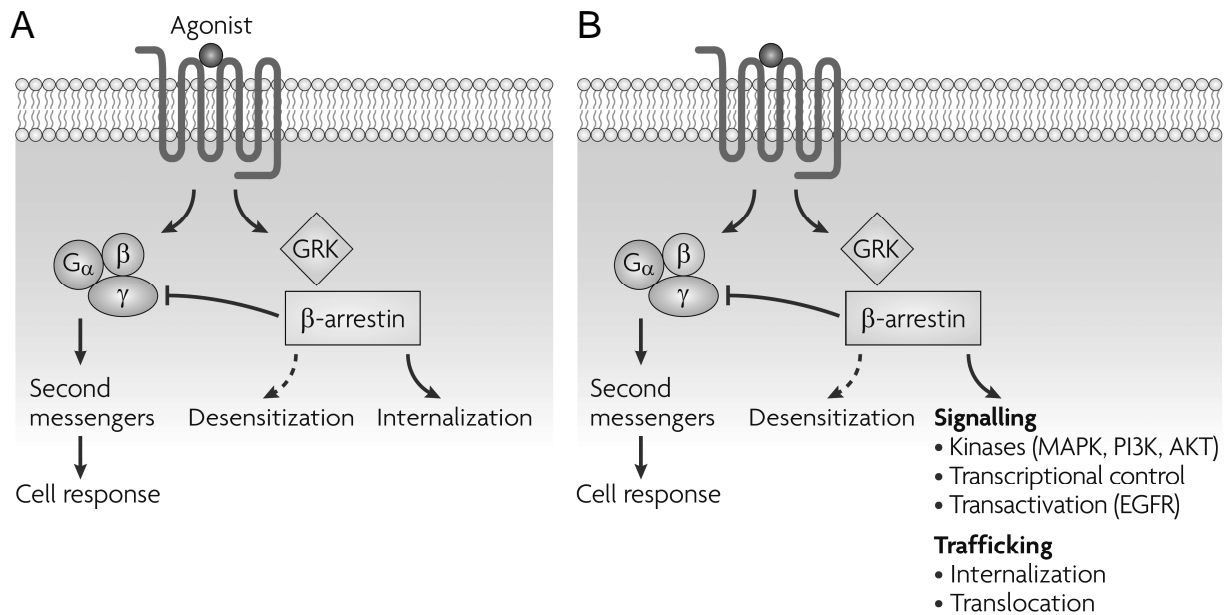


Abb. 3: G-Protein- und β -Arrestin-vermittelte Signalwege.

In der klassischen Vorstellung folgt nach Aktivierung von GPCR die Regulation nachgeschalteter Signalkaskaden mittels G-Proteinen, während β -Arrestine die Desensibilisierung und Internalisierung des GPCR steuern (A). Nach neueren Modellen kann eine GPCR-Aktivierung in der Aktivierung von sowohl G-Protein-, als auch β -Arrestin-vermittelten Signalwege resultieren. Darüber hinaus werden durch β -Arrestine auch Internalisierung und Desensibilisierung des GPCR gesteuert (B) (abgeändert nach Rajagopal, Rajagopal und Lefkowitz, 2010 [59]).

1.1.5 Rezeptordesensibilisierung

Durch Rezeptordesensibilisierung kann die GPCR-vermittelte Aktivierung von Signalwegen abgeschwächt, oder vollkommen terminiert werden [60]. Die Aktivierbarkeit eines Rezeptors, der wiederholt oder dauerhaft stimuliert wurde, wird somit herunter reguliert. Es wird zwischen einer homologen und einer heterologen Desensibilisierung unterschieden.

Von einer homologen Rezeptordesensibilisierung spricht man, wenn die Phosphorylierung des Rezeptors durch GRKs vermittelt wird. Dazu ist die Anwesenheit eines Agonisten nötig, da nur aktivierte Rezeptoren von GRKs als Substrat erkannt werden [61]. Eine heterologe Desensibilisierung liegt vor, wenn der Rezeptor aktivierungsunabhängig durch die Proteinkinasen C oder A (PKC, PKA) phosphoryliert wird. Diese Kinasen können auch durch Stimuli anderer Rezeptoren aktiviert werden, die Anwesenheit eines Agonisten des zu phosphorylierenden GPCR ist nicht notwendig [54, 62]. Durch die Bindung von Arrestin an den phosphorylierten Rezeptor wird die Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein sterisch gehindert. Die Regulation G-Protein abhängiger Signalwege ist somit nicht mehr möglich [63].

1.1.6 Rezeptorinternalisierung

Durch Rezeptorinternalisierung (Endozytose) werden phosphorylierte GPCR nach Desensibilisierung mittels Stachelsaumbläschen (*clathrin-coated vesicles*, CCVs) von der Zellmembran in intrazelluläre Kompartimente transportiert. Es konnte gezeigt werden, dass β -Arrestine bei diesem Prozess Clathrin direkt, hochaffin und stöchiometrisch komplexieren [64]. Das konstitutiv phosphorylierte β -Arrestin wird nach Rezeptoraktivierung zum phosphorylierten Rezeptor rekrutiert und dort anschließend dephosphoryliert [65]. Der Dephosphorylierungsschritt stellt eine nötige Voraussetzung zur Internalisierung des GPCR- β -Arrestin Komplexes in CCVs dar. Abgesehen von Clathrin können an der Rezeptor-

internalisierung auch die Adapterproteine AP-2 (Adapterprotein 2) und NSF (*N-Ethylmaleimide sensitive fusion protein*) als Mediatoren beteiligt sein [65-67].

Die Affinität, mit der β -Arrestine an aktivierte, phosphorylierte Rezeptoren binden hängt von dem Phosphorylierungsmuster der GPCR ab [41]. Basierend darauf können GPCR in zwei unterschiedliche Klassen (A und B) eingeteilt werden.

Entsprechend dieser Einteilung zeigen Klasse A GPCR (z.B. β_2 AR, μ -Opioidrezeptor) eine höhere Affinität für β -Arrestin2, als für β -Arrestin1 [41]. Sie werden nur schwach von β -Arrestinen gebunden. Diese translozieren den Rezeptor zu CCVs nahe der Zelloberfläche. Der Komplex aus GPCR und β -Arrestin dissoziiert allerdings wieder, bevor der Rezeptor internalisiert wird. Im Zytosol wird der Rezeptor anschließend dephosphoryliert und zurück an die Zellmembran transportiert (*resensitization, recycling*) [51, 68].

Im Gegensatz dazu bilden die Klasse B GPCR (z.B. Vasopressinrezeptor V_2R) einen Komplex mit β -Arrestin, der auch während der Rezeptorinternalisierung nicht gelöst wird [45]. Sie werden anschließend entweder in großen Endosomen im Zytosol zurück gehalten, oder dem lysosomalen Abbau (*degradation*) zugeführt [41, 69]. Klasse B GPCR binden beide β -Arrestin-Isoformen mit vergleichbarer Affinität.

1.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

1.2.1 Charakterisierung der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren

1.2.1.1 Klassifikation und Unterteilung in Subtypen

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) gehören zur Familie der Rhodopsin-ähnlichen GPCR [70, 71]. Sie teilen charakteristische GPCR-Merkmale wie beispielsweise den heptahelikalen Aufbau mit je drei intra- und extrazellulären Rezeptorschleifen, einem intrazellulären C-Terminus und einem extrazellulären N-Terminus. Zudem verfügen sie auch über die konservierte Disulfidbrücke zwischen Cysteinen in EL 1 und 2, sowie das DRY-Motiv im Bereich von TM 3 und EL 2 [72, 73].

Mit Hilfe von Radioligandenbindungsstudien, Klonierungsexperimenten und Sequenzanalysen konnten fünf Subtypen ($M_1 - M_5$) der mAChR identifiziert werden [74, 75]. Alle Subtypen der mAChR weisen eine große dritte intrazelluläre Rezeptorschleife auf (157 - 240 Aminosäuren lang), die sowohl bei der G-Protein Kopplung, als auch bei der β -Arrestin Rekrutierung eine entscheidende Rolle spielt [76-78]. Zudem zeigen die Subtypen der mAChR einen hohen Grad an Sequenzhomologie im Bereich der TMs [79, 80], hier vor allem in TM 2, 3 und 7. Ein größerer Unterschied der Aminosäuresequenz tritt hingegen im Bereich des C- und N-Terminus auf. Bis auf die direkt an die TMs angrenzenden Bereiche liegt in IL 3 keine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der $M_1 - M_5$ Subtypen vor. Dies korreliert mit der Fähigkeit unterschiedlicher mAChR-Subtypen zur Aktivierung verschiedener G-Proteine [76].

1.2.1.2 Kristallstruktur

Bislang wurden die Kristallstrukturen von zwei mAChR-Subtypen aufgeklärt.

Die Struktur des humanen M_2 AChR gebunden an den Antagonisten 3-Quinuclidinylbenzilat (QNB, Abb. 4, Seite 8) wurde von Haga *et al.* [6] gelöst (PDB entry: 3UON). Zwischen der Struktur des M_2 AChR und der bereits bekannten Rhodopsin-Struktur bestehen auffallende Ähnlichkeiten. So zeigt sich im zytoplasmatischen Bereich des M_2 AChR keine Interaktion zwischen dem Arginin des E/DRY-Motivs in TM 3 mit einem konservierten Glutamat in TM 6.

Stattdessen bildet das E/DRY-Arginin eine Salzbrücke mit einem benachbarten Aspartat aus. Eine derartige Wechselwirkung konnte auch in der inaktiven Konformation des Rhodopsins beobachtet werden [81]. IL 2 des M_2 AChR zeigt ähnlich wie im β_2 AR eine helikale Struktur [82]. Der extrazelluläre Bereich des M_2 AChR zeigt sich relativ einfach und offen strukturiert. Durch Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen einem Cystein in der N-terminalen Region von TM 3 und einem Cystein in EL 2 wird der relativ lange EL 2 in seiner Konformation stabilisiert. Eine weitere Disulfidbrücke konnte zwischen Cysteinen im EL 3 detektiert werden. Durch die ringförmige Anordnung der TMs wird ein Kanal im Inneren des Rezeptors gebildet, in dem die orthosterische Ligandenbindestelle lokalisiert werden konnte. Die, in allen fünf Subtypen hochkonservierten, Aminosäuren Leucin und Isoleucin in TM 2, TM 4 und TM 6 bilden unterhalb der orthosterischen Ligandenbindestelle eine Art „Deckel“, durch den der Kanal zum Extrazellulärraum hin isoliert wird. Wie die 3D-Struktur des β_2 AR zeigt [83], tritt bei der Aktivierung von GPCR eine Kontraktion der orthosterischen Bindestelle durch eine Einwärtsbewegung von TM 5 auf. Der relativ große Ligand QNB verhindert im M_2 AChR diese Einwärtsbewegung und fixiert den Rezeptor somit in seiner inaktiven Konformation. Mittels *Docking*-Studien unter Verwendung des kleineren, endogenen Liganden Acetylcholin (ACh) konnte jedoch gezeigt werden, dass auch im M_2 AChR ein Übergang von der inaktiven in die aktive Rezeptorkonformation durch eine Einwärtsbewegung der TM 5 möglich ist.

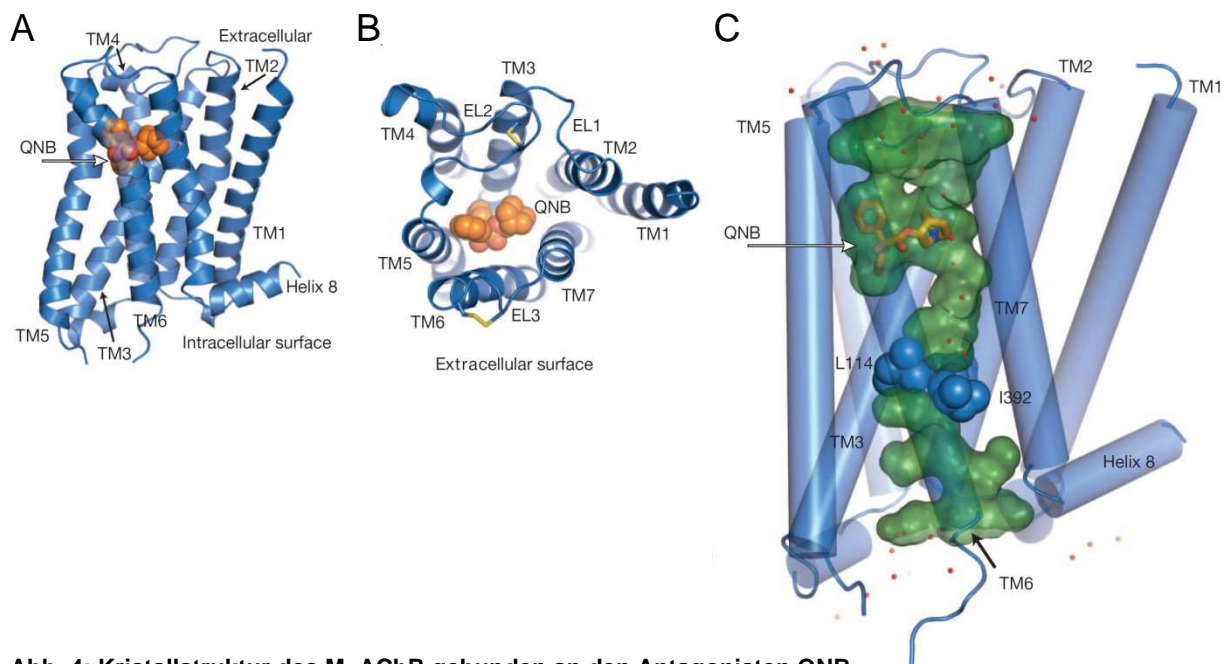


Abb. 4: Kristallstruktur des M_2 AChR gebunden an den Antagonisten QNB.

(A) M_2 AChR (blau) gebunden an QNB (orange) im Profil. (B) Zytoplasmatische Oberfläche des M_2 AChR gebunden an QNB, das konservierte DRY-Motiv in EL 3 ist gelb markiert. (C) Zwischen den Transmembrandomänen bildet sich ein Kanal mit hydrophiler Oberfläche (grün), der sich von der extrazellulären Oberfläche bis tief unterhalb der orthosterischen Bindestelle in den Rezeptor ausdehnt. Unterbrochen wird der Kanal durch drei hydrophobe Aminosäuren (blau), die in das Innere des Kanals ragen (entnommen aus Haga *et al.*, 2012 [6]).

Auch die Kristallstruktur des M_3 AChR der Ratte (PDB entry: 4DAJ) konnte aufgeklärt werden. Kruse *et al.* [84] kristallisierten den M_3 AChR gebunden an den inversen Agonisten Tiotropium. Dabei wurde ein hoher Grad an Übereinstimmung mit der Kristallstruktur des M_2 AChR detektiert. Obwohl sowohl IL 1 und 2, als auch EL 1-3 von M_2 und M_3 nur eine geringe Homologie der Aminosäuresequenzen aufweisen, zeigten diese Bereiche dennoch

eine hohe Ähnlichkeit in der Tertiärstruktur. Auch der bereits für den M_2 AChR beschriebene hydrophile Kanal zwischen den TMs [6], der auch die orthosterische Bindestelle enthält, konnte am M_3 AChR gezeigt werden. Tiotropium bindet tief in diesem Kanal und wird durch einen „Deckel“ aus drei Tyrosinen vom Extrazellulärraum abgetrennt. Diese Tyrosine sind in allen fünf Subtypen konserviert. Im Gegensatz zum M_2 AChR zeigt die 3D-Struktur des M_3 AChR eine zusätzliche Tasche in EL 2.

1.2.1.3 Endogener Ligand und orthosterische Bindestelle

Der endogene Ligand ACh vermittelt sowohl auf Ebene des zentralen Nervensystems (ZNS), als auch in der Peripherie eines Organismus cholinerge Effekte durch Bindung an mAChR, oder Nikotinrezeptoren (nAChR, ligandengesteuerter Ionenkanal). So wird beispielsweise der Parasympathikus-Tonus cholinerg reguliert.

Die Synthese des Neurotransmitters ACh erfolgt enzymatisch aus den Vorstufen Cholin und Acetyl-Coenzym A mittels der Cholinacetyltransferase. Als Reaktion auf einen Stimulus wird ACh in einem zirkadianen Rhythmus freigesetzt [85] und bindet an eine Bindestelle im transmembranären Bereich der mAChR (= orthosterische Bindestelle). Diese Bindestelle liegt in einem, von den TMs gebildeten Kanal im Inneren des Rezeptors und ist in allen mAChR-Subtypen hoch konserviert [6]. Dabei geht die Aminosäure Asp103^{3,32} eine Wechselwirkung mit der Cholin-Gruppe des ACh ein, während die Carbonylgruppe des ACh von Asn404^{6,52} gebunden wird. In Mutagenesestudien konnten noch zusätzliche Aminosäuren identifiziert werden, die in allen mAChR-Subtypen konserviert vorliegen, und die bei der Bindung orthosterischer Liganden an mAChR eine Schlüsselposition einnehmen [73, 76, 86-89]. Die orthosterische Bindestelle dient auch den bisher bekannten und teilweise in der pharmakologischen Therapie verwendeten Liganden der mAChR als Andockstelle, über die sie den Rezeptor modulieren. Durch den hohen Konservierungsgrad eben dieser Bindestelle erklärt sich die mangelnde Selektivität, mit der orthosterische mAChR-Liganden nicht nur den gewünschten Rezeptorsubtyp, sondern alle Subtypen der mAChR binden.

1.2.1.4 G-Protein Aktivierung und Modulation nachgeschalteter Signalwege

Basierend auf den jeweiligen G-Protein Kopplungseigenschaften können die fünf mAChR-Subtypen in zwei verschiedene Kategorien eingeteilt werden [90, 91].

M_1 , M_3 und M_5 koppeln nach Rezeptoraktivierung bevorzugt an die Pertussistoxin-insensitiven G_q -Proteine und aktivieren nachfolgend die Phospholipasen C und D. Dies induziert eine vermehrte Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). Dagegen aktivieren M_2 und M_4 AChR nach Stimulation präferentiell die Pertussistoxin-sensitiven G_i - und G_o -Proteine. Diese inhibieren über die Hemmung der Adenylzyklase die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) [92-96]. Darüber hinaus konnte eine M_2 -abhängige Stimulation des $G_{s/olf}$ und des G_q Proteins nachgewiesen werden. Während zwischen M_2 AChR und G_i ein *precoupling* postuliert wird, wird für eine Wechselwirkung zwischen M_2 AChR und G_s bzw. G_q das *collision coupling* angenommen [31, 97].

Mittels Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass sowohl IL 2, als auch die N- und C-terminalen Bereiche von IL 3 und der proximale Teil des C-Terminus an der Bindung des jeweiligen G-Proteins beteiligt sind [79, 98-101]. Weitere Studien an mutierten M_2 AChR belegten, dass die Trunkierung des zentralen Teils von IL 3 und die damit verbundene Entfernung von Phosphorylierungsstellen die Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein nicht negativ beeinflusst [102-104]. Eine Beteiligung der $G\beta\gamma$ -Untereinheit an der Regulierung

G-Protein gekoppelter Signalwege konnte für M_2 und M_4 AChR nachgewiesen werden. Hier resultiert die Rezeptorstimulation in einer $G\beta\gamma$ -vermittelten Öffnung von G-Protein gekoppelten, einwärts gleichgerichteten Kaliumkanälen (*G-Protein coupled inward rectifying potassium channels*, GIRK) [77, 105, 106]. Auch konnte eine $G\beta\gamma$ -vermittelte Aktivierung der Phospholipase C β durch den M_2 AChR detektiert werden [107].

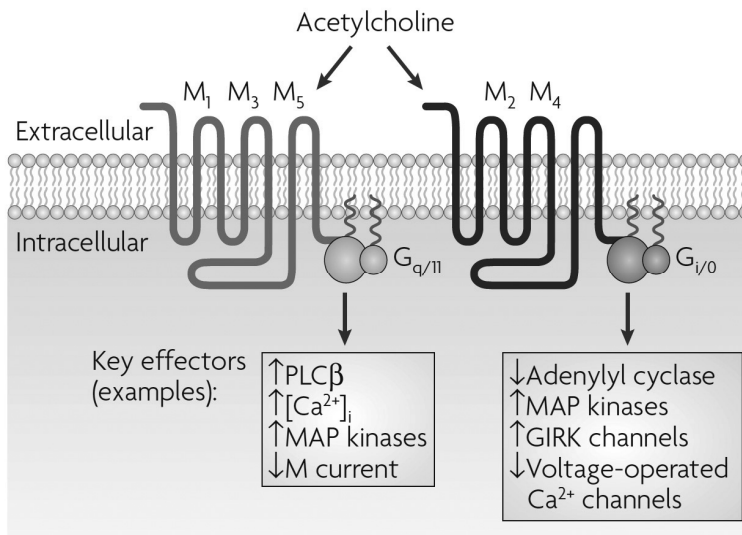


Abb. 5: Klassifizierung der mAChR-Subtypen basierend auf ihren G-Protein Kopplungseigenschaften.

Die Rezeptorsubtypen M_1 , M_3 , und M_5 koppeln vorwiegend das $G_{q/11}$ Protein und regulieren nachgeschaltet die Phospholipase C β , die Ca²⁺-Konzentration, MAPKinasen und den M-Kanal. Dagegen aktivieren M_2 und M_4 AChR überwiegend das G_i Protein, was in einer Hemmung der Adenylzyklase und der spannungsgesteuerten Ca²⁺-Kanäle resultiert. Es kommt zudem zu einer Aktivierung von MAPKinasen und GIRK-Kanälen (abgeändert nach Wess, Eglén und Gautam, 2007 [108]).

1.2.1.5 Rezeptorinternalisierung

Eine dauerhafte Stimulation der mAChR resultiert in deren Internalisierung in das Zytosol [73, 109, 110]. Dass dabei der Rezeptor auch ligandenunabhängig einer Internalisierung unterworfen wird, konnten Vögler *et al.* [110] demonstrieren. Auch scheint das Vorliegen eines aktivierten G-Proteins keine zwingende Voraussetzung für die mAChR-Internalisierung zu sein [111]. Dagegen ist die Rezeptorphosphorylierung an verschiedenen Serin- und Threoninresten in IL 3 nötig [112-114]. Für die Internalisierung der mAChR Subtypen M_1 , M_3 und M_4 konnte ein β -Arrestin-abhängiger Signalweg nachgewiesen werden [110, 115]. Darüber hinaus wird der M_3 AChR auch via eines durch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit vermittelten Signalwegs in den Intrazellulärraum sequestriert [116].

Studien zeigten, dass der M_2 AChR dagegen unabhängig von β -Arrestin und Clathrin internalisiert wird [117, 118]. Allerdings konnte in β -Arrestin *Knock-out* (KO) Mäusen keine Internalisierung des M_2 detektiert werden [119], was auf eine Involvierung von β -Arrestin bei der M_2 AChR Sequestrierung hindeutet. Auch Mosser *et al.* zeigten die essentielle Bedeutung einer Wechselwirkung mit β -Arrestin für die Internalisierung des M_2 AChR [120]. Entsprechend Untersuchungen von Vogler *et al.* und Roseberry und Hosey wurde eine Beteiligung von Dynamin und Caveolin an der Internalisierung des M_2 AChR als unwahrscheinlich angenommen [110, 117]. Dies steht allerdings in Kontrast mit Versuchen von Dessy *et al.* [121], die in Kardiomyozyten eine Caveolin- und Dynamin-vermittelte Sequestrierung beobachteten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bislang nicht zweifelsfrei belegt werden konnte, welche Proteine an der Internalisierung des M_2 AChR beteiligt sind.

1.2.2 Physiologische Charakterisierung

1.2.2.1 Expressionsmuster im humanen Organismus

Die mAChR-Subtypen, M_1 , M_4 und M_5 zeigen ein überwiegend ZNS-Expressionsmuster, während M_2 und M_3 AChR sowohl im ZNS, als auch in der Peripherie exprimiert werden [90]. Der M_1 AChR ist ubiquitär in Regionen des Vorderhirns, wie Cortex, Hippocampus und Striatum lokalisiert, findet sich aber auch peripher in der glatten Muskulatur. M_4 AChR werden fast ausschließlich im ZNS und dort vorwiegend im Vorderhirn gebildet [122]. In der Peripherie wird der M_2 sowohl im Herz und in glattem Muskelgewebe, als auch in der Haut gebildet [104, 123, 124]. Darüber hinaus ist er der dominierende mAChR-Subtyp im Rückenmark. Sowohl peripher, als auch im ZNS konnten M_2 AChR gefunden werden, durch deren Stimulation die Freisetzung des endogenen Liganden ACh über einen negativen Rückkopplungsmechanismus gehemmt wird [107]. Der M_3 AChR wird zentral und auch peripher exprimiert, das Ausmaß der zentralen Expression ist dabei allerdings geringer als das der übrigen mAChR-Subtypen [125]. Der M_3 AChR zeigt eine relativ hohe Expressionsdichte im Hypothalamus [126]. In der Peripherie wird er in glatten Muskelzellen, sowie in Drüsengewebe gebildet [123, 127], beispielsweise konnte seine Expression in den β -Zellen des Pankreas nachgewiesen werden [128, 129]. Der M_5 AChR wird in relativ geringem Ausmaß in neuronalen und nichtneuronalen Zellen gebildet [130, 131]. Er konnte als einziger aller mAChR-Subtypen in den dopaminergen Neuronen des Mittelhirns detektiert werden [132], wo seine Aktivierung in einer erhöhten Dopamin-Freisetzung resultiert. Zudem zeigte sich eine M_5 AChR-Expression in peripheren, sowie zentralen Blutgefäßen [133].

1.2.2.2 mAChR-vermittelte Effekte im zentralen Nervensystem

Der Mangel an Subtyp-selektiven Liganden für mAChR [93], sowie der Umstand, dass die mAChR-Subtypen nicht gewebsspezifisch exprimiert werden [134], erschwerte die Zuordnung physiologischer Funktionen zu spezifischen mAChR-Subtypen. Erst die Generierung von KO-Mausmodellen, in denen selektiv die Bildung eines der fünf Rezeptorsubtypen unterdrückt wurde, lieferte einen Einblick in die physiologischen Funktionen von M_1 – M_5 [108]:

Zentral gebildete mAChR sind an der Regulierung kognitiver, sensorischer, motorischer, verhaltensbezogener und autonomer Funktionen des Nervensystems beteiligt.

M_1 AChR KO-Mäuse zeigten eine vermehrte motorische Aktivität, die mit einem signifikanten Anstieg der Dopamin-Konzentration im Striatum in Zusammenhang gebracht wurde [135]. Pharmakologische Beobachtungen legen auch eine Beteiligung des M_1 AChR an Lern- und Erinnerungsprozessen nahe [122]. Auch an M_2 AChR KO-Mäusen konnten kognitive Defizite gezeigt werden [136]. Darüber hinaus wurde sowohl auf zentraler, als auch auf peripherer Ebene eine M_2 AChR -vermittelte Analgesie nach Rezeptorstimulation nachgewiesen. Dieser Effekt trat in geringerem Ausmaß auch nach Stimulation des M_4 AChR auf [137, 138]. In M_4 AChR KO-Mäusen war die motorische Aktivität gering, aber statistisch signifikant erhöht [137]. M_5 KO-Mäuse zeigten eine verminderte Vasodilatation zerebraler Blutgefäße nach Rezeptorstimulation [139]. Zudem war der M_5 AChR-vermittelte Anstieg der Dopamin-Freisetzung unterdrückt. Dadurch war der Belohnungseffekt nach Opioid-Applikation geringer, und Entzugssymptome nach Naloxon-Behandlung traten in geringerem Ausmaß auf [140].

1.2.2.3 Effekte mAChR-vermittelter Signalübertragung in peripheren Organen und Geweben

Vermittelt durch eine M₂AChR-Aktivierung treten am Herzen negativ chronotrope und inotrope Effekte auf [108, 141], wogegen für den M₁ AChR positiv chronotrope Effekte am menschlichen Herz nachgewiesen wurden [142]. In koronaren Blutgefäßen konnte M₂ AChR- und M₃AChR-vermittelt eine Vasodilatation detektiert werden [143, 144]. Eine Stimulation dieser beiden Rezeptorsubtypen führt zu einer Kontraktion glatter Muskelzellen in Ileus, Blase, Lunge und Magen [145, 146], wobei die Rolle des M₂AChR in diesem Prozess dominiert [123]. In zahlreichen Studien konnte eine Beteiligung von in β -Zellen lokalisierten M₃AChR an der Insulinfreisetzung und Glukose-Homöostase belegt werden [122, 147, 148]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass durch eine Stimulation von M₃AChR die Drüsensekretion angeregt werden kann [136].

1.2.3 Pharmakologische Bedeutung

1.2.3.1 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren als Zielstruktur in der Arzneimitteltherapie

Als Regulatoren zahlreicher, physiologischer und pathologischer Vorgänge spielen mAChR eine wichtige Rolle in der pharmakologischen Therapie unterschiedlicher Krankheiten, stellen aber auch bei der Erforschung zukünftiger Therapieoptionen potentielle Angriffspunkte dar. So werden sowohl der Agonist Carbachol als auch der Partialagonist Pilocarpin, und die Antagonisten Tropicamid und Atropin bereits seit Jahren erfolgreich in der Augenheilkunde zur Therapie des Glaukoms bzw. zur Pupillenerweiterung verwendet [149]. Pilocarpin spielt darüber hinaus auch bei der Mukoviszidose-Diagnose eine Rolle [150]. Die Therapie der Inkontinenz und des Reizblasensyndroms erfolgt mittels der Antagonisten Fesoterodin, Tolterodin, oder Oxybutinin [151-153]. Darüber hinaus werden die mAChR-Antagonisten Darifenacin und Solifenacin bei der Behandlung der Dranginkontinenz eingesetzt. Pirenzepin, ein mAChR-Antagonist mit relativer Selektivität für den M₁ AChR wurde als Antazidum verwendet, wird aber mittlerweile durch andere, stärker wirksame Substanzen (H₂ Rezeptor-Antagonisten und Protonenpumpenhemmer) abgelöst [154]. Des Weiteren kommen Antagonisten bzw. inverse Agonisten der mAChR auch bei der Behandlung der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) zur Anwendung. Eingesetzt werden hier vor allem Ipratropium und Tiotropium in Form von Inhalationstherapeutika [155, 156]. Auf zentraler Ebene erfolgen Prävention und Therapie von Kinetosen mit dem Antagonisten Scopolamin über einen transdermalen Applikationsweg [157]. In der Therapie von Morbus Parkinson werden die beiden mAChR-Antagonisten Biperiden und Trihexiphenidyl angewendet, durch die die gestörte Balance zwischen dopaminergem und cholinergem Innervation einreguliert wird [158-160]. Eine weitere Gruppe von Arzneistoffen, die zwar nicht direkt an mAChR angreifen, aber dennoch in der cholinergen Therapie angewendet werden, stellen die Acetylcholinesterasehemmer dar. Sie steigern die ACh-vermittelte Signaltransduktion, indem sie den Abbau von ACh hemmen. So werden beispielsweise die Acetylcholinesterasehemmer Donepezil, Rivastigmin und Galantamin zur Behandlung leichter bis moderater Formen der Demenz im Zusammenhang mit Morbus Alzheimer verwendet [161-164]. Hier beruht das Therapieprinzip darauf, dass durch ein Überangebot des Neurotransmitters ACh der Verlust an cholinergen Neuronen ausgeglichen wird, da die noch nicht degenerierten, cholinerg innervierten Neurone verstärkt aktiviert werden [165]. Darüber hinaus findet Rivastigmin zusätzlich Anwendung bei der Therapie der Morbus

Parkinson-assoziierten Psychose [166]. Auch in der Therapie von Schizophrenie-assoziierten Symptomen eröffnen Acetylcholinesterasehemmer neue Therapieoptionen [167-169].

1.2.3.2 Ausblick auf zukünftige Entwicklungen in der cholinergen Therapie

Ein Nachteil der cholinergen Therapie besteht im Auftreten von teilweise starken Nebenwirkungen, wie beispielsweise Bradykardie, Erbrechen, vermehrtem Speichelfluss, oder verstärktem Schwitzen [108, 136, 170]. Diese unerwünschten Arzneimittelwirkungen resultieren aus der relativ großen Unselektivität, mit der die eingesetzten Substanzen nicht nur den gewünschten mAChR-Subtyp, sondern auch alle anderen mAChR regulieren und führen bisweilen zu einer Dosisreduktion, oder gar zum Therapieabbruch.

Sollte es möglich sein, mit großer Selektivität nur den zur Therapie erforderlichen mAChR-Subtyp anzusprechen, würde die cholinerge Therapie neue Alternativen zu bislang eingesetzten Therapieformen eröffnen.

Eine selektive Aktivierung spinal und peripher exprimierter M_2 AChR würde eine neue Möglichkeit zur Schmerzbehandlung darstellen. In Tierversuchen konnte der analgetische Effekt einer systemischen Gabe von Oxotremorin gezeigt werden [138, 171, 172], eine weitere Tierstudie konnte anschließend auch die Beteiligung vom M_4 AChR am schmerzlindernden Effekt belegen [173]. Eine spezifische Regulierung von M_1 , M_2 und M_4 AChR auf supraspinaler Ebene würde außerdem die Schmerzwahrnehmung modulieren [174].

In Untersuchungen an Tumorgewebe konnte eine Expression von M_3 AChR beobachtet werden, deren Stimulation eine unkontrollierte Zellproliferation zur Folge hat. Eine selektive Hemmung von M_3 AChR würde das Tumorwachstum hemmen und so eine Alternative zur bisherigen Tumorbehandlung darstellen [175].

Dagegen würden Typ-2 Diabetiker von einer spezifischen Aktivierung des M_3 AChR, wodurch in den β -Zellen des Pankreas eine vermehrte Insulinfreisetzung stimuliert wird, profitieren [128, 147, 176, 177].

Eine Hemmung von zentralen M_5 AChR könnte eine neue Option zur Therapie der Drogenabhängigkeit darstellen [178, 179].

Die Therapie von Morbus Alzheimer erfolgte bislang lediglich symptomorientiert. Mit einer selektiven Stimulation des M_1 AChR könnte neben der Verbesserung kognitiver Fähigkeiten auch der Bildung von β -Amyloid Plaques vorgebeugt werden [165, 180-182].

1.3 Allosterie

1.3.1 Begriffsbestimmung

Allosterie beschreibt den Effekt, der auf ein Protein durch dessen gleichzeitige Interaktion mit zwei Molekülen ausgeübt wird [183]. Ursprünglich wurde das Konzept der Allosterie für Enzyme [184] und die an Hämoglobin beobachtete Kooperativität der Sauerstoffbindung (Bohr-Effekt) [185, 186] entwickelt. Monod entdeckte, dass die biologische Aktivität von Enzymen durch die Bindung von Liganden an eine Bindestelle (= allosterische Bindestelle), die sich von der orthosterischen (= Substrat-Bindestelle) unterscheidet, beeinflusst wird. Die erste Definition von Allosterie beschrieb also die Tatsache, dass viele Proteine über mehrere Ligandenbindestellen verfügen, durch die sie wechselseitig beeinflusst werden können.

Anfangs entwickelt, um die Eigenschaften und Voraussetzungen allosterischer Modulation an Enzymen zu beschreiben [187], kann das von Monod postulierte Monod-Wyman-

Changeux Modell (MWC-Modell) auch auf die allosterische Regulation von GPCR angewendet werden [184, 187, 188]. Entsprechend dieses Modells erfüllen GPCR einige, aber nicht alle Voraussetzungen, die für eine allosterische Modulation gefordert werden. So besitzen sie zwar keine Symmetrieachse, neuere Erkenntnisse deuten aber darauf hin, dass sich einige Mitglieder der GPCR-Familie zu Dimeren, oder Oligomeren höherer Ordnung zusammen finden können [9, 189, 190]. Zudem verfügen GPCR über mindestens zwei Bindestellen für unterschiedliche Bindungspartner [191, 192]. Ein typisches Beispiel allosterischer Interaktion in verschiedenen Bereichen von GPCR stellt dabei die Wechselwirkung zwischen GPCR und einem G-Protein dar [188]. Auch die Voraussetzung, dass das zu regulierende Protein in Abwesenheit eines Liganden in unterschiedlichen Konformationen vorliegen sollte, wird durch GPCR erfüllt [193, 194].

Zusätzlich zum MWC-Modell kann allosterische Interaktion auch nach anderen Gesichtspunkten beschrieben werden. Diese sind in dem sogenannten allosterischen ternären Komplexmodell (*allosteric ternary complex model*, ATCM) zusammengefasst [195].

1.3.1.1 Allosterisches ternäres Komplexmodell

Basierend auf dem ternären Komplexmodell (TCM, Abb. 2, Seite 4) wurde das allosterische ternäre Komplexmodell (*allosteric ternary complex model*, ATCM) entwickelt. Hierzu wurde das G-Protein im TCM durch das Alloster im ATCM ersetzt.

Da allosterische Modulatoren an eine eigene Bindestelle binden, tritt eine **Sättigung** des von ihnen hervorgerufenen Effekts ein, sobald alle allosterischen Bindestellen besetzt sind (*Ceiling*-Effekt, Sättigungseffekt). Dies steht im Gegensatz zu orthosterischen Wechselwirkungen, bei denen theoretisch so lange eine Konkurrenz um die orthosterische Bindestelle beobachtet werden kann, wie dem orthosterischen System unterschiedliche Konzentrationen von zwei orthosterischen Liganden zugeführt werden, die miteinander um dieselbe Bindestelle konkurrieren [183, 188, 196, 197].

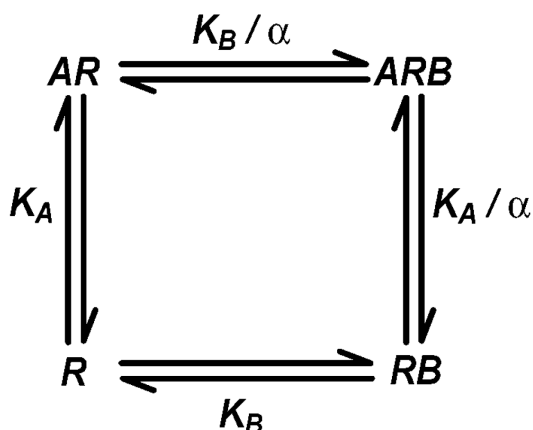


Abb. 6: Schematische Darstellung des allosterischen ternären Komplexmodells (ATCM).

Orthoster (A) und Alloster (B) können unabhängig voneinander, oder gemeinsam an den Rezeptor (R) binden. K_A und K_B repräsentieren die Dissoziationskonstanten im Gleichgewicht, α steht für den Kooperativitätsfaktor der Wechselwirkung zwischen orthosterischem und allosterischem Liganden. Im ATCM wird positive Kooperativität durch Werte $\alpha > 1$ und negative Kooperativität durch Werte $\alpha < 1$ beschrieben. Neutrale Kooperativität liegt vor, wenn $\alpha = 1$ (entnommen aus Avlani *et al.*, 2004 [198]).

Da allosterische Modulation einen *Ceiling*-Effekt zeigt, kann somit das Resultat orthosterischer Regulation lediglich in seinem Ausmaß verändert, aber nicht vollkommen inhibiert werden. Das Ausmaß des durch allosterische Liganden induzierten Effekts hängt dabei von der **Kooperativität** ab, mit der allosterischer und orthosterischer Ligand sich gegenseitig beeinflussen. Durch die Kooperativität (im ATCM als Kooperativitätsfaktor, *cooperativity factor*, α bezeichnet) werden die Stärke und die Richtung angegeben, mit der sich die beiden Liganden gegenseitig beeinflussen. Liegt eine positive Kooperativität vor ($\alpha > 1$), so werden die Eigenschaften eines orthosterischen Liganden durch ein Alloster verstärkt, man spricht

von einem positiven, allosterischen Modulator (*positive allosteric modulator*, PAM). Negative allosterische Modulatoren (*negative allosteric modulator*, NAM) dagegen schwächen die Eigenschaften des orthosterischen Liganden ab, der Kooperativitätsfaktor α nimmt Werte < 1 an. Da beide Ligandenbindestellen miteinander über die Konformation der GPCR verbunden sind, beeinflussen sich orthosterischer und allosterischer Ligand gegenseitig [197, 199]. Ein Kooperativitätsfaktor $\alpha = 1$ weist auf neutrale Kooperativität hin. Obwohl sowohl orthosterischer, als auch allosterischer Ligand an den Rezeptor binden, bleibt im Falle neutraler Kooperativität eine gegenseitige Beeinflussung aus [196, 200].

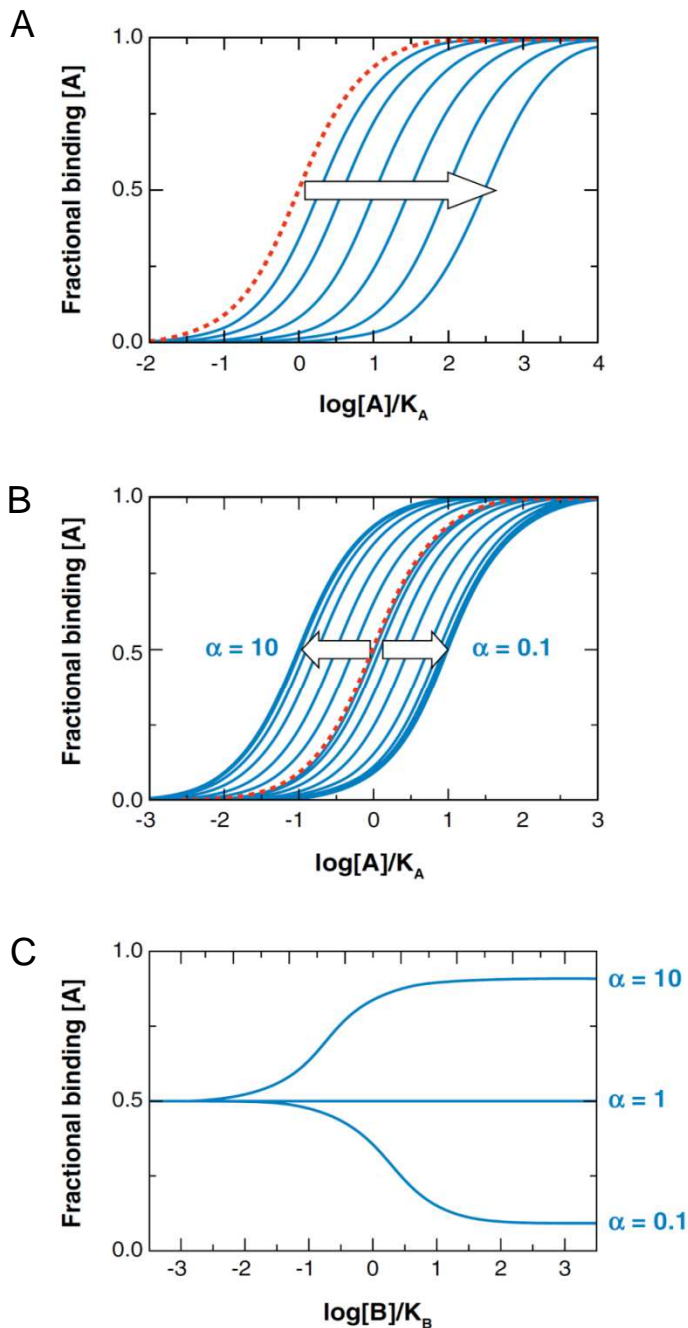


Abb. 7: Einfluss orthosterischer und allosterischer Liganden auf Konzentrations-Wirkungskurven.

(A) Konkurrieren zwei orthosterische Liganden miteinander um dieselbe Bindestelle eines GPCR, so ist theoretisch eine unbegrenzte Rechtsverschiebung der Konzentrations-Rezeptorbesetzungskurve des orthosterischen Liganden (A) möglich.

(B) In Gegenwart eines Allostere wird die Konzentrations-Wirkungskurve des Orthosters sättigend verschoben. Abhängig von der Kooperativität erfolgt entweder eine Links- ($\alpha > 1$), oder eine Rechtsverschiebung ($\alpha < 1$).

(C) Bindungskurve in Gegenwart einer stabilen Konzentration an orthosterischem Liganden. Mit zunehmender Konzentration des allosterischem Liganden (B) wird der Besetzungsgrad des Rezeptors bis zu einem bestimmten Limit erhöht (positive Kooperativität, $\alpha > 1$), oder vermindert (negative Kooperativität, $\alpha < 1$) (entnommen aus May et al., 2007 [186]).

Ein weiteres Merkmal allosterischer Interaktion wird durch die Ligandenabhängigkeit (*probe dependency*) beschrieben. Unter **probe dependency** versteht man die Beobachtung, dass der Effekt eines allosterischen Modulators vom jeweiligen orthosterischen Liganden abhängt [188, 196, 201, 202]. So konnte zum Beispiel in Untersuchungen am M_4 AChR belegt

werden, dass sich die Substanz LY2033298 abhängig vom orthosterischen Liganden als positiver, oder neutraler allosterischer Modulator verhält [203, 204].

Darüber hinaus können allosterisch modulierende Substanzen sowohl die Affinität eines Liganden zum regulierten Rezeptor, als auch dessen maximale Wirkstärke unabhängig voneinander, oder zusammen beeinflussen [186, 205, 206].

1.3.1.2 Allosterisches Zwei-Zustands Modell

Da neben PAM, NAM und neutralen allosterischen Modulatoren auch Allosterie existieren, die nach Bindung an die allosterische Bindestelle einen Rezeptor auch in Abwesenheit eines orthosterischen Agonisten aktivieren können (allosterische Agonisten) [207-209], wurde das ATCM zum allosterischen Zwei-Stadien Modell (*allosteric two-state model*, ATSM, oder *cubic ternary complex model*, CTC) erweitert. Hier wird die Möglichkeit berücksichtigt, dass auch orthosterisch inaktive Rezeptoren ein G-Protein aktivieren können.

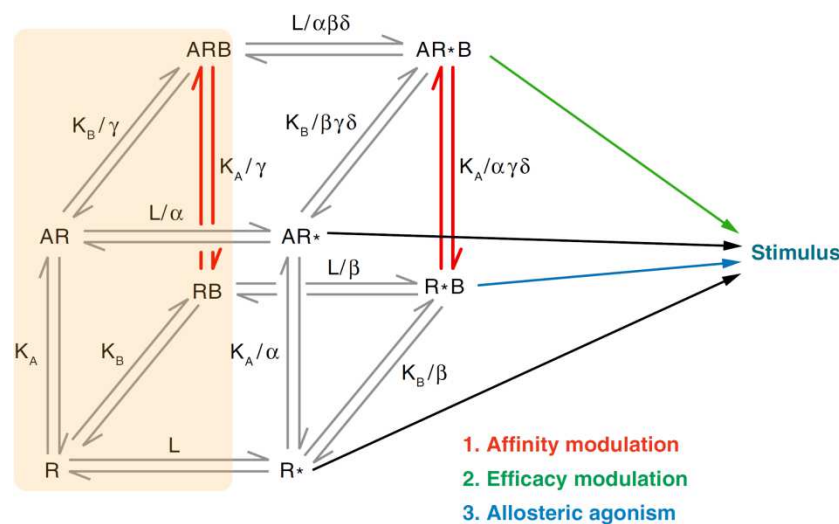


Abb. 8: Allosterisches Zwei-Zustands Modell (ATSM).

Das ATSM beschreibt die Effekte allosterischer Liganden (B) hinsichtlich Affinität (rot) und Maximaleffekt (grün) an einem inaktiven (R), oder aktiven Rezeptor (R^*) auf den orthosterischen Liganden (A). Die Möglichkeit, dass ein Alloster auch in Abwesenheit eines orthosterischen Agonisten einen Rezeptor aktivieren kann (Allosteric agonism, blau), wird berücksichtigt. Der linke Teil (orange) des ATSM repräsentiert das ATCM. (entnommen aus May *et al.*, 2007 [186]).

1.3.2 Funktionelle Selektivität

Funktionelle Selektivität bezeichnet die Beobachtung, dass unterschiedliche Liganden durch Bindung an einen Rezeptor bestimmte Signalwege bevorzugt regulieren, während sie auf andere Signalwege keinen, oder nur einen geringen Einfluss ausüben [59, 186, 187, 210-217]. Dies gründet vermutlich darauf, dass unterschiedliche Liganden eine selektive Änderung der Rezeptorkonformation induzieren [217-221]. Auf Grund unterschiedlicher Konformationen kann der Rezeptor anschließend mit verschiedenen Effektoren mit unterschiedlich hoher Affinität und in unterschiedlichem Ausmaß wechselwirken [10, 212, 222].

So konnte am Beispiel des β_2 AR gezeigt werden, dass bei einigen Liganden zwar der G_s -vermittelte Signalweg inhibiert, die β -Arrestin abhängige Signaltransduktion aber partiell aktiviert wurde [216]. Ein ähnlicher Befund ergab sich auch bei der Untersuchung verschiedener Liganden des β_2 AR hinsichtlich ihrer Fähigkeit, G_s -vermittelt die Bildung von cAMP zu stimulieren, beziehungsweise eine β -Arrestin abhängige Rezeptorinternalisierung zu induzieren [223].

Dass funktionelle Selektivität nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* auftritt, konnten sowohl Studien am chemokinen CCR7 Rezeptor, als auch am D_2 Dopaminrezeptor zeigen [222, 224, 225].

Auch von allosterischen Liganden wird angenommen, dass sie unterschiedliche Rezeptorkonformationen induzieren. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Phänomen der funktionellen Selektivität auch auf allosterische Modulation anwendbar ist [226, 227].

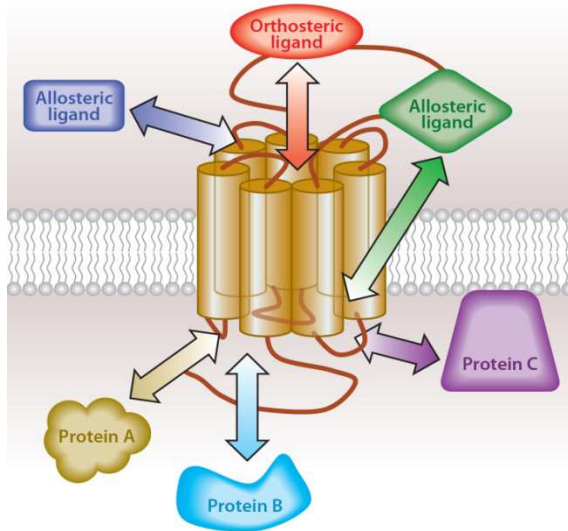


Abb. 9: Funktionelle Selektivität allosterischer und orthosterischer Liganden.

Binden unterschiedliche Agonisten und allosterische Modulatoren an einen Rezeptor, werden abhängig von der Konformationsänderung des GPCR unterschiedliche Signalwege reguliert (abgeändert nach Valant *et al.*, 2012 [228]).

1.3.3 Methoden zur Detektion allosterischer Modulation

Da der Effekt, den allosterische Modulatoren auf einen Rezeptor bzw. den orthosterischen Liganden ausüben, vom eingesetzten Orthoster abhängt (-> *probe dependency*), sollte in *Screening*-Versuchen im Idealfall der endogene Ligand als Referenzsubstanz eingesetzt werden.

1.3.3.1 Radioligandenbindungsstudien

Die am häufigsten angewandte Methode zur Identifizierung allosterischer Modulatoren und zur Untersuchung ihrer Eigenschaften hinsichtlich negativer, oder positiver Kooperativität stellen Radioligandenbindungsstudien dar [229]. Hier wird die spezifische Bindung eines radioaktiv markierten Orthosters in Anwesenheit eines allosterischen Modulators bestimmt. Wird die spezifische Bindung des orthosterischen Radioliganden nur bis zu einem gewissen Grad beeinflusst, d.h. tritt ein sättigender Effekt auf, handelt es sich bei der Testsubstanz um einen Alloster. Durch PAM wird die spezifische Bindung erhöht, während NAM die spezifische Bindung des Radioliganden reduzieren. Zeigen NAM eine stark negative Kooperativität (α nähert sich 0 an), ist eine sichere Unterscheidung zwischen einer allosterisch vermittelten Reduktion der Orthoster-Affinität und einer rein orthosterischen Konkurrenz nicht mehr möglich [197]. Eine weitere Möglichkeit, allosterische Wechselwirkungen mit Hilfe von Radioligandenbindungsstudien zu identifizieren und zu quantifizieren, besteht in der Analyse der Dissoziationskinetik des Radioliganden in Anwesenheit und Abwesenheit des Allosters, dabei kann sowohl eine Beschleunigung, als auch eine Verlangsamung der Dissoziation des Orthosters von dem Rezeptor beobachtet werden [186, 230]. Auch durch die Auswertung von Gleichgewichtsbindungsstudien mit Radioliganden können die Kooperativität zwischen Alloster und Orthoster, sowie die Affinität des Allosters zum Rezeptor ermittelt werden [230].

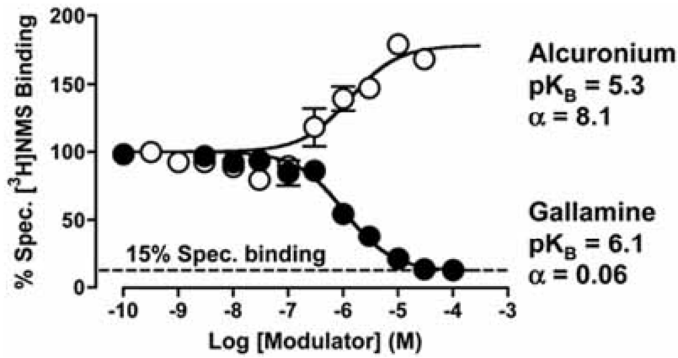


Abb. 10: Radioligandenbindungsstudien zur Identifikation allosterischer Modulatoren.

Wechselwirkung der allosterischen Modulatoren Gallamin und Alcuronium mit dem orthosterischen Antagonisten [³H] NMS am M₂ AChR. Durch den PAM Alcuronium wird die spezifische Bindung des Radioliganden erhöht, während der NAM Gallamin die spezifische Bindung von [³H] NMS reduziert. Vor allem am Beispiel von Gallamin wird die allosterische Modulation deutlich, da die spezifische Bindung des Radioliganden nicht vollständig inhibiert wird (entnommen aus Gregory, Sexton und Christopoulos, 2007 [197]).

Anfangs waren Radioligandenbindungsstudien nur mit radioaktiv markierten, orthosterischen Liganden möglich. Durch die Entwicklung eines radioaktiv markierten Allostere ([³H] Dime-thyl-W84) [231] ist die Identifizierung allosterischer Modulatoren und die Quantifizierung ihrer Effekte am M₂AChR auch über direkte Konkurrenz mit einem allosterischen Radioliganden an der typischen allosterischen Bindestelle möglich.

1.3.3.2 Funktionelle Experimente

Eine Alternative zur Aufklärung allosterischer Wechselwirkungen besteht in der Durchführung funktioneller Assays. Hier wird die Änderung eines Effekts (z.B. Rezeptor-aktivierung) in Abhängigkeit von der Konzentration des eingesetzten Allostere betrachtet. Dabei tritt abhängig von der Kooperativität zwischen allosterischem und orthosterischem Liganden eine Rechtsverschiebung ($\alpha < 1$, NAM), oder eine Linksverschiebung ($\alpha > 1$, PAM) der Konzentrations-Wirkungskurven auf. Ist die Kooperativität zwischen beiden Liganden begrenzt, erreicht die Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve ein Limit, ab dem eine weitere Verschiebung nicht mehr möglich ist (Abb. 7 B, Seite 15) [186, 197, 232, 233].

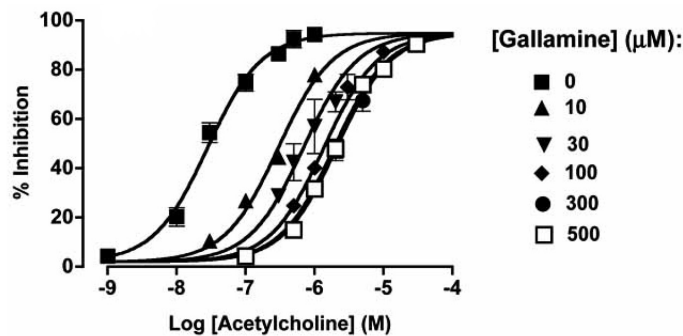


Abb. 11: Funktionelle Untersuchung des Effekts von Gallamin auf den ACh-Effekt am M₂ AChR des linken Vorhofs.

Mit steigender Konzentration des NAM Gallamin tritt eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von ACh auf. Bei hohen Konzentrationen von Gallamin ist eine Sättigung der Rechtsverschiebung zu beobachten (entnommen aus Gregory, Sexton und Christopoulos, 2007 [197]).

Während in Radioligandenbindungsstudien nur die Interaktion des Radioliganden mit einem Rezeptor detektiert wird, kann mit funktionellen Assays der Effekt untersucht werden, den Liganden auf einen Rezeptor bzw. nachgeschaltete Signalwege ausüben.

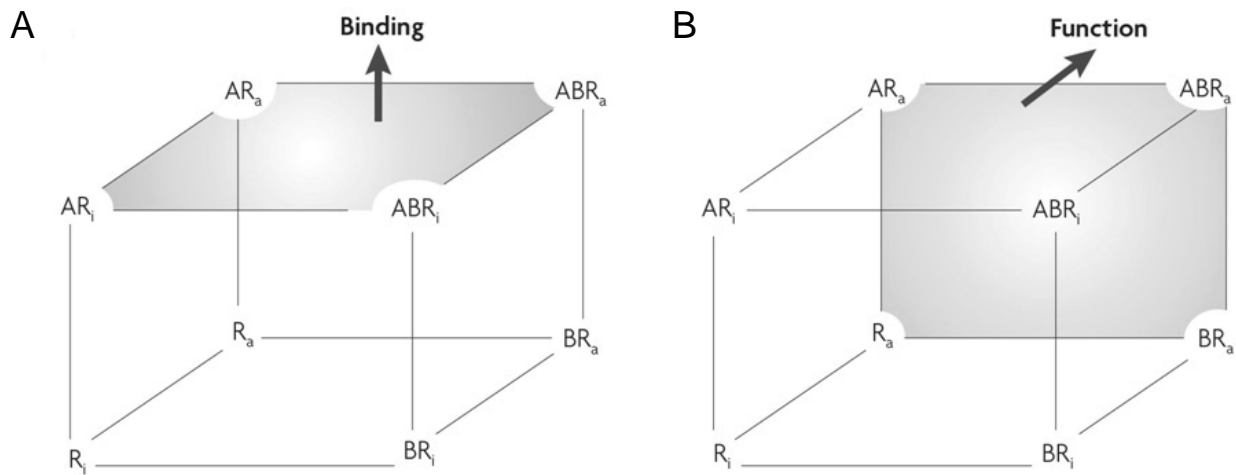


Abb. 12: Vergleich verschiedener Assay-Formate hinsichtlich ihrer Aussagekraft.

Gezeigt wird die Bindung eines Liganden A an einen allosterisch gebundenen Rezeptor (RB). Basierend auf dem allosterischen Zwei-Zustands-Modell werden in Radioligandenbindungsstudien (A) nur Rezeptoren erfasst, die einen Radioliganden gebunden haben. In funktionellen Experimenten werden dagegen all jene Rezeptoren detektiert, die einen pharmakologischen Effekt erzeugen (B) (entnommen aus Kenakin, 2009 [234]).

Funktionelle Methoden sind bei der Charakterisierung allosterischer Liganden den Radioligandenbindungsstudien insofern überlegen, als dass sie einen Rückschluss auf Affinität und Effekt der Allosteren auf nachgeschaltete Signalwege erlauben, während aus Radioligandenbindungsstudien nur die Affinität der allosterischen Liganden abgelesen werden kann [234].

1.3.4 Vergleich allosterischer und orthosterischer Liganden hinsichtlich ihrer Bedeutung für die pharmakologische Therapie

Bisher werden fast ausnahmslos orthosterische Rezeptorliganden in der Arzneimitteltherapie eingesetzt. Bei genauer Betrachtung bieten allosterische Modulatoren allerdings zum Teil bedeutende Vorteile gegenüber einer orthosterischen Therapieform.

Ein Vorteil allosterischer Modulatoren liegt in der höheren Selektivität mit der sie an die allosterische Bindestelle spezifischer Subtypen einer GPCR Familie binden können. Es wird angenommen, dass die allosterische Bindestelle im Gegensatz zur orthosterischen Bindestelle nicht Gegenstand der evolutionären Selektion war und somit weit geringere Sequenzhomologie unter den verschiedenen Subtypen aufweist [186, 201, 235-238]. Die erhöhte Selektivität, mit der allosterische Modulatoren einen Rezeptorsubtyp regulieren, vermindert somit das Auftreten von Nebenwirkungen in der pharmakologischen Therapie. Die zirkadiane Rhythmik, sowie der Wirkort einer physiologischen Rezeptorfunktion bleiben unter Verwendung positiver, oder negativer allosterischer Modulatoren erhalten, da diese nur in Anwesenheit des endogenen, orthosterischen Liganden einen Effekt ausüben können [197, 235]. Eine dauerhafte Systemaktivierung, oder -hemmung bleibt somit aus, lediglich Stärke bzw. Ausmaß eines physiologischen Effekts werden reguliert. Darüber hinaus zeigen allosterische Modulatoren einen, durch die limitierende Kooperativität zwischen allosterischem und orthosterischem Liganden begründeten, Sättigungseffekt [188, 199]. Die Gefahr einer Überdosierung wird somit minimiert.

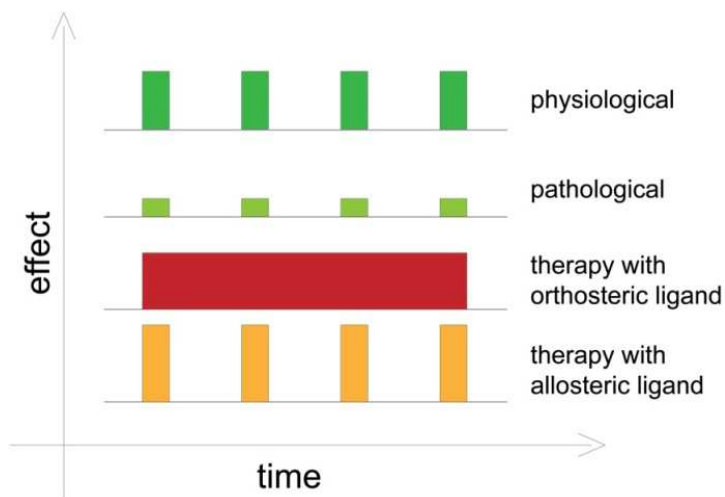


Abb. 13: Vorteil einer Therapie mit allosterischem Modulator im Vergleich zu einer Therapie mit orthosterischem Liganden.

Der physiologische Effekt (grün) ist in einem erkrankten Organismus verändert (hellgrün). Bei einer orthosteren Therapie (rot) tritt eine dauerhafte Systemveränderung auf. Dagegen bleibt mit einer allosterischen Therapie (orange) die zirkadiane Rhythmik erhalten, lediglich das Ausmaß des pathologisch veränderten Effekts wird beeinflusst.

1.3.4.1 Anwendungsbeispiele allosterischer Liganden in der pharmakologischen Therapie

Als allosterische Modulatoren von Ionenkanälen werden unter anderem Barbiturate oder Benzodiazepine zur Behandlung von Schlafstörungen beziehungsweise in der Epilepsiebehandlung eingesetzt. Während Barbiturate durch Bindung an eine allosterische Bindestelle des GABA_A-Rezeptors die Wirkung des endogenen Liganden γ -Aminobuttersäure verstärken, führen sie in hohen Dosen auch zu einer direkten Öffnung des Kanals. Dagegen modulieren Benzodiazepine den GABA-Rezeptor nur in Anwesenheit des endogenen Liganden und zeigen hierbei einen Sättigungseffekt [239]. Memantin (Axura, Ebixa), ein Modulator des NMDA-Rezeptors wird zur Behandlung moderater bis schwerer Formen von Morbus Alzheimer verwendet [240].

Erst kürzlich kam mit Cinacalcet (Mimpara[®], Amgen) ein neuer Arzneistoff zur Behandlung des Hyperparathyroidismus auf den Markt. Die Wirkung von Cinacalcet beruht auf einer allosterischen Modulation des Ca²⁺-Rezeptors der Nebenschilddrüsen, wodurch dessen Empfindlichkeit für extrazelluläres Ca²⁺ erhöht und die endokrine Sekretion von Parathormon gehemmt wird. Mit Cinacalcet hat der erste, pharmakologisch eingesetzte, allosterische Modulator von GPCR die Marktreife erreicht [241-243]. Als weiterer allosterischer Modulator von GPCR wird der Entry-Inhibitor Maraviroc (Celsentri[®], Pfizer) zur Behandlung einer HIV-Infektion eingesetzt. Als negativer Modulator des chemokinen CCR5 Rezeptors verhindert er das Eindringen von HI-Viren in CD4 positive T-Zellen [244, 245].

1.3.5 Allosterische Modulation des muskarinischen M₂ Acetylcholinrezeptors

1.3.5.1 Allosterische Bindestelle

Auf dem Forschungsgebiet der allosterischen Modulation stellen mAChR die mit Abstand am intensivsten studierten GPCR dar. Die Existenz einer allosterischen Bindestelle und somit die Möglichkeit allosterischer Modulation von GPCR wurde erstmals bei der Untersuchung des Effekts von Alkan-Bisammonium Substanzen bzw. Gallamin auf die negativ ionotrope Wirkung von ACh in funktionellen Experimenten an Herzvorhöfen erkannt [246, 247].

Neben der orthosterischen existieren in allen mAChR zusätzlich mindestens eine, möglicherweise auch zwei allosterische Bindestellen [248, 249]. In Mutagenesestudien konnte gezeigt

werden, dass die Aminosäuren, die an der Bildung der allosterischen Bindestelle der mAChR beteiligt sind, vorwiegend im Bereich der extrazellulären Rezeptorschleifen und den extrazellulären Regionen der TMs liegen [6, 197]. Im M₂ AChR konnten durch Versuche mit Punktmutanten die Aminosäuren Glutamat¹⁷²–Glutamat¹⁷⁵ (sog. EDGE-Motiv) in EL 2, Tyrosin¹⁷⁷, Tryptophan⁴²² und Threonin⁴²³ als an der Bildung einer allosterischen Bindestelle beteiligte Aminosäuren identifiziert werden [250-254]. Da diese Bindestelle nicht von dem endogenen Liganden ACh gebunden wird [255] und somit wahrscheinlich keinem evolutionären Selektionsdruck unterlag, ist die allosterische Bindestelle der mAChR-Subtypen wahrscheinlich nicht konserviert [236, 256].

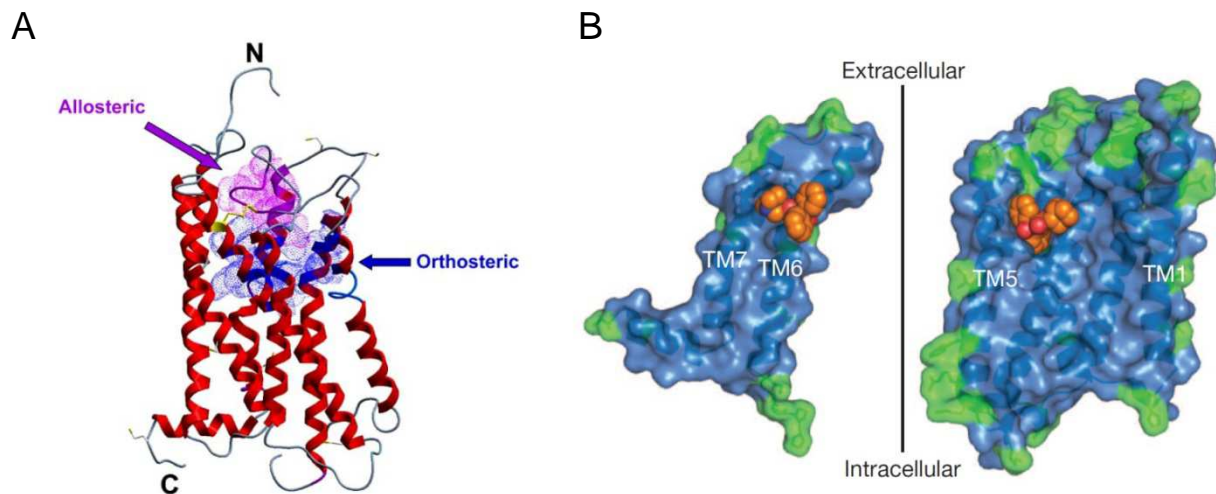


Abb. 14: Schematische Darstellung der hypothesierten allosterischen Bindestelle des M₂ AChR.

(A) Während sich die orthosterische Bindestelle (blau) im Inneren des von den TMs gebildeten Kanals befindet, ist die allosterische Bindestelle (rosa) im extrazellulären Bereich der TMs und in den extrazellulären Rezeptorschleifen lokalisiert (entnommen aus Gregory, Sexton und Christopoulos, 2007 [197]).

(B) Darstellung der inneren Oberfläche des durch die TMs gebildeten Kanals im M₂ AChR gebunden an QNB (orange). Unterschiede zur Aminosäuresequenz des M₄ AChR sind in grün dargestellt, konservierte Aminosäuren in blau. Die Homologie der orthosterischen Bindestelle wird deutlich, dagegen zeigen die extrazellulären Bereiche der TMs eine hohe Variabilität (entnommen aus Haga *et al.*, 2012 [6]).

1.3.5.2 Allosterische Modulatoren

Allosterische Modulatoren der mAChR unterscheiden sich stark hinsichtlich ihrer chemischen Struktur und in ihren physiologischen Eigenschaften. Zu ihnen zählen beispielsweise steroidale und nicht-steroidale neuromuskuläre Blocker (z.B. Pancuronium), aber auch Peptide (Dynorphin), Antibiotika, oder endogene Metabolite (Thiochrom) [146]. Die allosterischen Liganden, die bisher für mAChR bekannt sind, können anhand ihrer Struktur und ihres Bindeverhaltens in zwei Untergruppen klassifiziert werden.

1.3.5.2.1 Typische allosterische Liganden

Als **typische allosterische Liganden** gelten all jene, die wie die ursprünglich entdeckten Substanzen Gallamin und die Alkan-Bisammonium Verbindungen ihren allosterischen Effekt nach Bindung an das EDGE-Motiv entsprechend des ATCM-Modells entfalten. Dies konnte unter anderem für Gallamin, Alcuronium und W84 anhand von Radioligandenbindungsstudien in Gegenwart von [³H] Dimethyl-W84 gezeigt werden [257]. Die höchste Affinität zeigen typische allosterische Modulatoren meist zum M₂ AChR, während sie mit der niedrigsten Affinität den M₅ AChR binden [254, 258-260]. Typische allosterische Modulatoren verhalten sich meist negativ kooperativ. Ausnahmen stellen zum Beispiel die Substanzen

Alcuronium (PAM mit [³H] NMS und [³H] Atropin, NAM mit [³H] QNB und Pilocarpin), Brucin (PAM mit ACh), oder Thiochrom (PAM mit ACh am M₄) dar [202, 261-263].

Die Einteilung der typischen Allosteren kann anhand der chemischen Struktur und der funktionellen Aktivität in zwei Kategorien erfolgen:

- neuromuskuläre Blocker und Bis-Onium Modulatoren (z.B. Alcuronium, Vecuroium, Pancuronium, Gallamin) [264]
- monoquartäre und tertiäre Amine, die von Alkaloiden abgeleitet wurden (z.B. C₇/3'-phth W84) [257, 259]

1.3.5.2.2 Atypische allosterische Liganden

Zu den atypischen allosterischen Liganden zählen beispielsweise Duo3, oder Tacrin. Sie binden mutmaßlich an eine andere allosterische Bindestelle, als typische allosterische Modulatoren [249, 265-268].

Die Bindestelle atypischer allosterischer Liganden konnte bisher allerdings noch nicht zweifelsfrei lokalisiert werden [146]. Es existieren Studien, nach deren Ergebnis auch atypische Liganden zwar an die typische Bindestelle des M₂AChR binden, dort dann allerdings ein anderes Bindevverhalten, als typische Allosteren zeigen [267]. Atypische Modulatoren weisen, anders als typische Allosteren, keine positiv geladene Stickstofffunktion auf. Darüber hinaus unterscheiden sie sich von typischen Allosteren, da sie die höchste Affinität für den M₁ statt M₂AChR zeigen und die Dissoziationsrate von [³H] NMS in Radioligandenbindungsstudien kaum, oder gar nicht beeinflussen [197]. Zu ihnen zählen neben Tacrin, oder Duo3 beispielsweise auch WIN 51708, WIN 62577 und Stauroprostin [265, 269]. Das Verhalten mancher dieser Substanzen weicht zudem von dem normalen ATCM ab [197, 267].

1.3.6 Bitopische Liganden

Ein Ansatz, die allosterisch-vermittelte Subtypselektivität mit der hohen Affinität orthosterischer Liganden zu Rezeptorbindestellen zu kombinieren, besteht in der Verknüpfung von orthosterischen mit allosteren Liganden über eine Linkerkette. Diese sogenannten bitopischen, oder dualsterischen Liganden sind in der Lage, die allosterische und die orthosterische Bindestelle eines GPCR gleichzeitig zu besetzen [270].

Begründet wurde die Idee der bitopischen Liganden auf dem von Schwyzer postulierten Effekt-Adresse-Konzept (*message-address-concept*) [271]. Dieses besagt, dass jeder Ligand zwei Komponenten enthält:

Die Effekt-Komponente, die das Hauptinteraktionsmotiv des Liganden mit dem gewünschten Rezeptor enthält und für die Signalübertragung zuständig ist und die Adresse-Komponente, die zusätzliche Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor und somit eine erweiterte Selektivität ermöglicht. Homobivalente Liganden sind dabei dadurch charakterisiert, dass sie zwei identische Pharmakophore enthalten. Im Falle von zwei unterschiedlichen, miteinander verknüpften Pharmakophoren wird von heterobivalenten Liganden gesprochen [228]. Dieses Konzept wurde erstmals durch Porthogese *et al.* auf GPCR in Form bivalenter Liganden für den κ-Opioidrezeptor angewendet [272].

Um auch Bereiche des Rezeptors, die von der orthosterischen Bindestelle weiter entfernt liegen, durch bivalente Liganden miteinander zu verbinden, wurde in nachfolgenden Versuchen eine Linkerkette zwischen beide Ligandenkomponenten eingefügt [273]. Auf diese Weise wurden weitere bivalente Liganden für die Opioidrezeptoren, Cannabinoid-

Rezeptoren, oder mAChR generiert [274-276]. Dem Linker zwischen beiden Komponenten kommt dabei eine gewisse Bedeutung zu. Ist er zu kurz, können nicht beide Bindestellen gleichzeitig von einem bivalenten Liganden besetzt werden. Auch die Flexibilität der Linkerkette ist entscheidend. Ein zu starrer Linker könnte beispielsweise zu einer Abnahme der Affinität und Aktivität des Liganden führen. Flexible Linker dagegen erlauben eine größere Beweglichkeit der Adresse-Komponente und können dadurch zu einer Steigerung der Affinität beitragen [228].

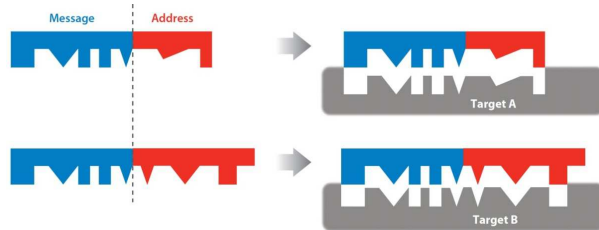


Abb. 15: Schematische Darstellung des Effekt-Adresse-Konzepts nach Schwyzer.

Beide Liganden enthalten die gleiche Effekt-Komponente (blau) und könnten deswegen theoretisch mit beiden Zielstrukturen (Target A, oder B) in Wechselwirkung treten. Erst durch die Adresse-Komponente (rot) wird durch zusätzliche Wechselwirkungen eine selektive Bindung an das jeweilige Zielprotein erreicht (entnommen aus Valant *et al.*, 2012 [228]).

Das vermehrte Interesse an allosterischer Modulation von GPCR resultierte in einer Weiterentwicklung der bivalenten zu bitopischen Liganden, die spezifisch einen orthosterischen und einen allosterischen Baustein, verbunden über eine Linkerkette, enthalten. Antony *et al.* [270] synthetisierten als erste Hybridsubstanzen für den M₂ AChR. Diese Substanzen, Hybrid 1 und Hybrid 2 (H 1 und H 2) wiesen zwar keine höhere Affinität als ihre einzelnen Bausteine auf, zeigten jedoch eine verbesserte Subtypselektivität. Einen Zugewinn an Affinität brachte die Synthese des bitopischen Liganden THRX-160209 für den M₂ AChR [277]. Mittlerweile existieren bitopische Liganden auch für andere Rezeptoren, als die mAChR [278].

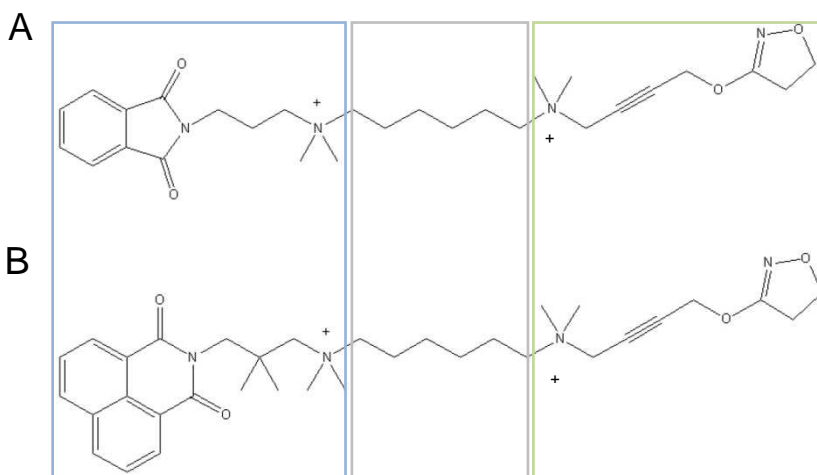


Abb. 16: Chemische Struktur der dualsterischen Liganden des M₂ AChR – Hybrid 1 und 2.

Bei H 1 (A) und H 2 (B) handelt es sich um bitopische Liganden, deren orthosterischer Baustein, Iperoxo (grün), dem Oxotremorin nachempfunden wurde. Bei den allosterischen Bausteinen (blau) handelt es sich um Hexamethonium-Derivate. Beide Bausteine wurden über eine sechs Kohlenstoffatome lange Linkerkette (grau markiert) miteinander verbunden.

1.3.6.1 Mögliche Bindungsstadien bitopischer Liganden an GPCR

Bitopische Liganden können auf unterschiedliche Weise an GPCR binden. Ist beispielsweise die Linkerkette nicht ausreichend lang, ist es möglich, dass je ein bitopischer Ligand an die orthosterische und an die allosterische Bindestelle bindet („Cooperativity“), oder nur ein Ligand gebunden wird, der dann zwischen beiden Bindestellen hin und her springt („Flip-Flop“). Bei ausreichender Länge der Linkerkette kann der Rezeptor trotz allem in einem Gleichgewicht zwischen fünf möglichen Bindungszuständen vorliegen [228, 270] (Abb. 17, Seite 24):

1. ein bitopischer Ligand bindet gleichzeitig die allosterische und orthosterische Bindestelle
2. der Rezeptor liegt ungebunden vor
3. nur die allosterische Bindestelle ist von einem bitopischen Liganden besetzt
4. der bitopische Ligand ist nur an die allosterische Bindestelle gebunden, während zusätzlich ein orthosterischer Ligand an der orthosterischen Bindestelle gebunden wird
5. der Rezeptor liegt nur orthosterisch gebunden vor

Die Wechselwirkungen zwischen bitopischem Ligand und GPCR werden dabei durch orthosterische Konkurrenz und allosterische Modulation der Kooperativität geprägt und mit Hilfe unterschiedlicher Affinitätskonstanten beschrieben. Die selektive Aktivierung nachgeschalteter Signalwege hängt von dem Bindungszustand ab, in dem der Rezeptor vorliegt (→ funktionelle Selektivität).

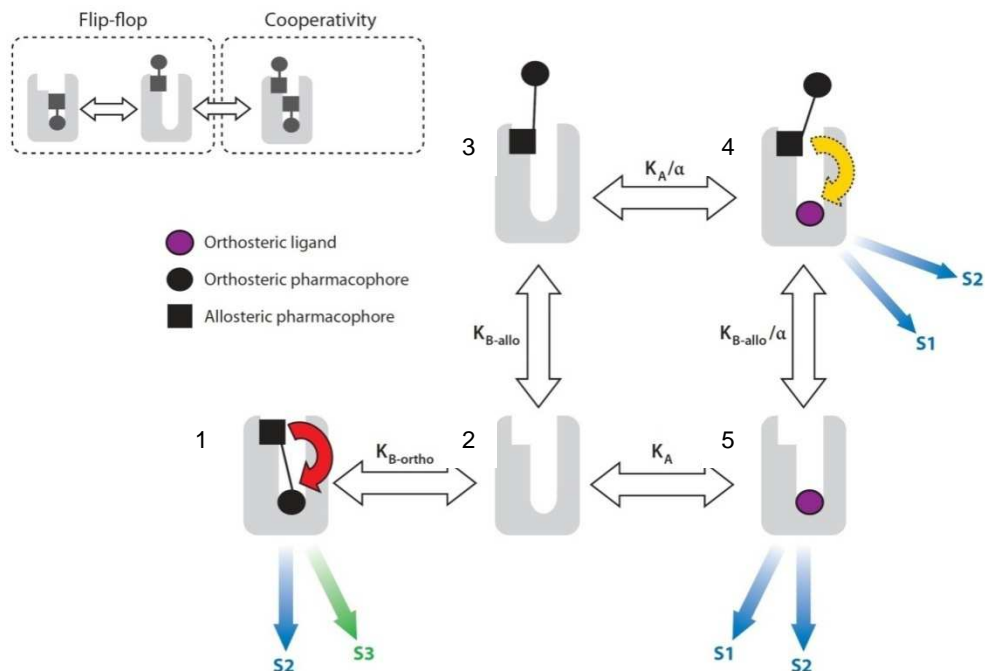


Abb. 17: Postulierte Bindungsmechanismen orthosterischer, allosterischer und dualsterischer Liganden an GPCR.

Allosterische und orthosterische Liganden können unterschiedlich an GPCR binden. Die verschiedenen Bindungszustände stehen über das ATCM miteinander im Zusammenhang. Die unterschiedlich gebundenen GPCR sind zudem in der Lage, selektiv nachgeschaltete Signalwege zu regulieren. Kann ein dualsterischer Ligand nicht beide Bindestellen gleichzeitig erreichen, ergeben sich zwei mögliche Bindungszustände. Im „Flip-Flop“-Zustand wird ein GPCR nur von einem dualsterischen Liganden gebunden, der zwischen beiden Bindestellen hin und her springt. Dagegen binden im *Cooperativity*-Modell zwei dualsterische Liganden an einen GPCR, wobei einer der beiden Liganden nur die orthosterische, der andere nur die allosterische Bindestelle besetzt (entnommen aus Valant *et al.*, 2012 [228]).

1.3.6.2 Bitopische Liganden der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren

Die Hybridsubstanzen Hybrid 1 und 2 (H 1 und H 2) wurden aus dem von Oxotremorin abgeleiteten orthosterischen Baustein Iperoxo und aus an Hexamethonium angelehnten allosterischen Modulatoren synthetisiert. Beide Bausteine wurden durch eine sechs Kohlenstoffatome lange Linkerkette miteinander verbunden. Mit Hilfe von Mutationsexperimenten

und Radioligandenbindungsstudien konnte belegt werden, dass H 1 und H 2 eine ausgeprägte Subtypselektivität für den M₂ AChR zeigen, an den sie in einem kombinierten allosterischen und orthosterischen (= dualsterischen) Modus binden. Beide Hybride weisen funktionelle Selektivität auf. Sie aktivieren im Gegensatz zu ACh und Iperoxo nur G_i-vermittelte Signalwege, die Aktivierung von G_s-abhängigen Signalwegen bleibt dagegen aus [270].

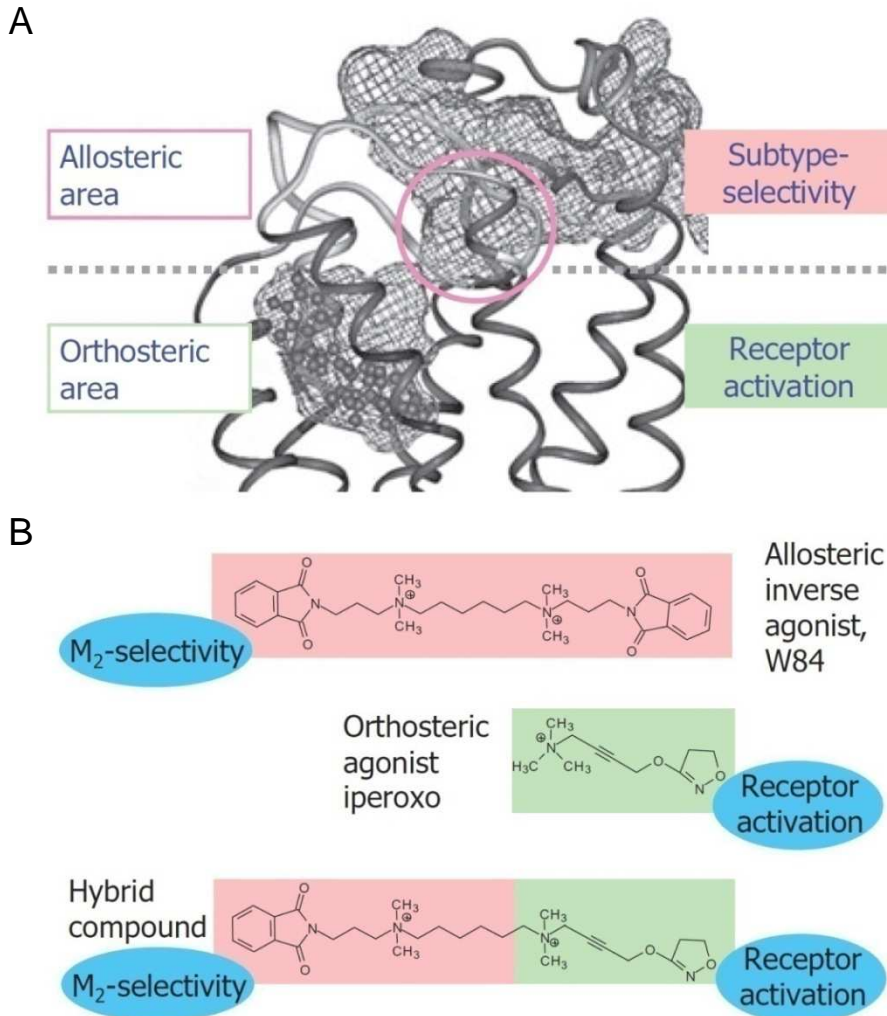


Abb. 18: Schematische Darstellung der hypothetischen allosterischen und orthosterischen Bindestelle des M₂ AChR (A), sowie der Bausteine von H 1 (B).

Die allosterische Bindestelle (rosa) befindet sich in der Region der extrazellulären Rezeptorschleifen. Durch sie wird die Subtypselektivität vermittelt. Die orthosterische Bindestelle (grün) liegt räumlich betrachtet unterhalb der allosterischen und vermittelt die Aktivierung des M₂ AChR (A). Kombiniert man den allosterischen Liganden W84 (rosa), der eine Selektivität für den M₂ AChR-Subtyp aufweist, mit dem hoch affinen orthosterischen Agonisten Iperoxo (grün), erhält man den dualsterischen Liganden H 1. Dieser weist sowohl Subtypselektivität, als auch eine hohe Affinität auf (entnommen aus Mohr *et al.*, 2010 [279]).

McN-A 343 und 77-LH-28-1 konnten als bitopische Liganden am M₂ AChR identifiziert werden [256, 279, 280]. Darüber hinaus konnte für AC-42 ein bitopisches Verhalten am M₁ AChR nachgewiesen werden [281].

1.4 Fluoreszenzmessungen

1.4.1 Allgemeine Grundlagen zur Fluoreszenz

1.4.1.1 Fluoreszenzmarker

1.4.1.1.1 Fluoreszenzproteine

Das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP) und seine andersfarbigen Varianten zählen zu den am häufigsten bei Fluoreszenzmessungen verwendeten Fluorophoren [282]. 1962 durch Shimomura *et al.* [283] als intrinsisch fluoreszierendes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert, entwickelte GFP einen unschätzbaren Wert für die Zell- und Molekularbiologie. Durch die Fusion der GFP-cDNA mit der DNA des zu untersuchenden Proteins konnte eine Fluoreszenzmarkierung von praktisch allen Proteinen erreicht werden [284], häufig ohne dass nach anschließender Expression in Zellen eine Beeinträchtigung von Zellwachstum und -funktion zu beobachten war [285]. Es war Forschern somit nun möglich, Vorgänge in Zellen und Organismen mit nicht-invasiven Methoden zu untersuchen [282].

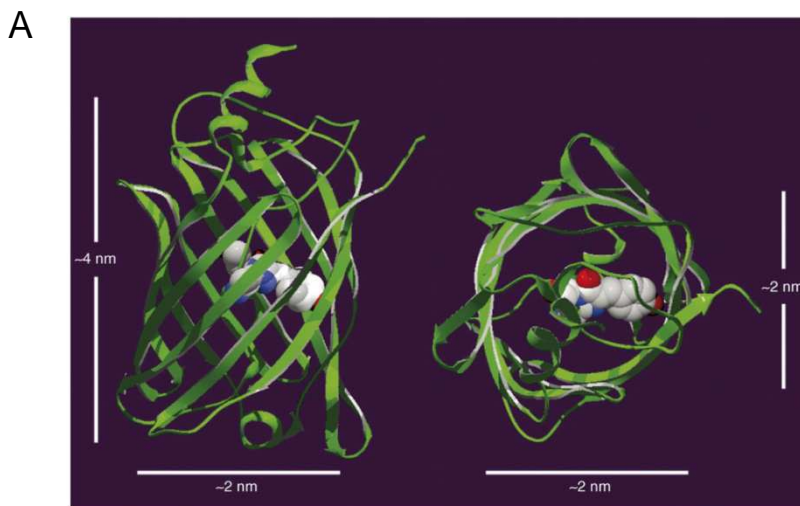
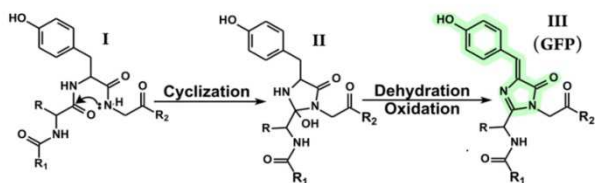
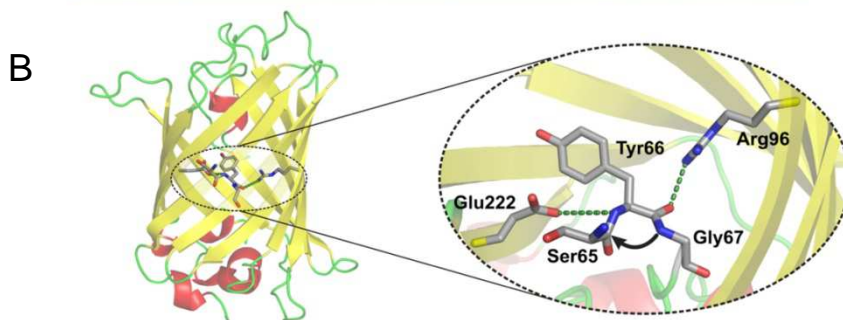


Abb. 19: Kristallstruktur des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und autokatalytische Bildung des Chromophors.

(A) Elf β -Faltblätter bilden eine Fass-ähnliche Struktur, in deren Zentrum der Chromophor als Bestandteil einer α -Helix vorliegt (entnommen aus Piston und Kremers, 2007 [286]). (B) Der Chromophor bildet sich autokatalytisch aus den Aminosäuren Serin⁶⁵, Tyrosin⁶⁶ und Glycin⁶⁷ durch Zyklisierung, Dehydratisierung und Oxidation (entnommen aus Pakhomov und Martynov, 2008 [287]).



Die Struktur des 238 Aminosäuren großen und 27 kDa schweren Fluoreszenzproteins konnte 1996 durch Ormö *et al.* und Yang *et al.* unabhängig voneinander aufgeklärt werden [288, 289]. Elf β -Faltblätter bilden eine Fass-ähnliche Struktur (β -barrel, β -can), in deren Zentrum der Fluorophor als Bestandteil einer α -Helix vorliegt. Der Chromophor, ein p-Hydroxybenzylidenimidazolion, das durch die Aminosäuren Serin⁶⁵, Tyrosin⁶⁶ und Glycin⁶⁷ gebildet wird, entsteht autokatalytisch durch Zyklisierung, Dehydratisierung und Oxidation [285]. Durch die Lage des Chromophors im Inneren des β -barrel wird er von schädlichen Umwelteinflüssen weitestgehend abgeschirmt [282].

Beständige Forschungsarbeit führte zu der Entwicklung weiterer Derivate des GFP. Diese zeigten beispielsweise veränderte Emissions- und Absorptionsspektren, oder wiesen eine verbesserte pH-Stabilität, oder Fluoreszenzintensität auf. Die andersfarbigen GFP-Varianten wurden entsprechend der von ihnen emittierten Fluoreszenzfarbe als z.B. cyan- (CFP), gelb- (YFP), oder blau- (BFP) fluoreszierende Proteine bezeichnet [290-293].

Die Mutation von Alanin²⁰⁶ zu Lysin resultierte in Fluoreszenzproteinen, die keine Dimerisierung aufwiesen, so konnte in anschließenden Fluoreszenzmessungen das Auftreten von Artefakten wegen Aggregation der Zielproteine verhindert werden [286, 290, 294]. Die Punktmutationen Phe64Leu und Ser65Thr im *enhanced GFP* (eGFP) führten zu einer Verbesserung der Proteinfaltung bei 37°C und einer 35-fach höheren Fluoreszenzintensität [291]. Durch die Entdeckung von rot fluoreszierenden Proteinen (*red fluorescent protein*, RFP) aus der Korallengattung *Discosoma* und deren Weiterentwicklung hinsichtlich Oligomerisierung und Fluoreszenzmaturierung bei 37°C konnte das Spektrum der Fluoreszenzproteine in den rot und dunkelrot (*far-red*) fluoreszierenden Bereich erweitert werden [294-296]. Mittlerweile umfasst das Emissionsspektrum, das durch die GFP- und RFP-Varianten abgedeckt werden kann einen Wellenlängenbereich von 440 bis >650 nm [287].

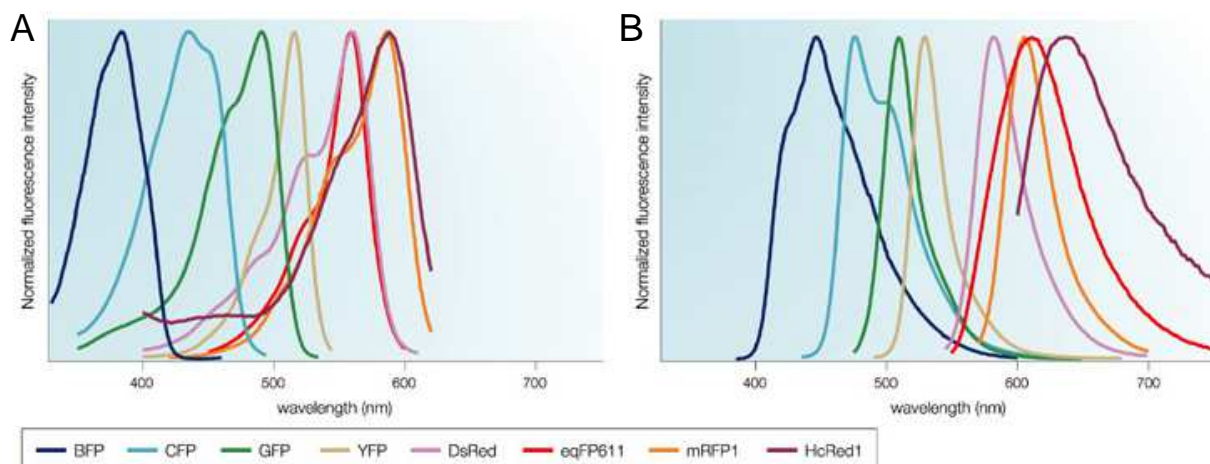


Abb. 20: Absorptions- und Emissionsspektren verschiedener Fluoreszenzproteine.

Sowohl die Absorptions- (A), als auch die Emissionsspektren (B) der aus *Aequorea victoria* und *Discosoma* Spezies abgeleiteten fluoreszenten Proteine überlappen miteinander. Die Emissions- sind im Vergleich zu den Anregungswellenlängen zu niedriger Energie hin verschoben. Die Emissionswellenlängen der GFP- und RFP-Derivate decken einen Wellenlängenbereich zwischen 440 bis >650 nm ab (entnommen aus Miyawaki, Sawano und Kogure, 2003 [297]).

1.4.1.1.2 Fluorescein arsenical hairpin binder (FIAsh)

Neben den Fluoreszenzproteinen existiert noch eine Vielzahl synthetischer Fluorophore, die zur Fluoreszenzmarkierung von Proteinen eingesetzt werden können. Zu diesen zählen unter anderem auch die Xanthenfarbstoffe Fluorescein und Rhodamin. Anders als bei GFP und dessen Varianten erfolgt hier die Fluoreszenzmarkierung nicht auf DNA-Ebene, sondern

kann nach der Proteinexpression durch spezielle Markierungsmethoden durchgeführt werden [298]. Im Falle von Fluorescein und Rhodamin erfolgt dies durch Kopplung der Farbstoffe an Cysteinreste im Zielprotein. Die Anwendung dieser Methode war allerdings auf *in vitro*-Experimente beschränkt. *In vivo* war eine solche Fluoreszenzmarkierung nur schwer durchführbar, da fast alle Proteine Cysteinreste aufweisen und so eine spezifische Markierung des Zielproteins unmöglich war [299].

Durch die Verwendung eines biarsenischen Derivats eines Fluorescein-Farbstoffes (4',5'-bis-(1,3,2-dithioarsolan-2-yl)-Fluorescein (*fluorescein arsenical hairpinbinder*, FIAsh), das nur an spezielle Tetracysteinmotive kovalent bindet, wurde die Fluoreszenzmarkierung eines spezifischen Zielproteins auch *in vivo* ermöglicht. Dazu wurde die hohe Affinität von Arsenverbindungen zu Dithiolen in Proteinen und Peptiden ausgenutzt [299, 300].

Der Vorteil von FIAsh besteht in der hohen Permeabilität, mit der es gebunden an Ethandithiol (EDT) die Zellmembran passieren kann. Die Bindung an EDT verringert zudem den toxischen Einfluss, der andernfalls durch die Biarsenverbindung beim Passieren der Zellmembran auf den Organismus ausgeübt werden könnte [300]. Erst durch Ausbildung einer hoch affinen, kovalenten Bindung zwischen den Arsenmolekülen des Farbstoffs und den Thiolverbindungen der Cysteinreste bildet sich das zur Fluoreszenz nötige, erweiterte Ringsystem aus. Für FIAsh ergibt sich ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 508 nm und ein Emissionsmaximum bei 528 nm im Bereich gelber Fluoreszenz [294, 301].

Das überaus seltene, natürliche Vorkommen des Tetracysteinmotivs in Kombination mit der Rigidität der Biarsenderivate, die nur Wechselwirkungen zwischen Arsenen und Cysteinen in einer bestimmten Konformation erlaubt [300-302], ermöglichen eine hoch spezifische Bindung zwischen Fluorophor und Zielstruktur.

Trotz der erhöhten Selektivität der Wechselwirkung mit dem Tetracysteinmotiv konnte gezeigt werden, dass auch endogene Cystein enthaltende Proteine durch die Biarsene markiert werden [303]. Die so erzeugte Hintergrundfluoreszenz kann allerdings durch einen der Markierung des Zielproteins nachgeschalteten Waschschrift mit EDT in mikromolaren Konzentrationen reduziert werden. Hierbei werden lediglich die unspezifisch gebundenen Fluorescein-Farbstoffe entfernt, die höher affine Bindung zwischen Biarsenen und den Cysteinen des Tetracysteinmotivs wird dadurch nicht beeinflusst [298].

Weitere Forschungsarbeiten führten zu der Entwicklung von Biarsenderivaten, die das Fluoreszenzspektrum komplett abdecken, wie beispielsweise rot und blau fluoreszierende Biarsenverbindungen (ReAsH, HoXAsH, CHoXAsH). War anfangs nur eine FIAsh-Markierung von Proteinen im intrazellulären Bereich möglich, konnte zudem auch eine Methode zur Fluoreszenzmarkierung von Strukturen im Extrazellulärbereich entwickelt werden [301].

Die Spezifität der Markierungsmethode konnte durch die Entwicklung von Tetracysteinsequenzen mit einer höheren Affinität zu den Fluorescein-Varianten erhöht werden. Durch die Weiterentwicklung der ursprünglichen Tetracysteinsequenz (CCRECC) zur CCPGCC-Sequenz konnte eine 5-10-fach höhere Stabilität des Komplexes zwischen FIAsh und dem Zielprotein beobachtet werden [301]. Die durch die CCPGCC-Sequenz induzierte Haarnadelstruktur, bei der die Cysteine einen Abstand von 6 Å zueinander einnehmen [301, 304] scheint der α -helikalen Konformation, die durch die CCRECC-Sequenz hervorgerufen wird, im Hinblick auf die Bindung von FIAsh überlegen zu sein.

Durch die Erweiterung von CCPGCC zu FLNccpgccMEP bzw. HRKccpgccKTF konnten die Quantenausbeute, Fluoreszenzintensität und Affinität der Biarsenverbindungen noch weiter gesteigert werden. So wurde eine 2-farbige Markierung mit Biarsenderivaten ermöglicht [305-307].

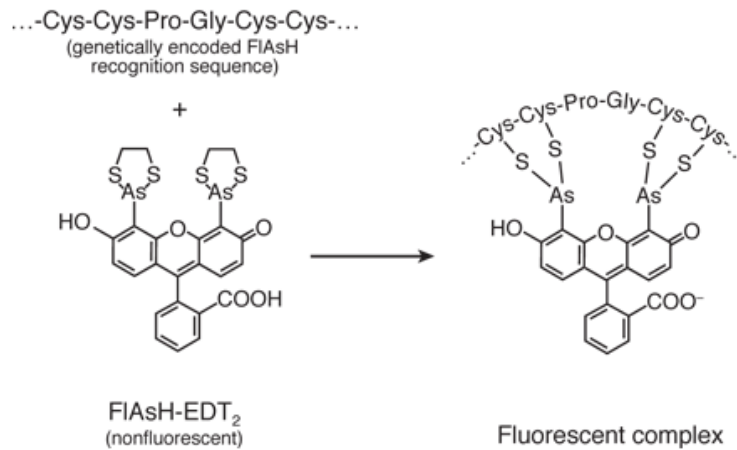


Abb. 21: Strukturformel des Fluorescein arsenical hairpin binders (FIAsH).

Gebunden an Ethandithiol (EDT) passiert FIASH als nicht fluoreszierende Verbindung die Zellmembran. Eine Fluoreszenz tritt erst auf, wenn FIASH über Wechselwirkungen mit den Thiolgruppen der Cysteine an die FIASH-Bindesequenz CCPGCC bindet (entnommen aus www.invitrogen.com).

Die Ähnlichkeit der spektralen Eigenschaften von YFP und FIASH ermöglichen einen Austausch von YFP gegen FIASH als Akzeptorfluorophor in FRET-Messungen mit CFP.

Das Einbringen der Tetracysteinsequenz in die Aminosäuresequenz des Zielproteins stellt einen weit weniger invasiven Eingriff dar, als die Fusion der cDNA eines Fluoreszenzproteins mit der des Zielproteins [299]. Verglichen mit YFP, das mit einer Größe von 27 kDa oft größer, als das Zielprotein ist, werden durch die Einführung des CCPGCC-Motivs und die anschließende Markierung mit Biarsenverbindungen (Größe = 700 Da) die Tertiärstruktur, sowie die Funktionalität des Zielproteins nicht wesentlich beeinträchtigt [284, 302].

Dies macht ein Vergleich der beiden A_{2A}-Sensoren A_{2A}-CFP-YFP und A_{2A}-CFP-FIASH deutlich. Während unter Verwendung des A_{2A}-CFP-YFP Sensors nur eine geringe Aktivierung der Adenylylzyklase detektiert werden konnte, induzierte der A_{2A}-CFP-FIASH Sensor eine dem wt A_{2A} Rezeptor vergleichbare Adenylylzyklase-Aktivierung [308]. Zudem können YFP-Derivate für gewöhnlich nur an den C-, oder N-Terminus eines Zielproteins fusioniert werden, die CCPGCC-Sequenz kann dagegen in jeden beliebigen Bereich des Zielproteins eingebracht werden [302, 305]. Darüber hinaus resultiert der Austausch von YFP gegen FIASH als Akzeptor in einer höheren FRET-Effizienz und auch die Distanzen zwischen Donor und Akzeptor können bei einer Verwendung von FIASH statt YFP akkurater ermittelt werden [308, 309].

1.4.1.2 Jablonski-Termschema

Das Jablonski-Termschema, auch als Jablonski-Diagramm bezeichnet, beschreibt die möglichen Energieniveaus, die ein Molekül nach Energieabsorption, oder – emission annehmen kann [310].

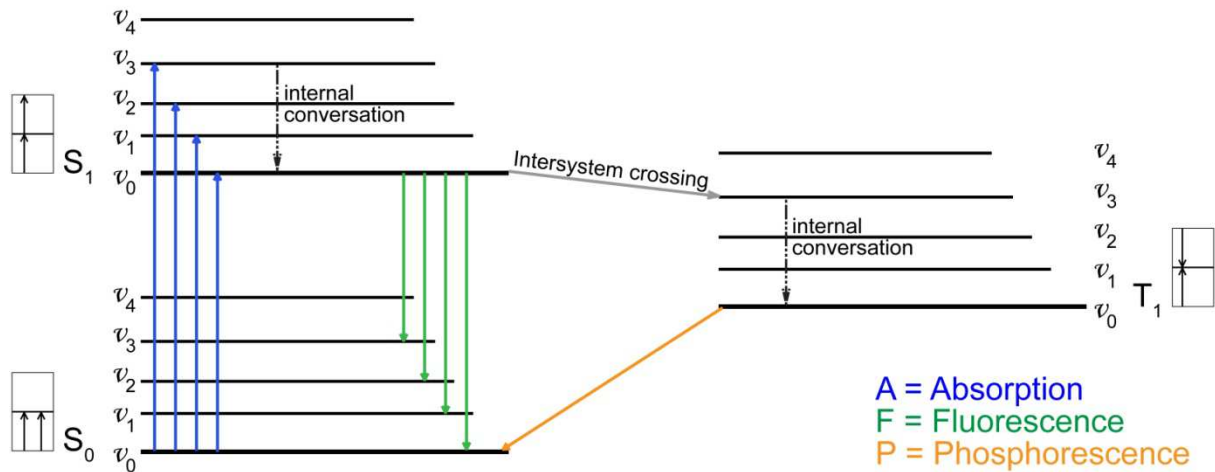
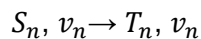


Abb. 22: Jablonski-Termschema (Jablonski-Diagramm).

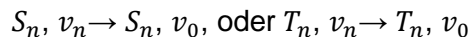
Darstellung der energetischen Übergänge eines Moleküls, die bei der Aufnahme, oder Abgabe elektromagnetischer Strahlung möglich sind. Farblich dargestellt sind Übergänge, bei denen Energie in Form von Photonen aufgenommen, oder abgegeben wird. Strahlungslose Übergänge sind grau oder schwarz markiert. Singulett- (S_0 , S_1) und Triplett-Zustände (T_1) können weiter in verschiedene Schwingungs- (v_0 , v_1) und Rotationsniveaus (hier nicht dargestellt) unterteilt werden.

Absorbiert ein Molekül elektromagnetische Strahlung, so wird es aus dem Singulett-Grundzustand (S_0) in einen angeregten Singulett-Zustand (S_n) angehoben, wobei Elektronen in höhere Schwingungs- (v_n), oder Rotationszustände versetzt werden können. Durch Energieabgabe (Emission) kann das angeregte Molekül wieder in seinen Grundzustand zurückkehren. Die Abgabe von Energie kann auf unterschiedliche Arten erfolgen:

Interkombination (*intersystem crossing*) : Das angeregte Elektron geht aus dem angeregten Singulett-Zustand unter Spin-Umkehr in einen angeregten Triplett-Zustand über. Diese Form der Emission erfolgt strahlungslos.

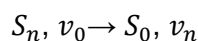


Interne Umwandlung (*internal conversion*): Strahlungslose Form der Energieabgabe, bei der das angeregte Elektron aus einer höheren Schwingungsebene des angeregten Singulett-, oder Triplett-Zustandes in den ersten, angeregten Singulett-, oder Triplett-Zustand zurückkehrt. Hierbei tritt keine Spin-Umkehr auf.



Bei der strahlungslosen Deaktivierung wird die emittierte Energie in Form von Wärme, als Rotations-, Schwingungs-, oder Translationsenergie an die Umgebung abgegeben.

Fluoreszenz: Durch die spontane Emission von Photonen gehen Elektronen aus dem angeregten Singulett-Zustand (S_n) in den Grundzustand (S_0) über. Die freiwerdende Energie ist dabei geringer als die zur Anregung aufgewendete Energie. Im Falle der Fluoreszenz bedeutet dies, dass die emittierte Strahlung eine größere Wellenlänge aufweist als die absorbierte. Dieses Phänomen wird auch als Stokes-Verschiebung (Rotverschiebung, *Stokes Shift*) bezeichnet.



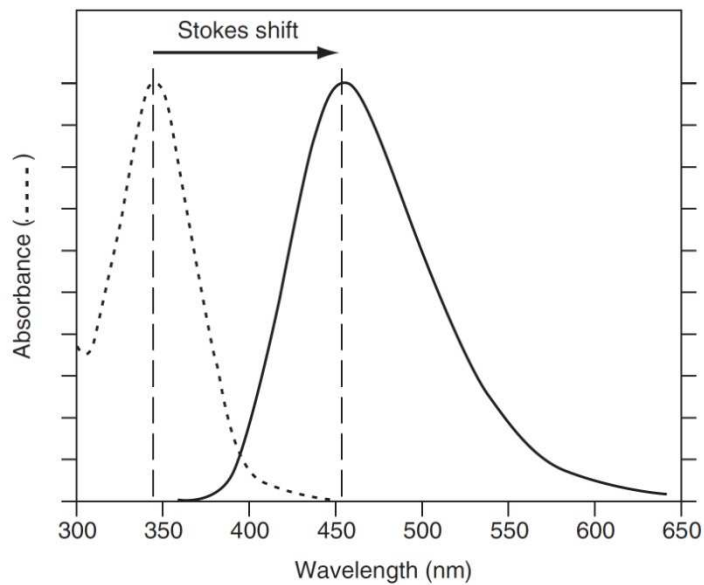
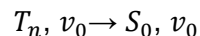


Abb. 23: Stokes-Verschiebung (Stokes shift).

Absorptions- und Emissionsspektrum eines Fluoreszenzproteins. Das Emissionsspektrum ist im Vergleich zum Exzitationsspektrum zu höheren Wellenlängen und somit zu einem Bereich geringerer Energie verschoben (entnommen aus Coling und Kachar, 2001 [311]).

Phosphoreszenz: Die Deaktivierung eines Elektrons aus dem Triplett-Zustand in den Singulett-Grundzustand unter Abgabe von Lichtenergie. Ein solcher Übergang ist aus quantenphysikalischer Sicht „verboten“, deswegen können angeregte Triplett-Zustände sehr langlebig sein. Während die Fluoreszenz innerhalb von Nanosekunden erlischt, kann bei der Phosphoreszenz ein Nachleuchten auftreten, das Sekunden bis Stunden anhalten kann [310].



1.4.2 Förster-Resonanz-Energietransfer

Der Förster-Resonanz-Energietransfer, auch als Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (*fluorescence resonance energy transfer*, FRET) bezeichnet, beschreibt die strahlungsfreie Energieübertragung von einem Donorfluorophor auf einen Akzeptorfluorophor. Hierbei wird der Akzeptor durch die strahlungslos transferierte Energie zur Fluoreszenz angeregt. In FRET-mikroskopischen Messungen wird die Fluoreszenzintensität von Donor und Akzeptor ermittelt, wobei allerdings nur der Donor durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird. Erfolgt der strahlungslose Energietransfer von einem biolumineszenten Donor auf einen Akzeptor, spricht man von Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer (BRET) [312].

Die strahlungslose Energieübertragung erfolgt bei FRET durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Akzeptor- und Donorfluorophor. Dies ist nur unter bestimmten Voraussetzungen möglich [313, 314]:

- Absorptionsspektrum des Akzeptors und Emissionsspektrum des Donors müssen ausreichend miteinander überlappen (>30%)
- die Dipole beider Fluorophore müssen parallel zueinander orientiert sein
- beide Fluorophore müssen sich in räumlicher Nähe zueinander befinden. Abhängig von Donor- und Akzeptor-Paar ist dabei ein Abstand zwischen beiden von 10 – 100 Å erforderlich [286].

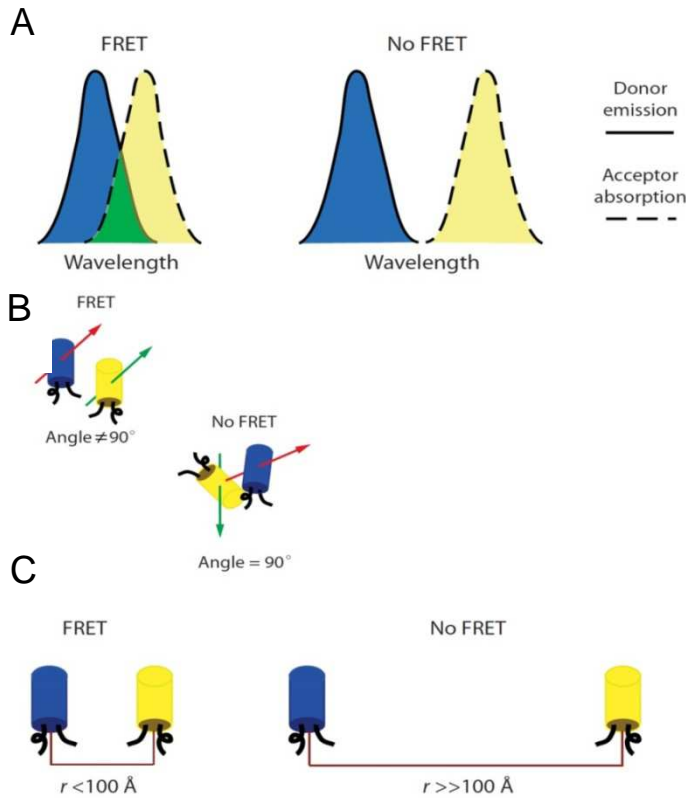


Abb. 24: Voraussetzungen, die das Auftreten eines FRET-Ereignisses ermöglichen.

(A) Emissionsspektrum von Donor (blau) und Absorptionsspektrum von Akzeptor (gelb) müssen miteinander überlappen, ist dies nicht der Fall, kann kein strahlungsloser Energietransfer stattfinden. (B) FRET tritt nur auf, wenn die Dipolmomente der beiden Fluorophore parallel zueinander ausgerichtet sind. (C) Der Abstand zwischen Donor und Akzeptor darf 100 Å nicht überschreiten (entnommen aus Vogel, Thaler und Koushik, 2006 [315]).

Die Distanz (r) der beiden Fluorophore zueinander und der Förster-Radius (R_0) sind für das Ausmaß der Energieübertragung (FRET-Effizienz, E_{FRET}), entscheidend. Die FRET-Effizienz beschreibt die Wahrscheinlichkeit, mit der ein strahlungsloser Energietransfer nach Donor-Exzitation auftritt. Sie kann mit Hilfe der Förster-Gleichung (Gl. 1) berechnet werden [314, 316].

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (\text{Gl. 1})$$

Aus Gl. 1 wird ersichtlich, dass die FRET-Effizienz in der sechsten Potenz von der Distanz zwischen beiden Fluorophoren abhängt. Der Förster-Radius definiert den Abstand zwischen Donor und Akzeptor, bei dem die Energieübertragung 50% entspricht. Beispielsweise beträgt der Förster-Radius des CFP-YFP-Paares $4,92 \pm 0,1 \text{ nm}$ [317]. Eine Verdopplung des Förster-Radius resultiert entsprechend der Förster-Gleichung in einer Abnahme der FRET-Effizienz um den Faktor 30.

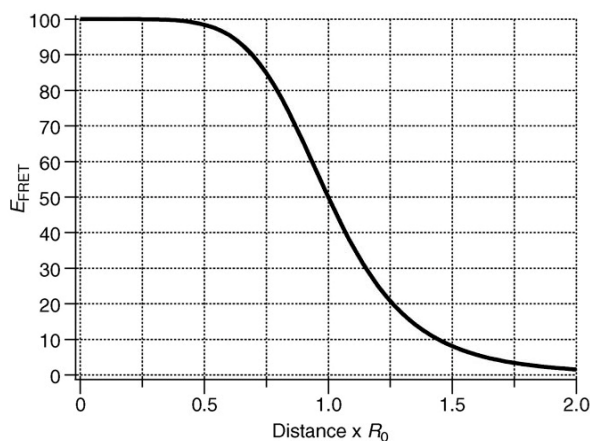


Abb. 25: Abhängigkeit der FRET-Effizienz von der Distanz zwischen Donor und Akzeptor.

Die FRET-Effizienz hängt in der sechsten Potenz von dem Abstand des Donor- und Akzeptorfluorophors voneinander ab. Daraus resultierend zeigt sich eine starke Abnahme von E_{FRET} mit zunehmender Distanz zwischen beiden Fluorophoren. Der Förster-Radius gibt den Abstand der beiden Fluorophore voneinander an, bei dem die FRET-Effizienz 50% beträgt (entnommen aus Piston und Kremers, 2007 [286]).

R_0 wird, wie in Gl. 2 angegeben, berechnet:

$$R_0 [nm] = \sqrt[6]{8,8 * 10^{-23} * n^{-4} * Q_D * \kappa^2 * J} \quad (\text{Gl. 2})$$

n	=	Refraktionsindex des umgebenden Mediums
Q_D	=	Quantenausbeute des Donors
κ^2	=	Orientierungsparameter der Dipolmomente der Fluorophore
J	=	spektraler Überlapp zwischen Donoremission und Akzeptorabsorption

Die Quantenausbeute des Donors (Quantum yield, Q_D) wird nach folgender Formel ermittelt (Gl. 3):

$$Q_D = \frac{\text{Anzahl der emittierten Photonen}}{\text{Anzahl der absorbierten Photonen}} \quad (\text{Gl. 3})$$

Die Messung von E_{FRET} kann auf drei verschiedene Arten erfolgen [286, 313, 314, 318-321]:

- intensitätsbasierte FRET-Messung
- Messung der Fluoreszenz-Lebenszeit (*Fluorescence-Lifetime-Imaging*, FLIM)
- Messung der Fluoreszenz-Anisotropie (homo-FRET)

Während in intensitätsbasierten und FLIM-Messungen ein Paar aus unterschiedlichen Fluorophoren, die einen spektralen Überlapp zeigen, eingesetzt wird, erfolgt die Messung der Fluoreszenz-Anisotropie mit einem Paar aus zwei identischen Fluorophoren.

Intensitätsbasierte FRET-Messungen: Sie ermöglichen eine Untersuchung der Konformationsänderung von Proteinen hinsichtlich Ausmaß, Ligandenabhängigkeit und Kinetik [297].

Zur Bestimmung der FRET-Effizienz werden Emissionsstärken von Donor- und Akzeptorfluorophor erfasst und ratiometrisch (FRET-Ratio) dargestellt. Angeregt wird dabei lediglich die Donorfluoreszenz. Bei den meisten FRET-Paaren überlappen sich die Emissionsspektren von Donor und Akzeptor in einem gewissen Ausmaß, d.h. im Akzeptorkanal wird nicht nur die Akzeptorfluoreszenz, sondern auch ein Anteil an Donoremission detektiert (Durchbluten, *bleed-through*). Zudem wird der Akzeptorfluorophor zum Teil auch durch die Exzitationswellenlänge des Donors angeregt (Falschanregung, *cross-talk*) [322]. Bei der quantitativen Analyse von E_{FRET} muss deswegen das FRET-Ratio um diese Werte korrigiert werden [286, 323].

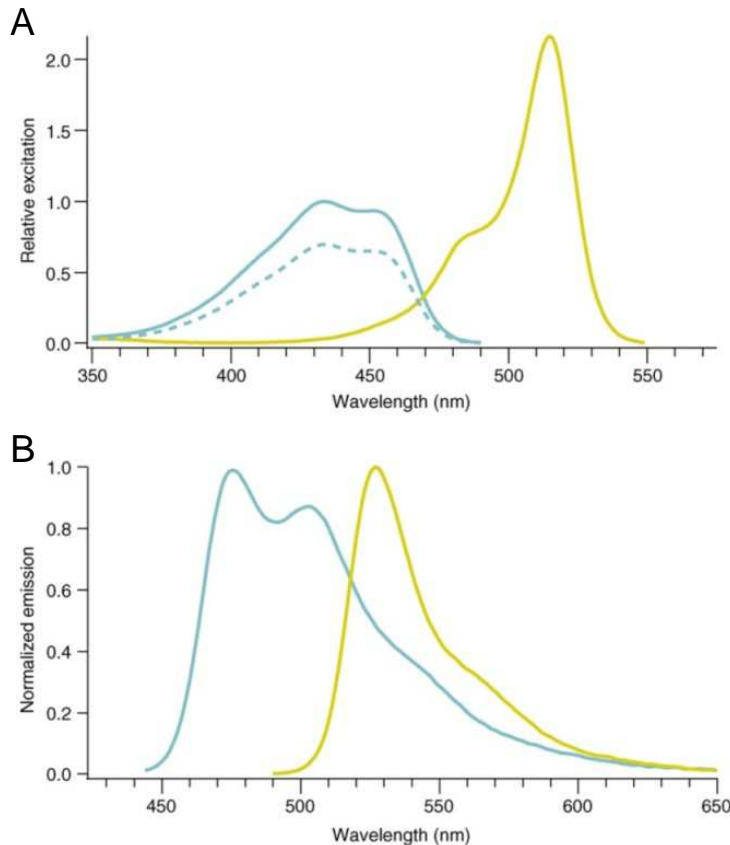


Abb. 26: Spektraler Überlapp der Exzitations- (A) und Emissionsspektren (B) von CFP (türkis) und YFP (gelb).

Sowohl die Anregungs-, als auch die Emissionsspektren der beiden Fluoreszenzproteine CFP und YFP überlappen miteinander. Wird CFP bei einer Wellenlänge von 436 nm zur Fluoreszenz angeregt, wird gleichzeitig auch die YFP-Fluoreszenz in gewissem Ausmaß angeregt (Falschanregung). Bei der Detektion der YFP-Fluoreszenz wird auch CFP zu einem bestimmten Anteil mit detektiert (Durchbluten) (entnommen aus Piston und Kremers, 2007 [286]).

Eine weitere Möglichkeit zur Ermittlung der FRET-Effizienz besteht in dem Akzeptor-Photobleichen, auch *Donor-Dequenching* genannt. Dazu wird die Donorfluoreszenz in Anwesenheit eines Akzeptors (F_{AD}) und nach Photobleichen des Akzeptorfluorophors (F_D) bestimmt. Die FRET-Effizienz wird anschließend wie folgt berechnet (Gl. 4):

$$E_{FRET} = 1 - \frac{F_{AD}}{F_D} \quad (\text{Gl. 4})$$

Bei der Auswahl des Akzeptors zur ratiometrischen Bestimmung von E_{FRET} sollte auf eine hohe Quantenausbeute geachtet werden.

FLIM: Mittels FLIM kann die FRET-Effizienz durch Messung der Zeitdauer zwischen Donoranregung und -emission ermittelt werden. Durch FRET, d.h. durch den strahlungslosen Energietransfer von Donor auf Akzeptor verkürzt sich die Lebensdauer des Donorfluorophors. Da in einem optimierten Messsystem das Durchbluten des Donors in den Akzeptorkanal vernachlässigt werden kann, sind FLIM-Messungen weitestgehend unabhängig von der Konzentration der Fluorophore und der Lichtstreuung [320, 324]. Nachdem bei der FLIM-Methode nur die Fluoreszenz des Donors bestimmt wird, kann eine hohe Quantenausbeute bei der Wahl des Akzeptors als Auswahlkriterium vernachlässigt werden, es sollte aber darauf geachtet werden, dass der Akzeptorfluorophor einen hohen Absorptionskoeffizient aufweist.

Fluoreszenz-Anisotropie-Messung: Bei der Auswahl des zur Messung verwendeten Fluorophors sollte darauf geachtet werden, dass dieser nur einen geringen *Stokes shift* aufweist. Die Bestimmung der FRET-Effizienz erfolgt hier durch den Vergleich der Dipolmomente der Fluorophore nach Anregung mit polarisiertem Licht.

Tritt FRET auf, so ändert sich abhängig vom Ausmaß des Energietransfers die Polarisierung von Anregungs- und Emissionsdipolmoment, die Anisotropie wird verringert.

1.4.2.1 Methoden der FRET-Messung in lebenden Zellen

Mit Hilfe von FRET-Messungen können sowohl inter- (Protein-Protein-Wechselwirkungen) [325-328] als auch intramolekulare (z.B. Konformationsänderung eines Proteins) [328, 329] Ereignisse untersucht werden. Dazu werden Fluorophore, die sich als FRET-Paar eignen (z.B. CFP und FIAsh, oder CFP und YFP) in das gleiche Protein an unterschiedlichen Positionen eingebracht (intramolekulares FRET). Für intermolekulare FRET-Studien werden unterschiedliche Proteine, oder Proteinuntereinheiten einzeln mit den Fluorophoren markiert [294]. Mit Hilfe geeigneter Biosensoren kann auch die Aktivierung, oder Inhibition nachgeschalteter Signalwege (z.B. cAMP-Messung), sowie die Freisetzung von Botenstoffen wie beispielsweise Ca^{2+} untersucht werden [286, 330-332].

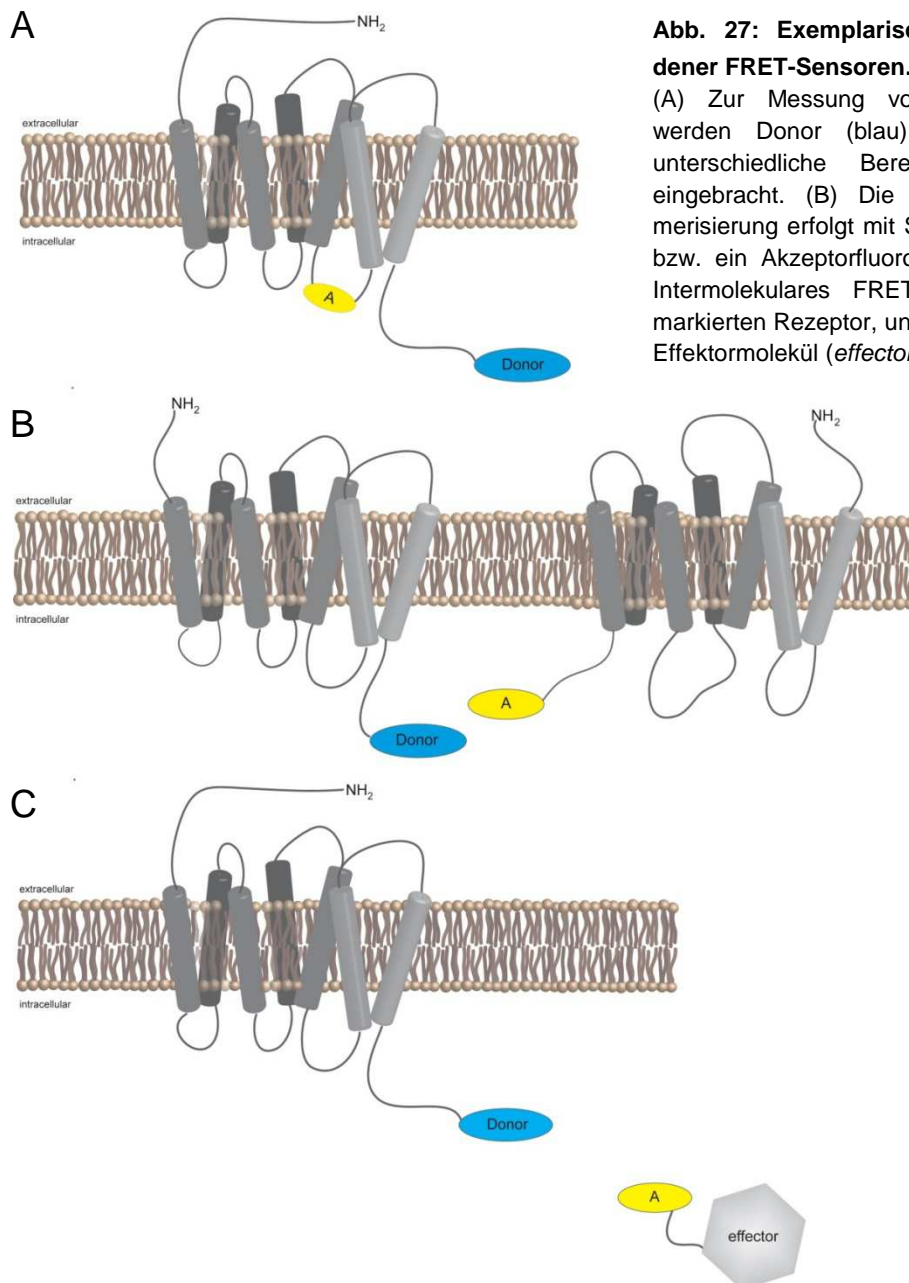


Abb. 27: Exemplarische Darstellung verschiedener FRET-Sensoren.

(A) Zur Messung von intramolekularem FRET werden Donor (blau) und Akzeptor (gelb) in unterschiedliche Bereiche desselben Proteins eingebracht. (B) Die Detektion von Rezeptordimerisierung erfolgt mit Sensoren, an die ein Donor-, bzw. ein Akzeptorfluorophor fusioniert wurden. (C) Intermolekulares FRET wird mit einem Donor-markierten Rezeptor, und einem Akzeptor-markierten Effektormolekül (*effector*) gemessen.

Dynamische FRET-Messungen erfassen die zeit-, oder stimulusabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität von Donor und Akzeptor. Bei der herkömmlich verwendeten Weitwinkel-Fluoreszenzmikroskopie stellt hierbei die Hintergrundfluoreszenz, hervorgerufen durch Autofluoreszenz anderer Zellorganelle, oder Proteine ein großes Problem dar.

Mittels zeitauflösendem FRET (*time resolved FRET*, TR-FRET), *total internal refraction fluorescence* (TIRF) Mikroskopie, oder Konfokalmikroskopie kann dies umgangen werden. Die Verwendung von Fluorophoren mit einer langen Lebensdauer und die zur Fluoreszenzanregung zeitversetzte Emissions-Detektion reduzieren in der TR-FRET-Mikroskopie das Auftreten spontaner Fluoreszenzwechselwirkungen mit endogen fluoreszenten Zellbestandteilen. Bei der TIRF-Messung wird die Hintergrundfluoreszenz dadurch reduziert, dass die Fluoreszenz nur in einem oberflächlichen Bereich der Zelle angeregt wird [333]. Durch die Punktillumination kleiner Regionen des zu untersuchenden Materials werden in der Konfokalmikroskopie sowohl Kontrast als auch optische Auflösung verbessert. Zudem erlaubt die Konfokalmikroskopie eine dreidimensionale Aufnahme der FRET-Signale [334]. Aus der Abstandsabhängigkeit des FRET-Ereignisses resultiert die Anwendbarkeit der FRET-Technik zur Bestimmung der Distanz zwischen fluoreszenzmarkierten Proteinen, oder Proteinuntereinheiten.

Für jede Methode der FRET-Mikroskopie muss die Auswahl an Donor und Akzeptor optimiert werden, um das bestmögliche FRET-Ergebnis zu erzielen.

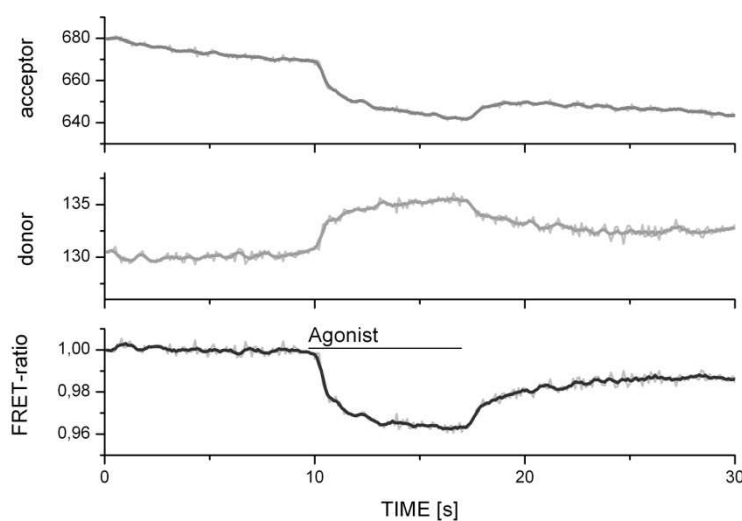


Abb. 28: Beispiel einer dynamischen FRET-Messung.

Die Zugabe von Agonist führt in diesem Beispiel zu einer Abnahme der Akzeptoremission und einer wechselseitigen Zunahme der Donoremission. Daraus resultierend nimmt das FRET-Ratio ab. Nach Entfernen des Agonisten kehren die jeweiligen Signale wieder auf die Basislinie zurück.

1.4.2.2 Detektion ligandenselektiver Änderungen der Rezeptorkonformation mittels FRET

Mit Hilfe von FRET-Messungen konnten Zürn *et al.* [335] am α_{2A} Adrenorezeptor bereits zeigen, dass die Bindung unterschiedlicher Liganden eine selektive Beeinflussung der Rezeptorkonformation zur Folge hat. Dies konnte auch am β_2 AR nachgewiesen werden [217].

Um die ligandenselektive Änderung der Rezeptorkonformation durch FRET-Studien nachzuweisen, sind mindestens zwei Sensoren desselben Rezeptors notwendig, in denen sich die Positionen von Donor bzw. Akzeptor unterscheiden. Beispielsweise könnte Sensor A den Donor am C-Terminus und den Akzeptor im N-terminalen Bereich von IL 3 tragen, während sich bei Sensor B der Donorfluorophor auch am C-Terminus, der Akzeptorfluorophor aber in der C-terminalen Region von IL 3 befinden könnte. Bei anschließenden

FRET-Experimenten werden die Sensoren mit unterschiedlichen Liganden superfundiert. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die Liganden in sättigenden Konzentrationen eingesetzt werden. So wird sicher gestellt, dass die verschiedenen Signal-Antworten aus der unterschiedlichen Fähigkeit der Liganden resultieren, den Rezeptor zu aktivieren. Abweichungen in der Rezeptorbesetzung können somit als Begründung für unterschiedlich hohe Amplituden der FRET-Signale ausgeschlossen werden. Als Referenz sollte in derartigen Messungen nach Möglichkeit der endogene Ligand des zu untersuchenden GPCR eingesetzt werden.

Werden nun die unterschiedlichen Höhen der FRET-Signale ligandenselektiv analysiert und Sensor-abhängig in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen, können unterschiedliche Befunde auftreten:

- Die Testliganden beeinflussen, wie die Referenzsubstanz, beide Sensoren im jeweils gleichen Ausmaß. In einer grafischen Darstellung kommen alle Liganden auf unterschiedlichen Höhen der Winkelhalbierenden zwischen beiden Achsen zu liegen
- Die Testliganden zeigen, verglichen mit dem Referenzliganden eine unterschiedliche Beeinflussung der beiden Sensoren. In einer grafischen Darstellung ist kein 1:1-Zusammenhang zwischen den Substanzen erkennbar.

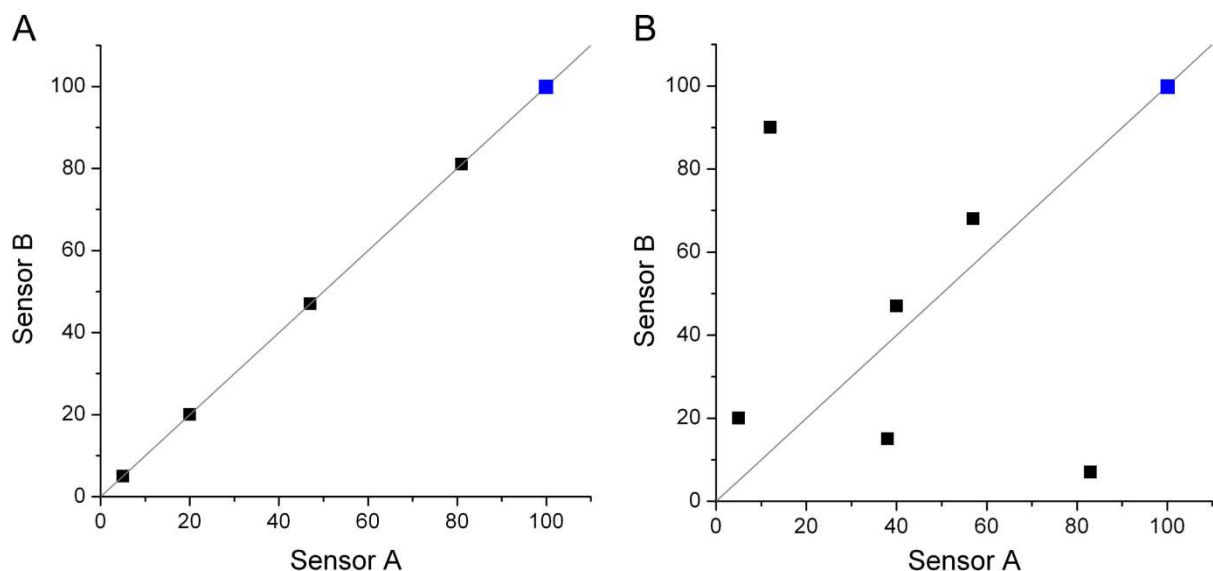


Abb. 29: Vergleich ligandenselektiver Beeinflussung der Rezeptorkonformation ermittelt mittels FRET-Experimenten.

(A) Die Testliganden beeinflussen die Sensoren A und B im jeweils gleichen Ausmaß verglichen mit der Referenzsubstanz (blau). Die Amplituden der FRET-Signale wurden analysiert, als Perzentile der Referenzsignale berechnet und Sensor-spezifisch grafisch dargestellt. Alle Messpunkte befinden sich auf der Winkelhalbierenden zwischen den beiden Achsen.

(B) Die Testsubstanzen beeinflussen, anders als die Referenzsubstanz, die beiden Sensoren in jeweils unterschiedlichem Ausmaß. Nach Ausmessung der Signalhöhen und statistischer Analyse zeigt sich im Diagramm kein 1:1-Zusammenhang zwischen beiden Sensoren.

Die Beobachtung, dass verschiedene Sensoren desselben Rezeptors durch Liganden unterschiedlich stark beeinflusst werden, könnte darauf hinweisen, dass unterschiedliche Liganden eine jeweils andere Konformation des GPCR induzieren.

2. Zielsetzung

Die Beteiligung der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) an einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Vorgänge im Organismus macht sie zu einer attraktiven Zielstruktur für die pharmakologische Therapie. Durch die hohe Sequenzhomologie der orthosterischen Ligandenbindestelle in allen mAChR-Subtypen ($M_1 - M_5$) und der damit verbundenen eingeschränkten Rezeptorselektivität, mit der Pharmaka an mAChR binden, sind die pharmakologischen Einsatzmöglichkeiten der muskarinergen Therapie derzeit allerdings begrenzt.

Bei der Erforschung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) konnten in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt werden. Dies war unter anderem auch durch die Verwendung verschiedener Mikroskopietechniken in Kombination mit Fluoreszenzmarkern möglich. Anders als *in vitro* Methoden erlaubt die FRET-Mikroskopie eine Untersuchung intra- und intermolekularer Wechselwirkungen in lebenden Zellen mit einer hohen zeitlichen Auflösung.

Mit Hilfe der FRET-Technik sollte in dieser Arbeit die Konformationsänderung des M_2 AChR in Abhängigkeit von verschiedenen Liganden untersucht werden. Zunächst sollten zwei M_2 AChR-Sensoren entwickelt und charakterisiert werden. Mit deren Hilfe sollte nachfolgend untersucht werden, ob verschiedene orthosterische Liganden die Rezeptorkonformation unterschiedlich beeinflussen können.

Neben der orthosterischen Bindestelle verfügen mAChR über mindestens eine zusätzliche allosterische Bindestelle. Diese weist einen geringen Konservierungsgrad zwischen allen mAChR-Subtypen auf. So kann mit Hilfe allosterischer Modulatoren, im Gegensatz zu orthosterischen Liganden, eine selektivere Regulierung einzelner mAChR-Subtypen erreicht werden. Zunächst sollten ausgewählte Allosterie bezüglich ihrer Affinität und Wirkstärke in FRET-Messungen charakterisiert werden, darüber hinaus sollte ein möglicher Einfluss allosterischer Liganden auf die Rezeptorkonformation untersucht werden.

Durch die bereits publizierten dualsterischen Liganden (Hybrid 1 und 2) des M_2 AChR [270] wird eine gleichzeitige Interaktion mit der orthosterischen und der allosterischen Bindestelle des Rezeptors ermöglicht. Auf diese Weise wird allosterisch-vermittelte Subtypselektivität mit orthosterisch induzierter Wirkstärke und Affinität kombiniert. Zudem konnte für die Hybride funktionelle Selektivität hinsichtlich der G-Protein Aktivierung detektiert werden. Diese Eigenschaften machen die dualsterischen Liganden zu einem interessanten Forschungsgegenstand in der Arzneimittelentwicklung. Deshalb sollte die Beeinflussung der Rezeptorkonformation des M_2 AChR durch die Hybride 1 und 2 mittels FRET-Messungen untersucht werden.

Durch die Untersuchung von Signalwegen, die einer Rezeptoraktivierung nachgeschaltet reguliert werden, sollte eine Korrelation zwischen der ligandenselektiven Konformationsänderung des M_2 AChR und dem Ausmaß der Regulation von downstream Signalwegen hergestellt werden. Als wichtige Signalwege wurden dazu die Translokation von β -Arrestin2 nach Rezeptoraktivierung, sowie die Aktivierung des G_i Proteins mit Hilfe konfokal- und FRET-mikroskopischer Methoden untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Biologisches Material

3.1.1.1 Bakterienstämme

Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland: *E. coli* DH5 α

3.1.1.2 Eukaryotische Zelllinien

HEK293 Zellen

HEK293T Zellen (HEK TSA-Zellen)

CHO-K1-wt Zellen

3.1.1.3 Enzyme

Eppendorf, Hamburg, Deutschland:

Taq DNA-Polymerase

New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland:

Restriktionsenzyme und Puffer
100bp und 1kb DNA-Leiter
DNA-Polymerasen und Puffer

3.1.1.4 Plasmide und Primer

Alle Primer wurden von Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

3.1.1.4.1 Plasmide

Die Expression aller DNA-Inserts erfolgte in dem Vektorsystem pcDNA3.

3.1.1.4.2 Plasmid-DNA

cDNA resource center, University of Missouri Rolla, Rolla, MO: huM₂ AChR

Zabel, U., Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg:

hu HAFlagM₂CFP (M₂CFP)

hu HAFlagM₂YFP (M₂YFP)

hu HAFlagM₂FIAsH-TM5CFP (M₂i3-N) Einschubstelle: Asp²²⁹CCPGCCPro²³⁰

hu HAFlagM₂FIAsH-TM5CFP Y104A (M₂i3-N Y104A)

hu HAFlagM₂FIAsH-TM5CFP Y177A (M₂i3-N Y177A)

hu HAFlagM₂FIAsH-TM5CFP W422A (M₂i3-N W422A)

hu HAFlagM₂FIAsH-TM5CFP Y177A/W422A (M₂i3-C Y177A/W422A)

hu HAFlagM₂FIAsHTM6CFP -5 (M₂i3-C) Einschubstelle: Asp³⁵⁵CCPGCCGlu³⁵⁶

hu HAFlagM₂FIAsHTM6CFP -1 (M₂i3-C-1) Einschubstelle: Thr³⁶⁹CCPGCClys³⁷⁰

hu HAFlagM₂FIAsHTM6CFP -2 (M₂i3-C-2) Einschubstelle: Ala³⁷³CCPGCClys³⁷⁴

hu HAFlagM₂FIAsHTM6CFP -3 (M₂i3-C-3) Einschubstelle: Iso³⁶⁰CCPGCCVal³⁶¹

hu HAFlagM₂FIAsHTM6CFP -4 (M₂i3-C-4) Einschubstelle: Iso³⁶⁵CCPGCCVal³⁶⁶

hu HAFlagM₂FIAsH-TM6CFP-5 Y104A (M₂i3-C Y104A)

hu HAFlagM₂FIAsH-TM6CFP-5 Y177A (M₂i3-C Y177A)

hu HAFlagM₂FIAsH-TM6CFP-5 W422A (M₂i3-C W422A)

hu HAFlagM₂FIAsH-TM6CFP-5 Y177A/W422A (M₂i3-C Y177A/W422A)

im Haus bereits vorhanden:

Flag-M₂-sl3-FIAsH-GSGEG-CFP

bovines β -Arrestin1YFP

bovines β -Arrestin2CFP

bovines β -Arrestin2YFP

bovine GRK 2

Bünemann, M., Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg/ Institut für Pharmakologie, Universität Marburg:

Hu G β ₁-Untereinheit

r G α iYFP-Untereinheit

hu G γ ₂CFP-Untereinheit

Kostenis, E., Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn:

G α q G66Di5

3.1.2 Verbrauchsmaterial, Reagenzien und Chemikalien

3.1.2.1 Plastikwaren und Verbrauchsmaterial

Hartenstein, Würzburg, Deutschland:	Deckgläschen, 24mm (coverslips) Gummiwischer
Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland:	MultiScreen FC, Filterplatten
Nunc, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland:	Zellkulturschalen „six-well“ Platten „48-well“ Platten Kryoröhrchen
Eppendorf, Hamburg, Deutschland:	Reaktionsgefäße (Eppendorf-Tube)
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland:	BD Falconröhrchen, Polystyrol-Röhrchen
Corning GmbH, Wiesbaden, Deutschland:	„96-well“ Platte, costar 3599 „96-well“ Platte, costar 3367

3.1.2.2 Reagenzien und Gebrauchsmaterial für die Mikroskopie

Applichem, Darmstadt, Deutschland:	Immersionsöl für die Mikroskopie (fluoreszenzfrei)
------------------------------------	---

Molecular Probes, Eugene, Oregon

Attofluor® cell chamber
(Attofluor Kammer)

3.1.2.3 Kits

Invitrogen, Molecular Probes, Karlsruhe, Deutschland

Fluo-4 NW Calcium Assay Kit

Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

Qiagen Plasmid Midi Kit
Qiagen Plasmid *Plus* Midi Kit
Qiaquick Gel Extraction Kit

3.1.2.4 Reagenzien für die Zellkultur

Biochrom AG, Berlin, Deutschland:

Fötale Kälberserum (FKS)

Gibco Life Technologies, Eggenstein, Deutschland:

Geneticin (G418)

Invitrogen, Darmstadt, Deutschland:

Opti-MEM®

MP Biomedicals, Heidelberg, Deutschland:

Poly-D-Lysin

PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland:

Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5g/l Glucose (DMEM)
DMEM mit Nährfaktor F12 (DMEM F12)
DPBS-Puffer
L-Glutamin
Minocyclin
Penicillin-Streptomycin
Tiamulin
Trypsin-EDTA

3.1.2.5 Transfektionsreagenzien

Invitrogen, Molecular Probes, Karlsruhe Deutschland:

Lipofectamine LTX™ Plus Reagent

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland:

GeneJuice®

Qiagen, Hilden, Deutschland:

Effectene® Transfection Reagent

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland:

FuGENE® HD

3.1.2.6 Chemikalien

Applichem, Darmstadt, Deutschland:

Agar
Kalziumchlorid (CaCl₂)
Dimethylsulfoxid (DMSO)
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)
EDTA
Eisessig
Ethidiumbromid

Glucose, wasserfrei
Guanosin-5'-triphosphat (GTP)
Hefeextrakt
HEPES
Kaliumchlorid (KCl)
Kaliumacetat
Kalium-Dihydrogenphosphat
(KH_2PO_4)
Magnesiumchlorid (MgCl_2)
Natriumchlorid (NaCl)
Natriumhydroxid (NaOH)
Natriumdodecylsulfat (SDS)
Tris, Tris-HCl
Trypton

Bio-Rad, München, Deutschland:

Bio-Rad Protein Assay Reagenz

Eppendorf, Hamburg, Deutschland:

Desoxyribonukleotide (dNTPs)

Invitrogen, Molecular Probes, Karlsruhe Deutschland:

CellMask™ DeepRed
fluorescein arsenical hairpin binder
(FIAsH)
(Synthese durch Heller, E., Lehrstuhl
für Pharmazeutische Chemie,
Universität Würzburg)
RNaseA
T4 DNA-Ligase

J.T. Backer, Deventer, Niederlande:

Ethanol (EtOH)
Isopropanol

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland:

Bromphenolblau
Glycerin

New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland:

Bovines Serum Albumin (BSA)

peQLab, Erlangen, Deutschland:

Agarose

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland:

1,2-Ethandithiol (EDT)
Polyethylenglycol 3000 (PEG 3000)

3.1.3 Rezeptorliganden

Amersham, GE Healthcare, München, Deutschland:

[^3H] N-Methylscopolamin
([^3H] NMS)

Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland:

Carbachol

Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland:

Acetylcholin (ACh)
Acetyl- β -methylcholin

Tocris, Bristol, UK:

Klöckner, J., Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie,
Universität Würzburg:

Acetylthiocholin
Arecolin
Atropin
Carbamyl- β -methylcholin
Muskarin
5-Methylfurmethiodid
Arecaidin-2-ynylester Tosylat
Ipratropium
McN-A 343
(4-(N-(3-chlorophenyl)carbamoyloxy)-
2-butynyltrimethylammoniumchlorid)
Oxotremorin
OxotremorinM
Pilocarpin
Pirenzepin
Scopolamin
Telenzepin
Xanomelin
EHW 477
Hybrid 1 (H 1)
Hybrid 2 (H 2)
Iperoxo-Hexamethonium
Iperoxo
Iper-8-Phth
JK 289
JK 337
JK 338
JK 519
Naph-7-Iper
Naph-8-Iper
Naphmethonium
N-Butyliperoxo
Seminaph
 $\frac{1}{2}$ W84
W84

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung prokaryotischer Zellen

E. coli DH5 α wurden auf LB-Agarplatten, oder in LB-Medium bei 37°C über Nacht im Brutschrank, oder im Schüttler inkubiert. Um gegebenenfalls eine Selektion der Bakterien hinsichtlich eines transformierten Plasmides zu erreichen, wurden LB-Medium und LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzt.

LB (*Lysogeny Broth*)-Medium:

10 g/l	Trypton
5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	NaCl

LB-Agarplatten: 10 g Agar pro Liter Medium wurden unter Erhitzen gelöst, auf Petrischalen ausgegossen und ausgehärtet.

3.2.1.2 Generierung kompetenter Bakterien

Bereits kompetente Bakterienzellen wurden zur Vereinzelnung auf LB-Agarplatten ohne Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für eine Vorkultur wurde eine Einzelkolonie von der Agarplatte in 50 ml LB-Medium überführt und wiederum über Nacht bei 37°C im Schüttler kultiviert. 250 ml LB-Medium wurden mit 4,5 ml dieser Vorkultur angeimpft und bei 37°C im Rotationsschüttler bis zum Erreichen einer optischen Dichte von OD = 0,4-0,6 (gemessen bei 595 nm) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min, 3400 x g, Hettich, Rotanta 96 R). Das erhaltene Pellet wurde in 25 ml frisch angesetztem TSB resuspendiert und aliquotiert. Nach einer 90-minütigen Inkubation der Aliquots auf Eis wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten *E. coli* wurden bei -80°C im Gefrierschrank gelagert.

TSB („*transformation and storage buffer*“):

10% (M/V)	PEG 3000
5% (V/V)	DMSO
20 mM	MgCl ₂
in LB-Medium, pH 6,1, steril filtriert	

3.2.1.3 Transformation kompetenter *E.coli* mittels KCM-Methode

Ein Ansatz aus 100 μ l kompetenten Bakterien, 100 μ l 1 x KCM und der zu transformierenden DNA (5-10 μ g DNA aus Ligationsansatz, oder 0,1-0,5 μ g Plasmid-DNA) wurde 20 Minuten auf Eis und anschließend 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Transformationsansatz für 50 Minuten bei 37°C im Heizblock geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde bei 2300 x g in einer handelsüblichen Tischzentrifuge 5 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 100 μ l LB-Medium resuspendiert, auf eine LB-Agarplatte mit Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht im Inkubator bei 37°C kultiviert.

5 x KCM-Puffer:	150 mM	CaCl ₂
	250 mM	MgCl ₂
	500 mM	KCl

3.2.1.4 Testung der kompetenten Zellen auf Transformationseffizienz

Kompetente *E. coli* wurden nach der KCM-Methode mit Plasmid-DNA in unterschiedlichen Konzentrationen transformiert. Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt und die Transformationseffizienz wurde nach folgender Formel errechnet:

$$\text{Transformationseffizienz} = \frac{\text{Anzahl der Bakterienkolonien}}{\text{Menge der transformierten DNA } [\mu\text{g}]}$$

Bakterien wurden als ausreichend kompetent zu Klonierungszwecken angesehen, wenn pro 1 µg eingesetzter DNA $\geq 10^7$ Kolonien gebildet wurden. Zur Plasmidamplifikation waren auch geringere Kolonie-Ausbeuten geeignet.

3.2.1.5 DNA-Präparation

3.2.1.5.1 Minipräparation

Die Aufreinigung geringer DNA-Mengen erfolgte mittels Minipräparation. 5 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum wurden mit einer Kolonie transformierter *E. coli* versetzt und über Nacht im Rotationsschüttler inkubiert. 1,5 ml dieser Vorkultur wurden bei 2300 x g über 5 Minuten abzentrifugiert. Nach Abtrennen des Überstandes wurde das Pellet in 300 µl Puffer 1 aufgenommen und resuspendiert. Ein Aufschluss der Bakterien und die DNA-Denaturierung wurden durch Zugabe von 300 µl Puffer 2 und 5-minütige Inkubation bei RT erreicht. Mit Zugabe von 300 µl Puffer 3 wurde der Ansatz neutralisiert und nach ausreichendem Mischen 15 Minuten bei 20800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde aus diesem die Plasmid-DNA unter Zufügen von 500 µl Isopropanol (70% V/V) und starkem Vermischen gefällt und abzentrifugiert (15 min, 20800 x g, 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet wurde mit 600 µl 70%-igem (V/V) Ethanol gewaschen und für 5 Minuten bei 16100 x g zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde die pelletierte Plasmid-DNA für einige Minuten getrocknet und anschließend in 30 µl bidestilliertem H₂O gelöst.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in einer handelsüblichen Tischzentrifuge.

Puffer 1:	100 µg/ml	RNaseA
	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	EDTA, pH 8,0

Puffer 2:	200 mM	NaOH
	1% (M/V)	SDS

Puffer 3:	3 M	Kaliumacetat, pH 5
-----------	-----	--------------------

3.2.1.5.2 Midipräparation mit Hilfe von Qiagen-Säulen

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren und aufzureinigen, wurde das Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen GmbH) verwendet.

100 ml einer Bakterien-Vorkultur wurden durch 15-minütige Zentrifugation (6000 x g, 4°C, Beckman Avanti J-25) pelletiert. Das resultierende Pellet wurde in 4 ml Puffer 1 resuspendiert, die Bakterien durch Zusatz von 4 ml Puffer 2 und Schütteln bis zum Auftreten einer Blaufärbung aufgeschlossen und die DNA denaturiert. Nach 5-minütigem Lysieren bei RT wurde der Ansatz durch Zugabe von 5 ml Puffer 3 neutralisiert. Nach ausreichender Vermischung – sichtbar durch eine Farbänderung von blau zu weiß - wurde der Ansatz 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation der Suspension (30 min, 20000 x g, 4°C, Beckman Avanti J-25) wurde der Überstand auf Anionenaustauscher-Säulen aufgebracht. Nach Durchlaufen des Überstandes wurden die Säulen 2-mal mit 10 ml Waschpuffer QC gewaschen, die gereinigte DNA wurde mit 5 ml Elutionspuffer eluiert. Aus dem Eluat wurde die DNA durch Zusatz von 3,5 ml Isopropanol 70% (V/V) gefällt und durch einen anschließenden Zentrifugationsschritt (30 min, 15000 x g, 4°C, Hettich Rotanta 96 R) präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 2 ml 70%-igem (V/V) EtOH gewaschen, erneut für 10 Minuten bei 15000 x g abzentrifugiert und abschließend in 100 µl bidestilliertem H₂O gelöst.

3.2.1.5.3 DNA-Präparation mittels Qiagen Plasmid *Plus* Midi Kit

Eine zeitlich verkürzte Isolation größerer DNA-Mengen wurde mit Hilfe des Qiagen Plasmid *Plus* Midi Kit (Qiagen GmbH) möglich.

50 ml einer Bakterien-Vorkultur wurden durch Zentrifugation (15 min, 6000 x g, 4°C, Hettich Rotanta 96 R) pelletiert. Die Resuspendierung erfolgte in 2 ml Resuspendierungspuffer P1. Durch Zugabe von 2 ml Lyse-Puffer P2, Vermischen und anschließende Inkubation (4 min, RT) wurden die Bakterien aufgeschlossen und die DNA freigesetzt. Ein Farbumschlag hin zu blau zeigte hierbei eine vollständige Durchmischung an. Die alkalische Lyse wurde durch Vermischen der Suspension mit 2 ml Neutralisationspuffer S3 erreicht, als Indikator für eine gute Vermischung diente hierbei eine Farbänderung von blau nach weiß. Nach Überführen auf eine Qiafilter Säule wurde die Suspension für 10 Minuten inkubiert. Während des Inkubationsschrittes wurden die Absaugvorrichtung und die Zentrifugationssäulchen vorbereitet. Zur Abtrennung der Bakterienreste und Isolierung der DNA wurde das Lysat durch eine Qiafilter Säule in ein 15 ml Falcon filtriert und anschließend mit 2 ml Bindepuffer BB vermischt. Das Eluat wurde auf das Zentrifugationssäulchen gegeben und durch Anlegen von Vakuum filtriert, hierbei verblieb die Plasmid-DNA auf dem Zentrifugationssäulchen. Um die DNA von Endotoxinen zu befreien, erfolgte ein Waschschriff mit 700 µl Endotoxin-Waschpuffer ETR. Um die DNA zusätzlich zu reinigen, wurden 700 µl PE Waschpuffer auf das Säulchen gegeben und abgesaugt. Eine vollständige Entfernung des Waschpuffers wurde durch Zentrifugation für 1 Minute bei 10000 x g (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) erreicht. Das Säulchen wurde anschließend in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 200 µl bidestillierten H₂O für 1 Minute bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die auf dem Säulchen gebundene DNA wurde durch Zentrifugieren bei 10000 x g (1 min) eluiert. Alle zur DNA-Präparation mittels Qiagen Plasmid *Plus* Midi Kit eingesetzten Puffer waren in dem Kit enthalten.

3.2.1.6 Bestimmung von DNA-Konzentration und –Reinheit

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe einer spektrophotometrischen Messung (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific). Hierzu wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Eine Konzentration von 50 ng/µl entspricht dabei einer optischen Dichte von 1,0 gemessen bei 260 nm. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades

der isolierten DNA wurde die Absorption der DNA bei 260 nm zu der Absorption von Proteinen (gemessen bei 280 nm) ins Verhältnis gesetzt. Die DNA wurde als ausreichend rein betrachtet, wenn der so ermittelte Quotient Werte $\geq 1,8$ ergab.

3.2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese erfolgte eine Trennung und Identifizierung von DNA-Gemischen entsprechend der unterschiedlichen Fragmentgrößen. Hierzu wurden 1%-ige (M/V) Gele von Agarose in 1 x TAE-Puffer versetzt mit 0,05 g Ethidiumbromid verwendet. Das DNA-Gemisch wurde mit 10 x DNA-Ladepuffer versetzt, auf das 1%-ige Agarose-Gel geladen über 1-1,5 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Stärke des Stromflusses orientierte sich daran, wie mit dem aufgetrennten DNA-Gemisch weiter verfahren wurde.

Wurde die Gelelektrophorese zur Identitätsüberprüfung eines Plasmides verwendet, konnte ein höherer Stromfluss angelegt werden, als wenn die DNA-Banden ausgeschnitten und zur Klonierung weiterverwendet werden sollten. Eine Identifizierung der gewünschten DNA-Banden wurde durch Sichtbarmachung des in die DNA eingelagerten Ethidiumbromids unter UV-Licht möglich. Zur Bestimmung der Fragment-Größen wurde ein DNA-Größenstandard (100bp oder 1kb Leiter, New England Biolabs) zum Vergleich herangezogen.

50 x TAE-Puffer:	0,1 M	EDTA
	1 M	Eisessig
	2 M	Tris-Base, pH 8,0

10 x DNA-Ladepuffer:

0,25% (M/V)	Bromphenolblau
50% (V/V)	Glycerin
100 mM	EDTA

3.2.1.8 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Im Anschluss an die Identifizierung der gewünschten DNA-Banden wurden diese aus den Agarose-Gelen ausgeschnitten und unter Verwendung des Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH) extrahiert.

Die ausgeschnittenen Gel-Stücke wurden in einem Eppendorf-Tube in 900 μ l Solubilisierungspuffer QG durch 10-minütiges Schütteln bei 50°C im Heizblock aufgelöst. Zur Fällung der DNA wurde die Lösung mit 150 μ l Isopropanol (70% V/V) versetzt. Um die DNA von den übrigen Gel-Bestandteilen zu isolieren, wurde das Gemisch auf eine Qiaquick Säule gegeben und bei 17900 x g (1 min, Centrifuge 5415 R, Eppendorf) zentrifugiert. Hierbei wurde die DNA durch die Ausbildung von -OH-Brücken an die Silicamembran in der Qiaquick Säule gebunden, unerwünschte Verunreinigungen, wie z.B. Primer, Enzyme, Agarose, oder Ethidiumbromid passierten diese Membran und wurden als Eluat verworfen. Zum Reinigen der auf dem Säulchen gebundenen DNA wurde diese mit 750 μ l Waschpuffer PE versetzt und erneut bei gleichen Einstellungen zentrifugiert. Reste des Waschpuffers wurden anschließend durch Trockenzentrifugation entfernt. Um die DNA zu eluieren, wurde die Qiaquick Säule in ein frisches Eppendorf-Tube überführt und nach 1-minütiger Inkubation mit 50 μ l Elutionspuffer EB bei 17900 x g 1 Minute zentrifugiert.

3.2.1.9 Polymerasekettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR)

Unter Verwendung strangspezifischer Oligonukleotide (*Primer*) wurden gewünschte DNA-Bereiche (*Template*) mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Die *Primer* wurden so entworfen, dass sie zum Ende des jeweiligen DNA-Einzelstranges komplementär waren und eine Länge von 40 Basen nicht überschritten. Zudem wurde darauf geachtet, dass sich die Schmelztemperaturen der verwendeten Primer ähneln, um deren gleichmäßiges Anlagern (*Annealing*) an die DNA-Einzelstränge zu erreichen. Ansatz und Bedingungen der Polymerasekettenreaktion wurden wie folgt gewählt:

PCR-Ansatz:	100-200 ng	<i>Template</i>
	2,5 µl	„Vorwärtsprimer“ (20 µM)
	2,5 µl	„Rückwärtsprimer“ (20 µM)
	10 µl	Polymerase-Puffer (10 x)
	2 µl	dNTPs (10 mM)
	1 µl	DNA-Polymerase

Die benötigte Zeit zur *Primer*-Anlagerung und zur DNA-Elongation wurde abhängig von den Eigenschaften von *Primer* und *Template* für jede Reaktion individuell bestimmt. Die verschiedenen Einstellungen bewegten sich dabei im Rahmen der unten angegebenen PCR-Bedingungen.

PCR-Bedingungen:	Denaturierung	94°C	3 min	} 30-32 Zyklen
	Denaturierung	94°C	30 s	
	<i>Annealing</i>	50 - 60°C	1 min	
	Elongation	72 – 75°C	2 – 3 min	
	Elongation	72°C	5 min	
	Kühlen	4°C	∞	

Die Amplifikation erfolgte in einem programmierbaren Thermocycler (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems)

3.2.1.10 Restriktionsverdau

Zum Verdau wurde DNA mit ausgewählten Restriktionsenzymen 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Pro 1 µg DNA wurden 1,5 – 2 Einheiten der jeweiligen Enzyme eingesetzt. Die Verwendung der Reaktionspuffer, sowie der Zusatz von BSA erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers (New England Biolabs). Nach abgeschlossenem Restriktionsverdau wurden die DNA-Schnittstücke gelelektrophoretisch aufgetrennt und anhand ihrer Größe identifiziert.

3.2.1.11 Ligation

Um ein gewünschtes DNA-Fragment (Insert) in ein Plasmid (Vektor) einzubringen, müssen Insert und Vektor vorher mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden sein, um so zueinander passende 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden zu erhalten. Die Ligation erfolgte in einem Endvolumen von 20 µl bei 16°C über Nacht. Dazu wurden circa 3-5 ng Insert und 6-30 ng Vektor mit 2 µl 10 x Ligase-Puffer und T4 DNA-Ligase eingesetzt.

Zur Überprüfung des Ligationsergebnisses wurde der Ligationansatz mittels der KCM-Methode in kompetente *E. coli* transformiert und die resultierenden Kolonien zum Ansetzen einer Bakterien-Vorkultur in 5 ml LB-Medium überführt. Nach Isolation der Plasmid-DNA mittels Minipräparation wurde der Einbau des Inserts in den Vektor über Restriktionsverdau

und Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Um die Richtigkeit und Fehlerfreiheit des Inserts zweifelsfrei festzustellen, wurde eine Analyse der DNA-Sequenz durchgeführt (Eurofins MWG GmbH).

3.2.2 Zellbiologische Methoden, Zellkultur.

3.2.2.1 Kultivierung von Zellen

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sterilbank. Eukaryotische Zellen wurden auf Petrischalen in Kompletmedium, das abhängig vom Zelltyp zusätzlich angereichert wurde, bei 37°C und 5-7% CO₂ in Brutschränken kultiviert. Zur Aufrechterhaltung der Rezeptor-expression stabiler Zelllinien wurde das Medium außerdem mit 0,2 µg/ml G418 versetzt. Das Passagieren der Zellen erfolgte abhängig von deren Konfluenz 2-3-mal wöchentlich. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit DPBS-Puffer gewaschen. Zum Ablösen von der Petrischale wurden die Zellen kurz mit einer Trypsin-EDTA-Lösung überspült. Die abgelösten Zellen wurden in Medium homogenisiert und anschließend im Verhältnis 1:5-10 gesplittet.

Kompletmedium:	10% (V/V)	FKS
	100 U/ml	Penicillin
	100 U/ml	Streptomycin
	2 mmol/l	L-Glutamin
	DMEM	(4,5 g/l Glucose)

3.2.2.2 Auftauen von Zellen

Die zur Lagerung in flüssigem Stickstoff, oder bei -80°C eingefrorenen Zellen wurden möglichst rasch bei 37°C aufgetaut und anschließend auf eine Kulturschale mit DMEM überführt. Nach ca. 2 Stunden wurden die Zellen auf Anheftung an den Kulturschalenboden hin überprüft. Waren die Zellen ausreichend angewachsen, wurde das Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt. Stabile Zelllinien wurden nach dem Auftauen bis zu einer Konfluenz von ca. 30% in normalem DMEM kultiviert, das erst ab Erreichen einer Konfluenz >30 % durch Selektionsmedium ersetzt wurde.

3.2.2.3 Einfrieren von Zellen

Um Zellen einzufrieren, wurden diese in einer möglichst frühen Passage auf Zellkulturschalen (Durchmesser 15cm) ausgesät und bei einer Konfluenz von 70-80% durch Trypsinieren abgelöst, anschließend in Medium aufgenommen und abzentrifugiert (130 x g, 3 min, 25°C, Hettich, Rotanta 96 R). Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Pellet in gekühltem Einfriermedium resuspendiert. Nachfolgend wurde die Zellsuspension in gekühlte Kryoröhrchen aliquotiert und für 2 Stunden bei -20°C eingefroren. Für eine kurzfristige Aufbewahrung wurden die Aliquots in -80°C überführt, eine Langzeitlagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Einfriermedium:	80% (V/V)	Kompletmedium
	10% (V/V)	FKS
	10% (V/V)	DMSO

3.2.2.4 Testung von Zellen auf Mycoplasmenbefall

Infektion von Zellen mit Mycoplasmen kann eine Verfälschung der Messergebnisse zur Folge haben. Um dem entgegen zu wirken, wurden frisch in die Zellkultur aufgenommene Zellen routinemäßig auf einen Befall mit diesen Bakterien hin untersucht. Der Nachweis einer Infektion wurde nach Amplifikation der Mycoplasmen-DNA mittels PCR über Agarose-Gelelektrophorese erbracht.

Dazu wurden, nachdem die Zellen eine Konfluenz von ca. 70-80% erreicht hatten, 100 µl Medium aus der Gewebekulturschale entnommen und 5 Minuten lang bei 95°C im Heizblock erhitzt. Durch Zentrifugation bei 15700 x g (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) wurden im Medium enthaltene Zellbestandteile abgetrennt. Als PCR-*Template* dienten 2 µl des Überstandes. Die Mycoplasmen-PCR wurde wie nachfolgend beschrieben durchgeführt:

PCR-Ansatz:	2 µl	<i>Template</i> (Überstand)
	0,25 µl	<i>Primer</i> GPO (50 pM)
	0,25 µl	<i>Primer</i> MGSO (50 pM)
	2,5 µl	Polymerase-Puffer (10 x)
	2,5 µl	dNTPs (2 mM)
	0,2 µl	Taq-Polymerase
	1 µl	MgCl ₂ (2 mM)
	ad 25 µl	H ₂ O

PCR-Bedingungen:	Denaturierung	95°C	5 min	} 30 Zyklen
	Denaturierung	95°C	20 s	
	<i>Annealing</i>	60°C	60 s	
	Elongation	72 °C	1 min	
	Elongation	72°C	5 min	
	Kühlen	4°C	∞	

<i>Primer</i> -Sequenzen:	GPO:	5' actcctacgggaggcagcagt 3'
	MGSO:	5' tgcaccatctgtcactctgttaacctc 3'

Das so erhaltene DNA-Gemisch wurde anschließend mit DNA-Ladepuffer gemischt und in ein 1%-iges Agarose-Gel geladen. Nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Bandenmuster unter UV-Licht detektiert. Waren die Zellen mit Mycoplasmen befallen, zeigte sich dies an einer DNA-Bande bei ca. 720 bp. Die Größenabschätzung der DNA-Banden erfolgte mit Hilfe eines 100 bp Größenstandards. Infizierte Zellen wurden wechselweise mit Tiamulin und Minocyclin nach Herstellervorgaben behandelt. Ein Behandlungserfolg wurde durch regelmäßige Durchführung der Mycoplasmen-PCR überprüft.

3.2.2.5 Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

10 µl einer Zellsuspension wurden seitlich auf die mit einem Deckgläschen bedeckte Zählkammer pipettiert. Die Zellzahl in vier Großquadraten wurde unter dem Lichtmikroskop für jedes Großquadrat einzeln ausgezählt. Der resultierende Mittelwert wurde mit dem für die Neubauer-Kammer spezifischen Faktor 1000 multipliziert, um die Anzahl der Zellen, die in 1 ml einer Zellsuspension enthalten waren, zu bestimmen.

3.2.2.6 Beschichten von Deckgläschen mit Poly-D-Lysin

Bei Poly-D-Lysin handelt es sich um eine Kette aus synthetischen Aminosäuren. Als Polykation erhöht es die elektrostatische Wechselwirkung zwischen negativ geladenen Ionen der Zellmembran und der Oberfläche beschichteter Deckgläschen bzw. „96-well“ Platten.

Durch die Beschichtung der Deckgläschen bzw. „96-well“ Platten (Multiwellplatten) wurde dem Ablösen der Zellen von den Oberflächen der Deckgläschen, oder „96-well“ Platten während verschiedener Messungen bzw. bei Ligandenzugabe entgegengewirkt. Zur Beschichtung mit Poly-D-Lysin wurden die Deckgläschen einzeln in je eine Vertiefung einer „six-well“ Platte gelegt und mit wenigen Tropfen einer Lösung von Poly-D-Lysin in DPBS-Puffer (0,1 mg/ml) überschichtet. Mit Multiwellplatten wurde auf die gleiche Weise verfahren. Nach einer mindestens 20-minütigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde die Poly-D-Lysin Lösung abgesaugt und die Deckgläschen, bzw. „96-well“ Platten wurden mit DPBS-Puffer gewaschen. Eine anschließende Lagerung der so beschichteten Deckgläschen und Multiwellplatten war über mehrere Tage im Brutschrank möglich.

3.2.2.7 Generierung stabiler Zelllinien

Zur Erzeugung stabiler Zelllinien wurden HEK293 Zellen 3 Stunden vor Transfektion in einer Zelldichte von ca. 30% auf Zellkulturschalen ausgesät. Die Transfektion wurde mit Hilfe des Effectene[®] Transfection Reagent Kits unter Verwendung folgender DNA- und Reagenzmengen durchgeführt:

cDNA (1 µg/µl)	3 µl
Effectene	42 µl
Enhancer	16 µl
Puffer	300 µl

Die Vorgaben des Herstellers hinsichtlich der Inkubationszeiten wurden nicht verändert. 24 Stunden nach Transfektion wurde das Komplettmedium durch Selektionsmedium (Komplettmedium mit 0,4 µg/ml G418) ersetzt. Bis zum vollständigen Absterben aller untransfizierten Zellen wurde täglich ein Mediumwechsel mit Selektionsmedium vollzogen. Zur Generierung einzelner, stabiler Zellklone wurden die stabil exprimierenden Zellen durch Abtrypsinieren von der Zellkulturschale abgelöst, die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellsuspension wurde verdünnt, um beim späteren Aussäen in „48-well“ Platten statistisch genau eine Zelle pro „well“ zu erhalten. Die homogenen Zellklone wurden mittels geeigneter Methoden z.B. Fluoreszenzmikroskopie oder Radioligandenbindung auf die stabile Expression der gewünschten cDNA hin untersucht.

3.2.2.8 Markierung („Labeln“) von Zellen mit FIAsH

Die angegebenen Reagenzmengen und –Konzentrationen beziehen sich auf ein „well“ einer „six-well“ Platte. Jegliche Markierungsschritte wurden unter dem Abzug ausgeführt, um eine Geruchsbelästigung zu minimieren. Zum Zeitpunkt der FIAsH-Markierung wiesen die auf, mit Poly-D-Lysin beschichteten, Deckgläschen ausgesäten Zellen eine Konfluenz von ca. 80% auf. Alle Waschschrte wurden äußerst vorsichtig durchgeführt, um ein vorzeitiges Ablösen der Zellen von den beschichteten Deckgläschen zu vermeiden.

Die FIAsH-Labeling-Lösung wurde durch Vermischen von 0,5 µl einer Lösung von FIAsH in DMSO (1 mM) mit 0,5 µl EDT (25 mM; 2,1 µl EDT in 1 ml DMSO) hergestellt. Nach

5-minütiger Inkubation bei RT wurde die Lösung in 1 ml Labeling-Puffer verdünnt und auf das „well“ pipettiert.

Das Zellkulturmedium wurde von den Zellen abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit 2 ml Labeling-Puffer pro „well“ gewaschen. Nach Überschichtung der Zellen mit FIAsH-Labeling-Lösung wurden diese 50 Minuten lang bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Die 50-minütige Inkubationszeit wurde dabei speziell für die Rezeptorsensoren des M₂AChR optimiert, eine längere Inkubationszeit führte in den anschließenden Messungen zu einer schlechteren Ansprechrate und einem erleichterten Ablösen der Zellen. Wurden die Zellen für einen kürzeren Zeitraum inkubiert, war deren gezeigte FIAsH-Fluoreszenz nicht ausreichend stark, um auswertbare Messergebnisse zu liefern.

Nach Inkubation wurde die Labeling-Lösung entfernt und die Zellen wurden mit 2 ml Labeling-Puffer pro „well“ gewaschen. Zur Entfernung von unspezifisch gebundenem FIAsH wurden die Zellen mit 2 ml einer EDT-Waschlösung (13 µl 500 mM EDT in 25 ml Labeling-Puffer) bedeckt und anschließend 10 Minuten lang bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Nach Entfernen der EDT-Waschlösung wurden die Zellen einmal mit Labeling-Puffer gewaschen, anschließend mit Zellkulturmedium überschichtet und bis zum Mikroskopieren im Brutschrank bei 37°C und 7% CO₂ gelagert.

Labeling-Puffer:	150 mM	NaCl
	10 mM	HEPES
	10 mM	Glucose, wasserfrei
	2,5 mM	KCl
	4 mM	CaCl ₂
	2 mM	MgCl ₂

3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

3.2.3.1 Membranpräparation

Stabile, oder untransfizierte HEK293 Zellen wurden auf Zellkulturschalen (Durchmesser 15 cm) bis zum Erreichen einer 80%-igen Konfluenz gezogen. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen 2-mal mit PBS-Puffer gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen mit 5 ml kaltem 5/2 Puffer versetzt, durch Abschaben mit einem Gummiwischer von der Zellkulturschale gelöst und in ein 50 ml Falconröhrchen überführt. Zur vollständigen Entfernung aller Zellen wurden die Gewebekulturschalen erneut mit 1 ml 5/2 Puffer nachgewaschen, die Zellsuspension wurde in dasselbe Röhrchen überführt. Um die Zellen zu homogenisieren und die Zellmembranen aufzubrechen, wurden die Zellen auf Eis mit einem Ultraturrax T-25 (IKA-Werke) 2-mal 15 Sekunden lang auf höchster Stufe gemixt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation (170 x g, 4°C, Hettich, Rotanta 96 R) wurde das Pellet verworfen, der Überstand wurde in ein Zentrifugenröhrchen aufgenommen und für 40 Minuten bei 4°C und 120000 x g in einer Ultrazentrifuge abzentrifugiert (Beckman LE 70 Ultracentrifuge). Das resultierende Pellet wurde in 800 µl kaltem 50 mM Tris-Puffer resuspendiert und unter Verwendung eines Glaspotters vollständig homogenisiert. Die Membransuspension wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Langzeitaufbewahrung wurden die gefrorenen Aliquots bei -80°C gelagert.

PBS-Puffer:	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	12 mM	Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
5/2-Puffer:	5 mM	Tris-HCl
	2 mM	EDTA, pH 7,4

3.2.3.2 Bestimmung der Proteinmenge nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde spektrophotometrisch mittels des Protein Assay-Reagenz von Biorad nach der Bradford-Methode ermittelt. Dazu wurde ausgehend von einer mit BSA-Standardlösungen erstellten Eichgerade die Proteinkonzentration über die Absorption der Testlösung bei 595 nm bestimmt (UV-1601 Spektrophotometer, Shimadzu).

3.2.3.3 Radioligandenbindung

Die Zellmembranen wurden, wie in Kapitel 3.2.3.1 dargestellt, präpariert. Die Bestimmung der Radioligandenbindung erfolgte in „96-well“ Filterplatten (MultiScreen FC, Millipore) in einem Endvolumen von 200 µl. Zur Ermittlung der Sättigungsbindung, bzw. der Verdrängungsbindung wurden die Reagenzien nach folgendem Schema pipettiert:

Sättigungsbindung:

50 µl	Assay-Puffer (spezifische Bindung)
50 µl	Membransuspension (2 µg/1 µl Protein)
50 µl	GTP 400µM in Assay-Puffer
50 µl	[³ H] N-Methylscopolamin (3 pM - 12 nM)

Verdrängungsbindung:

50 µl	Assay-Puffer (spezifische Bindung)
50 µl	Membransuspension (2 µg/1 µl Protein) versetzt mit GTP 400 µM
50 µl	Carbachol (3 µM – 4 mM)/ Puffer
50 µl	[³ H] N-Methylscopolamin (4nM)

Die unspezifische Bindung des Radioliganden an den Filter, die Wände der Filterplatten, oder an andere Bestandteile der Zellmembran wurde sowohl für die Sättigungsbindung, als auch für die Verdrängungsbindung in Gegenwart von 400 µM Atropin bestimmt.

Der Reaktionsansatz wurde zur vollständigen Durchmischung mit einem Mini-Shaker geschüttelt und anschließend 3 Stunden bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Absaugen der Lösung durch die Filter der „96-well“ Platte gestoppt. Um unspezifische Bindung des Radioliganden an die Filterplatte und den Filter zu reduzieren, wurde jedes „well“ 3-mal mit 200 µl kaltem Assay-Puffer gewaschen. Die Filterplatten wurden anschließend 30 Minuten bei 40°C getrocknet. Nach Zugabe von 20 µl Scintillationsflüssigkeit (Irga-Safe Plus, PerkinElmer, Rodgau, Deutschland) und Inkubation bei RT für 3 Stunden wurden die Proben mittels eines Flüssig-Scintillationszählers (1450 Micro Beta Trilux Liquid Scintillation Counter, PerkinElmer) gezählt. Zur Analyse der Sättigungs- und Verdrängungsbindung, sowie zur Berechnung der K_i- und K_p-Werte wurde das Programm Origin 6.1 (OriginLab) verwendet.

Assay-Puffer:	10 mM	HEPES
	10 mM	MgCl ₂
	100 mM	NaCl, pH 7,4

3.2.4 Fluoreszenz-basierte Messmethoden

3.2.4.1 FRET-Mikroskopie

Die in dieser Arbeit durchgeführten FRET-Messungen erfolgten alle am Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland), das mit einem 63 x Öl-Objektiv ausgestattet war. Zur Anregung der Fluoreszenz wurde ein Polychrom IV (TILL Photonics, Gräfelfing, Deutschland) verwendet, die Emissions-Aufnahme erfolgte mittels eines dualen Emissionssystems (TILL Photonics). Auf mit Poly-D-Lysin beschichteten Glasplättchen ausgesäte, transfizierte, oder stabile HEK Zellen wurden in eine Attofluor-Kammer (Molecular Probes) eingespannt und auf dem Mikroskop platziert. Bei einer Messfrequenz von 10 Hz wurde die Belichtungszeit abhängig von der Fluoreszenzintensität der Messprobe individuell eingestellt (≤ 60 ms). Es wurde ein möglichst kurzer Belichtungszeitraum angestrebt, um ein Photobleichen zu minimieren. Als Donor diente in allen Experimenten CFP, als Akzeptorfluorophor wurden FIAsh bzw. YFP eingesetzt. Die Donoranregung erfolgte mit Licht der Wellenlänge 436 nm (Strahlenteiler DCLP 460 nm, Chroma Technology). Die Fluoreszenzemission von CFP wurde bei 480 nm (F_{480} , Strahlenteiler DCLP 505 nm), die des Akzeptormoleküles bei einer Wellenlänge von 535 nm (F_{535} , Strahlenteiler DCLP 505 nm) erfasst.

Zur Detektion ligandinduzierter FRET-Änderungen wurden Einzelzellen gleicher Fluoreszenzintensität und -Verteilung mit Messpuffer mit, oder ohne Ligand mit Hilfe eines Superfusions-Systems (ALA Scientific Instruments, Farmingdale, NY) überspült.

Um die FRET-Änderungen, die konzentrationsabhängig durch Superfusion der Zellen mit allosterischen Liganden ausgelöst wurden, zu erfassen, wurden Einzelzellen zuerst mit orthosterischem Ligand vorstimuliert und dann mit einer Kombination aus ortho- und allosterischem Liganden superfundiert. Während die Konzentration des orthosterischen Liganden dabei konstant gehalten wurde, wurde die des allosterischen Liganden schrittweise erhöht.

Die Signaldetektion erfolgte mittels Photodioden. Nach Digitalisierung der analogen Signale über einen A/D-Wandler (Digidata 1322A, Axon Instruments, Union City, CA) wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Einzelkanäle (F_{480} bzw. F_{535}), ebenso wie das Ratio der Einzelkanäle (FRET-Signal; F_{535}/F_{480}) als Funktion der Zeit visualisiert (Clampex 8.1 Software, Axon Instruments, Foster City, CA). Zur Korrektur der gemessenen Emission um das Durchbluten des Donors in den Akzeptorkanal, sowie um die direkte Akzeptoranregung wurde die Origin 6.1 Software (OriginLab) verwendet.

Messpuffer:	140 mM	NaCl
	5 mM	KCl
	2 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂
	10 mM	HEPES, pH 7,3

3.2.4.2 Konfokalmikroskopie

3.2.4.2.1 Translokation von β -Arrestin2

Die Translokation von β -Arrestin2 zum jeweiligen Rezeptor wurde mit dem Leica TCS SP2 Konfokalmikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) mit Öl-Immersionsobjektiv (HCXPL APO 63 x 1,32) aufgenommen. Transient transfizierte HEK TSA-Zellen wurden auf, mit Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläschen ausgesät und nach Einspannen in eine Attofluor-Kammer (Molecular Probes) und Überschichten mit Messpuffer auf das Mikroskop gelegt. Durch direktes Zupipettieren des jeweiligen Liganden wurde die β -Arrestin2 Translokation stimuliert. Die Exzitation des YFP-Fluorophors erfolgte mit einem Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 514 nm (Strahlenteiler DD 458/514). Bei 430 nm (Strahlenteiler RSP 455) wurde die Fluoreszenz des CFP mittels eines Doppeldiodenlasers angeregt. Der detektierte Emissionsbereich umfasste für YFP 525-600 nm, die CFP-Fluoreszenz wurde in einem Emissionsbereich zwischen 465 und 500 nm gemessen. Die Aufnahmeeinstellungen wurden mit 400 Hz und einem Format von 512 x 512 Pixel für alle Versuche konstant gehalten. Zur Aufnahme von Zeitserien wurde das Leica Software Package (Version 2.61) verwendet, um alle 30 s über eine Dauer von 15 Minuten ein Bild zu erfassen.

Die Translokation von β -Arrestin2 wurde mit dem Leica Software Package (Version 2.61) quantifiziert. Dazu wurden im Zytosol definierte Bereiche (*region of interest*, ROI) festgelegt und die Abnahme der YFP-Fluoreszenz quantitativ bestimmt. Die ROIs wurden so gewählt, dass trotz eventueller Zellbewegung weder der Zellkern, noch die Membran bei der Auswertung erfasst wurden.

Die resultierende Fluoreszenzintensität wurde um das Photobleichen des Fluorophors korrigiert. Dazu wurden ROIs so festgelegt, dass sie nicht nur einen definierten Bereich im Zellzytosol, sondern ganze Zellen enthielten. Die Abnahme der YFP-Fluoreszenz der ganzen Zellen wurde als Bleicheffekt von der Fluoreszenzabnahme im Zellzytosol abgezogen. Anschließend wurde die Fluoreszenzabnahme als Perzentile der Ausgangsfluoreszenz zum Zeitpunkt $t = 0$ berechnet und als Funktion der Zeit dargestellt.

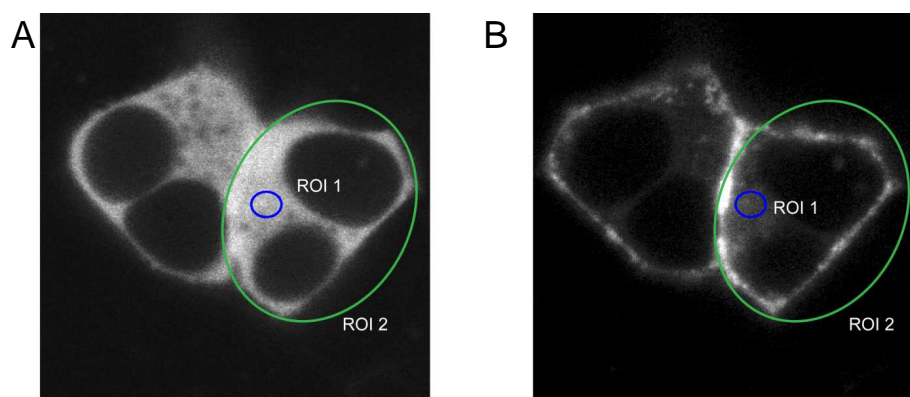


Abb. 30: Auswertung der Translokation von β -Arrestin2YFP nach Stimulation des M_2 AChR.

Transient mit M_2 CFP, β -Arrestin2YFP und GRK2 transfizierte HEK TSA-Zellen wurden mit 100 μ M ACh stimuliert. Zur Quantifizierung der ligandvermittelten β -Arrestin2 Translokation wurde die Intensitätsabnahme der Gesamtzellfluoreszenz (= Bleichen), oder der Fluoreszenz im Zellzytosol in definierten Bereichen (ROI 1 = Zellzytosol, ROI 2 = ganze Zelle) detektiert. (A) Vor Rezeptorstimulation ist β -Arrestin2 ubiquitär im Zytosol lokalisiert. (B) 15 Minuten nach Stimulation der Zellen mit ACh. β -Arrestin2 wurde an die Zellmembran rekrutiert.

3.2.4.2.2 Untersuchung der Rezeptorsensoren auf Membranständigkeit

Die Membranexpression der verschiedenen Rezeptorsensoren wurde mit dem Leica TCS SP5 System (Leica, Wetzlar, Deutschland), ausgestattet mit einem 63 x Ölimmersionsobjektiv, untersucht. Stabile, oder transient transfizierte HEK Zellen wurden auf mit Poly-D-Lysin beschichtete Deckgläschen ausgesät. Am Messtag wurden die mit Zellen bewachsenen Deckgläschen mit dem Membranmarker CellMask™ DeepRed (Invitrogen, 2 µl/2 ml Messpuffer) im Brutschrank inkubiert (5 min, 37°C, 7% CO₂) und anschließend 2-mal mit DPBS-Puffer gewaschen. Nach Einspannen in eine Attofluor-Kammer (Molecular Probes) und Überschichten mit Messpuffer wurden die Zellen auf dem Mikroskop platziert. Die Anregung der CFP-Fluoreszenz erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm mit der UV-Diode, die CFP-Emission wurde in einem Bereich von 450-510 nm detektiert. CellMask™ DeepRed wurde mit der 594 nm Line eines Argon-Lasers zur Fluoreszenz angeregt, der Emissionsbereich wurde von 650-680 nm festgesetzt. Abhängig von der Größe des ausgewählten Zellbereiches wurden die Bilder mit einer Auflösung von 1024 x 1024, oder 2048 x 2048 Pixel aufgenommen. Zur Auswertung der Zellbilder wurde die Leica LAS AF Software verwendet.

3.2.4.3 Ca²⁺-Messungen

Die Messung der Ca²⁺-Freisetzung nach Rezeptorstimulation erfolgte im NOVOstar Plattenlesegerät (BMG LABTECH, Jena, Deutschland) unter Verwendung des Fluo-4 NW Calcium Assay Kits (Invitrogen).

Leere HEK TSA-Zellen (Kontrolle), oder mit dem jeweiligen Rezeptorsensor und dem chimären G-Protein G_{αq}G66Di5 transfizierte HEK TSA-Zellen wurden von den Gewebekulturschalen abtrypsiniert, in der Neubauer-Kammer ausgezählt und anschließend in einer Zelldichte von 50000 Zellen/100 µl Medium/„well“ auf eine mit Poly-D-Lysin beschichtete „96-well“ Platte (costar3599, Corning GmbH) wie nachfolgend gezeigt ausgesät.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA
B	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA	HEK TSA
C	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂
D	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂	wt M ₂
E	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N
F	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N	M ₂ i3-N
G	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C
H	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C	M ₂ i3-C

Am Folgetag wurde durch Vermischen von 10 ml Calcium-Assay-Puffer mit 100 µl wässriger Probenecid-Lösung und dem Fluo-4 Calciumindikator die Indikatorlösung hergestellt. Nach Entfernen des Kulturmediums wurden die Zellen mit 100 µl Indikatorlösung pro „well“ überschichtet und danach 45 Minuten bei 37°C und 7% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die anschließende Messung wurde bei einer konstanten Temperatur von 37°C durchgeführt. Die

Zellen wurden mit Carbachol (gelöst in Calcium-Assay-Puffer) in steigender Konzentration stimuliert. Die jeweiligen Ligandenkonzentrationen wurden wie in nachfolgendem Schema gezeigt auf eine weitere „96-well“ Platte (costar 3367, Corning GmbH) vorgelegt:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	0,1µM	1µM	1 M	10µM	10µM	100µM	100µM	1mM	1mM	10mM	10mM
B	P	0,1µM	1µM	1µM	10µM	10µM	100µM	100µM	1mM	1mM	10mM	10mM
C	P	0,1µM	1µM	1µM	10µM	10µM	100µM	100µM	1mM	1mM	10mM	10mM
D	P	0,1µM	1µM	1µM	10µM	10µM	100µM	100µM	1mM	1mM	10mM	10mM
E	P	0,1µM	1µM	1µM	10µM	10µM	100µM	100µM	1mM	1mM	10mM	10mM
F	P	0,1µM	1µM	1µM	10µM	10µM	100µM	100µM	1mM	1mM	10mM	10mM
G	P	0,1µM	1µM	1µM	10µM	10µM	100µM	100µM	1mM	1mM	10mM	10mM
H	P	0,1µM	1µM	1µM	10µM	10µM	100µM	100µM	1mM	1mM	10mM	10mM

Carbachol

P = Calcium-Assay-Puffer

Die Anregung der Fluoreszenz von Fluo-4 erfolgte bei 480/10 nm, die Emission wurde über 50 Intervalle à 0,4 s pro „well“ bei einer Wellenlänge von 520 nm (Filter-Bandweite 20) detektiert. Die Auswertung erfolgte mittels der Microsoft Office Excel 2007 Software. Die Zunahme der Fluo-4-Fluoreszenz wurde konzentrationsabhängig gemittelt, um die nicht rezeptorvermittelte Ca²⁺-Freisetzung korrigiert und zeitabhängig grafisch aufgetragen.

4. Ergebnisse

4.1 Transfektionsoptimierung

4.1.1 Transfektionsoptimierung in CHO-K1 Zellen

Um unspezifische Ergebnisse zu vermeiden, sollte die Charakterisierung funktioneller Eigenschaften und ligandenselektiver Konformationsänderungen des M₂ AChR in einem Zellsystem erfolgen, das endogen keine mAChR exprimiert. Da von HEK293 und TSA-Zellen bekannt ist, dass sie endogen den M₃ AChR bilden [336], wurde die Transfektionsoptimierung an CHO-K1-Zellen durchgeführt.

Zu Beginn der Arbeit erfolgte die Transfektionsoptimierung mit dem bereits vorhandenen Flag-M₂-sl3-FIAsh-GSGEG-CFP Konstrukt [337].

Zur Optimierung des Transfektionsergebnisses wurden unterschiedliche Transfektionsreagenzien eingesetzt, alle Transfektionen erfolgten 48 Stunden vor der geplanten Messung. Die nachfolgend angegebenen Transfektionsbedingungen zeigten hierbei die besten Ergebnisse. Alle Angaben sind auf ein „well“ einer „six-well“ Platte zu beziehen:

Transfektion mit Lipofectamine™ LTX

DNA (1 µg/µl)	2,5 µg
Lipofectamine	4 µl
Plus-Reagenz	1 µl
Opti-MEM®	500 µl
Transfektionsgefäß	Eppendorf-Tube

Transfektion mit FuGENE® HD

DNA (1 µg/µl)	2 µg
FuGENE HD	5 µl
Opti-MEM®	100 µl
Transfektionsgefäß	Polystyrol-Röhrchen

Transfektion mit GeneJuice®

DNA (1 µg/µl)	1 µg
GeneJuice-Reagenz	3 µl
Opti-MEM®	100 µl
Transfektionsgefäß	Eppendorf-Tube

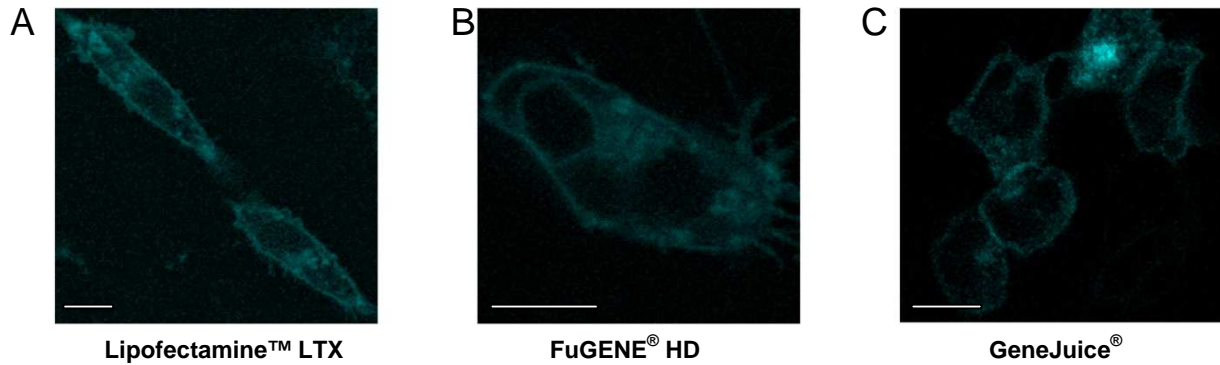


Abb. 31: CHO-K1-Zellen transfiziert mit dem Flag-M₂-sI3-FIAsH-GSGEG-CFP Rezeptorsensor.

Die Membranexpression wurde konfokalmikroskopisch untersucht. Dazu wurde die CFP-Fluoreszenz mit einem Doppeldiodenlaser bei 430 nm angeregt und in einem Bereich von 465 – 600 nm detektiert. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 10 μM. (A) CHO-K1 transient mittels Lipofectamine™ LTX transfiziert zeigten eine schwache CFP-Fluoreszenz sowohl an der Zellmembran, als auch im Zytosol. (B) Mit FuGENE® HD transfizierte CHO-K1-Zellen zeigten CFP-Fluoreszenz in geringem Ausmaß an der Zellmembran. Im Zytosol waren fluoreszierende Rezeptor-Cluster zu erkennen. (C) Mit GeneJuice® transfizierte CHO-K1 Zellen zeigten eine starke CFP-Fluoreszenz an der Zellmembran, auch intrazellulär war eine Rezeptorexpression erkennbar.

Mit keiner der getesteten Transfektionsbedingungen konnte in CHO-K1-Zellen eine Transfektionseffizienz > 20% erreicht werden. Die schwache Fluoreszenz und der Mangel an ausreichend membranständig exprimiertem Rezeptorsensor erschwerten im Falle der Transfektion mit Lipofectamine LTX und FuGENE HD anschließende FRET-Experimente. Lediglich die mit GeneJuice® transfizierten Zellen zeigten eine ausreichende CFP-Fluoreszenz, die in FRET-Experimenten eine Unterscheidung zwischen Hintergrundfluoreszenz und spezifischer Rezeptorfluoreszenz ermöglichte. Allerdings führte hier die Superfusion mit Ligandenlösung zu einem reversiblen Anschwellen der Zellen. Diese Zellbewegung verursachte das Auftreten von Artefakten während der FRET-Messungen, die eine Auswertung der FRET-Signale erschwerten. Untransfizierte Zellen zeigten diesen Effekt nicht und auch in konfokalmikroskopischen Untersuchungen konnte kein Anschwellen der Zellen beobachtet werden.

4.1.2 Transfektionsoptimierung in HEK TSA-Zellen

Die in den FRET-Messungen beobachtete Bewegung von CHO-K1 Zellen begründete einen Wechsel des Zellsystems zu HEK TSA-Zellen. Bei der Verwendung von TSA-Zellen und HEK293 Zellen in FRET-Experimenten konnten bisher keine Veränderungen des Zellvolumens beobachtet werden.

Es wurden verschiedene Transfektionsmethoden hinsichtlich Transfektionseffizienz, Membranständigkeit und Fluoreszenzintensität des Rezeptorsensors getestet und optimiert. Die Transfektion erfolgte 48 Stunden vor den geplanten Experimenten. Die nachfolgend angegebenen Transfektionsbedingungen erzielten hierbei die besten Resultate (Angaben bezogen auf ein „well“ einer „six-well“ Platte):

Transfektion mit GeneJuice®

DNA (1 µg/µl)	0,5 µg
GeneJuice-Reagenz	6 µl
Opti-MEM®	100 µl
Transfektionsgefäß	Eppendorf-Tube

Transfektion mit Effectene®

DNA (1 µg/µl)	0,6 µg
Effectene	7 µl
Enhancer	2,7 µl
Puffer	50 µl
Transfektionsgefäß	Eppendorf-Tube

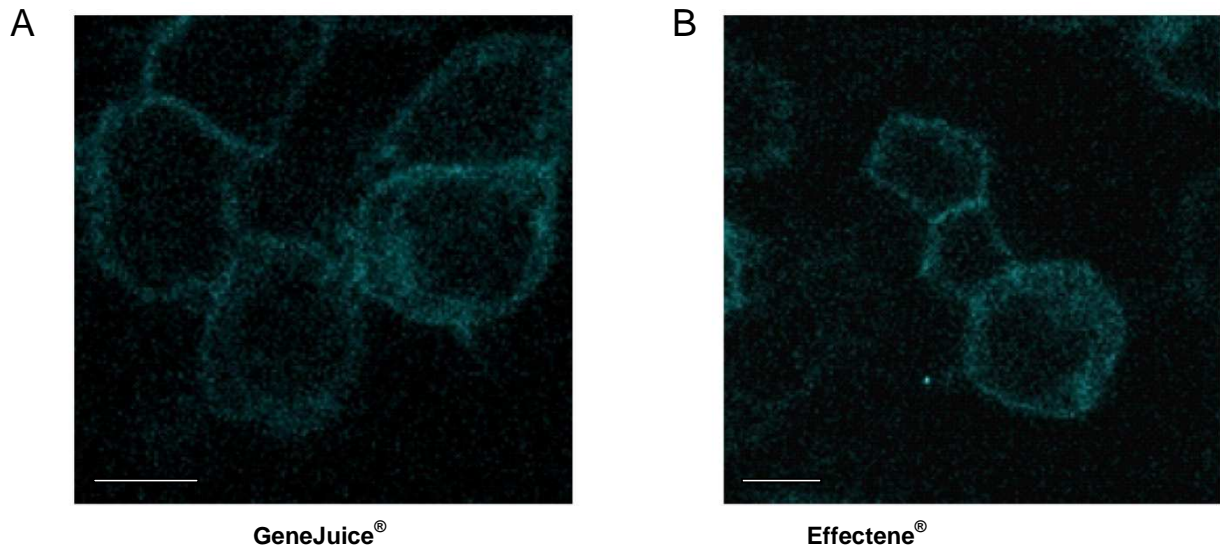


Abb. 32: Transfektion von HEK TSA-Zellen mit dem Flag-M₂-sl3-FIAsH-GSGEG-CFP Rezeptorsensor.

Die Überprüfung der Membranexpression wurde konfokalmikroskopisch (Leica TCS SP2) durchgeführt. CFP wurde bei 430 nm angeregt und die Emission zwischen 465 – 600 nm erfasst. Die Größenbalken entsprechen 10 µm. (A) Mit GeneJuice® transfizierte Zellen zeigten eine CFP-Fluoreszenz an der Zellmembran und im Zellzytosol. (B) Die Transfektion erfolgte mittels Effectene® Reagenz. Zum Teil konnte eine Fluoreszenz des Rezeptorsensors an der Zellmembran detektiert werden. In geringerem Ausmaß wurde auch zytoplasmisch Rezeptor exprimiert.

Mit beiden Transfektionsmethoden ergab sich ein ähnliches Expressionsmuster des Rezeptorsensors. In beiden Fällen war die Fluoreszenzintensität für nachfolgende FRET-Messungen ausreichend. Während die Transfektionseffizienz der GeneJuice-Methode allerdings nur bei ca. 30% lag, betrug die der Effectene-Methode etwa 70%.

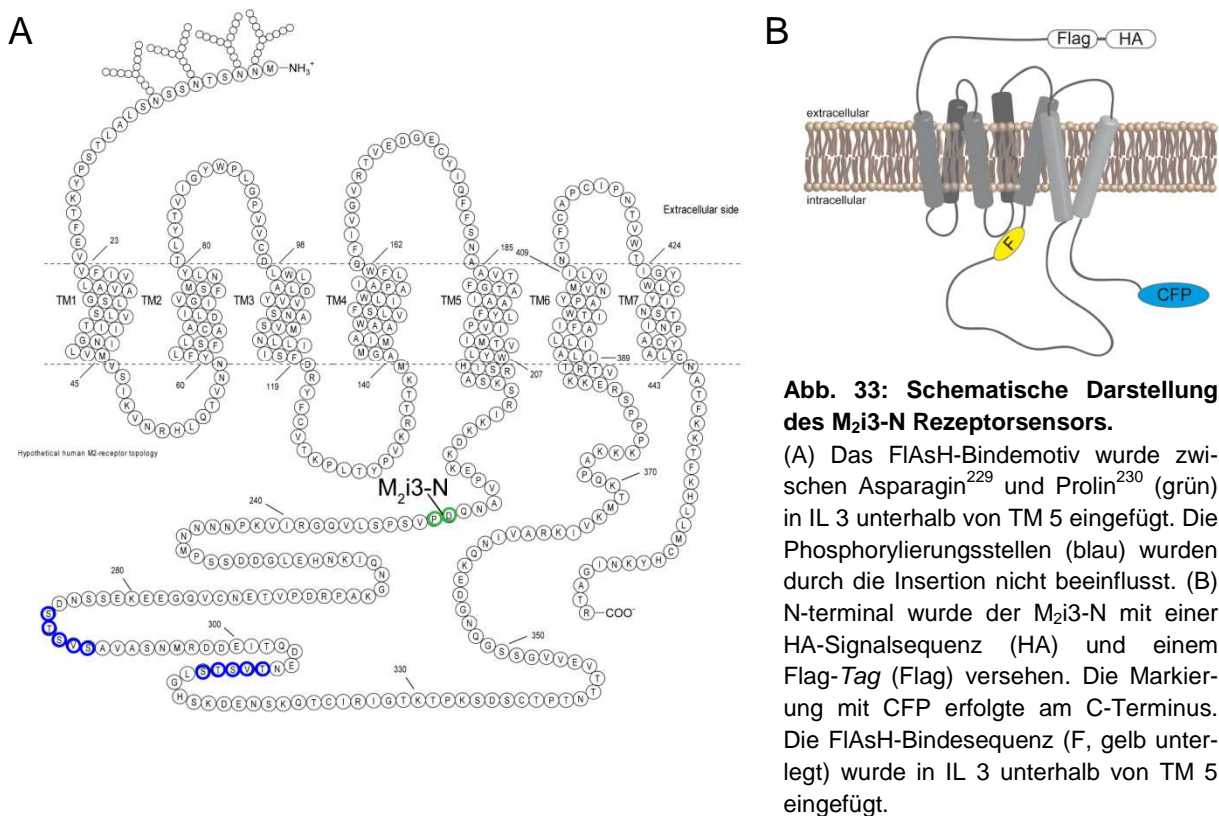
4.2 Generierung der Rezeptorsensoren

Wie in Kapitel 1.4.2.2 dargestellt, kann die ligandenselektive Änderung der Rezeptorkonformation mit Hilfe zweier verschiedener Sensoren desselben Rezeptors mittels FRET-Mikroskopie detektiert werden.

Zur Untersuchung ligandenselektiver Konformationsänderungen des M_2 AChR sollten unterschiedliche Rezeptorsensoren für die FRET-Messungen kloniert werden. CFP sollte in beiden Sensoren am C-Terminus lokalisiert sein. Die FIAsh-Bindesequenz sollte in beiden Sensoren in unterschiedlichen Regionen von IL 3 eingefügt werden.

4.2.1 Sensoren des muskarinischen M_2 Acetylcholinrezeptors mit FIAsh unterhalb von TM 5

Durch Mutation wurde das FIAsh-Bindemotiv CCPGCC unterhalb von TM 5 zwischen den Aminosäuren Asparagin²²⁹ und Prolin²³⁰ in IL 3 des M_2 AChR eingefügt. Unter Elimination des Stop-Codons wurde eCFP direkt an den intrazellulären C-Terminus hinter Arginin⁴⁶⁶ angefügt. Die Rezeptorregion zum Einbringen des CCPGCC Bindemotivs wurde so gewählt, dass die zur Rezeptorphosphorylierung wichtigen Bereiche Serin²⁸⁶ - Serin²⁹⁰ (= *N-Cluster*) und Threonin³⁰⁷ - Serin³¹¹ (= *C-Cluster*) erhalten blieben [338, 339]. Die schematische Rezeptordarstellung in Abbildung 33 veranschaulicht die genaue Position des FIAsh-Bindemotivs in IL 3 des M_2 AChR. Zur Verbesserung der Membranexpression wurden am N-Terminus eine Hämagglutinin (HA)-Signalsequenz (KTIIALSYIFCLVFA), sowie ein Flag-Tag (DYKDDDDK) angefügt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird das so erhaltene Rezeptorkonstrukt als M_2i3-N bezeichnet.



HEK293 Zellen wurden mit Effectene[®] mit dem Rezeptorsensor transfiziert. Es wurden stabile Zelllinien generiert, die mittels Konfokalmikroskopie auf Membranlokalisation des Rezeptors hin untersucht wurden.

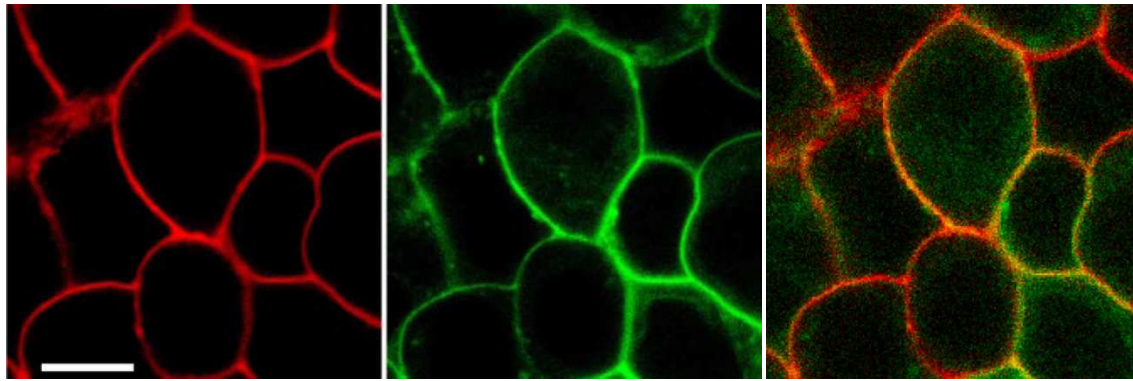


Abb. 34: Membranexpression des M₂i3-N Rezeptorsensors untersucht mittels Konfokalmikroskopie.

HEK293 Zellen, die stabil den M₂i3-N Rezeptorsensor exprimierten, wurden mit dem Konfokalmikroskop Leica TCS SP5 auf die Membranexpression des Rezeptors untersucht. Die Überlappung der Rezeptorfluoreszenz (Falschfarbendarstellung, grün) mit der des Membranmarkers CellMask™ DeepRed (Falschfarbendarstellung, rot) ist deutlich erkennbar (gelb im Überlagerungsbild). CFP wurde mit einer UV-Diode bei 405 nm, CellMask™ DeepRed mit der 594 nm Linie eines Argon-Lasers angeregt. Die Detektion erfolgte für CFP in einem Wellenlängenbereich von 450-510 nm, für CellMask™ DeepRed zwischen 650-680 nm.

In anschließend gemessenen FRET-Experimenten zeigte der M₂i3-N Rezeptorsensor eine konzentrationsabhängige Änderung des FRET-Signals. Stimulation mit dem endogenen Liganden ACh führte zu einer maximalen FRET-Antwort von ca. 9% ausgehend von der Basislinie. Die Qualität des Signal-Rausch-Verhältnisses erlaubte auch eine Auswertung selbst kleinster FRET-Unterschiede.

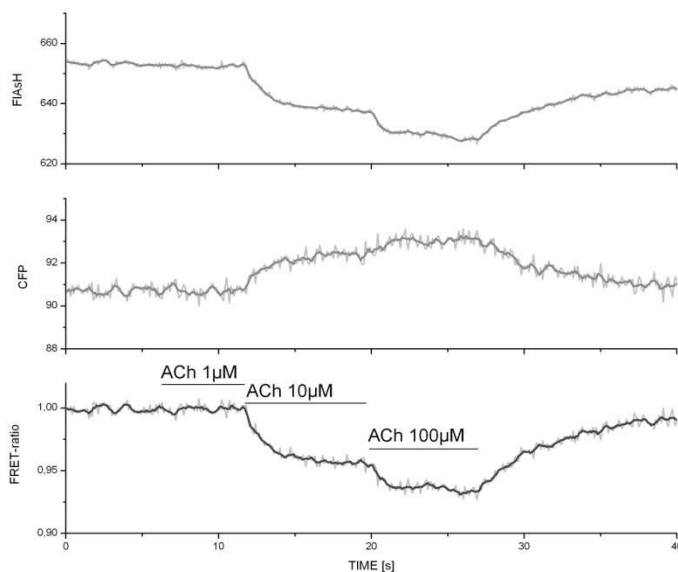


Abb. 35: Beispiel eines FRET-Experiments durchgeführt mit Acetylcholin (ACh) am M₂i3-N Rezeptorsensor.

HEK293 Zellen, die M₂i3-N stabil exprimierten, wurden in FRET-Messungen mit ACh in steigenden Konzentrationen perfundiert. Konzentrationsabhängig nahm die Donorfluoreszenz (CFP) zu und reziprok die Akzeptorfluoreszenz (FIAsh) ab, was in einer Abnahme des FRET-Ratio resultierte. Die FRET-Signale wurden um das Bleichen des Akzeptorfluorophors, sowie das Durchbluten der Donorfluoreszenz in den Akzeptorkanal korrigiert. Das so errechnete FRET-Ratio wurde normalisiert, geglättet und in Abhängigkeit der Messzeit dargestellt.

4.2.2 Sensoren des muskarinischen M₂ Acetylcholinrezeptors mit FIAsh unterhalb von TM 6

Bei der Klonierung der HAFlagM₂FIAshTM6-CFP Rezeptorkonstrukte wurden ebenfalls ein Flag-Tag, sowie die HA-Signalsequenz am N-Terminus und C-terminal das CFP eingefügt. Die FIAsh-Bindestelle wurde in einem ersten Versuch unterhalb von TM 6 in IL 3 zwischen den Aminosäuren Threonin³⁶⁹ und Lysin³⁷⁰ ergänzt (Abb. 40, Seite 65). Das resultierende HAFlagM₂FIAshTM6-CFP-1 Rezeptorkonstrukt wird im Folgenden als M₂i3-C-1 bezeichnet. FRET-Messungen an Zellen, die mit diesem Konstrukt mittels Effectene[®] transfiziert wurden,

zeigten nur einen minimalen Ausschlag bei Zugabe von 100 μM ACh. Auch war das Signal-Rausch-Verhältnis nicht ausreichend groß, um konzentrations- oder ligandenabhängige Unterschiede im FRET-Signal zuverlässig auswerten zu können.

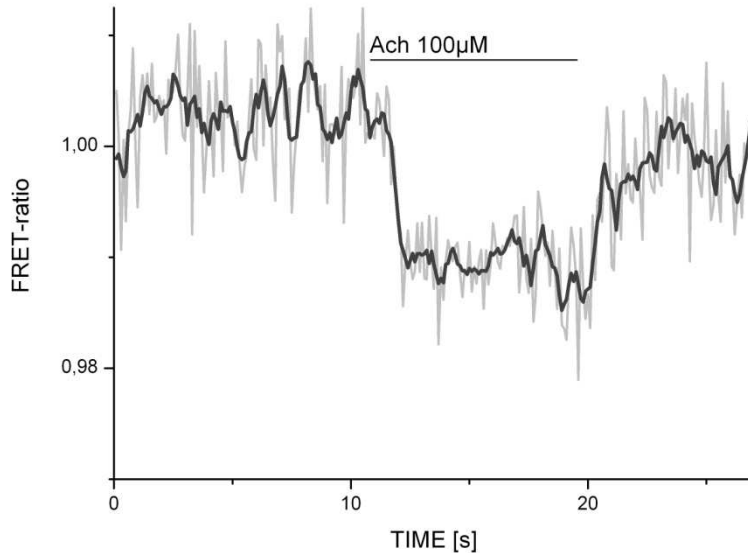


Abb. 36: FRET-Spur nach Stimulation des $M_{2i3}\text{-C-1}$ Sensors mit Acetylcholin (ACh) in sättigender Konzentration.

Die Superfusion von HEK TSA-Zellen, die transient mit dem $M_{2i3}\text{-C-1}$ Rezeptorkonstrukt transfiziert wurden, mit 100 μM ACh führte zu einer geringen Änderung des FRET-Signals. Diese und das schlechte Signal-Rausch-Verhältnis erlaubten keine Quantifizierung konzentrationsabhängiger Änderungen der FRET-Antworten. Dargestellt ist das um das Durchbluten des Donor- und das Bleichen des Akzeptorfluorophors korrigierte FRET-Ratio.

Zur Optimierung des Rezeptorsensors für FRET-Experimente wurde in weiteren Klonierungen die Position des CCPGCC-Bindemotives verändert.

In dem **HAFlag M_2 FIAsHTM6-CFP-2** Rezeptorsensor (bezeichnet als $M_{2i3}\text{-C-2}$) wurde das FIAsH-Bindemotiv um vier Aminosäuren in Richtung von TM 6 verschoben und somit zwischen Alanin³⁷³ und Lysin³⁷⁴ eingefügt. Auch dieses Rezeptorkonstrukt zeigte nur sehr geringe Änderungen des FRET-Ratio nach Agoniststimulation in sättigenden Konzentrationen. Eine Auswertung der Signaländerung abhängig von verschiedenen Liganden oder Ligandenkonzentrationen war somit nicht möglich. Allerdings führte eine Superfusion des Rezeptorsensors mit Agonisten nun zu einer Zunahme des FRET-Ratio.

Nachdem eine Verschiebung des Bindemotives in Richtung der TM 6 keine Verbesserung hinsichtlich der messbaren FRET-Änderungen erbracht hatte, wurde nun eine Verschiebung des CCPGCC-Motivs weiter zur Mitte des IL 3 vorgenommen. Somit wurde im Folgekonstrukt die FIAsH-Bindesequenz ausgehend vom $M_{2i3}\text{-C-1}$ Rezeptorsensor um neun Aminosäuren weiter zum N-terminalen Ende von IL 3 geschoben. Im sich so ergebenden **HAFlag M_2 FIAsHTM6-CFP-3**, auch als $M_{2i3}\text{-C-3}$ bezeichnet, befand sich die CCPGCC-Sequenz nun zwischen den Aminosäuren Isoleucin³⁶⁰ und Valin³⁶¹.

In anschließenden FRET-Versuchen konnte erneut nur eine kleine FRET-Antwort auf die Stimulation des Sensors mit Ligand in sättigender Konzentration beobachtet werden. Auch hier war wegen des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses eine Quantifizierung der unterschiedlichen FRET-Signale nicht möglich. Wie schon im $M_{2i3}\text{-C-2}$ resultierte eine Stimulation des Rezeptors in einer Zunahme des FRET-Ratio.

Im **HAFlag M_2 FIAsHTM6-CFP-4** Rezeptorkonstrukt (nachfolgend bezeichnet als $M_{2i3}\text{-C-4}$) wurde das CCPGCC-Motiv wieder mehr an TM 6 angenähert und zwischen den Aminosäuren Isoleucin³⁶⁵ und Valin³⁶⁶ eingeschoben. Wie auch in den vorherigen Rezeptorsensoren bleiben das CFP am C-Terminus, sowie Flag-Tag und HA-Signalsequenz am N-Terminus erhalten.

Ähnlich wie bei den vorherigen Rezeptorsensoren des M_2i3 -C-Typs erlaubte auch hier die nur geringe FRET-Antwort keine quantitative Auswertung konzentrations-, oder ligandenspezifischer FRET-Signale. Das Signal-Rausch-Verhältnis war – verglichen mit dem der vorherigen Rezeptorkonstrukte - zwar bedeutend größer, reichte für eine Auswertung geringer FRET-Signale aber nicht aus. Das Ausmaß der Signaländerung war mit dem des M_2i3 -C-1 vergleichbar.

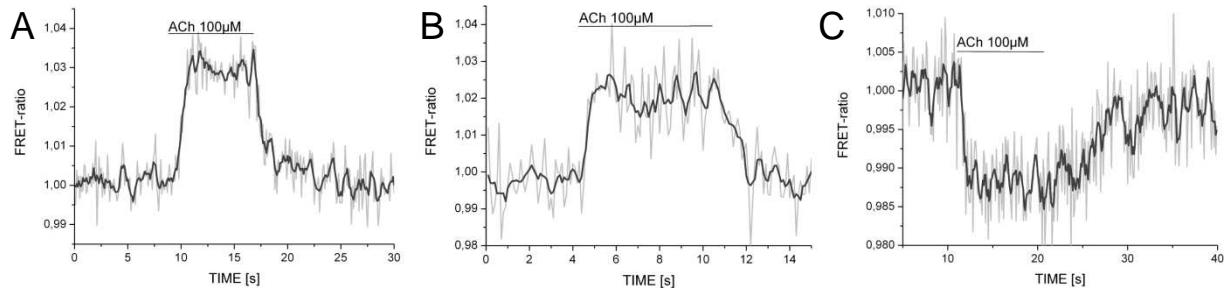


Abb. 37: Ligandinduzierte Änderung des FRET-Ratio nach Stimulation der M_2i3 -C-2, M_2i3 -C-3 und M_2i3 -C-4 Rezeptorsensoren mit 100 μ M Acetylcholin (ACh).

Die FRET-Messungen erfolgten an HEK TSA-Zellen, die transient die jeweiligen Rezeptorsensoren exprimierten. Die FRET-Signale wurden um Akzeptorbleichen, Falschanregung und Durchbluten korrigiert, geglättet und als Funktion der Zeit dargestellt. (A) Eine Aktivierung des M_2i3 -C-2 Rezeptorsensors resultierte in der Zunahme des FRET-Ratio. Höhe der Signaländerung, wie auch das Signal-Rausch-Verhältnis, zeigten eine deutliche Verbesserung gegenüber dem M_2i3 -C-1 Rezeptor Konstrukt. (B) Die Stimulation des M_2i3 -C-3 Sensors führte zu einer Zunahme des FRET-Signals. Das Ausmaß der Signaländerung war allerdings geringer, als das am M_2i3 -C-2 beobachtete. (C) Das M_2i3 -C-4 Konstrukt zeigte eine rasche Abnahme des FRET-Signals nach Ligandensuperfusion.

In einem weiteren Versuch zur Verbesserung der FRET-Messbarkeit der Rezeptorsensoren wurde die FIASH-Bindesequenz nochmals etwas weiter unterhalb von TM 6 verschoben. Zur Generierung des HAFlag M_2 FIAsHTM6-CFP-5 Rezeptorkonstrukts wurde das FIASH-Bindemotiv zwischen den Aminosäuren Aspartat³⁵⁵ und Glutamat³⁵⁶ eingefügt. Das so erhaltene Konstrukt wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als M_2i3 -C Rezeptorsensor bezeichnet.

In nachfolgenden FRET-Messungen zeigte der M_2i3 -C Rezeptorsensor eine maximale Antwort von annähernd 8% gemessen von der Basislinie nach Stimulation mit ACh (100 μ M). Dabei resultierte die Überspülung der Zellen in einer Abnahme des FRET-Ratio. Im Vergleich zum FRET-Signal war nur ein sehr geringes Rauschen zu beobachten.

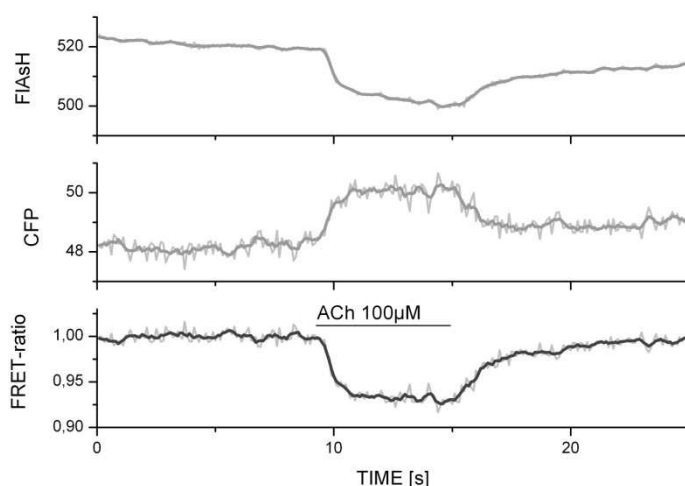


Abb. 38: Änderung des FRET-Ratio nach Aktivierung des M_2i3 -C Rezeptorsensors.

HEK293 Zellen, die transient den M_2i3 -C Sensor exprimierten, wurden in FRET-Messungen mit 100 μ M Acetylcholin (ACh) stimuliert. Das FRET-Ratio wurde um das Akzeptorbleichen und das Durchbluten des Donors korrigiert. Eine Stimulation mit 100 μ M ACh rief eine Zunahme der Donorfluoreszenz (CFP) und eine Abnahme der Akzeptorfluoreszenz (FIAsH) hervor. Das FRET-Signal änderte sich um ca. 8%. Bei gleichzeitig hoher Signalamplitude war das Rauschen gering.

Es wurden Zelllinien generiert, die das M_{2i}3-C Konstrukt stabil exprimierten. Diese Zellen wurden mittels Konfokalmikroskopie auf die Membranständigkeit des Rezeptors überprüft.

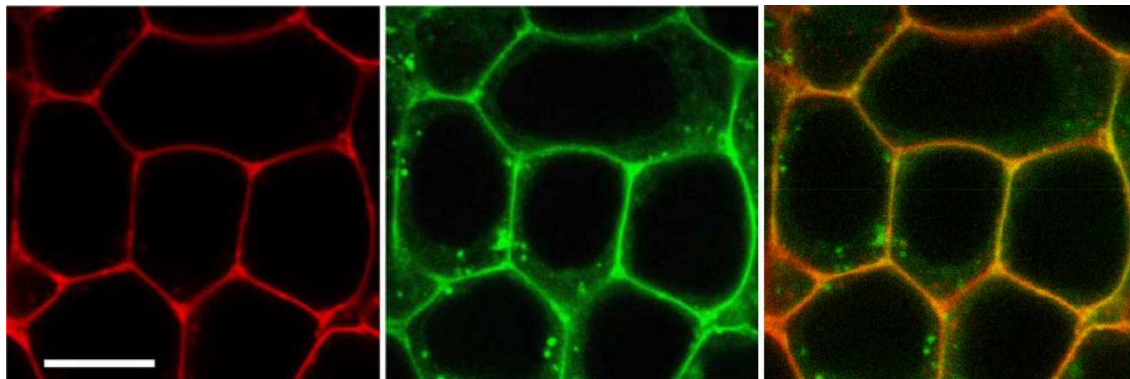


Abb. 39: Konfokalmikroskopische Untersuchung der Membranexpression des M_{2i}3-C Rezeptors.

Stabil den M_{2i}3-C Sensor exprimierende HEK293 Zellen wurden mit Hilfe des Konfokalmikroskops Leica TCS SP5 auf Membranlokalisierung des Rezeptorkonstrukts getestet. Das M_{2i}3-C Konstrukt zeigte eine deutliche Membranexpression sichtbar an der Überlappung (Falschfarbendarstellung, gelb) der Fluoreszenz des Membranmarkers CellMask™ DeepRed (Falschfarbendarstellung, rot) mit der Rezeptorfluoreszenz (Falschfarbendarstellung, grün). Der Größenbalken gibt eine Länge von 10 µm wieder. Die Fluoreszenzanregung von CFP erfolgte bei 405 nm, die von CellMask™ DeepRed bei 594 nm. Die Emission der CFP-Fluoreszenz wurde bei 450-510 nm erfasst. Der Membranmarker wurde in einem Wellenlängenbereich von 650-680 nm detektiert.

Abbildung 40 veranschaulicht die Positionen der FIASH-Bindesequenz CCPGCC, die zur Generierung der unterschiedlichen M_{2i}3-C Rezeptorkonstrukte unterhalb vom TM 6 in IL 3 gewählt wurden, sowie die Lage von CFP, der HA-Signalsequenz und des Flag-Tags.

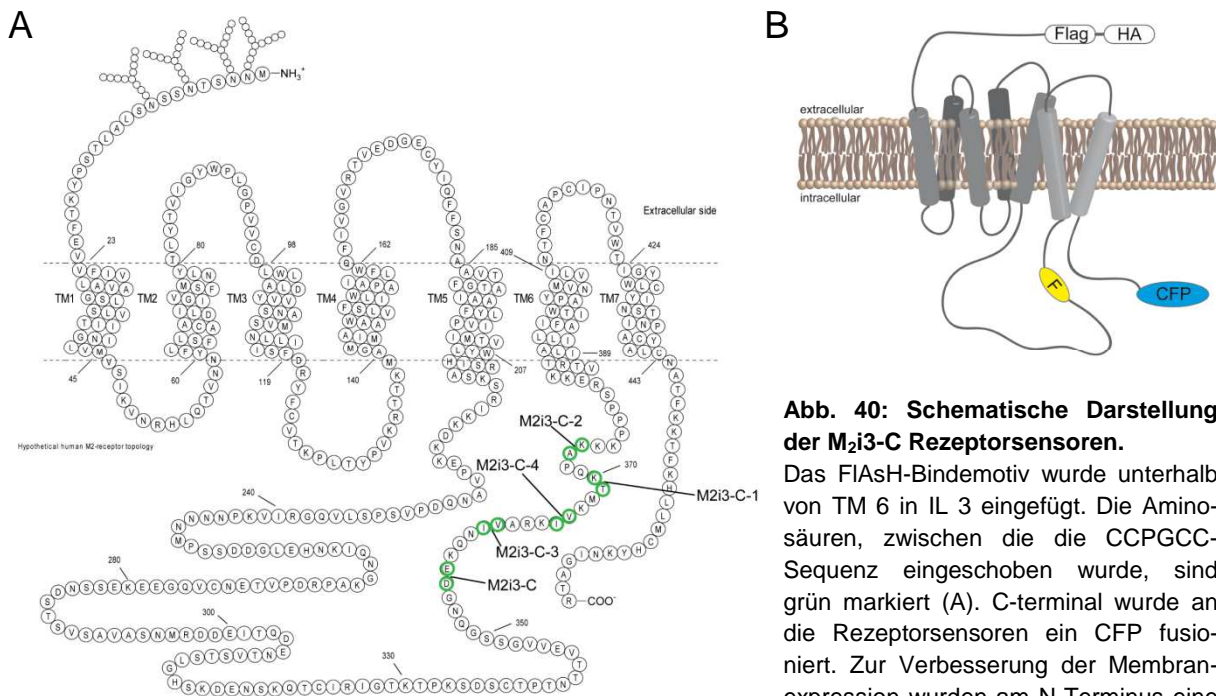


Abb. 40: Schematische Darstellung der M_{2i}3-C Rezeptorsensoren.

Das FIASH-Bindemotiv wurde unterhalb von TM 6 in IL 3 eingefügt. Die Aminosäuren, zwischen die die CCPGCC-Sequenz eingeschoben wurde, sind grün markiert (A). C-terminal wurde an die Rezeptorsensoren ein CFP fusioniert. Zur Verbesserung der Membranexpression wurden am N-Terminus eine HA-Signalsequenz (HA), sowie ein Flag-Tag (Flag) angefügt (B).

4.3 Charakterisierung der Rezeptorsensoren

4.3.1 Bestimmung der K_D - und K_I -Werte mittels Radioligandenbindung

Um das Ligandenbindeverhalten der Rezeptorsensoren M_2i3 -N und M_2i3 -C zu untersuchen, wurden Radioligandenbindungsversuche durchgeführt. Durch die Bestimmung der K_D - und K_I -Werte konnten die Rezeptordichte, sowie die Affinität der Liganden zu den getesteten Sensoren ermittelt werden. Ein Vergleich mit Literaturwerten sollte dabei zeigen, ob die Rezeptorsensoren durch das Einfügen der Fluorophore bzw. des Flag-Tags und der HA-Signalsequenz an Funktionalität eingebüßt hatten. Auf die Bestimmung der Rezeptorexpression mit dem membranpermeablen Radioliganden [3 H] QNB wurde verzichtet, da die Konfokalmikroskopie der mit den jeweiligen Sensoren transfizierten Zellen ein ausreichender Beweis dafür war, dass intrazellulär kaum Rezeptoren exprimiert wurden und der Großteil der gebildeten Rezeptoren an der Plasmamembran lokalisiert war.

Die Rezeptordichte wurde mit Hilfe von Sättigungsexperimenten analysiert. Dazu wurde in einem Vorversuch die optimale Konzentration an einzusetzendem Membranprotein bestimmt. Getestet wurden sowohl das M_2i3 -N, als auch das M_2i3 -C Rezeptorkonstrukt. Als Vergleich diente hierbei der M_2 CFP Rezeptor. Die Membranproteine wurden durch Membranpräparation aus HEK293 Zellen gewonnen, die das jeweils zu testende Rezeptorkonstrukt stabil exprimierten. Zur Kontrolle wurden auch untransfizierte HEK293 Zellen getestet.

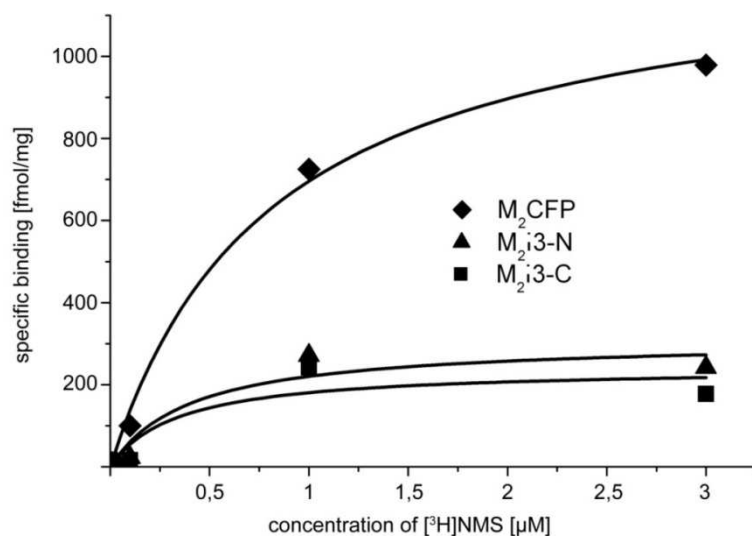


Abb. 41: Beispiel eines Radioligandenexperimentes zur Ermittlung der Sättigungsbindung.

Die M_2 Rezeptorsensoren wurden mit steigenden Konzentrationen von [3 H] NMS inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von Atropin (100 μ M) bestimmt. Die totale Bindung wurde um die unspezifische korrigiert und abhängig von der eingesetzten Konzentration an Radioligand für jedes getestete Rezeptorkonstrukt aufgetragen (Raute: M_2 CFP; Dreieck: M_2i3 -N; Quadrat: M_2i3 -C)

Die Auswertung der Sättigungsbindungsexperimente lieferte folgende K_D -Werte:

Tab. 1: K_D -Werte für [3 H] NMS ermittelt an den Rezeptorkonstrukten M_2 CFP-, M_2i3 -N- und M_2i3 -C.

Angegeben wurden mittels Radioligandenbindungsexperimenten ermittelte K_D -Werte mit zugehörigem Konfidenzintervall aus $n = 3$ unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Rezeptorsensor	K_D -Werte [nM]	Konfidenzintervall [nM]
M_2 CFP	1,4	0,13 - 15,6
M_2i3 -N	1,5	0,30 - 6,5
M_2i3 -C	1,2	0,14 - 9,4

Zur Ermittlung der K_i -Werte wurden Membranen von HEK293 Zellen, die stabil entweder den M_2 CFP-, M_2i3 -N-, oder M_2i3 -C Rezeptor exprimierten, präpariert. In den anschließenden Verdrängungsexperimenten wurden die Membransuspensionen in Anwesenheit einer fixen Konzentration von [3 H] NMS mit Carbachol in steigenden Konzentrationen inkubiert.

Nachdem der M_2 CFP-Rezeptor bereits in den Sättigungsexperimenten keine Abweichung von den beiden anderen Rezeptorsensoren bezüglich des K_D -Wertes aufwies und auch das erste Verdrängungsexperiment keine unterschiedlichen K_i -Werte für die drei Rezeptorkonstrukte ergab, wurde auf eine Einbeziehung des M_2 CFP Konstrukts in weitere Verdrängungsexperimente verzichtet.

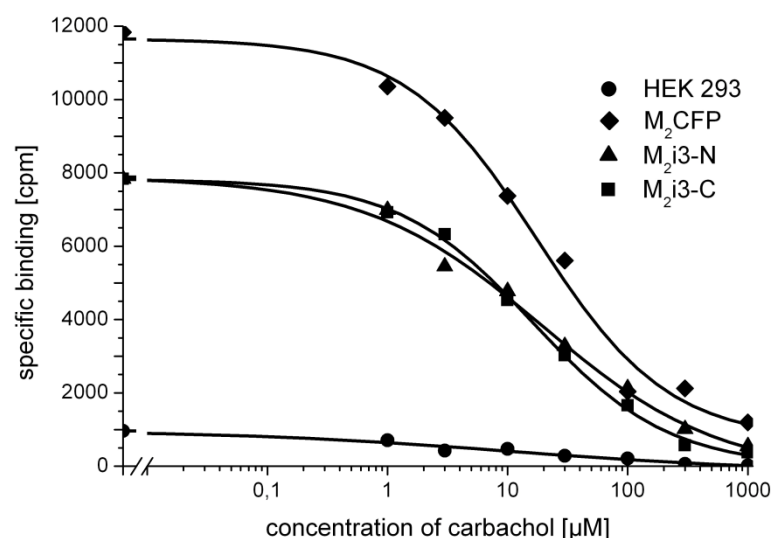


Abb. 42: Verdrängungsbindung, zur Ermittlung der K_i -Werte des M_2i3 -N- und des M_2i3 -C Rezeptorsensors.

Die Rezeptorsensoren wurden in Gegenwart einer festen Konzentration von [3 H] NMS mit Carbachol in steigender Konzentration inkubiert. Die totale Bindung wurde um die unspezifische korrigiert und abhängig von der eingesetzten Konzentration an Carbachol aufgetragen. Als Kontrolle dienten untransfizierte HEK293 Zellen. (Kreis: HEK293 Zellen; Raute: M_2 CFP; Dreieck: M_2i3 -N; Quadrat: M_2i3 -C Sensor).

Die Berechnung der K_i -Werte führte zu folgenden Ergebnissen:

Tab. 2: K_i -Werte für Carbachol ermittelt mit den Rezeptoren M_2 CFP-, M_2i3 -N- und M_2i3 -C.

Die aus Verdrängungsexperimenten berechneten K_i -Werte wurden zusammen mit dem entsprechenden Konfidenzintervall spezifisch für den Rezeptorsensor aufgelistet ($n = 4$).

Rezeptorsensor	K_i -Werte [μ M]	Konfidenzintervall [μ M]
M_2 CFP	13,1	<i>n.d.</i>
M_2i3 -N	10,6	6,1-18,5
M_2i3 -C	11,3	6,7-18,8

Die aus den Verdrängungsexperimenten ermittelten K_i -Werte waren für die unterschiedlichen Rezeptorkonstrukte vergleichbar.

4.3.2 Funktionelle Charakterisierung mittels Messung der Ca^{2+} -Freisetzung

Der Beleg, dass das Einfügen der FIAsh-Bindesequenz die Funktionalität der Rezeptorsensoren nicht beeinflusste, wurde mittels Messung der konzentrationsabhängigen Ca^{2+} -Freisetzung erbracht. Die Versuche erfolgten in HEK TSA-Zellen, die transient mit dem jeweiligen Rezeptorsensor transfiziert waren. Um eine Freisetzung von Ca^{2+} zu erreichen, musste hierbei mit dem chimären G-Protein $G_{\alpha q}G66Di5$ gearbeitet werden. Dieses erkennt einen aktivierten G_i -gekoppelten Rezeptor, stimuliert nachfolgend allerdings die Freisetzung von Ca^{2+} , die unter physiologischen Bedingungen G_q -vermittelt erfolgt [340].

Transfektionsschema:

wt M ₂ / M ₂ i3-N/ M ₂ i3-C	1,8 µg
Gαq G66D-Protein	1,8 µg
Effectene	100 µl
Enhancer	32 µl
Puffer	600 µl

Die Transfektion wurde direkt auf Gewebekulturschalen (Durchmesser 6 cm) 48 Stunden vor dem Beginn der Messung durchgeführt.

Da HEK TSA-Zellen endogen M₃ AChR [336] exprimieren, wurde als Kontrolle in jedem Experiment die Ca²⁺-Freisetzung nach Agoniststimulation untransfizierter HEK TSA-Zellen bestimmt. Die Zellen wurden mit Carbachol stimuliert und die Zunahme der Fluoreszenz des Calcium-Indikators Fluo-4 wurde konzentrationsabhängig für jedes Rezeptorkonstrukt berechnet.

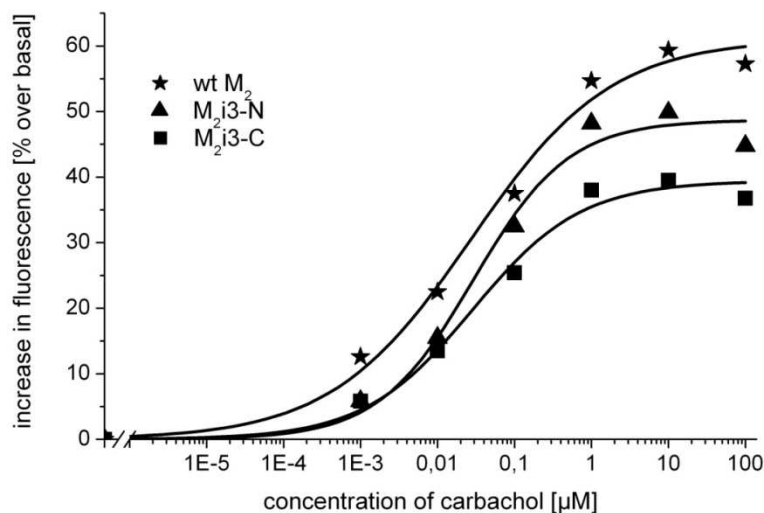


Abb. 43: Beispiel eines Versuchs zur Bestimmung der konzentrationsabhängigen Ca²⁺-Freisetzung nach Rezeptorstimulation.

HEK TSA-Zellen, die transient mit dem wt M₂ AChR, bzw. mit den Rezeptorsensoren M₂i3-N und M₂i3-C und dem Gαq G66D Protein transfiziert worden waren, wurden mit Carbachol in steigenden Konzentrationen versetzt. Die Freisetzung von Ca²⁺ wurde über einen Anstieg der Fluoreszenz des Ca²⁺-Indikators Fluo-4 NW bestimmt. Die gemessenen Werte wurden um die ligandvermittelte Ca²⁺-Freisetzung nach Stimulation leerer HEK TSA-Zellen korrigiert (Stern: wt M₂; Dreieck: M₂i3-N; Quadrat: M₂i3-C).

Aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten ergaben sich folgende EC₅₀-Werte:

Tab. 3: EC₅₀-Werte für Carbachol ermittelt mit dem wt M₂-, M₂i3-N- und M₂i3-C Rezeptor.

Aus n = 3 Experimenten zur Ca²⁺-Freisetzung wurden die EC₅₀-Werte ermittelt und mit dem entsprechenden Standardfehler für jeden Rezeptor aufgelistet.

Rezeptorsensor	EC ₅₀ -Werte [µM]	S.E.
wt M ₂	1,9	0,7
M ₂ i3-N	1,9	0,8
M ₂ i3-C	1,7	1,3

Die EC_{50} -Werte für das M₂i3-N- und das M₂i3-C Rezeptorkonstrukt zeigten keine Abweichungen von dem wt M₂ AChR.

4.3.3 Vergleich der β -Arrestin2 Translokation

Bisher ist ausschließlich die Beteiligung der Aminosäuren Threonin³⁰⁷ bis Serin³¹¹ an der Interaktion mit β -Arrestin2 beschrieben [341]. Obwohl die postulierten Phosphorylierungsstellen des M₂ AChR durch den Einschub der CCPGCC-Bindesequenz nicht verändert wurden, wurde die β -Arrestin2 Translokation zum aktivierten Rezeptor gemessen. So sollte ausgeschlossen werden, dass andere, bisher nicht bekannte Aminosäuresequenzen, die an der Interaktion der Rezeptors mit β -Arrestin2 beteiligt sind, durch das Einfügen des FIAsh-Bindemotivs zerstört wurden. In diesen Versuchen wurde neben den in dieser Arbeit neu generierten M₂i3-N- und M₂i3-C Sensoren auch der bereits publizierte Flag-M₂-sl3-FIAsh-GSGEG-CFP Rezeptorsensor getestet. Da bei diesem Rezeptorkonstrukt IL 3 und somit die postulierten Phosphorylierungsstellen vollständig entfernt worden waren, wurde für den Flag-M₂-sl3-FIAsh-GSGEG-CFP keine β -Arrestin2 Translokation erwartet.

Nachdem die M₂-vermittelte Translokation von β -Arrestin2 in der Literatur kontrovers diskutiert wird, wurden in Vorversuchen die zur Erzielung einer β -Arrestin2 Translokation nötigen Bedingungen ermittelt. Dies erfolgte unter Verwendung des M₂CFP Rezeptors. Untersucht wurde die β -Arrestin2 Translokation in Abwesenheit von GRK bzw. in Anwesenheit von GRK5, oder GRK2. HEK TSA-Zellen wurden transient mit den benötigten cDNAs (M₂CFP, GRK2/GRK5/- und β -Arrestin2YFP) transfiziert und 48 Stunden später mittels Konfokalmikroskopie auf die β -Arrestin2YFP Translokation hin getestet. Dazu wurden die Rezeptoren mit ACh (100 μ M) stimuliert. Direkt im Anschluss wurde mit Hilfe des Konfokalmikroskops eine Zeitserie über 15 Minuten erstellt, wozu alle 30 Sekunden ein Bild aufgenommen wurde. Weder in Abwesenheit von GRK, noch in Gegenwart von GRK5 wurde eine ACh-vermittelte Translokation von β -Arrestin2 zum M₂CFP Rezeptor gezeigt. Nur in Anwesenheit von GRK2 konnte eine β -Arrestin2 Translokation durch Stimulation des M₂CFP Konstrukts induziert werden.

Transfektionsschema (bezogen auf ein „well“ einer „six-well“ Platte):

M ₂ CFP (1 μ g/ μ l)	0,3 μ g
β -Arrestin2YFP	0,3 μ g
GRK2/ GRK5	0,2 μ g
Effectene	7 μ l
Enhancer	2,7 μ l
Puffer	50 μ l

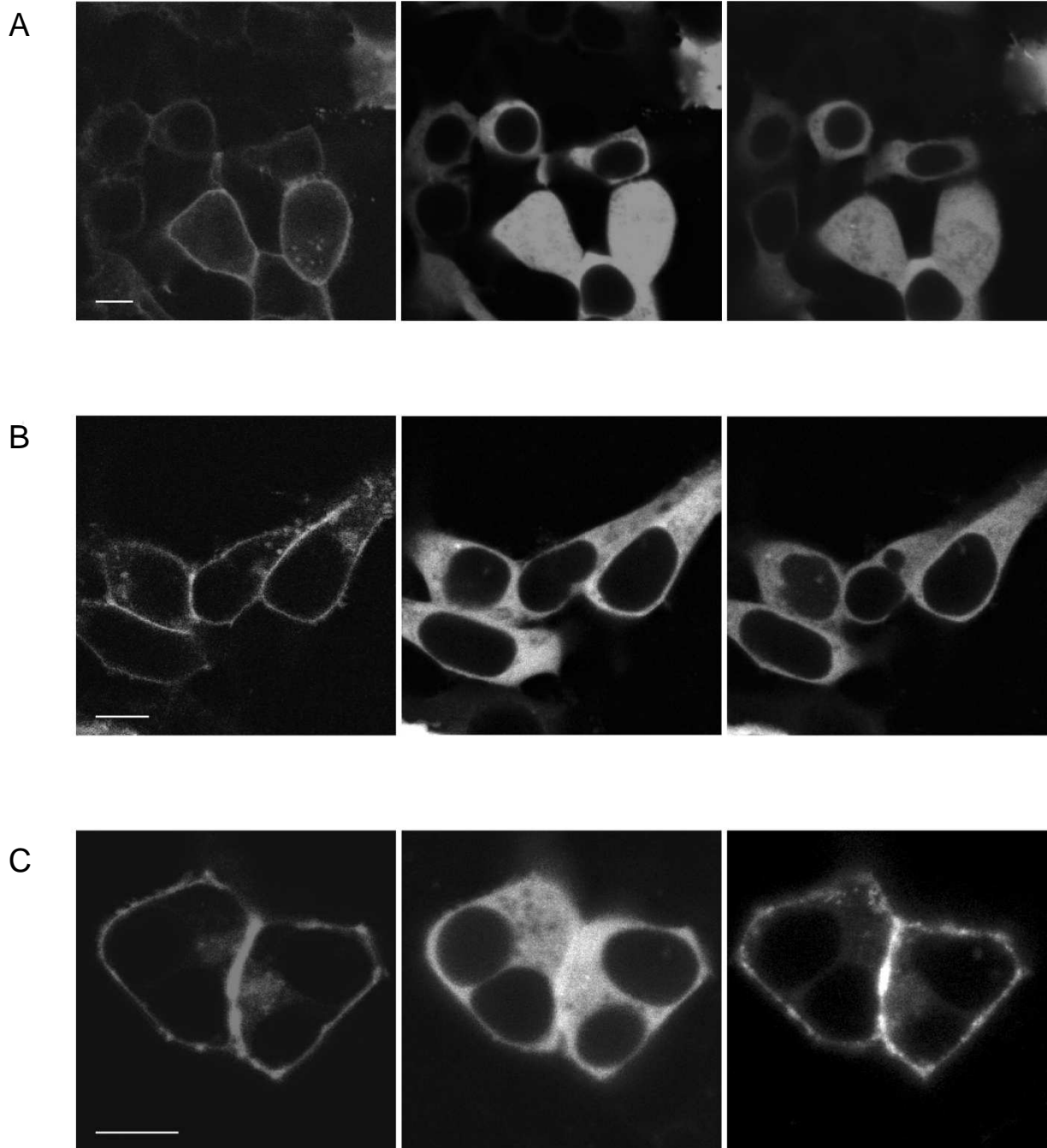


Abb. 44: Translokation von β -Arrestin2YFP zur Zellmembran nach Stimulation des M_2 CFP Rezeptors.

HEK TSA-Zellen wurden transient mit M_2 CFP und β -Arrestin2YFP transfiziert und in Abwesenheit von GRKs (A) bzw. in Anwesenheit von GRK5 (B), oder GRK2 (C) auf die rezeptorvermittelte β -Arrestin2 Translokation getestet. Es wurden nur Zellen untersucht, die den Rezeptor membranständig exprimierten (links), die Kontrolle erfolgte hierbei über Anregung des mit CFP markierten Rezeptors bei einer Wellenlänge von 430 nm. Nach Zugabe von 100 μ M ACh wurden Zeitserien über 15 Minuten aufgenommen. YFP wurde bei 514 nm angeregt, die Emission wurde zwischen 525 – 600 nm detektiert. Erfasst wurde die Abnahme der zytosolischen YFP-Fluoreszenz. Nach Ablauf der 15 Minuten war in Anwesenheit von GRK2 eine deutliche Translokation des YFP-markierten β -Arrestin2 von Zellzytosol ($t = 0$, Mitte) an die Membran der Zelle (rechts) zu erkennen. Die Größenbalken entsprechen 10 μ m.

Die Charakterisierung der verschiedenen Rezeptorsensoren hinsichtlich β -Arrestin2YFP Rekrutierung erfolgte in HEK TSA-Zellen, die transient mit dem jeweiligen, CFP-markierten Rezeptorkonstrukt, GRK2 und β -Arrestin2YFP transfiziert wurden. Nach Stimulation der

Rezeptoren mit 100 μM ACh wurden wie in den Optimierungsversuchen 15-minütige Zeitserien aufgenommen. Für jedes Rezeptorkonstrukt wurden mindestens vier Zeitserien erstellt. Insgesamt wurden $n \geq 12$ Zellen ausgewertet.

Die, durch Stimulation der $M_2\text{CFP}$ -, $M_{2i3}\text{-N}$ - und $M_{2i3}\text{-C}$ Rezeptoren vermittelte, β -Arrestin2YFP Translokation erreichte bereits nach ca. 8 Minuten ein Plateau. Nach Ablauf der vollen 15 Minuten zeigte sich für den $M_2\text{CFP}$ Rezeptor im Zytosol eine Rest-YFP-Fluoreszenz von $56,5 \pm 3,9\%$ im Vergleich zum Zeitpunkt $t = 0$. Mit einer im Zytosol verbleibenden YFP-Fluoreszenz von $63,9 \pm 2,8\%$ für das $M_{2i3}\text{-N}$ - und $61,6 \pm 2,5\%$ für das $M_{2i3}\text{-C}$ Konstrukt zeigten beide Sensoren eine dem $M_2\text{CFP}$ -Rezeptor ähnliche Translokation von β -Arrestin2. In Abbildung 45 ist die zeitabhängige Abnahme der YFP-Fluoreszenz nach Stimulation der Rezeptorsensoren nochmals dargestellt. Aus dieser Abbildung wird auch ersichtlich, dass einer Flag- $M_2\text{-sl3-FIAsH-GSGEG-CFP}$ Aktivierung keine β -Arrestin2 Translokation folgte.

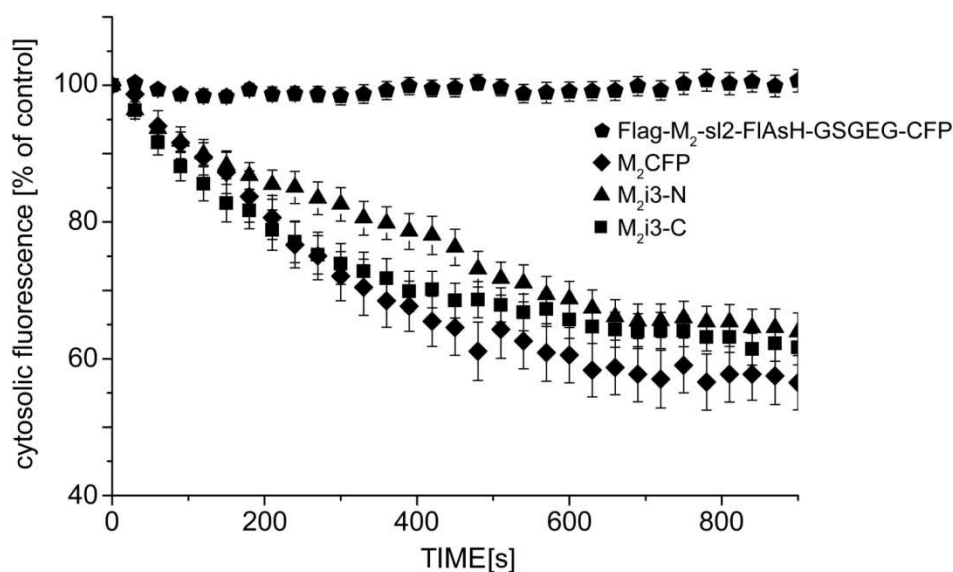


Abb. 45: Quantifizierung der β -Arrestin2YFP Translokation nach Stimulation der jeweiligen Rezeptoren mit 100 μM ACh.

Das Ausmaß der ACh-vermittelten Rekrutierung von β -Arrestin2YFP zur Zellmembran wurde als Abnahme der zytosolischen YFP-Fluoreszenz bestimmt. Der statistisch ermittelte Mittelwert, sowie der Standardfehler wurden für das jeweilige Rezeptorkonstrukt zeitabhängig aufgetragen. Sowohl der $M_2\text{CFP}$ (Raute), als auch der $M_{2i3}\text{-N}$ (Dreieck) und der $M_{2i3}\text{-C}$ Rezeptor (Quadrat) zeigten eine deutliche und vergleichbare Reduktion der YFP-Fluoreszenz im Zellzytosol. Das Flag- $M_2\text{-sl2-FIAsH-GSGEG-CFP}$ Konstrukt (Diamant) dagegen war nicht in der Lage eine agonistvermittelte Translokation von β -Arrestin2YFP an die Zellmembran hervorzurufen ($n \geq 12$ Einzelzellen).

4.4 Charakterisierung der verwendeten Liganden

4.4.1 Orthosterische Liganden

Ziel dieser Arbeit war es, die unterschiedliche Beeinflussung der Konformation des M_2 AChR durch verschiedene orthosterische und allosterische Liganden zu untersuchen. Augenmerk wurde dabei auch auf die Untersuchung der *probe dependency*, des Effekts allosterischer Modulatoren in Abhängigkeit vom anwesenden orthosterischen Liganden gelegt. Zur Bestimmung einer möglichen *probe dependency* wurden im Vorfeld zwei unterschiedliche

Agonisten als orthosterische Liganden ausgewählt, der endogene Ligand ACh und der orthosterische Baustein von H 1 und H 2 [270], Iperoxo.

Während die Eigenschaften von ACh an mAChR bereits weitestgehend untersucht wurden [342, 343], ist über Iperoxo bislang nur wenig bekannt [344]. Zur näheren Charakterisierung von Iperoxo wurden deswegen Konzentrations-Wirkungsexperimente mittels FRET-Mikroskopie durchgeführt, um die Affinität dieser Substanz zum M₂ AChR und deren maximalen, stimulatorischen Effekt zu untersuchen.

Stabil transfizierte M₂i3-N HEK Zellen wurden mit Hilfe eines Perfusionssystems mit dem jeweiligen Agonisten in steigender Konzentration überspült. Als Referenz wurde in jeder Messung eine Stimulation der Rezeptoren mit 300 µM ACh durchgeführt. Die Höhen der gemessenen FRET-Signale wurden anschließend als prozentualer Anteil der durch 300 µM ACh hervorgerufenen FRET-Antwort berechnet und in Abhängigkeit von der eingesetzten Ligandenkonzentration grafisch dargestellt.

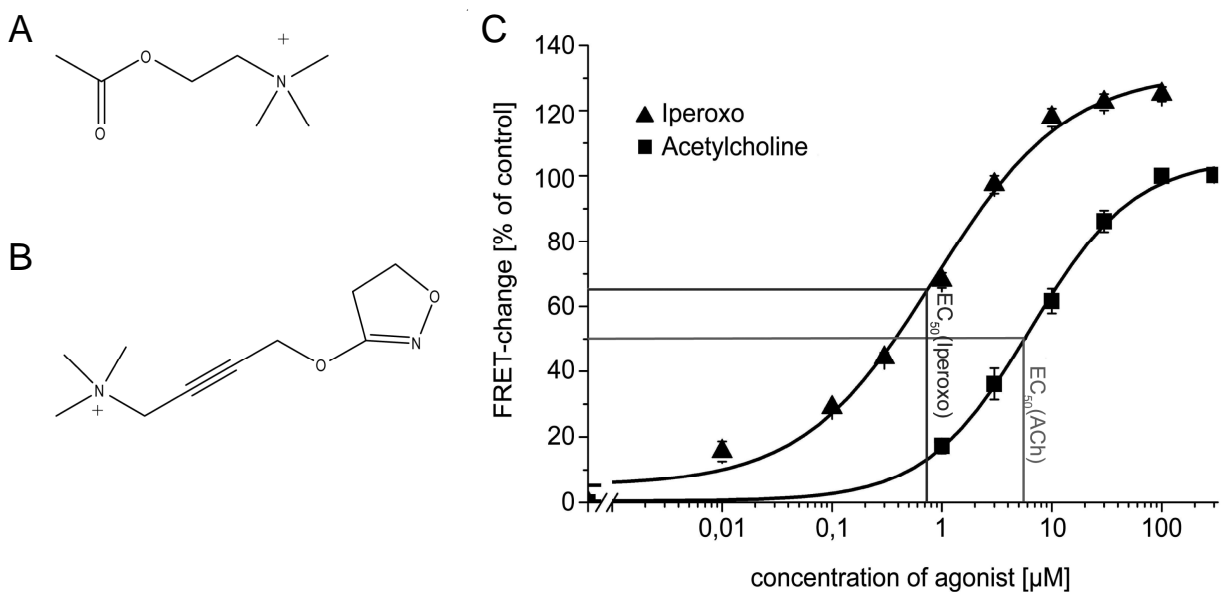


Abb. 46: Strukturformeln und Konzentrations-Wirkungskurven von Acetylcholin (ACh) und Iperoxo gemessen am M₂i3-N Rezeptorsensor.

Sowohl ACh (A), als auch Iperoxo (B) weisen eine positiv geladene Stickstoffgruppe auf, im Gegensatz zu ACh verfügt Iperoxo zusätzlich über eine 4,5-Dihydroisoxazol-Ringstruktur. Die mittels FRET-Mikroskopie ermittelten Konzentrations-Wirkungskurven der beiden Agonisten (C) zeigten eine deutliche Linksverschiebung der Iperoxo-Kurve (Dreieck) gegenüber der ACh-Kurve (Quadrat). Auch konnte Iperoxo eine höhere Rezeptoraktivierung hervorrufen. Gezeigt werden die statistisch ermittelten Mittelwerte und Standardfehler. Als 100% Referenzwert diente die Signalhöhe des durch 300 µM ACh induzierten FRET-Signals (n ≥ 15 Einzelzellen).

Iperoxo aktivierte den M₂i3-N Rezeptorsensor mit $131,8 \pm 5,4\%$ verglichen mit ACh (300 µM) in einem wesentlich größeren Ausmaß. Zudem lag die mittlere effektive Konzentration von Iperoxo mit einem EC₅₀-Wert von $0,8 \pm 0,1$ µM niedriger, als die von ACh (EC₅₀(ACh) = $6,3 \pm 0,7$ µM).

4.4.2 Allosterische Modulatoren

4.4.2.1 Erarbeitung eines Messschemas zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungskurven

Bei den allosterischen Testsubstanzen handelte es sich um Verbindungen, die dem jeweiligen allosterischen Baustein von H 1 und H 2 nachempfunden waren. Da diese bisher nicht mit Hilfe von FRET-Experimenten untersucht wurden, mussten in Vorversuchen die Versuchsbedingungen zur Erzielung eines optimalen Ergebnisses bestimmt werden.

4.4.2.1.1 Überlegungen zur Konzentration des eingesetzten Orthosters

Bereits publizierten Daten [270] konnte entnommen werden, dass sich einzelne Bausteine von H 1 und H 2 in Radioligandenbindungsstudien als negative allosterische Modulatoren erwiesen hatten. Bis dato war allerdings noch nicht bekannt, ob sich die allosterischen Modulatoren auch in den FRET-Messungen negativ verhalten würden. Außerdem wurden in den bereits publizierten Experimenten sowohl die Hybridsubstanzen, als auch die allosterischen Bausteine in Anwesenheit von [³H] NMS untersucht. Legt man die Theorie der *probe dependency* zugrunde, so wäre es durchaus möglich, dass die Allosterie in Kombination mit ACh, oder Iperoxo ein anderes Verhalten zeigen könnten. Deshalb wurden in ersten Versuchen die Konzentrations-Wirkungskurven der unterschiedlichen Allosterie in Anwesenheit eines orthosterischen Liganden erstellt. Als orthosterische Liganden wurden der endogene Agonist ACh und Iperoxo als orthosterischer Hybridbaustein gewählt. Im Falle positiver allosterischer Modulatoren würden die durch den orthosterischen Agonisten hervorgerufenen Signale verstärkt werden. Negative allosterische Modulatoren hingegen würden das FRET-Signal der orthosterischen Liganden reduzieren. Die bereits erwähnten Daten ließen vermuten, dass es sich bei den allosterischen Bausteinen um negative Modulatoren handelt. Deswegen wurde die Konzentration von ACh und Iperoxo so gewählt, dass auch kleine, allosterisch-vermittelte Effekte sichtbar wären. Bei nur 50%-iger Rezeptoraktivierung wäre das Messfenster zu klein, um geringe Effekte der allosterischen Modulatoren aufzulösen. Die Konzentrationen von Iperoxo und ACh wurden deshalb so festgelegt, dass die Rezeptorsensoren zu ca. 80% aktiviert werden sollten. In Abbildung 47 werden die Beweggründe für die Konzentrationsauswahl noch einmal grafisch verdeutlicht.

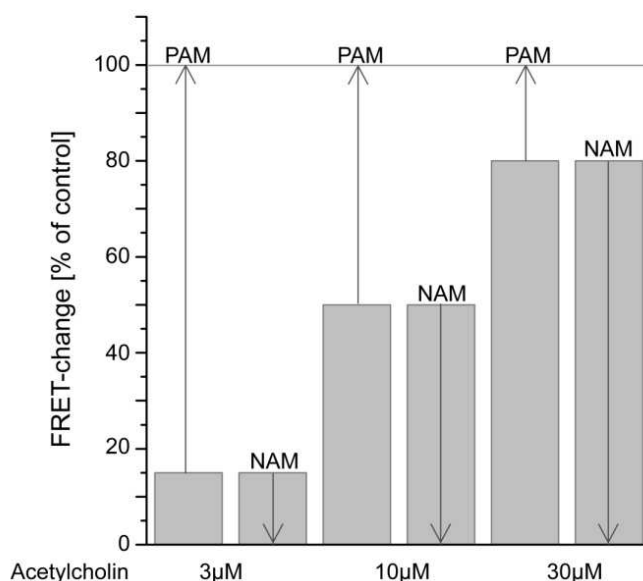


Abb. 47: Überlegungen zur Auswahl einer geeigneten Konzentration orthosterischer Liganden zur Bestimmung konzentrationsabhängiger Wirkungskurven für die allosterischen Testsubstanzen.

Das Säulendiagramm zeigt die prozentuale Rezeptoraktivierung ausgelöst durch unterschiedliche Konzentrationen an ACh. Positiv allosterische Modulatoren (PAM), die das Signal eines orthosterischen Agonisten verstärken, besitzen das größte Detektionsfenster bei einer geringen Konzentration von ACh (3 µM = 15% Rezeptoraktivierung). Negativ allosterische Modulatoren (NAM) hingegen zeigen das größte Messfenster bei hohen Konzentrationen von Acetylcholin (30 µM = 80% Aktivierung).

Abbildung 48 veranschaulicht, welche Konzentration an orthosterischem Ligand theoretisch nötig wäre, um eine Rezeptoraktivierung von ca. 80% zu erreichen. Auf Grund dieser theoretischen Überlegungen wurde für Iperoxo eine Konzentration von 10 μM und für ACh eine Konzentration von 30 μM zur Ermittlung der Konzentrations-Wirkungskurven mittels FRET festgelegt.

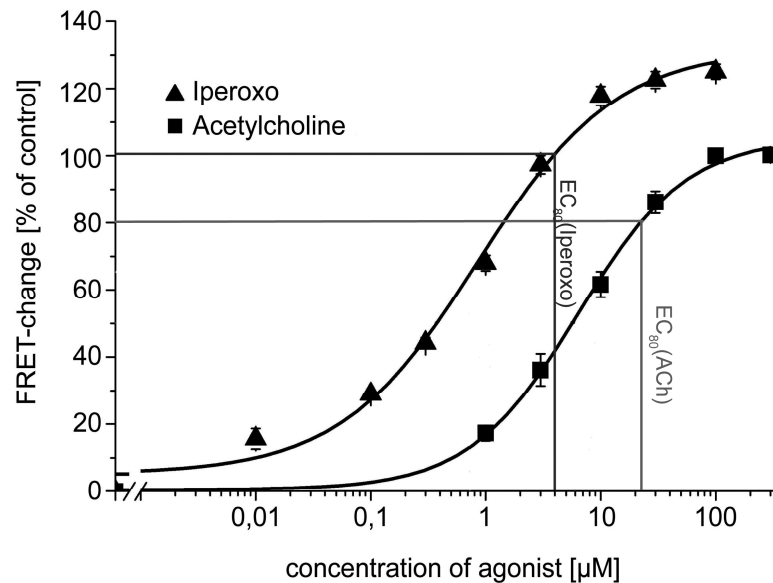


Abb. 48: Konzentrations-Wirkungskurven für Acetylcholin (ACh) und Iperoxo erstellt am M_{2i3}-N Rezeptorsensor.

Mittels FRET-Messungen wurden Konzentrations-Wirkungskurven für ACh (Quadrat) und Iperoxo (Dreieck) am M_{2i3}-N Sensor gemessen. Gezeigt werden die statistisch ermittelten Mittelwerte und Standardfehler. Als 100% Referenzwert diente die Signalthöhe des durch 300 μM ACh induzierten FRET-Signals ($n \geq 15$ Einzelzellen). Es wurden die Konzentrationen ermittelt, die nötig waren, um eine etwa 80%-ige Rezeptoraktivierung zu induzieren.

4.4.2.1.2 Vergleich zweier Messschemata zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungskurven

Zwei verschiedene FRET-Messschemata wurden auf ihre Eignung zur Generierung von Konzentrations-Wirkungskurven der allosterischen Modulatoren untersucht.

Zum einen wurde das sogenannte „Treppenschema“ getestet:

Der Rezeptor wurde mit dem orthosterischen Liganden allein vorstimuliert und anschließend mit einer Lösung aus dem orthosterischen Agonisten und dem allosterischen Modulator superfundiert. Ohne einen zwischengeschalteten Waschschrift wurde der Rezeptor im Anschluss erneut mit einer Kombinationslösung aus orthosterischem und allosterischem Liganden versetzt. Die Konzentration des Orthosters wurde dabei über die gesamte Messung stabil gehalten, während die Konzentration des Allosters mit jeder Rezeptorstimulation schrittweise erhöht wurde.

Zur Auswertung wurden die Basislinien vor und nach Stimulation miteinander verbunden und die Höhe der unterschiedlichen Messsignale ausgemessen. Dazu wurde parallel zur y-Achse eine Gerade von dem Plateau des FRET-Signals zur erweiterten Basislinie gezogen. Die Länge der sich so ergebenden Geraden wurde ausgemessen und als prozentualer Anteil der Signalthöhe bestimmt, die durch den orthosterischen Liganden allein induziert wurde (Abb. 49, Seite 75).

Ergebnisse

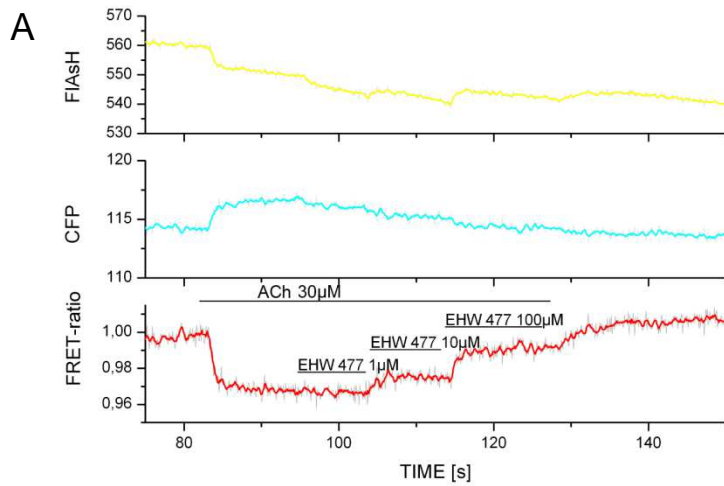
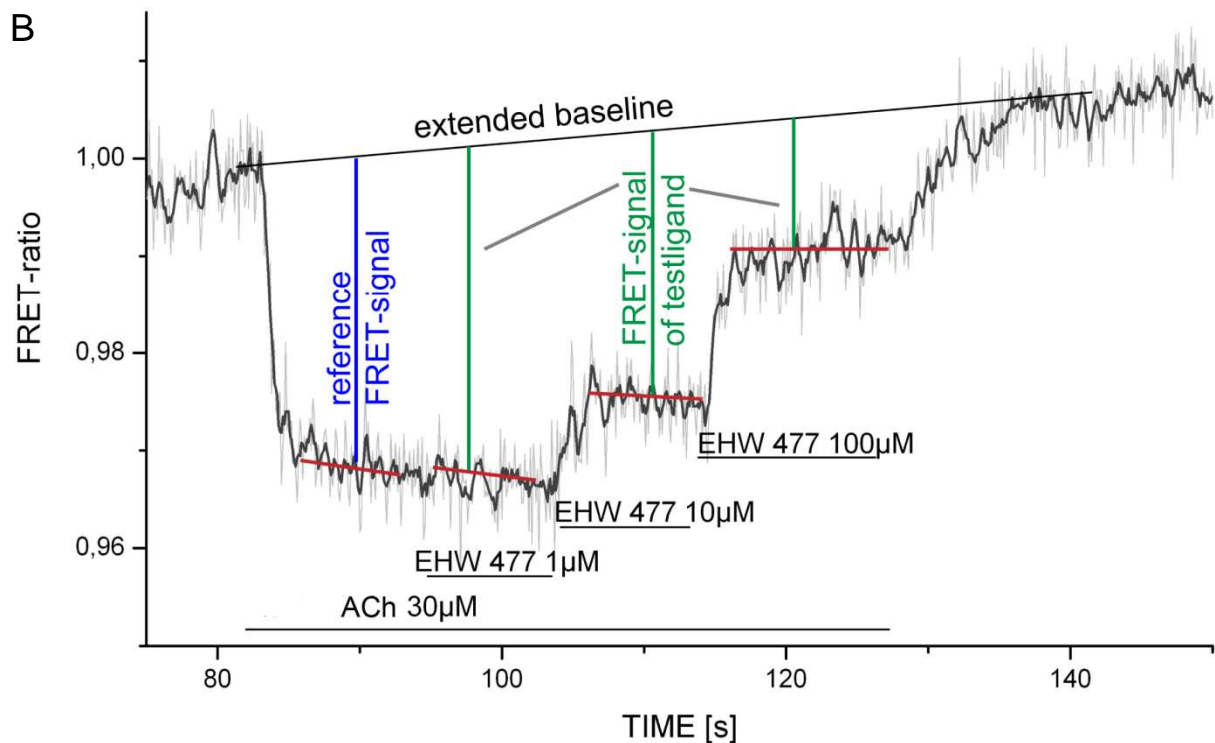


Abb.49: FRET-Messungen der Effekte von EHW 477 in Anwesenheit von ACh (A) und Auswertung der FRET-Signale (B) generiert nach dem Treppenschema am M₂i3-N Rezeptorsensor .

(A) HEK293 Zellen, die das M₂i3-N Rezeptorkonstrukt stabil exprimierten, wurden nach dem Treppenschema mit ACh und dem allosterischen Liganden EHW 477 superfundiert. (B) Bei der Auswertung wurden die Höhen der FRET-Signale (grün) ausgemessen und als Perzentile der Signalhöhe des Referenz-FRET-Signals (blau) berechnet. Die Signalhöhen wurden als Abstand zwischen der verlängerten Basislinie und dem Plateau (rot) der jeweiligen FRET-Antwort ermittelt.



Als alternatives Messschema wurde das „Zahnschema“ untersucht:

Die Rezeptorsensoren wurden zuerst mit orthosterischem Liganden (Referenzlösung) vorstimuliert und anschließend direkt mit einer Lösung, in der Orthoster und Alloster kombiniert vorlagen, überspült. Danach wurden die Rezeptoren nochmals mit der Referenzlösung stimuliert. Nach einem Waschschrift erfolgte die zweite Stimulationsfolge. In dieser wurde die Konzentration des Orthosters konstant gehalten, wogegen die des Allosters schrittweise erhöht wurde. Die Auswertung erfolgte wie im oben beschriebenen Treppenschema.

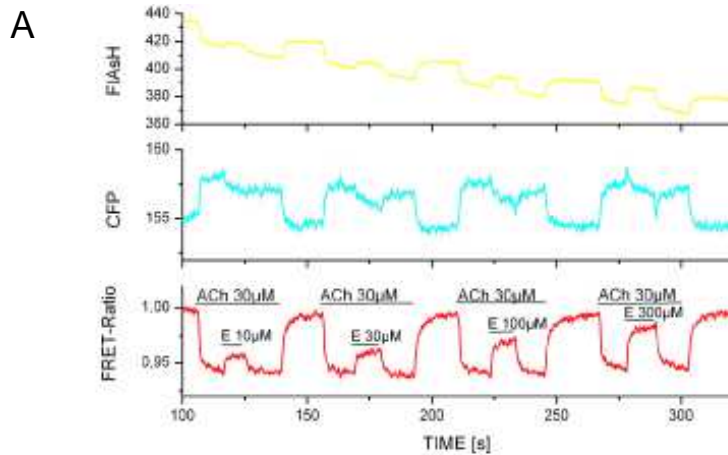
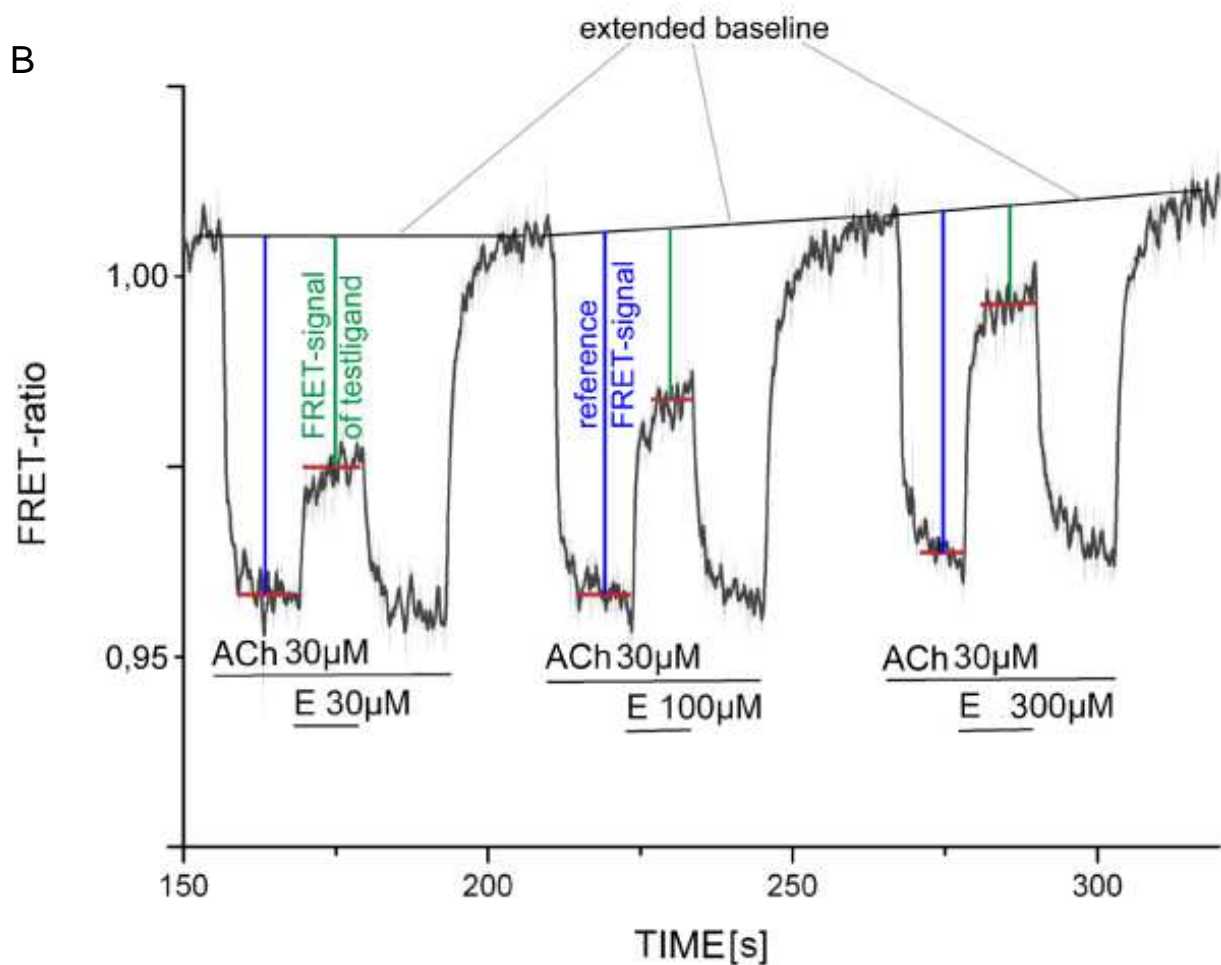


Abb. 50: FRET-Messungen der Effekte von EHW 477 in Anwesenheit von ACh (A) und Auswertung der FRET-Signale (B) generiert am M_{2i3-N} Sensor nach dem Zahnschema.

(A) Stabil das M_{2i3-N} Rezeptorkonstrukt exprimierende HEK293 Zellen wurden in FRET-Messungen nach dem Zahnschema mit ACh und EHW 477 (E) überspült. (B) Zur Auswertung der gemessenen FRET-Signale wurde die Basislinie verlängert und der Abstand zu den jeweiligen Plateaus (rot) ausgemessen.



Stellt man beide Messschemata einander gegenüber, so wird deutlich, dass das Zahnschema im Vergleich zu dem Treppenschema mehrere Vorteile bietet.

So wird im Zahnschema das Anlegen einer erweiterten Basislinie dadurch vereinfacht, dass die Basislinien des FRET-Signals in geringerer Distanz zueinander vorliegen, als im Treppenschema. Der aus dem Photobleichen der Fluorophore resultierende, exponentielle Verlauf der FRET-Spuren kann somit leichter ausgeglichen werden. Da im Zahnschema einer Superfusion mit einer Kombination aus Alloster und Orthoster immer eine Stimulation mit der Referenzlösung vorgeschaltet ist, kann ein potenzieller Verlust des FRET-Signals

durch Rezeptordesensibilisierung einfacher kompensiert werden. Das Zahnschema erlaubt auch die Auswertung der Deaktivierungskinetik (Off-Kinetik) des vorstimulierten Rezeptors nach Zugabe einer Kombination aus Alloster und Orthoster oder Puffer. Zudem ist es möglich, die durch einen orthosterischen Agonisten ausgelöste Reaktivierungskinetik (On-Kinetik) eines Rezeptors nach allosterisch-orthosterischer Hemmung auszuwerten.

4.4.2.2 FRET-Messungen zur Generierung konzentrationsabhängiger Effektkurven

Bisher wurde ein Großteil der allosterischen Liganden in funktionellen Experimenten oder Radioligandenbindungsstudien getestet [220, 345-348]. In FRET-Experimenten sollten sie darüber hinaus bezüglich ihrer Affinität und Potenz in lebenden Zellen untersucht werden.

Die Auswahl der allosterischen Modulatoren erfolgte in Anlehnung an H 1 und H 2 [270]. So stellen JK 289, JK 337, JK 338, $\frac{1}{2}$ W84 und W84 den allosterischen Baustein von H 1 in seiner tatsächlichen (JK 289), leicht modifizierten, oder dimerisierten (W 84) Form dar. Im JK 337 wurde beispielsweise die Linkerkette des JK 289 um eine 3-Amino-N,N-dimethylhexylgruppe und im JK 338 um einen Propylrest verlängert. Das $\frac{1}{2}$ W84 weist zwei zusätzliche Methylgruppen in Position 2 der Linkerkette auf.

Bei dem in H 2 mit Iperoxo verbundenen allosterischen Baustein handelt es sich um Seminaph, EHW 477 stellt das um eine 3-Amino-N,N-dimethylhexyl-Kette verlängerte Seminaph dar. Im JK 519 wurden die beiden Methylgruppen am allosterischen Baustein von H 2 entfernt. Bei der Synthese des Naphmethonium wurden Seminaph und JK 289 aneinander fusioniert.

Die FRET-Messungen zur Generierung der Konzentrations-Effektkurven wurden nach dem Zahnschema durchgeführt. Die stabilen M_{2i}3-N- bzw. M_{2i}3-C-Zellen wurden zuerst mit dem orthosterischen Agonist (10 μ M Iperoxo, oder 30 μ M ACh) vorstimuliert und direkt im Anschluss mit einer Kombination aus 10 μ M Iperoxo bzw. 30 μ M ACh und allosterischem Liganden überspült. Die Konzentration des allosterischen Liganden wurde schrittweise erhöht, während die der orthosterischen Agonisten konstant gehalten wurde. Nach einer anschließenden Stimulation mit orthosterischem Liganden allein, wurde der Ligand durch Superfundieren der Zellen mit Messpuffer ausgewaschen. Die Höhen der durch Stimulation mit der orthosterischen-allosterischen Ligandenkombination hervorgerufenen FRET-Signale wurden bestimmt und als prozentualer Anteil des Referenzsignals berechnet. Durch grafische Darstellung der prozentualen Effekte der verschiedenen allosterischen Testsubstanzen in Abhängigkeit von der Konzentration des allosterischen Liganden wurden die Konzentrations-Wirkungskurven ermittelt.

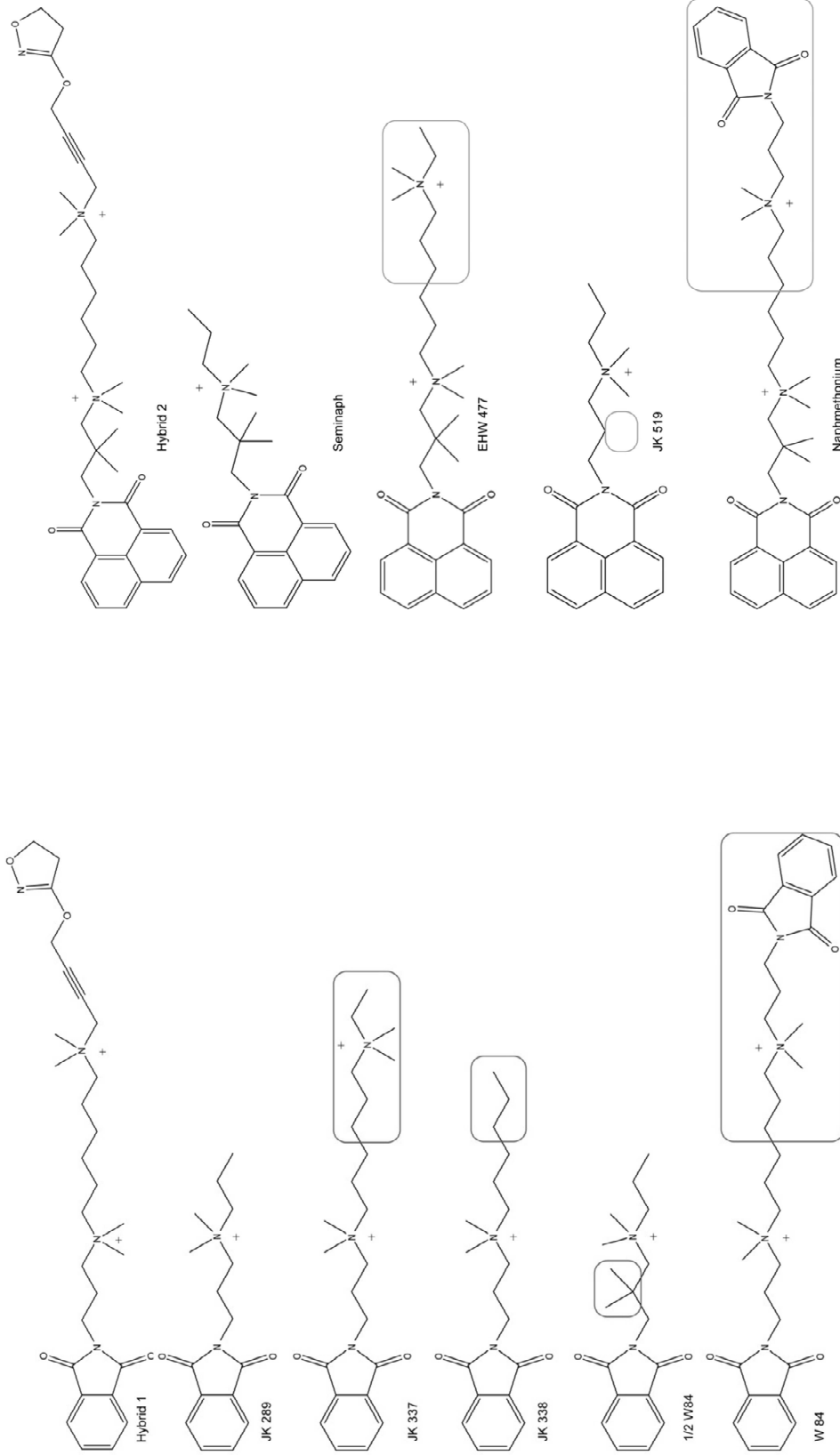


Abb. 51: Strukturformeln von H 1 und den daraus abgeleiteten allosterischen Modulatoren.

Bei JK 289 handelt es sich um den tatsächlichen allosteren Anteil von H 1, wohingegen in den anderen allosterischen Liganden, die H 1 nachempfunden waren, chemische Veränderungen vorgenommen wurden. Die in den jeweiligen Substanzen abgewandelten Elemente sind grau umrandet.

Abb. 52: Chemische Struktur von H 2 und den daraus entwickelten allosterischen Modulatoren.

Seminaph stellt den eigentlichen allosterischen Teil von H 2 dar, während es sich bei den anderen Allosteren um aus H 2 abgeleitete Derivate des Seminaph handelt. Die in der Synthese in die jeweiligen Liganden eingeführten Modifikationen sind grau umrandet.

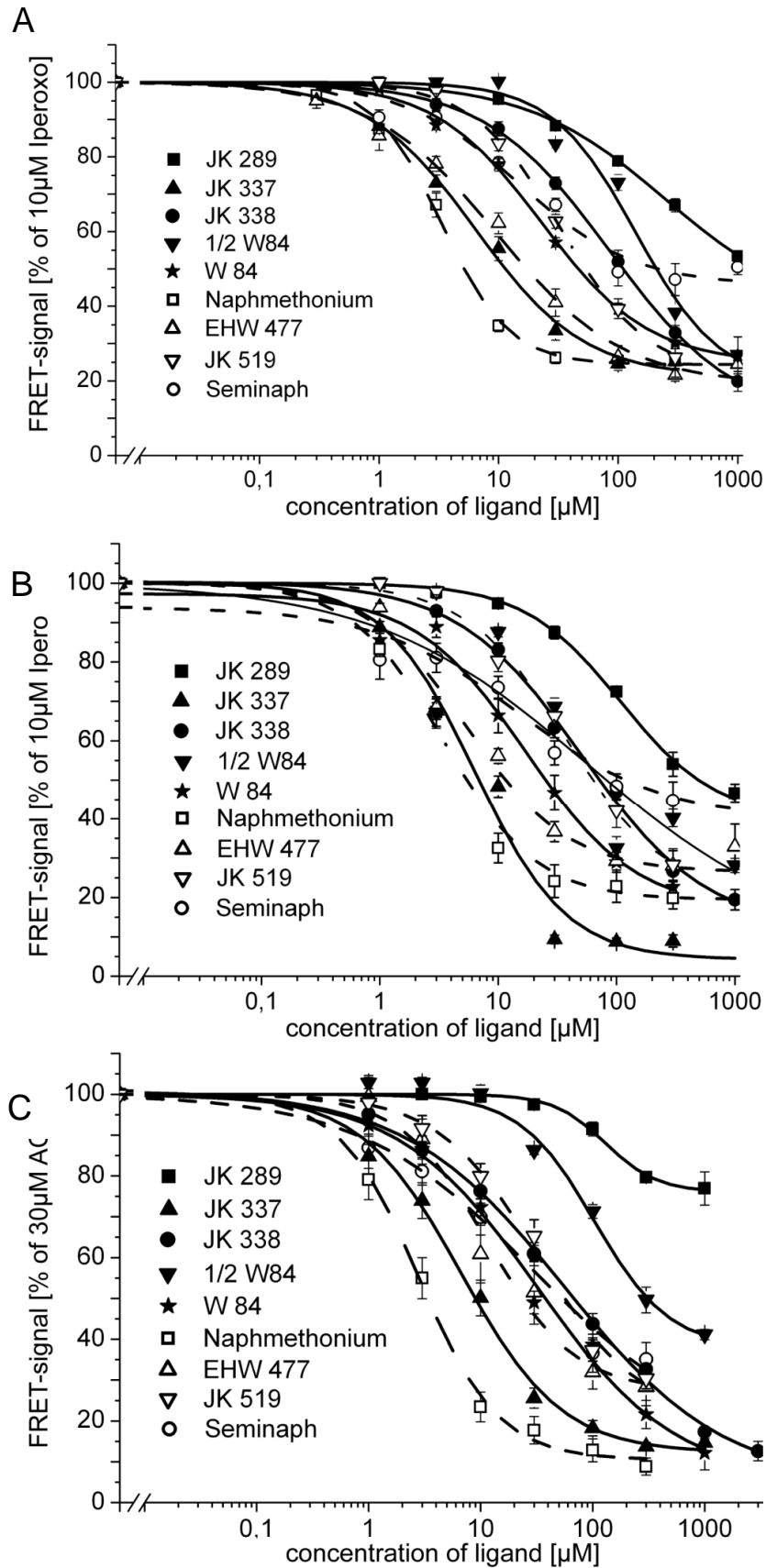


Abb. 53: Konzentrations-Wirkungskurven zur Ermittlung der Hemmwirkung der allosteren Liganden auf einen mit Iperoxo (A und B), oder ACh (C) vorstimulierten Rezeptor, ermittelt am M_{2i3} -N- (A und C) bzw. M_{2i3} -C Rezeptor (B). Die mittels FRET-Messungen ermittelten Konzentrations-Wirkungskurven der allosterischen Liganden zeigten unabhängig von Rezeptorsensor, bzw. orthosterischem Liganden eine konzentrationsabhängige Hemmung des durch Agoniststimulation hervorgerufenen FRET-Signals. Gezeigt werden die statistisch ermittelten Mittelwerte und Standardfehler aus $n \geq 12$ Einzelerperimenten.

4.4.2.2.1 Vergleich der EC_{50} -Werte allosterischer Modulatoren in Abhängigkeit des eingesetzten orthosterischen Liganden

Beim Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven, die am M_2i3 -N Sensor mit Iperoxo bzw. ACh erstellt wurden (Abb. 53, A und C, Seite 79) fällt auf, dass JK 289 und JK 338 die ACh-vermittelte Rezeptoraktivierung in geringeren Konzentrationen inhibierten, als die Iperoxo-vermittelte. JK 337, $\frac{1}{2}$ W84, W 84, Seminaph, EHW 477, JK 519 und Naphmethonium hingegen wiesen unabhängig vom getesteten orthosterischen Liganden vergleichbare EC_{50} -Werte auf (Tab. 4).

Tab. 4: EC_{50} -Werte für das Ausmaß, in dem die allosterischen Modulatoren den mit ACh oder Iperoxo stimulierten M_2i3 -N Rezeptorsensor inhibierten.

Die aus den FRET-Messungen ermittelten EC_{50} -Werte der allosterischen Modulatoren wurden abhängig vom eingesetzten orthosterischen Ligand zusammengefasst ($n \geq 12$).

allosterischer Ligand	Nummer	M_2i3 -N Rezeptorsensor	
		Acetylcholin	Iperoxo
JK 289	20	$130,2 \pm 10,9 \mu\text{M}$	$218 \pm 11,1 \mu\text{M}$
JK 337	21	$7,1 \pm 0,9 \mu\text{M}$	$6,5 \pm 1,1 \mu\text{M}$
JK 338	22	$37,8 \pm 2,2 \mu\text{M}$	$85,6 \pm 4,4 \mu\text{M}$
$\frac{1}{2}$ W84	23	$103,8 \pm 20,2 \mu\text{M}$	$141,2 \pm 36,9 \mu\text{M}$
W84	24	$25,3 \pm 8,8 \mu\text{M}$	$23,5 \pm 3,5 \mu\text{M}$
Seminaph	25	$29,3 \pm 8,3 \mu\text{M}$	$17,1 \pm 5,3 \mu\text{M}$
EHW 477	26	$11,6 \pm 2,8 \mu\text{M}$	$11,8 \pm 1,3 \mu\text{M}$
JK 519	27	$32,7 \pm 7,5 \mu\text{M}$	$33,2 \pm 3,1 \mu\text{M}$
Naphmethonium	28	$2,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$	$3,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$

Trägt man die am M_2i3 -N Rezeptorsensor gemessenen EC_{50} -Werte der allosterischen Liganden abhängig von ACh und Iperoxo gegeneinander auf, ergibt sich folgende Abbildung:

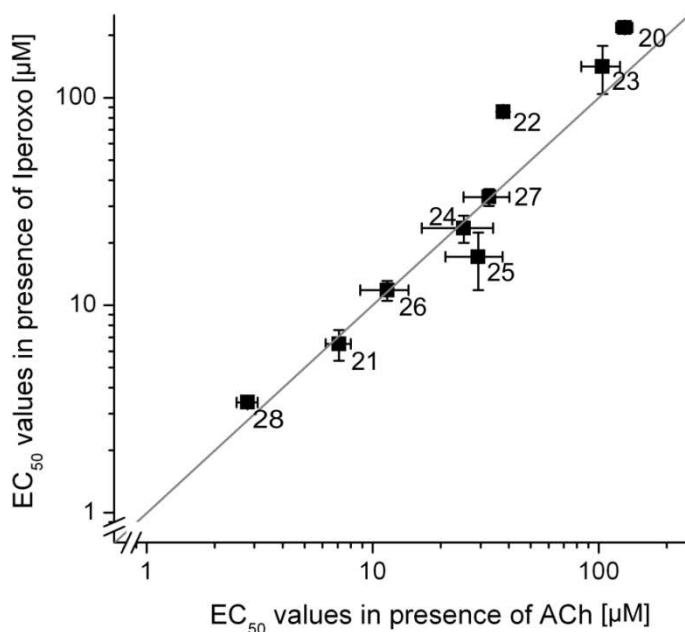


Abb. 54: Vergleich der EC_{50} -Werte für die Hemmungswirkung der allosterischen Modulatoren auf den mit Acetylcholin (ACh), oder Iperoxo vorstimulierten M_2i3 -N Rezeptor.

Mittelwert und Standardfehler der EC_{50} -Werte der allosterischen Modulatoren wurden gegeneinander aufgetragen. Die Nummerierung der Substanzen entspricht der in Tabelle 4. Die Kombinationen aus Iperoxo mit JK 289 (20) und JK 338 (22) wichen bei dieser Darstellung von der Winkelhalbierenden zwischen x- und y-Achse ab ($n \geq 12$).

4.4.2.2 Vergleich der EC₅₀-Werte allosterischer Modulatoren abhängig von den verwendeten Rezeptorsensoren

Der Vergleich der EC₅₀-Werte der verschiedenen allosterischen Modulatoren nach Rezeptorstimulation mit Iperoxo ergab, dass JK 289, JK 338, ½ W84 und EHW 477 die Iperoxo-induzierte Aktivierung des M₂i3-C Rezeptorsensors in geringeren Konzentrationen inhibierten, als die des M₂i3-N Sensors. JK 337, W 84, Seminaph, JK 519 und Naphmethonium hemmten beide Rezeptorkonstrukte im jeweils gleichen Ausmaß.

Tab. 5: EC₅₀-Werte der allosterischen Modulatoren für deren Hemmwirkung auf den mit Iperoxo vorstimulierten M₂i3-N bzw. M₃i3-C Rezeptorsensor.

Den mit Hilfe von FRET-Messungen ermittelten Konzentrations-Wirkungskurven der allosterischen Modulatoren wurden die EC₅₀-Werte entnommen und selektiv für den transfizierten Rezeptorsensor zusammengefasst (n = 15).

allosterischer Ligand	Nummer	Iperoxo	
		M ₂ i3-N	M ₂ i3-C
JK 289	20	218 ± 11,1 µM	107,7 ± 4,5 µM
JK 337	21	6,5 ± 1,1 µM	6,3 ± 1,5 µM
JK 338	22	85,6 ± 4,4 µM	51,3 ± 10,0 µM
½ W84	23	141,2 ± 36,9 µM	56,9 ± 20,0 µM
W84	24	23,5 ± 3,5 µM	17,2 ± 6,1 µM
Seminaph	25	17,1 ± 5,3 µM	15,4 ± 3,6 µM
EHW 477	26	11,8 ± 1,3 µM	5,5 ± 1,2 µM
JK 519	27	33,2 ± 3,1 µM	38,5 ± 9,1 µM
Naphmethonium	28	3,4 ± 0,2 µM	3,5 ± 1,7 µM

Die Unterschiede der EC₅₀-Werte der allosterischen Substanzen kombiniert mit 10 µM Iperoxo werden, in Abhängigkeit von dem jeweiligen Rezeptorsensor, in Abbildung 55 nochmals verdeutlicht

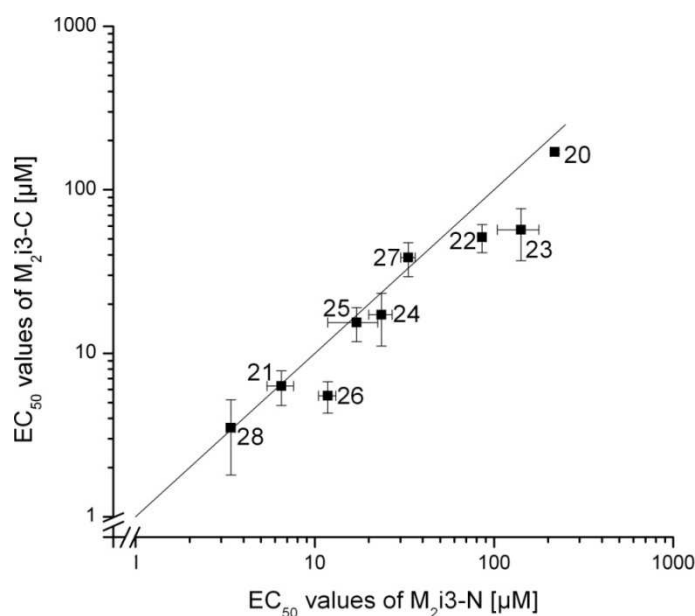


Abb. 55: Vergleich der halbmaximalen Hemmwirkung der allosterischen Modulatoren am mit Iperoxo stimulierten M₂i3-N- und M₂i3-C Sensor.

Die aus den Konzentrations-Wirkungskurven der allosterischen Liganden erhaltenen EC₅₀-Werte für M₂i3-N und M₂i3-C wurden als Mittelwert mit Standardfehler aus n = 15 Experimenten gegeneinander aufgetragen. Nur die Kombinationen aus Iperoxo mit JK 289 (20), ½ W84 (23), JK 338 (22) und EHW 477 (26) wichen bei dieser Darstellung von der Winkelhalbierenden zwischen x- und y-Achse ab.

4.4.3 Charakterisierung von Atropin

Um zu zeigen, dass eine totale Inhibition einer durch 30 μM ACh, beziehungsweise 10 μM Iperoxo hervorgerufenen Rezeptoraktivierung möglich war, wurde mittels FRET-Messungen eine Atropin-Hemmkurve erstellt. Stabil den M_2 i3-C Rezeptorsensor exprimierende HEK293 Zellen wurden nach dem Zahnschema mit 10 μM Iperoxo und einer Kombination aus Iperoxo und Atropin untersucht. Iperoxo wurde ACh vorgezogen, weil es eine stärkere Rezeptoraktivierung induzierte. Die Signalhöhen der FRET-Antworten wurden bestimmt, als Perzentile der Iperoxo-induzierten FRET-Antwort berechnet und abhängig von der eingesetzten Atropin-Konzentration als Konzentrations-Wirkungskurve dargestellt.

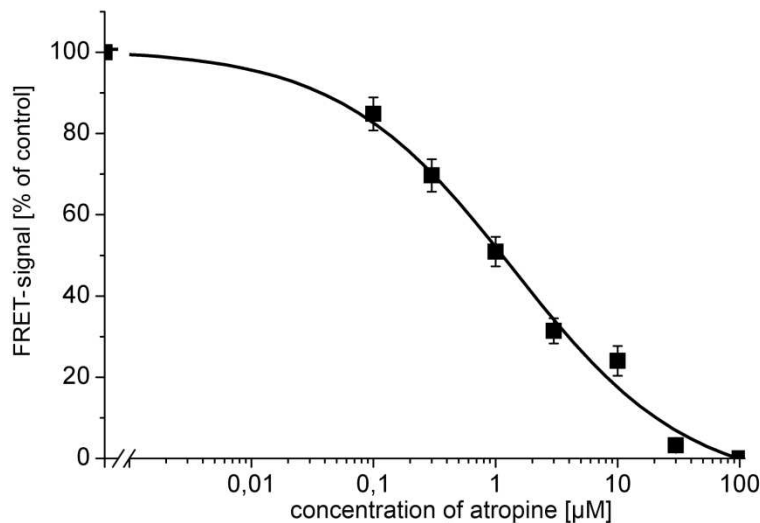


Abb. 56: Konzentrations-Wirkungskurve von Atropin in Gegenwart von 10 μM Iperoxo.

Atropin zeigte eine konzentrationsabhängige Hemmung des durch 10 μM Iperoxo hervorgerufenen FRET-Signals. Bei Atropin-Konzentrationen von ≥ 100 μM war eine vollständige Inhibition der Rezeptoraktivierung zu beobachten. Aufgetragen sind Mittelwerte und Standardfehler aus $n \geq 9$ Messungen.

Es konnte gezeigt werden, dass Atropin ab einer Konzentration von ≥ 100 μM eine durch einen Vollagonisten induzierte Rezeptorantwort vollständig blockieren konnte.

4.4.4 Bestimmung der Deaktivierungskinetik des muskarinischen M_2 Acetylcholinrezeptors mit verschiedenen orthosterischen und allosterischen Liganden

Eine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Allosteren und Orthosteren besteht in der Analyse der Geschwindigkeit der Deaktivierung eines aktivierten Rezeptors (Deaktivierungs-/ Off-Kinetik), die durch Superfusion mit einem Antagonisten oder einem negativen allosterischen Modulator ausgelöst wird. Wie bereits durch frühere Studien belegt wurde [337], erfolgt die Deaktivierung eines aktivierten Rezeptors durch Competition eines orthosterischen Antagonisten mit einem Agonisten langsamer als durch einen allosterischen Modulator.

Die Messwerte zur Ermittlung der Deaktivierungskinetiken wurden den FRET-Experimenten entnommen, die zur Erstellung der Konzentrations-Effektcurven der allosterischen Modulatoren bzw. von Atropin durchgeführt wurden. Zur Auswertung wurden nur diejenigen Werte verwendet, die mit sättigenden Konzentrationen an Atropin (100 μM) oder negativem allosterischen Modulator (300 bzw. 1000 μM) in Anwesenheit von 10 μM Iperoxo gemessen worden waren. In die Analyse wurden nur die am M_2 i3-C Rezeptor durchgeführten Messungen einbezogen, da diese ein geringeres Rauschen zeigten. Durch die bessere Qualität der Messsignale wurde die Festlegung der Messpunkte erleichtert.

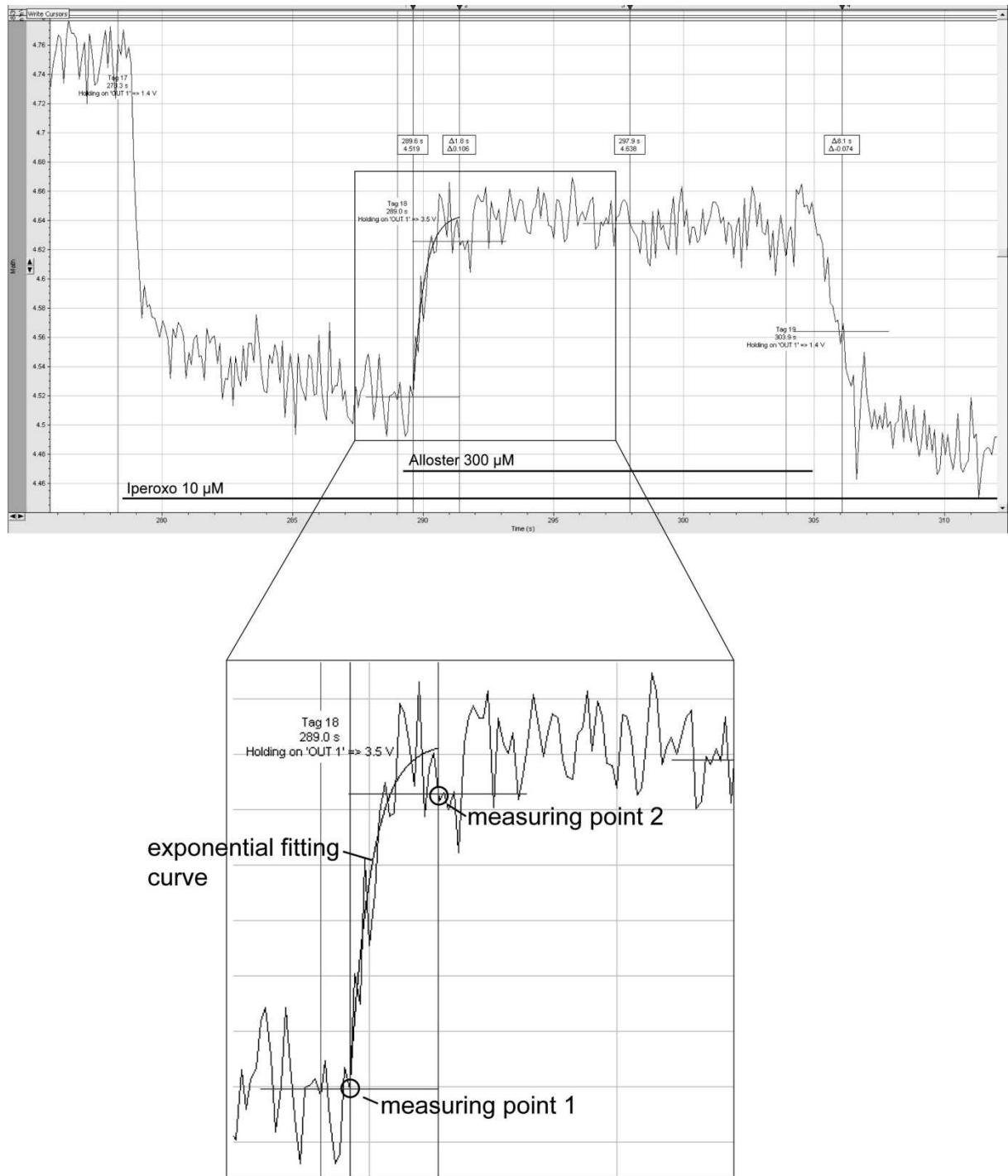


Abb. 57: Beispiel einer Auswertung zur Ermittlung der Deaktivierungskinetik des M₂i3-C Sensors.

Es wurden zwei Messpunkte (measuring point 1 und 2) im FRET-Ratio definiert. Messpunkt 1 wurde in das aufsteigende FRET-Signal oberhalb des Rauschens gelegt. Messpunkt 2 wurde im Plateau der FRET-Antwort definiert. Beide Messpunkte wurden durch einen exponentiellen Fit miteinander verbunden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Clampfit-Software.

Abbildung 57 verdeutlicht das Vorgehen, das bei der Bestimmung der Deaktivierungsgeschwindigkeit verschiedener Liganden angewandt wurde. Es wurden zwei Messpunkte in der Spur des FRET-Ratio festgelegt. Messpunkt 1 wurde so gelegt, dass er auf dem aufsteigenden Ast des FRET-Signals, möglichst direkt nach erfolgter Alloster-Zugabe zu liegen kam. Dabei musste beachtet werden, dass der Messpunkt sich bereits leicht aus dem Rauschen abgehoben haben musste. Der zweite Messpunkt wurde in das Signal-Plateau gelegt,

das sich durch die Superfusion des Rezeptors mit der Kombination aus Alloster bzw. Atropin und Iperoxo neu eingestellt hatte. Beide Messpunkte wurden mit Hilfe der Clampfit-Software durch eine exponentielle Standardfunktion gefittet. Die Deaktivierungsgeschwindigkeit der verschiedenen Liganden konnte als τ -Wert abgelesen werden.

Die τ -Werte wurden ligandenabhängig statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt.

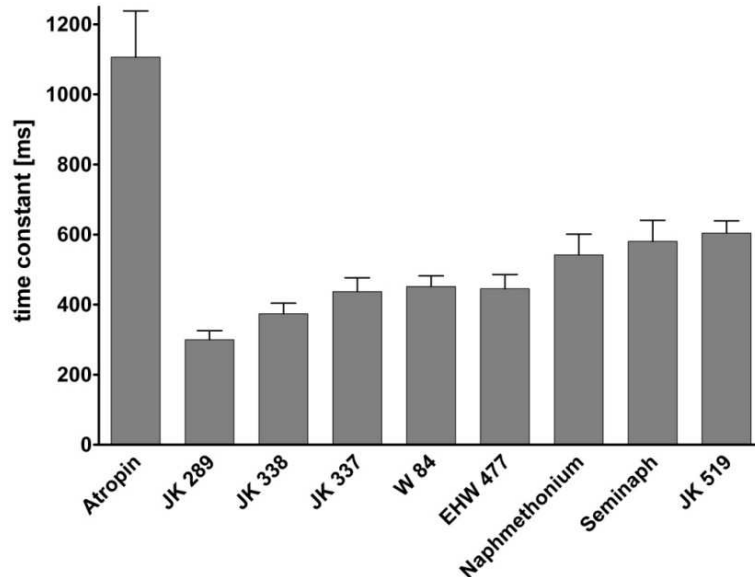


Abb. 58: Liganden-spezifische Off-Kinetik des M_2i3 -C Sensors.

Die τ -Werte aus $n \geq 9$ Versuchen wurden statistisch analysiert und als Mittelwert mit zugehörigen Standardfehlern ligandenabhängig in einer Säulengrafik aufgetragen. Alle allosterischen Liganden zeigten eine schnellere Deaktivierungskinetik als Atropin.

Alle allosterischen Liganden deaktivierten den M_2i3 -C Rezeptorsensor mit einer schnelleren Kinetik, als Atropin (1110 ± 130 ms). Die schnellste Deaktivierung war mit dem allosterischen Modulator JK 289 (300 ± 30 ms) zu beobachten.

4.5. Ligandenselektive Änderung der Rezeptorkonformation

4.5.1 Einfluss orthosterischer Liganden

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob orthosterische Liganden die Konformation des M_2 AChR anders als der endogene Ligand ACh beeinflussen.

Die dazu nötigen Experimente erfolgten mit Hilfe der FRET-Mikroskopie. Dazu wurden HEK293 Zellen, die stabil das M_2i3 -N oder das M_2i3 -C Rezeptorkonstrukt exprimierten mit verschiedenen orthosterischen Liganden in sättigender Konzentration ($100 \mu\text{M}$) stimuliert. Um einen direkten Vergleich mit dem endogenen Liganden zu ermöglichen, wurde die zu untersuchende Zelle zu Beginn jeder Messung mit $100 \mu\text{M}$ ACh superfundiert. Ein möglicher Signalverlust durch Rezeptordesensibilisierung wurde dadurch ausgeglichen, dass vor jeder Stimulation mit einem orthosterischen Testliganden eine Aktivierung des Rezeptorsensors mit $100 \mu\text{M}$ ACh erfolgte. Daraus ergab sich folgendes Messschema:

Ergebnisse

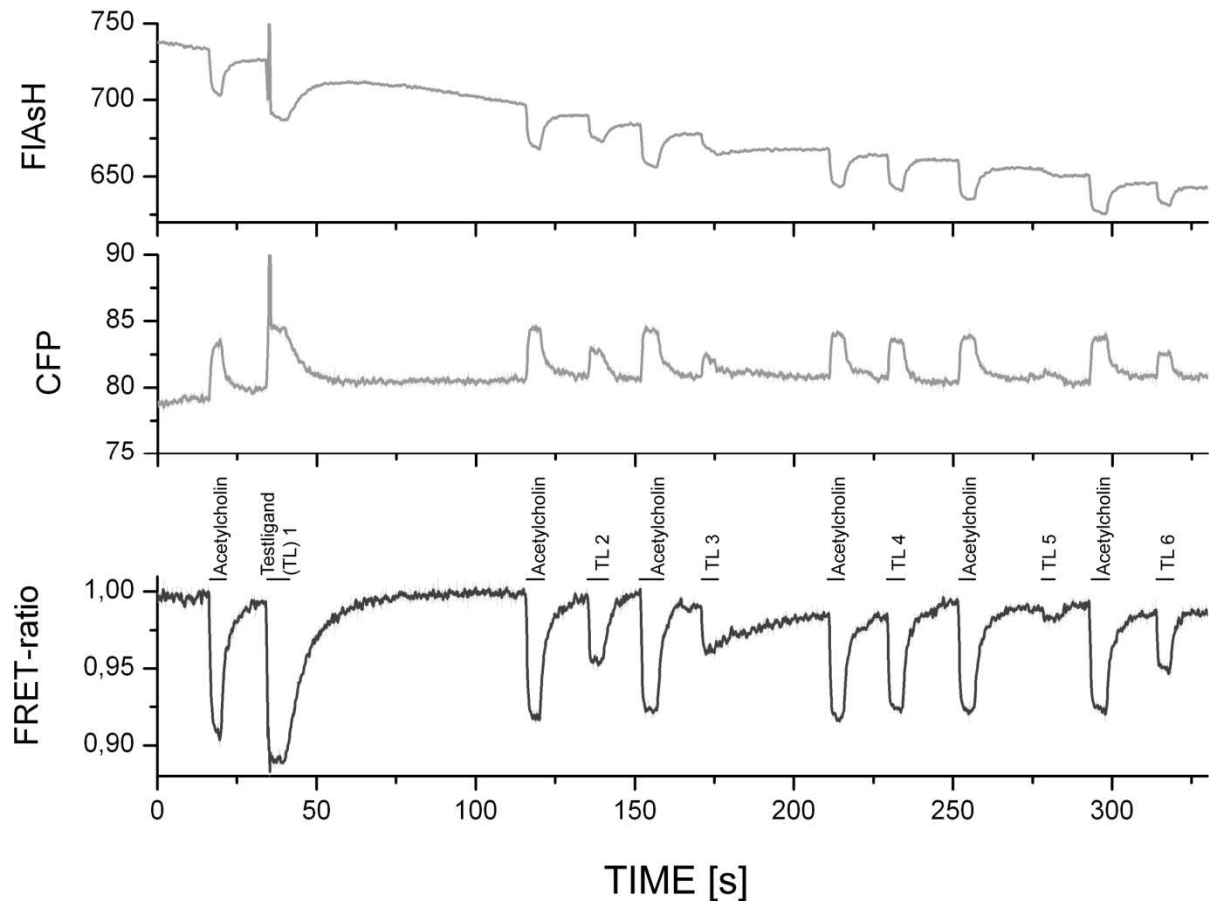


Abb. 59: Veranschaulichung des Messschemas zur Ermittlung selektiver Änderung der Rezeptorkonformation durch orthosterische Liganden.

Stabile $M_{2i}3$ -N, oder $M_{2i}3$ -C-Zellen wurden in FRET-Messungen mit Testliganden (TL) in sättigenden Konzentrationen ($100 \mu\text{M}$) überspült. Um eine Vergleichbarkeit der FRET-Signale untereinander zu gewährleisten und den Einfluss von Rezeptordesensibilisierung auszuschließen, wurde vor jeder Zugabe von Testligand eine Stimulation mit ACh ($100 \mu\text{M}$) durchgeführt.

Die Zugabe von Agonist führte zu einer Abnahme der FIAsH-Fluoreszenz und Zunahme der CFP-Fluoreszenz. Daraus resultierend nahm das FRET-Ratio ab.

Dies könnte gleichbedeutend mit einer Entfernung der beiden Fluorophore voneinander sein. Da so weniger Energie vom Donor CFP strahlungslos auf den Akzeptor FIAsH übertragen werden kann, nimmt auch die Fluoreszenz des Akzeptors ab, da dieser nicht mehr ausreichend aktiviert wird. Dagegen wird die Energie, die vorher strahlungslos auf den Akzeptor übertragen wurde nun als Fluoreszenzenergie des Donors frei, die Donoremission nimmt folglich zu.

Abbildung 60 stellt beispielhaft ein FRET-Experiment durchgeführt am M_2i3 -N- bzw. M_2i3 -C Rezeptorkonstrukt dar.

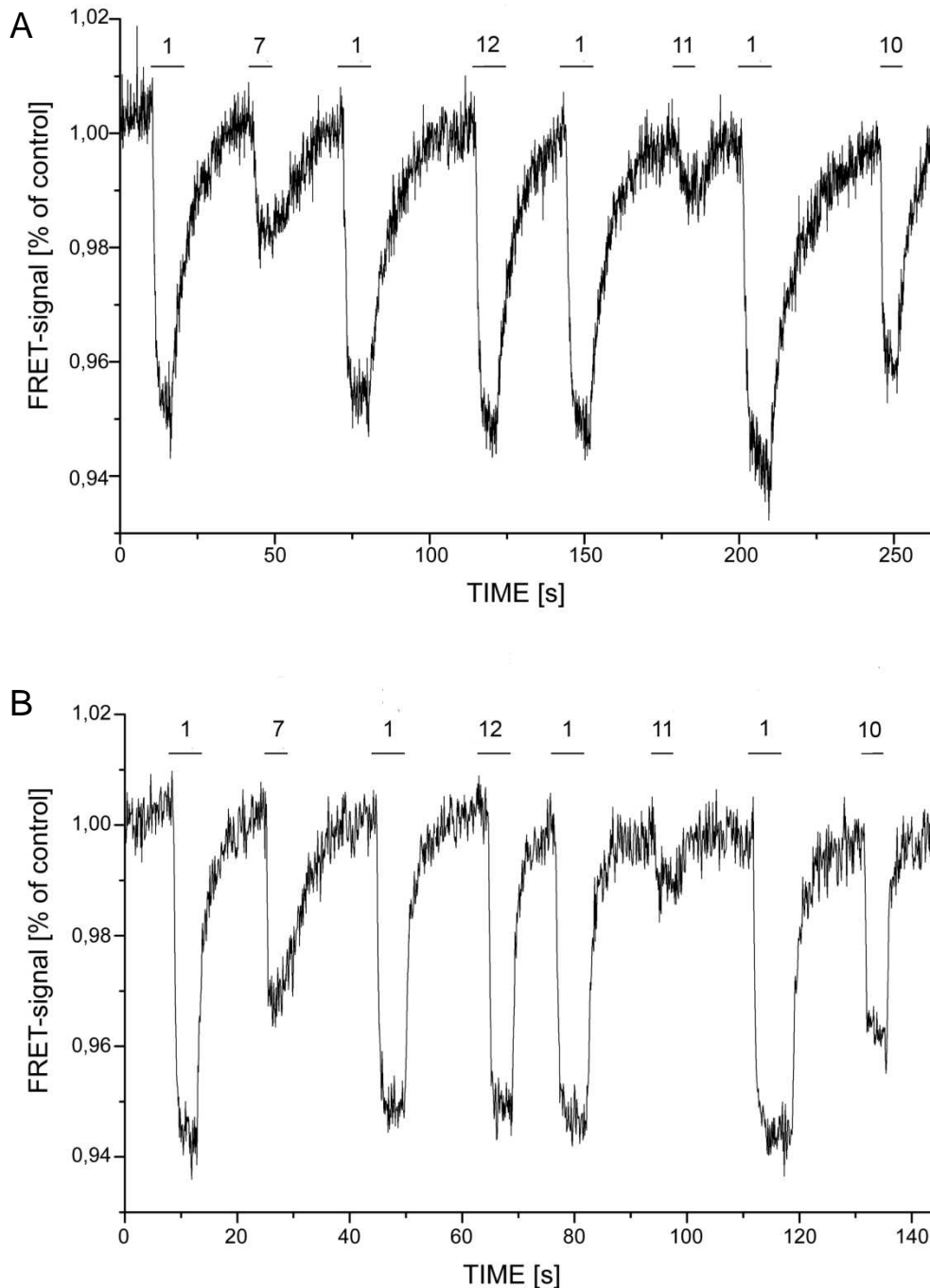


Abb. 60: Beispiele von FRET-Experimenten zur Ermittlung der Maximaleffekte der orthosterischen Liganden durchgeführt am M_2i3 -N- (A), oder M_2i3 -C Rezeptorsensor (B).

Zur Untersuchung ligandenspezifischer Beeinflussung der Rezeptorkonformation wurden HEK293 Zellen, die stabil das M_2i3 -N-, oder das M_2i3 -C Konstrukt exprimierten mit unterschiedlichen, orthosterischen Liganden (Konzentration = 100 μ M) superfundiert. Als Referenz diente eine Stimulation mit 100 μ M ACh. Sowohl der M_2i3 -N-, als auch der M_2i3 -C Sensor zeigten abhängig vom eingesetzten Liganden unterschiedlich große Änderungen des FRET-Ratio. Die FRET-Antworten waren für den jeweiligen Liganden in beiden Rezeptorsensoren miteinander vergleichbar. Die FRET-Spuren wurden um Falschanregung, Durchbluten und Akzeptorbleichen korrigiert, normalisiert und als Funktion der Zeit dargestellt (Nummerierung entspricht Tabelle 6, Seite 88).

Bei den untersuchten Liganden handelte es sich um bekannte und gut charakterisierte Agonisten, Partialagonisten, inverse Agonisten und Antagonisten der mAChR [343]. Iperoxo wurde als orthosterischer Baustein von H 1 und H 2 in diese Versuche mit einbezogen. Die Signalhöhen der durch Rezeptorstimulation induzierten FRET-Signale wurden ligandenspezifisch ausgewertet und auf das ACh-Signal bezogen. Die prozentuale, gemittelte Rezeptoraktivierung wurde abhängig vom jeweilig verwendeten Liganden als Säulendiagramm dargestellt.

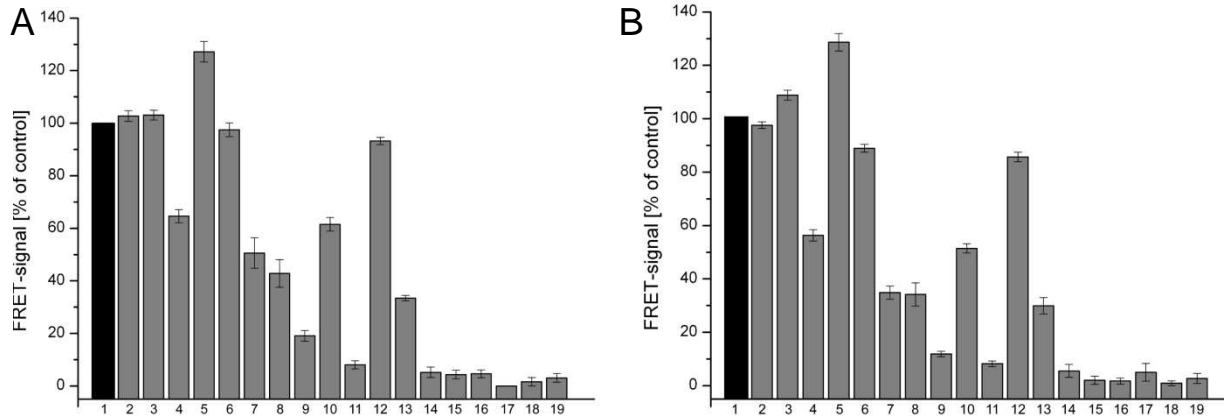


Abb. 61: Ligandenspezifische, prozentuale Rezeptoraktivierung des M₂i3-N- (A), bzw. des M₂i3-C Rezeptorsensors (B).

Die aus den FRET-Messungen errechneten Signalamplituden wurden ligandenselektiv als Prozent der Rezeptoraktivierung nach Stimulation mit 100 μ M ACh (schwarz markiert) berechnet. Die statistisch ermittelten Mittelwerte aus $n \geq 15$ Experimenten wurden mit den zugehörigen Standardfehlern (S.E.) in einer Säulengrafik ligandenbezogen aufgetragen. Die Nummerierung der verwendeten Substanzen entspricht hierbei derjenigen in Tabelle 6 (Seite 88).

Die berechneten Mittelwerte, sowie der Standardfehler werden in nachfolgender Tabelle nochmals spezifisch für das zur Messung verwendete Rezeptorkonstrukt aufgelistet.

Tab. 6: Maximale Rezeptoraktivierung des M₂i3-N- und des M₂i3-C Konstrukts.

Die FRET-mikroskopisch ermittelte, maximale Rezeptoraktivierung wurde als Mittelwert mit Standardfehler (S.E.) abhängig von der getesteten Substanz für das jeweilige Konstrukt angegeben (n ≥ 15).

Substanz	Nummer	M ₂ i3-N		M ₂ i3-C	
		Mittelwert [%]	S.E.	Mittelwert [%]	S.E.
Acetylcholin (ACh)	1	100	0	100	0
Carbachol	2	102,7	2,0	97,6	1,2
OxotremorinM	3	103,1	1,9	108,8	1,8
Oxotremorin	4	64,6	2,5	56,3	2,1
Iperoxo (Iper)	5	127,2	3,9	128,7	3,2
Muskarin	6	97,4	2,6	88,9	1,5
Arecaidin-2-ynylester Tosylat	7	50,6	5,7	34,8	2,5
Arecolin	8	42,8	5,2	34,2	4,3
Pilocarpin	9	19,1	2,0	11,9	0,9
5-Methylfurmethiodid	10	61,5	2,6	51,4	1,7
Acetylthiocholin	11	8,0	1,5	8,2	1,1
Acetyl-β-methylcholin	12	93,2	1,4	85,7	1,8
Carbamyl-β-methylcholin	13	33,4	1,0	29,9	3,1
McN-A 343	14	5,2	2,0	5,5	2,4
Ipratropium	15	4,3	1,7	0	0
Telenzepin	16	4,6	1,5	0	0
Pirenzepin	17	0	0	5,0	3,3
Atropin	18	1,6	1,6	0,9	0,2
Scopolamin	19	3,1	1,6	2,7	1,8

Mit Hilfe dieser Tabelle ist auch eine Unterscheidung der getesteten Liganden bezüglich ihrer Effizienz möglich. So aktivierten Carbachol, OxotremorinM, Muskarin und Acetyl-β-methylcholin den M₂ AChR in einem ähnlichen Ausmaß wie ACh. Dagegen wurde der M₂ AChR durch Oxotremorin, Arecaidin und 5-Methylfurmethiodid nur noch zu ca. 50% im Vergleich zu ACh aktiviert. Arecolin und Carbamyl-β-methylcholin waren in der Lage eine noch 30-40%-ige Rezeptoraktivierung hervorzurufen. Pilocarpin, Acetylthiocholin, McN-A 343, Ipratropium, Telenzepin, Pirenzepin, Atropin und Scopolamin induzierten eine Rezeptoraktivierung von ≤ 20%. Wie bereits in den Konzentrations-Wirkungskurven gezeigt, (Abb. 46, Seite 72) aktivierte Iperoxo beide Sensoren um ≥ 125% im Vergleich zu ACh.

Die maximalen Rezeptoraktivierungen, die mit jedem getesteten, orthosterischen Liganden erreicht wurden, wurden abhängig von dem bei der Messung verwendeten Rezeptorsensor

miteinander korreliert. So sollte verdeutlicht werden, ob zwischen den Substanzen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Rezeptorstimulation bzw. zur Induktion verschiedener Rezeptorkonformationen ein Zusammenhang bestand.

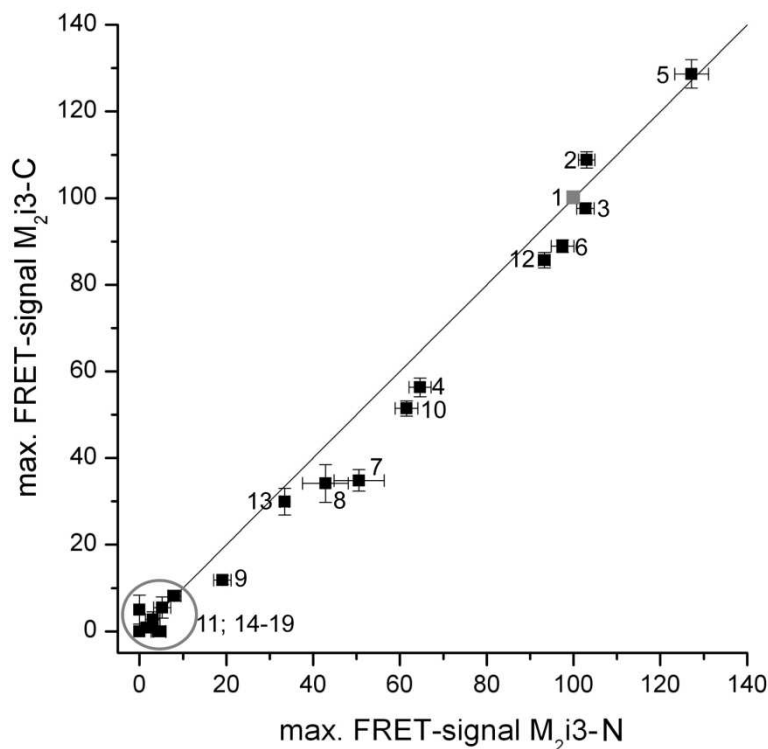


Abb. 62: Vergleich der maximalen, ligandenspezifischen Aktivierung des M₂i3-N- und des M₂i3-C Rezeptorsensors.

Die berechneten Mittelwerte und Standardfehler, der ligandenselektiv hervorgerufenen Rezeptoraktivierung wurde für das M₂i3-N- und das M₂i3-C Rezeptorkonstrukt gegeneinander aufgetragen. Hierbei wurde angenommen, dass die Stimulation mit ACh beide Sensoren zu 100% aktivierte (ACh: graues Quadrat). Alle getesteten Substanzen liegen auf der Winkelhalbierenden zwischen der x- und der y-Achse ($n \geq 15$, Nummerierung entspricht Tab. 6, Seite 88).

Wie in Abbildung 62 zu sehen, liegen alle getesteten, orthosterischen Liganden auf der Winkelhalbierenden zwischen beiden Achsen. Dies deutet darauf hin, dass im Vergleich mit ACh jedes getestete Orthoster beide Rezeptorsensoren in etwa im gleichen Ausmaß aktivierte.

4.5.2 Selektive Konformationsänderung durch allosterische Liganden

Um auf eine ligandenselektive Änderung der Rezeptorkonformation des M₂AChR durch Allosterie schließen zu können, wurde der Effekt einer sättigenden Konzentration allosterischer Liganden in Kombination mit 10 μ M Iperoxo auf den M₂i3-N- und M₂i3-C Sensor untersucht. Würde bei einer grafischen Gegenüberstellung der maximalen Hemmeffekte der verschiedenen Allosterie in Abhängigkeit vom eingesetzten Rezeptorsensor eine Abweichung der einzelnen Messwerte von der Winkelhalbierenden auftreten (Abb. 29, B, Seite 37), könnte dies auf die Induktion ligandenselektiver Konformationsänderungen des M₂AChR hinweisen.

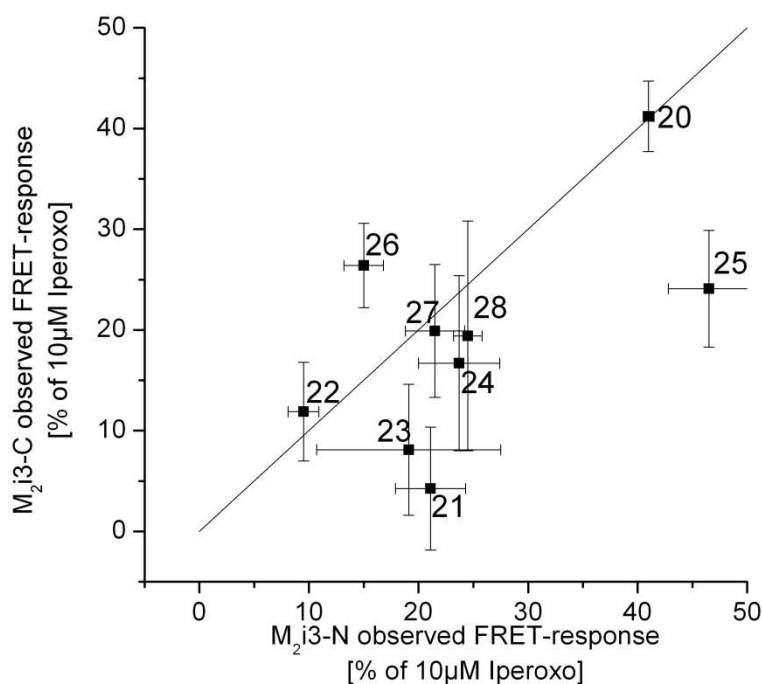
Die Betrachtung der maximalen Inhibitionseffekte (= Plateau in den Konzentrations-Wirkungskurven nach Superfusion mit allosterischem Modulator in maximaler Konzentration), die die allosterischen Modulatoren rezeptorabhängig ausübten, zeigte, dass auch in sehr hohen Konzentrationen ($\geq 300 \mu$ M) außer JK 337, $\frac{1}{2}$ W84 und Naphmethonium kein allosterischer Ligand die Iperoxo-vermittelte Rezeptorstimulation vollständig inhibieren konnte. Stattdessen stellte sich abhängig vom allosterischen Liganden eine Sättigung (*Ceiling*-Effekt) der Rezeptorinhibition ein. Als Referenzwert diente in diesen Messungen eine Rezeptoraktivierung mit 10 μ M Iperoxo.

Tab. 7: Maximale Hemmeffekte der allosterischen Modulatoren getestet am M₂i3-N bzw. M₃i3-C Sensor in Gegenwart von Iperoxo.

Den Konzentrations-Wirkungskurven der allosterischen Modulatoren wurden die maximalen Inhibitionseffekte (Messwert bei einer Rezeptorstimulation mit 10 µM Iperoxo kombiniert mit Alloster in sättigender Konzentration) entnommen und selektiv für den transfizierten Rezeptorsensor zusammengefasst (n = 15).

allosterischer Ligand	Nummer	Iperoxo	
		M ₂ i3-N	M ₂ i3-C
JK 289	20	41 ± 0,5 µM	41,2 ± 3,5 µM
JK 337	21	21,1 ± 3,2 µM	4,25 ± 6,1 µM
JK 338	22	9,5 ± 1,4 µM	11,9 ± 4,9 µM
½ W84	23	19,1 ± 8,4 µM	8,1 ± 6,5 µM
W84	24	23,7 ± 3,7 µM	16,7 ± 8,7 µM
Seminaph	25	46,5 ± 3,7 µM	24,1 ± 5,8 µM
EHW 477	26	15 ± 1,8 µM	26,4 ± 4,2 µM
JK 519	27	21,5 ± 2,7 µM	19,9 ± 6,6 µM
Naphmethonium	28	24,5 ± 1,3 µM	19,4 ± 11,4 µM

Die grafische Gegenüberstellung der maximalen Hemmeffekte der unterschiedlichen allosterischen Liganden, bezogen auf die verschiedenen Rezeptorsensoren, verdeutlicht den *Ceiling*-Effekt nochmals. Zudem zeigte sich, dass die Kombinationen aus Iperoxo mit JK 337, Seminaph und EHW 477 von der Winkelhalbierenden abwichen. Für die übrigen allosterischen Testsubstanzen konnte dagegen keine Abweichung von der Winkelhalbierenden detektiert werden.

**Abb. 63: Vergleich der maximalen Hemmeffekte ermittelt für die allosterischen Modulatoren in Kombination mit Iperoxo am M₂i3-N- und M₂i3-C Sensor.**

Die maximalen Hemmeffekte mit Standardfehler, ermittelt aus den Konzentrations-Wirkungskurven der allosterischen Modulatoren in Kombination mit Iperoxo am M₂i3-N- und M₂i3-C Rezeptorsensor, wurden substanzspezifisch gegeneinander aufgetragen (für Nummerierung siehe Tab. 7). Alle Angaben entsprechen dem Prozentsatz an Rezeptor-Restaktivität verglichen mit einer Aktivierung der Rezeptorsensoren mit 10 µM Iperoxo. Die Kombinationen aus Iperoxo mit JK 337 (21), Seminaph (25), oder EHW 477 (26) zeigten eine Abweichung von der Winkelhalbierenden (n = 15).

4.5.3 Beeinflussung der Rezeptorkonformation durch Hybrid 1 und Hybrid 2

Wie bereits in Kapitel 4.5.1 beschrieben, wurde die Konformation des M₂ AChR durch die Aktivierung mit Orthosteren ligandenselektiv nicht unterschiedlich beeinflusst. Die allosterischen Testsubstanzen zeigten allerdings ligandenabhängige Änderungen der Konformation des M₂ AChR (Kapitel 4.5.2).

Es sollte nun mit Hilfe von FRET-Messungen untersucht werden, ob die dualsterischen Liganden Hybrid 1 und 2 (H 1 und H 2) einen unterschiedlichen Effekt auf die Rezeptorkonformation ausübten. Dazu wurden HEK293 Zellen, die stabil das M₂i3-N- oder M₂i3-C Rezeptorkonstrukt exprimierten mit H 1 bzw. H 2 in einer Konzentration von 100 µM stimuliert. Als Referenz wurde eine Stimulation mit dem endogenen Liganden ACh (100 µM) gewählt. Die Amplitudenhöhe der FRET-Signale wurde gemessen und als prozentualer Anteil der Rezeptoraktivierung durch 100 µM ACh berechnet.

Einen Überblick über Mittelwerte und den jeweiligen, statistisch berechneten Standardfehler der Hybrid-induzierten Rezeptoraktivierung gibt Tabelle 8.

Tab. 8: Maximale Rezeptoraktivierung nach Stimulation der M₂i3-N- und M₂i3-C Rezeptorsensoren mit ACh, oder den Hybridsubstanzen H 1 und H 2.

Es wurden die Mittelwerte mit entsprechenden Standardfehlern zusammengefasst, die für die maximale Rezeptoraktivierung durch Stimulation der M₂ Rezeptorsensoren mit ACh, oder den Hybriden 1 und 2 ermittelt wurden. Die Konzentration der Ligandenlösungen betrug 100 µM (n = 18).

Substanz	Nummer	M ₂ i3-N		M ₂ i3-C	
		Mittelwert [%]	S.E.	Mittelwert [%]	S.E.
Acetylcholin	1	100	0	100	0
Hybrid 1	29	3,2	1,4	6,9	2,7
Hybrid 2	30	0	0	0	0

Die maximale Rezeptoraktivierung durch die Hybridsubstanzen wurde als Prozentanteil des Effekts von 100 µM ACh berechnet und in Abhängigkeit der eingesetzten Liganden in einer Säulengrafik dargestellt (Abb. 64, A, Seite 92). Die Mittelwerte der Amplitudenhöhen der FRET-Signale wurden in Abbildung 64, B abhängig von dem zur Messung verwendeten Rezeptorkonstrukt gegeneinander aufgetragen.

H 1 erzeugte mit $3,2 \pm 1,4\%$ bzw. $6,9 \pm 2,7\%$ Rezeptoraktivierung, verglichen mit ACh, einen sehr geringen Effekt in den FRET-Experimenten. Mit H 2 konnte weder am M₂i3-N-, noch am M₂i3-C Rezeptorsensor eine Änderung des FRET-Ratio beobachtet werden.

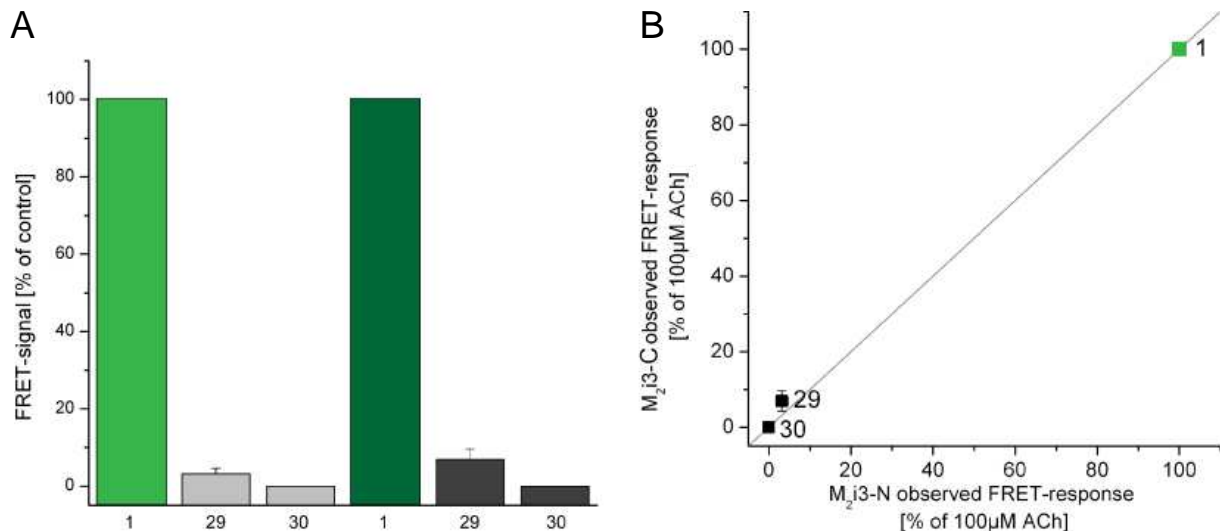


Abb. 64: Maximale Aktivierung der M₂i3-N- und M₂i3-C Rezeptorsensoren mit den Hybriden 1 und 2.

(A) Prozentuale Rezeptoraktivierung des M₂i3-N- (hellgrau) bzw. M₂i3-C Sensors (dunkelgrau) mit H 1 (29) H 2 (30) und ACh (grün für M₂i3-N bzw. dunkelgrün für M₂i3-C). Aufgetragen sind Mittelwerte mit Standardfehler aus n = 18 Einzelmessungen. (B) Die Mittelwerte und Standardfehler der ligandenselektiv hervorgerufenen Rezeptorstimulation wurden abhängig vom verwendeten Rezeptorkonstrukt gegeneinander aufgetragen. Die ACh-Aktivierung (grün) wurde gleich 100% gesetzt.

4.6 Regulierung nachgeschalteter Signalwege

Nachfolgende Studien sollten zeigen, ob sich die Eigenschaften der orthosterischen und allosterischen Testsubstanzen bezüglich ihrer Wirkstärke in FRET-Experimenten auch auf nachgeschaltete (*downstream*) Signalwege übertragen ließ.

4.6.1 β -Arrestin2 Translokation nach Rezeptorstimulation mit orthosterischen Liganden

Nach ligandinduzierter Rezeptoraktivierung wird der Rezeptor durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung des Rezeptors wird dessen Affinität für β -Arrestine, die eine um bis zu 40-fach erhöhte Präferenz für phosphorylierte Rezeptoren aufweisen, erhöht [349]. Folglich werden die β -Arrestine (β -Arrestin1 und 2) aus dem Zytosol an die Zellmembran rekrutiert, an der der phosphorylierte Rezeptor lokalisiert ist. Die Kopplung der β -Arrestine an den Rezeptor kann zu dessen Desensibilisierung führen. Alternativ können durch die Wechselwirkung zwischen β -Arrestin und Rezeptor auch β -Arrestin-vermittelte Signalwege reguliert werden [48].

Um zu untersuchen, ob die mit Hilfe der FRET-Experimente ermittelte Potenz der orthosterischen Liganden, den M₂ AChR zu aktivieren, auch auf *downstream* Signalwege übertragbar war, wurde die ligandinduzierte β -Arrestin2 Translokation zur Zellmembran mit Hilfe der Konfokalmikroskopie analysiert.

HEK TSA wurden 48 Stunden vor der Messung transient mit dem M₂CFP Rezeptor, GRK2 und β -Arrestin2YFP transfiziert. Dabei wurde bewusst der mit CFP markierte M₂ AChR statt des wt M₂ gewählt. Durch die Markierung des Rezeptors mit CFP bestand so die Möglichkeit, die Membranexpression des Rezeptors zu überprüfen. Zu Beginn der Messungen wurde der M₂CFP durch Zugabe der orthosterischen Liganden in sättigender Konzentration (Endkonzentration = 100 μ M) stimuliert. Die Translokation des YFP markierten β -Arrestin2 an die Zellmembran wurde in 15-minütigen Zeitserien erfasst. Das Ausmaß der

β -Arrestin2 Translokation wurde über die Berechnung der Fluoreszenzabnahme des YFP-Fluorophors im Zytosol ermittelt. Die um das Photobleichen korrigierte Reduktion der YFP-Fluoreszenz wurde abhängig vom jeweiligen Liganden über den Zeitverlauf von 15 Minuten grafisch dargestellt. Zudem wurde auch das maximale Ausmaß der β -Arrestin2 Translokation zum Zeitpunkt $t = 15$ Minuten bestimmt.

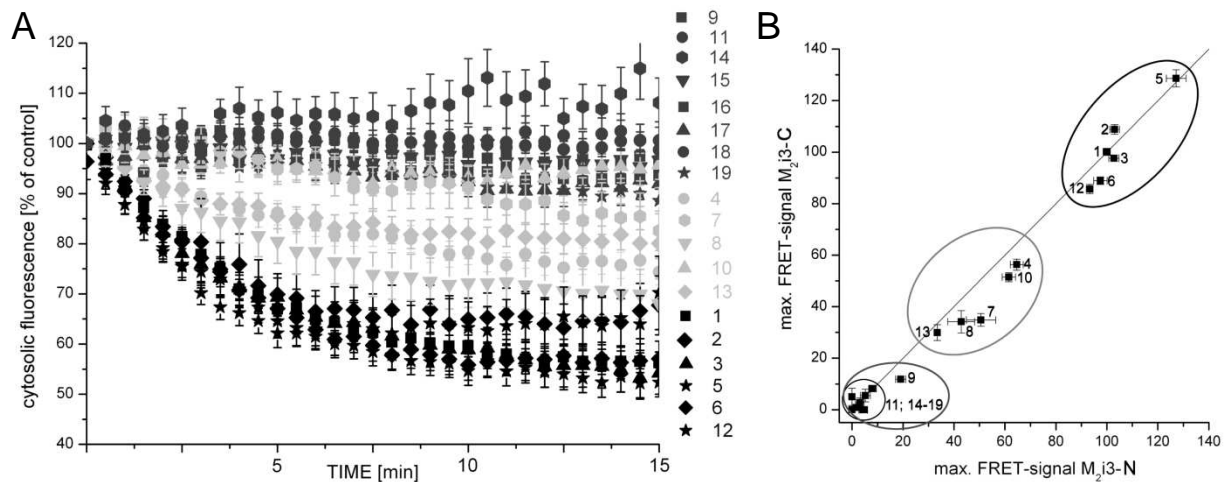


Abb. 65: Translokation von β -Arrestin2YFP nach Stimulation des M₂CFP Rezeptors (A) und Vergleich mit der maximalen Rezeptoraktivierung der M₂i3-N- und M₂i3-C Rezeptorsensoren nach Aktivierung mit orthosterischen Liganden (B).

Die Translokation des β -Arrestin2YFP zur Zellmembran wurde zeitabhängig gemittelt und als Funktion der Zeit für den jeweiligen Liganden aufgetragen. Ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der β -Arrestin2 Translokation (A) und der Rezeptoraktivierung (B) wird für die meisten Liganden erkennbar. Die einzige Ausnahme stellte 5-Methylfurmethiodid (10) dar, welches eine ca. halbmaximale Rezeptorstimulation, aber nur eine geringe Rekrutierung von β -Arrestin2 induziert. Die Nummerierung ist in Tab. 6, Seite 88 erklärt.

Vergleicht man das Ausmaß der β -Arrestin2 Translokation in Abhängigkeit des verwendeten Liganden mit der Effizienz der orthosterischen Liganden den M₂ AChR zu aktivieren, so fällt auf, dass diejenigen Substanzen, die den Rezeptor stark aktivierten ($\geq 80\%$) auch eine starke Translokation des β -Arrestin2 ($\geq 60\%$) hervorrufen. Dagegen induzieren Liganden, die den M₂ AChR nur zu 20-60% aktivierten auch nur eine β -Arrestin2 Translokation von 30-60%. Orthosterische Rezeptorliganden, die weniger als 20% Rezeptoraktivierung verursachten, rekrutieren β -Arrestin2 nur zu maximal 30%. Bei der Rezeptorstimulation mit den klassischen, orthosterischen Antagonisten bzw. inversen Agonisten Ipratropium, Telenzepin, Pirenzepin, Atropin und Scopolamin konnte keine Translokation des β -Arrestin2 beobachtet werden. Lediglich für 5-Methylfurmethiodid konnte kein Zusammenhang zwischen Rezeptoraktivierung und β -Arrestin2 Translokation hergestellt werden.

4.6.2 Regulierung nachgeschalteter Signalwege durch allosterische Liganden des muskarinischen M₂ Acetylcholinrezeptors

Wie für die orthosterischen Liganden, sollte auch für die Kombination aus allosterischen und orthosterischen Liganden untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß an Rezeptoraktivierung und der Modulation nachgeschalteter Signalwege bestand. Dies erfolgte zum einen durch die Untersuchung der ligandenabhängigen Aktivierung des G_i-Proteins, zum anderen durch die Analyse der β -Arrestin2 Translokation nach Rezeptorstimulation.

4.6.2.1 Aktivierung des G_i-Proteins

Die Stimulation des M₂AChR hat eine Aktivierung des nachgeschalteten G_i-Protein Signalweges zur Folge. Zur Messung der ligandenabhängigen G_i-Protein Aktivierung wurden HEK TSA-Zellen transient mit dem wt M₂ Rezeptor, der YFP markierten G_{ai}-Untereinheit, der unmarkierten G_β- und der mit CFP fusionierten G_γ-Untereinheit transfiziert. Die Transfektion erfolgte 48 Stunden vor den geplanten Messungen.

Transfektionsschema (Angaben beziehen sich auf eine „six-well“ Platte):

wt M ₂	1,4 µg
G _{ai} YFP	1,8 µg
G _β	1 µg
G _γ ₂ CFP	0,6 µg
Effectene	100 µl
Enhancer	32 µl
Puffer	600 µl

Die Untersuchung der G_i-Protein Aktivierung nach Rezeptorstimulation erfolgte mittels FRET-Messungen. Die transient transfizierten Zellen wurden entweder mit orthosterischem Ligand, oder mit einer Kombination von orthosterischem mit allosterischem Liganden stimuliert. Dies führte zu einer Zunahme der CFP-Fluoreszenz und wechselseitig zu einer Abnahme der YFP-Fluoreszenz. Daraus resultierte eine Abnahme des FRET-Ratio. Es konnte gezeigt werden, dass eine FRET-mikroskopische Detektion der M₂ AChR-vermittelten G_i Aktivierung möglich war. Zudem ist erkennbar, dass die Zugabe allosterischer Liganden zu einem bereits vorstimulierten Rezeptor die G_i-Protein Aktivierung teilweise inhibierte. Es wird ersichtlich, dass der Grad der Inhibition dabei von dem eingesetzten Alloster abhängig war. Zur Quantifizierung der beobachteten Effekte müssen allerdings die Messbedingungen optimiert werden. So konnte in den FRET-Experimenten keine stabile Basislinie gemessen werden und das oft verhältnismäßig große Rauschen erschwerte eine quantitative Auswertung der einzelnen Messsignale.

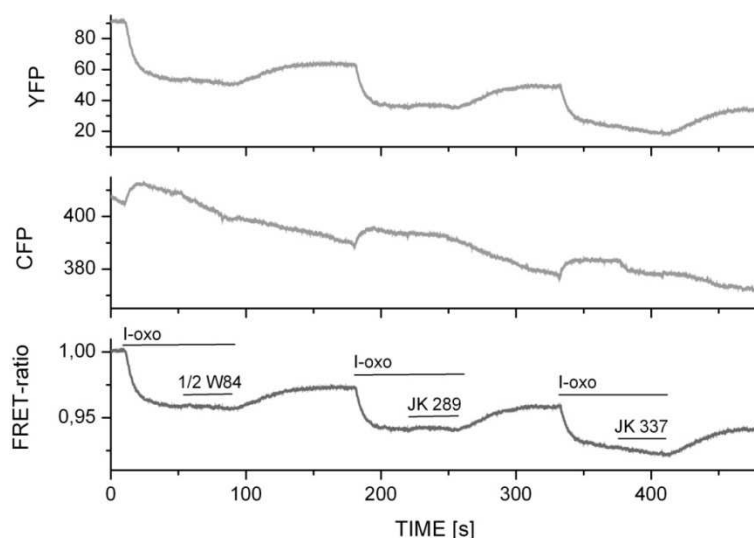


Abb. 66: FRET-Untersuchung der Effekte allosterische Modulatoren auf die Iperoxo-induzierte G_i-Protein Aktivierung am wt M₂.

Die ligandenabhängige G_i-Protein Aktivierung wurde mittels FRET-Mikroskopie an transient transfizierten HEK TSA-Zellen analysiert. Die Zugabe von Iperoxo (I-oxo, 100 µM) führte zu einer Abnahme des FRET-Ratio. Die Stimulation mit einer Kombination aus Iperoxo und Alloster (Konzentration je 100 µM) resultierte in einer partiellen Deaktivierung des G_i-Proteins. Ligandenabhängig fiel dabei die Hemmung unterschiedlich stark aus. Das Ratio wurde um Falschanregung und Durchbluten korrigiert, normalisiert und geglättet.

4.6.2.2 β -Arrestin2 Translokation

Die Rekrutierung des β -Arrestin2 zur Zellmembran wurde, nicht wie für die orthosterischen Liganden konfokalmikroskopisch, sondern mit Hilfe der FRET-Mikroskopie untersucht. Da FRET-Messungen im Vergleich zu konfokalmikroskopischen Untersuchungen deutlich empfindlicher sind, können hier auch geringe, ligandvermittelte Effekte detektiert werden. 48 Stunden vor der Messung wurden HEK TSA mit β -Arrestin2CFP, M₂YFP und GRK2 transfiziert.

Transfektionsschema: (bezogen auf eine „six-well“-Platte)

M ₂ YFP	1,8 μ g
β -Arrestin2CFP	1,8 μ g
GRK2	1,2 μ g
Effectene	42 μ l
Enhancer	16,2 μ l
Puffer	300 μ l

Anders, als für die konfokalmikroskopischen Messungen wurden hier die Fluorophore vertauscht (β -Arrestin2 mit CFP markiert, statt mit YFP und M₂ AChR YFP-, statt CFP-markiert). Auf diese Weise wurde eine höhere Amplitude der FRET-Signale erhalten. Die Stimulation mit Ligand führte zu einer Abnahme der Donorfluoreszenz des CFP und wechselseitig zu einer Zunahme der YFP-Fluoreszenz. Daraus resultierte eine Zunahme des FRET-Signals. Es konnte gezeigt werden, dass die Zugabe einer Kombination aus allosterischem und orthosterischem Liganden zum bereits vorstimulierten Rezeptor eine Reduktion des FRET-Signals zur Folge hatte. Das Ausmaß der Signalreduktion unterschied sich dabei abhängig vom zugegebenen Alloster. Um quantitative Aussagen über die einzelnen Effekte machen zu können, müssen allerdings die Versuchsbedingungen weiter optimiert werden, da die instabile Basislinie eine quantitative Auswertung erschwerte, auch war das Ausmaß der einzelnen Effekte nicht immer reproduzierbar.

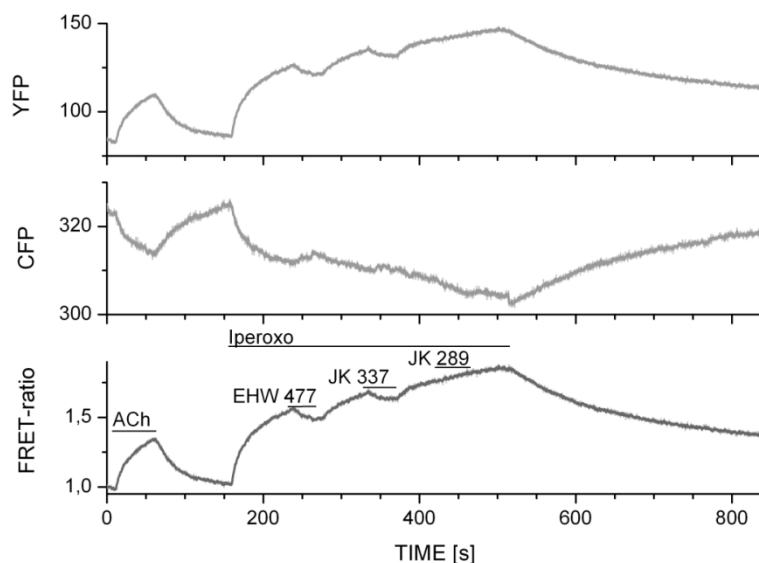


Abb. 67: FRET-Messung der Einflüsse allosterischer Liganden auf die Translokation von β -Arrestin2 zum vorstimulierten M₂YFP Rezeptor.

Transient transfizierte HEK TSA-Zellen wurden FRET-mikroskopisch untersucht. Stimulation mit ACh bzw. Iperoxo resultierte in einem Anstieg des FRET-Ratio. Die Zugabe einer Kombination aus Iperoxo und Alloster (Konz. Jeweils = 100 μ M) führte zu einer partiellen Inhibition der β -Arrestin2 Translokation. Das Ausmaß der Inhibition war von dem eingesetzten allosterischen Modulator abhängig. Das FRET-Ratio wurde um Falschanregung und Durchbluten korrigiert, normalisiert und geglättet.

4.7 FRET-mikroskopische Charakterisierung von Derivaten der Hybrids-substanzen

Wie bereits in Kapitel 4.5.3 gezeigt, konnte nach Stimulation der M_2 Rezeptorsensoren mit den beiden bitopischen Liganden H 1 und H 2 keine nennenswerte Änderung des FRET-Signals gemessen werden. Im Gegensatz dazu konnte in beiden Rezeptorsensoren durch die miteinander kombinierten Einzelbausteine der Hybride (Hybrid 1 = Iperoxo + JK 289; Hybrid 2 = Iperoxo + Seminaph) eine Rezeptoraktivierung beobachtet werden (Abb. 53, Seite 79).

4.7.1 Verlängerung der Linkerkette

4.7.1.1 Iper-8-Phth

Eine Möglichkeit, die mangelnde Wirkstärke der Hybrids-substanzen in FRET-Experimenten zu erklären, bestand darin, dass die Kohlenstoffkette (Linkerkette), durch die beide Bausteine in den Hybriden miteinander verbunden sind, zu kurz war. Somit war es nicht möglich, dass nach Bindung des Allosters das Orthoster an seine korrekte Bindestelle „andocken“ konnte. Dies wird in Abbildung 68 verdeutlicht.

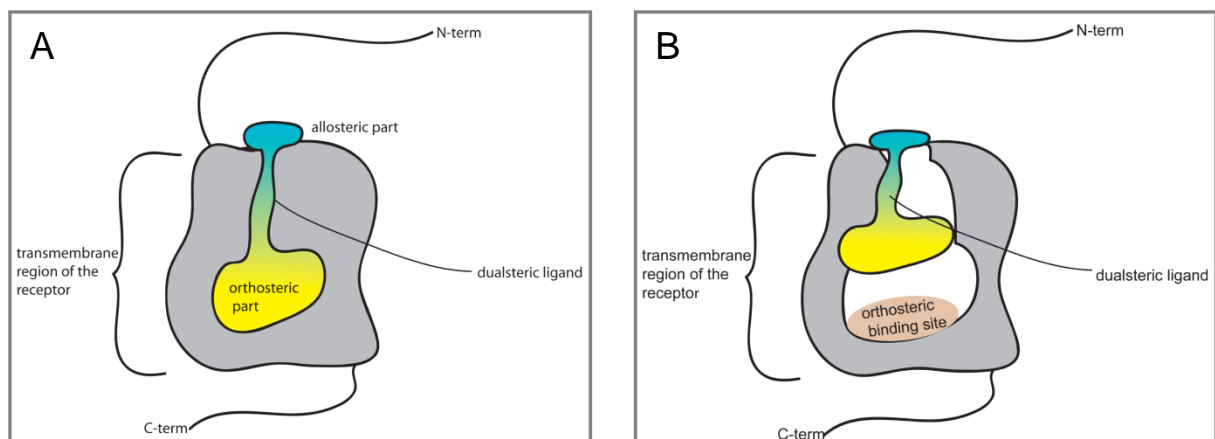


Abb. 68: Schematische Darstellung einer korrekten und einer unkorrekten Bindung von dualsterischen Liganden an den M_2 AChR.

(A) Ist die Linkerkette zwischen orthosterischem Baustein (gelb) und allosterischem Baustein (blau) ausreichend lang, können beide Elemente des dualsterischen Liganden an ihre jeweiligen Bindestellen binden. (B) Ist die Linkerkette dagegen zu kurz, wird der dualsterische Ligand durch Bindung des allosterischen Hybrid-Anteils an der allosterischen Bindestelle festgehalten. Der orthosterische Baustein kann die orthosterische Bindestelle nicht erreichen.

Um diese Annahme zu testen, wurde die Linkerkette von H 1 um zwei Kohlenstoffatome verlängert. Die so synthetisierte Substanz wurde als Iper-8-Phth bezeichnet.

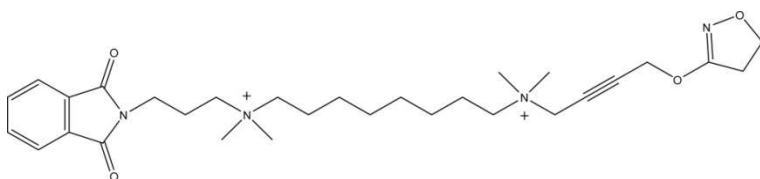


Abb. 69: Chemische Struktur von Iper-8-Phth.

In Iper-8-Phth wurde die Linkerkette von H 1 um zwei Kohlenstoffatome verlängert.

Zur Durchführung der FRET-Experimente wurden Zellen, die den M_2i3-N Rezeptorsensor stabil exprimierten, mit Iper-8-Phth (100 μM) stimuliert, als Referenzsubstanz diente ACh

(100 μM). Die ausgemessenen Signalhöhen der FRET-Antworten wurden als prozentualer Anteil der mit 100 μM ACh induzierten FRET-Signale berechnet und anschließend als Säulengrafik dargestellt.

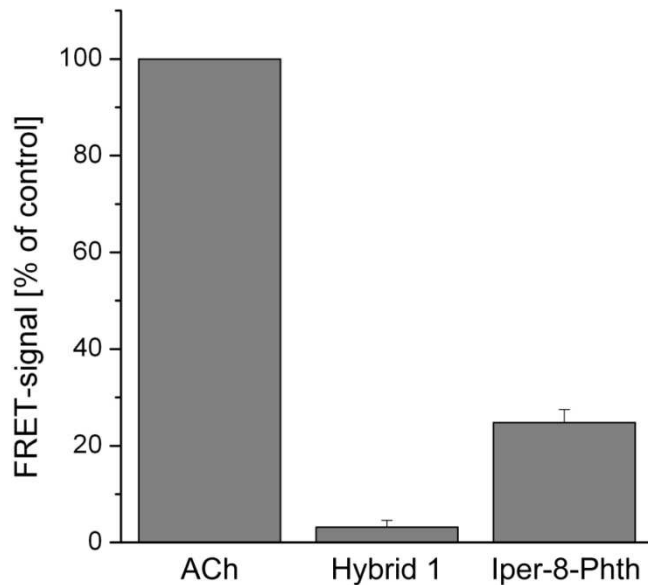


Abb. 70: Quantitative Darstellung der Rezeptoraktivierung mit Acetylcholin (ACh), Hybrid 1 und Iper-8-Phth (Konz. 100 μM) gemessen am $\text{M}_2\text{i}3\text{-N}$ Rezeptorsensor.

Die in FRET-Messungen ermittelten Amplituden der FRET-Signale wurden ligandenspezifisch quantifiziert, und statistisch analysiert. Das ACh-Signal wurde als 100% Referenzwert definiert. Die Mittelwerte der Rezeptoraktivierung wurden zusammen mit dem Standardfehler abhängig vom verwendeten Liganden in einer Säulengrafik zusammengefasst. Während H 1 eine Rezeptoraktivierung von $3,2 \pm 1,4\%$ induzieren konnte, aktivierte Iper-8-Phth den $\text{M}_2\text{i}3\text{-N}$ um ca. den Faktor 8 stärker, als H 1 ($n = 10$).

Die Verlängerung der Linkerkette von H 1 um zwei Kohlenstoffatome zum Iper-8-Phth führte zu einem ca. 8-fachen Zugewinn an Potenz verglichen mit H 1. So wurde $\text{M}_2\text{i}3\text{-N}$ durch Iper-8-Phth zu $24,8 \pm 2,7\%$ im Vergleich zu ACh aktiviert.

4.7.1.2 Naph-7-Iper und Naph-8-Iper

Auch im Falle von H 2 wurde untersucht, ob eine Elongation der Linkerkette einen positiven Einfluss auf die Wirkstärke des dualsterischen Liganden hatte. Dazu wurde in H 2 die Linkerkette schrittweise um jeweils ein C-Atom verlängert. Im Naph-7-Iper sind der allosterische und der orthosterische Baustein durch eine sieben Kohlenstoffatome lange Linkerkette miteinander verbunden, während die Linkerkette des Naph-8-Iper eine Länge von acht C-Atomen beträgt. Durch die Kettenverlängerung wurde so der Abstand zwischen dem orthosterischen und dem allosterischen Teil des Hybrides vergrößert, eine gleichzeitige Bindung der beiden Bausteine an ihre jeweilige, spezifische Bindestelle könnte somit erleichtert worden sein.

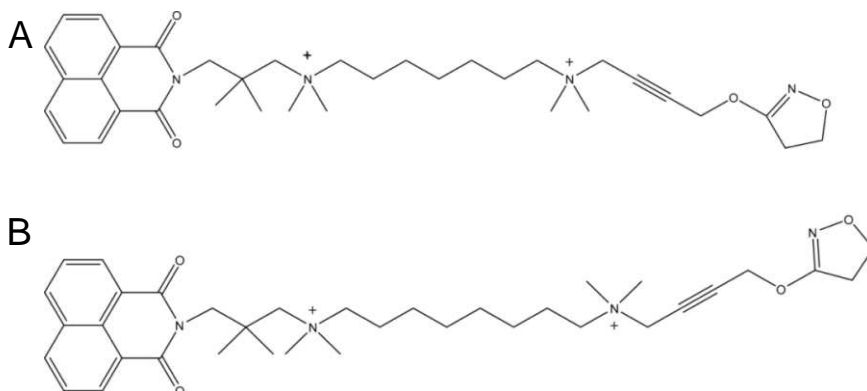


Abb. 71: Strukturformeln von Naph-7-Iper (A) und Naph-8-Iper (B).

(A) Zur Generierung von Naph-7-Iper wurde die Linkerkette von H 2 um ein Kohlenstoffatom verlängert. Naph-8-Iper (B) ergab sich durch Verlängerung der Linkerkette von H 2 um zwei Kohlenstoffatome.

Mit beiden Substanzen wurden FRET-Messungen durchgeführt. HEK293 Zellen, die stabil das M₂i3-N Konstrukt exprimierten, wurden mit Naph-7-Iper und Naph-8-Iper in sättigender Konzentration (100 µM) stimuliert. Als Referenz diente eine Stimulation mit 100 µM ACh. Die Höhen der FRET-Signale wurden ermittelt, als Prozentanteil der Aktivierung mit ACh berechnet und anschließend in Abhängigkeit von dem gemessenen Liganden in einer Grafik zusammengefasst.

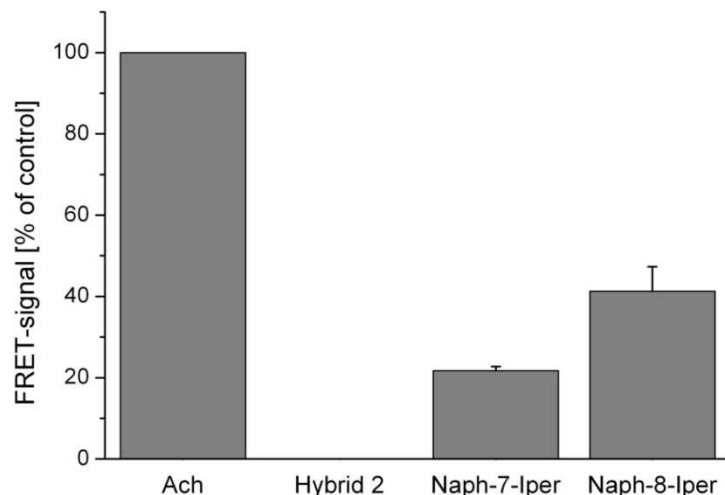


Abb. 72: Quantifizierte Aktivierung des M₂i3-N mit Acetylcholin (ACh) und Derivaten von H 2 (Konz. = 100 µM).

Die Höhen der FRET-Signale wurden ligandenselektiv ausgemessen und statistisch analysiert (n = 9). Mittelwerte und Standardfehler wurden in einer Säulengrafik zusammengefasst. ACh diente als 100% Referenzwert. Die Verlängerung der Linkerkette um ein C-Atom (Naph-7-Iper) resultierte in einem Zugewinn an agonistischer Aktivität von 21,7 ± 2,3%. Naph-8-Iper aktivierte den M₂i3-N zu 41,3 ± 13,5%.

Mit Hilfe der FRET-Messungen konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit der Derivate von H 2 zur Rezeptoraktivierung mit zunehmender Verlängerung der Linkerkette anstieg. Während H 2 in den FRET-Experimenten keine Stimulation des M₂i3-N Rezeptorsensors bewirken konnte, wurde das Rezeptorkonstrukt durch Naph-7-Iper zu 21,7 ± 2,3 % im Vergleich mit ACh stimuliert. Die Bindung des um zwei Kohlenstoffatome verlängerten Naph-8-Iper resultierte in einer 41,3 ± 13,5%-igen Aktivierung des M₂i3-N-Rezeptors.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die Verlängerung der Linkerkette in beiden Derivaten von H 2 in einer Zunahme der Wirkstärke der Liganden resultierte.

4.7.2 Entfernung des allosterischen Bausteins – Iperoxo-Hexamethonium

Daten belegen, dass die orthosterische Bindestelle tief in einem von den Transmembrandomänen des M₂ AChR geformten Kanal liegt [6]. Dagegen sind an der allosterischen Bindestelle vornehmlich Aminosäuren beteiligt, die sich in den extrazellulären Bereichen der Transmembrandomänen und in den extrazellulären Rezeptorschleifen befinden. Bisher wurde angenommen, dass beide Bindestellen durch einen Kanal miteinander verbunden sind [146, 279].

Nachdem die bitopischen Liganden H 1 und H 2 in den FRET-Messungen kaum eine messbare Änderung der Rezeptorkonformation bewirken konnten, bestand die Vermutung, dass dieser Kanal nach Bindung des orthosterischen Liganden durch die räumliche Umorientierung von Aminosäuren oberhalb der orthosterischen Bindestelle verlegt wurde und somit entweder zu eng war, um die Linkerkette der dualsterischen Liganden aufzunehmen, oder durch Aminosäuren komplett geschlossen wurde.

Auf diese Weise könnte ein bitopischer Ligand zwar kurz an die orthosterische Bindestelle binden, würde danach aber wieder aus der Bindung ausgestoßen, da durch das Vor-

handensein der Linkerkette, sowie des allosterischen Bausteins eine neue räumliche Ausrichtung der Aminosäuren im M₂ AChR nicht möglich ist.

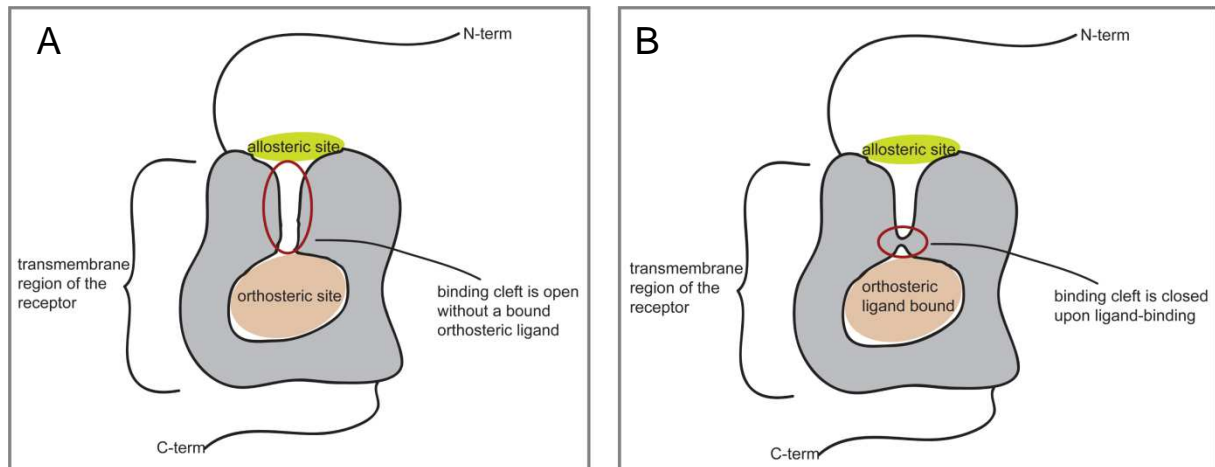


Abb. 73: Schematische Darstellung der mutmaßlichen Änderung der M₂ Rezeptorkonformation nach Bindung eines orthosterischen Liganden.

(A) Liegt der M₂ AChR ungebunden vor, so ist der Kanal, der die orthosterische und die allosterische Bindestelle miteinander verbindet, geöffnet. (B) Nach Bindung eines orthosterischen Liganden wird der Kanal zwischen allosterischer und orthosterischer Bindestelle durch eine räumliche Neuordnung der Aminosäuren oberhalb der orthosterischen Bindestelle verschlossen.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden FRET-Messungen mit Iperoxo-Hexamethonium durchgeführt.

Zur Gewinnung der Substanz wurde der allosterische Baustein von H 1 bzw. H 2 entfernt. Die sechs Kohlenstoffatome lange Linkerkette, sowie die zweite positiv geladene Amino-Gruppe blieben am Iperoxo erhalten.

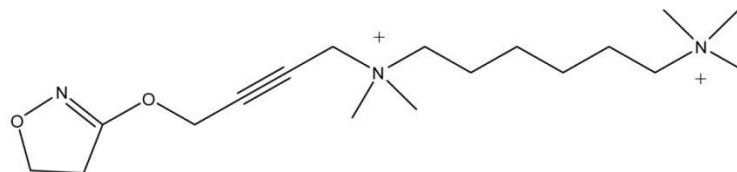


Abb. 74: Strukturformel von Iperoxo-Hexamethonium.

Iperoxo-Hexamethonium wurde durch Entfernen des allosterischen Bausteines von H 1 bzw. H 2 generiert. Die sechs C-Atome lange Linkerkette, sowie die zweite positiv geladene Stickstoffgruppe blieben erhalten.

Mittels FRET-Messungen wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt. HEK293 Zellen, die stabil den M₂i3-N, oder den M₂i3-C Rezeptorsensor exprimierten, wurden mit Iperoxo-Hexamethonium (Konzentration 1 µM – 3 mM) stimuliert. Als Referenz diente eine Rezeptorstimulation mit 100 µM ACh. Die so erhaltenen FRET-Signale wurden ausgemessen und als Prozentanteil der durch ACh induzierten FRET-Antwort berechnet. Durch grafisches Auftragen des jeweiligen FRET-Effekts in Abhängigkeit der Konzentration von Iperoxo-Hexamethonium wurden die jeweiligen Konzentrations-Wirkungskurven generiert.

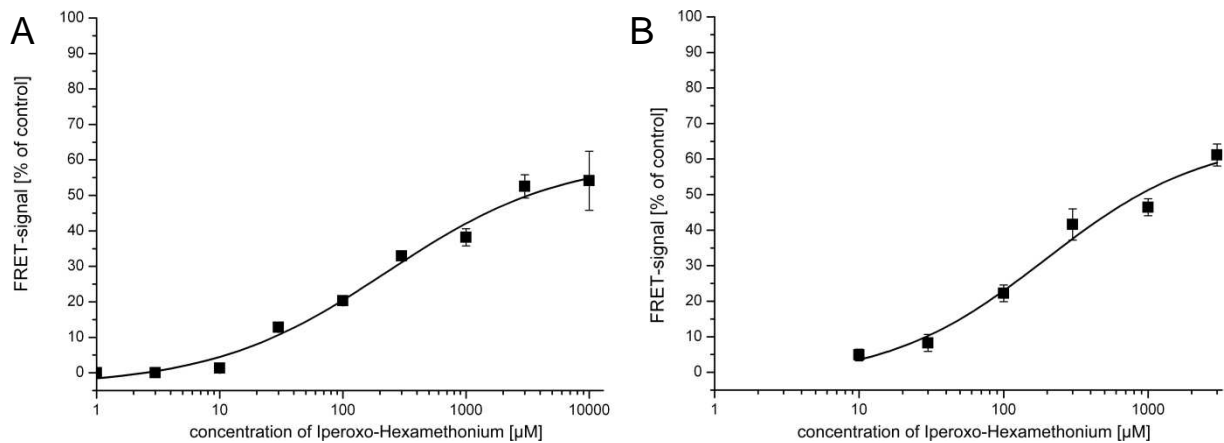


Abb. 75: Konzentrations-Wirkungskurven von Iperoxo-Hexamethonium am M₂i₃-N- (A) und M₂i₃-C Rezeptorsensor (B) ermittelt mit Hilfe von FRET-Messungen.

Das Ausmaß der Rezeptoraktivierung wurde ermittelt, statistisch analysiert und abhängig von der eingesetzten Ligandenkonzentration aufgetragen. Iperoxo-Hexamethonium zeigte eine konzentrationsabhängige Aktivierung des M₂i₃-N (A) und M₂i₃-C (B) Sensors. Selbst in hohen Konzentrationen ($\geq 1000 \mu\text{M}$) konnte keine vollständige Aktivierung der Rezeptoren erzielt werden. Als Kontrolle diente eine Rezeptoraktivierung mit $100 \mu\text{M}$ ACh. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus $n \geq 10$ Messungen.

Es wird deutlich, dass Iperoxo-Hexamethonium auch in hohen Konzentrationen ($\geq 1 \text{ mM}$) keinen der beiden Rezeptorsensoren zu 100% aktivieren konnte. Es wurde eine Rezeptorstimulation von ca. 60% im Vergleich zu ACh erreicht ($57,7 \pm 4,6\%$ für M₂i₃-N und $63,6 \pm 7,8\%$ für M₂i₃-C). Auch die für Iperoxo-Hexamethonium ermittelten EC₅₀-Werte liegen mit $241,8 \pm 82,8 \mu\text{M}$ am M₂i₃-N Sensor und $194,9 \pm 83,2 \mu\text{M}$ am M₂i₃-C Sensor deutlich höher, als die EC₅₀-Werte, die am M₂i₃-N Rezeptor für ACh (EC₅₀ = $6,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$), oder Iperoxo (EC₅₀ = $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$) bestimmt wurden.

4.7.3 Verkürzung der Linkerkette - N-Butyliperoxo

Nachdem die Aktivierung des Rezeptors mit Iperoxo-Hexamethonium im Vergleich zu ACh weitaus geringer ausfiel, lag die Vermutung nahe, dass das Entfernen des allosterischen Teils der Hybride noch nicht ausreicht, um eine optimale Bindung des Liganden an die orthosterische Bindestelle zu ermöglichen. Deshalb wurden in einem zweiten Syntheseschritt die Linkerkette am Iperoxo-Hexamethonium um zwei weitere Kohlenstoffatome verkürzt, sowie die zweite positiv geladene Stickstofffunktion entfernt.

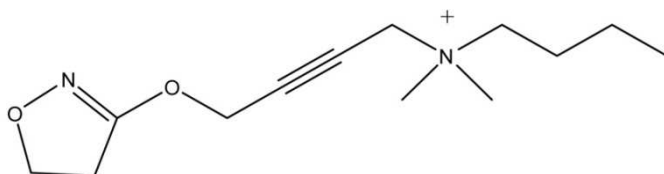


Abb. 76: Struktur von N-Butyliperoxo.

Durch die Verlängerung des orthosterischen Liganden Iperoxo um eine Butyl-Kette an der positiv geladenen Stickstofffunktion wurde N-Butyliperoxo erhalten.

Das so entstandene N-Butyliperoxo wurde mittels FRET-Messungen auf seine Fähigkeit den M₂ AChR zu aktivieren untersucht. M₂i₃-C- bzw. M₂i₃-N-Zellen wurden mit einer Lösung von N-Butyliperoxo (Konzentration $100 \mu\text{M}$) stimuliert. Kontrollmessungen wurden mit $10 \mu\text{M}$ Iperoxo durchgeführt. Die Verwendung höherer Konzentrationen an N-Butyliperoxo war durch die schlechte Löslichkeit der Substanz limitiert.

Ergebnisse

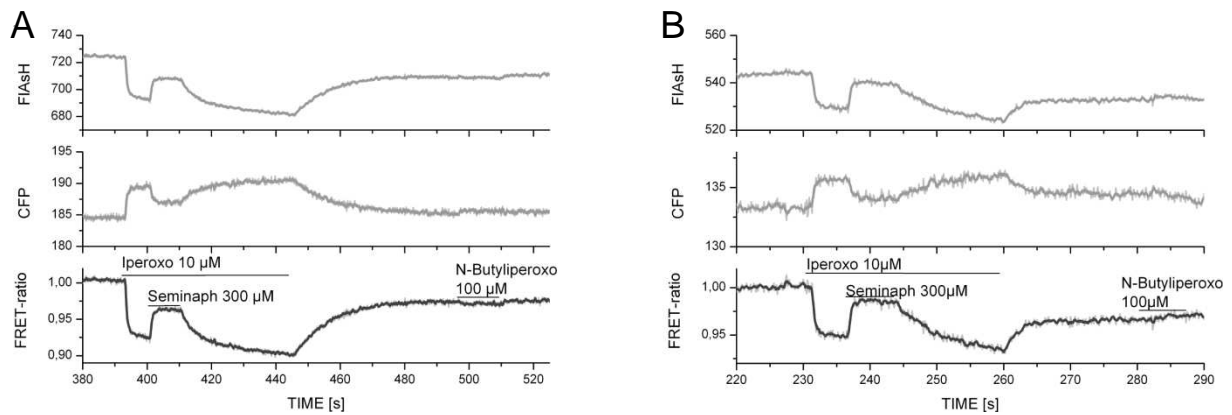


Abb. 77: FRET-Messungen am M_{2i3}-N- (A) bzw. M_{2i3}-C Rezeptorsensor (B) zur Ermittlung der Effekte von N-Butylperoxo auf die Rezeptoraktivierung.

HEK293 Zellen, die stabil das M_{2i3}-N Konstrukt (A), oder den M_{2i3}-C Sensor (B) exprimierten, wurden in FRET-Messungen mit 100 µM N-Butylperoxo superfundiert. Zum Vergleich wurde auch eine Stimulation mit Iperoxo allein, oder in Kombination mit allosterischem Liganden durchgeführt. Es zeigte sich, dass N-Butylperoxo den M_{2i3}-N Sensor nur in äußerst geringem Ausmaß, den M_{2i3}-C Sensor gar nicht aktivieren konnte. Die FRET-Spuren wurden um Akzeptorbleichen, Falschanregung und Durchbluten korrigiert, normalisiert und geglättet.

Aus den abgebildeten FRET-Spuren ist erkennbar, dass die Superfusion der Zellen mit N-Butylperoxo kaum eine detektierbare Rezeptoraktivierung zur Folge hatte.

4.8 Charakterisierung von mutierten Sensoren des muskarinischen M₂ Acetylcholinrezeptors mittels FRET-Mikroskopie

4.8.1 Mutation der orthosterischen Bindestelle

Wie bereits unter Kapitel 4.4.1 gezeigt, konnte mit Iperoxo im Vergleich zu ACh eine stärkere Rezeptoraktivierung hervorgerufen werden. Zudem zeigte Iperoxo eine verlangsamte Auswaschkinetik verglichen mit ACh. Dies lässt sich mit der, verglichen mit ACh, höheren Affinität von Iperoxo zum M₂ AChR erklären.

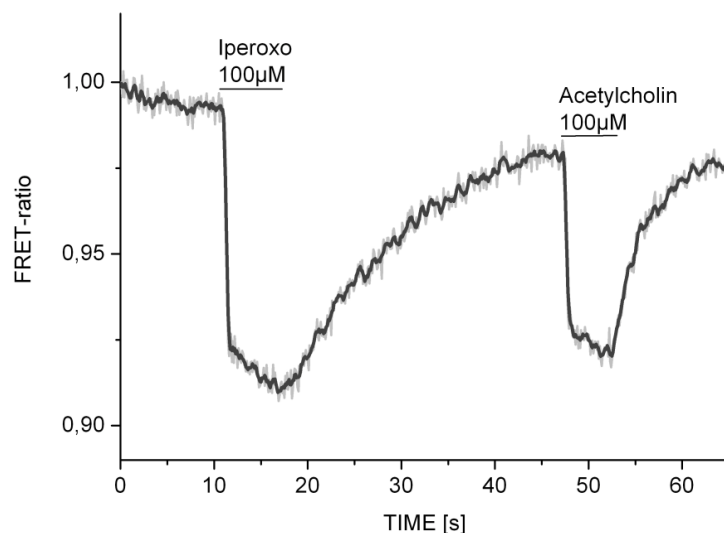


Abb. 78: FRET-Messung der M_{2i3}-C Rezeptoraktivierung mit Iperoxo bzw. Acetylcholin.

Der M_{2i3}-C Rezeptorsensor wurde mit Iperoxo und ACh (Konzentration jeweils 100 µM) stimuliert. Iperoxo konnte eine größere Änderung des FRET-Signals hervorrufen, als ACh. Auch war die Auswaschkinetik nach Entfernen von Iperoxo deutlich langsamer, als die nach Entfernen von ACh. Die FRET-Spur wurde um Falschanregung und Bleichen des Akzeptors, sowie Donor-Durchbluten korrigiert, normalisiert und geglättet.

Es wurde gemutmaßt, dass Iperoxo außer mit der, in TM 3 liegenden, Aminosäure Tyrosin¹⁰⁴, die von allen orthosterischen Liganden gebunden wird [6, 350], noch mit anderen Aminosäuren zusätzliche, spezifische Wechselwirkungen eingeht. Um das zu untersuchen wurde Tyrosin¹⁰⁴ in beiden Rezeptorsensoren M₂i3-N und M₂i3-C mit Hilfe der PCR-Technik zu Alanin mutiert. Dass die Tyr¹⁰⁴Ala-Mutation im M₂ AChR einen Wirkverlust von ACh zur Folge hatte, konnte bereits in vorangehenden Studien gezeigt werden [350].

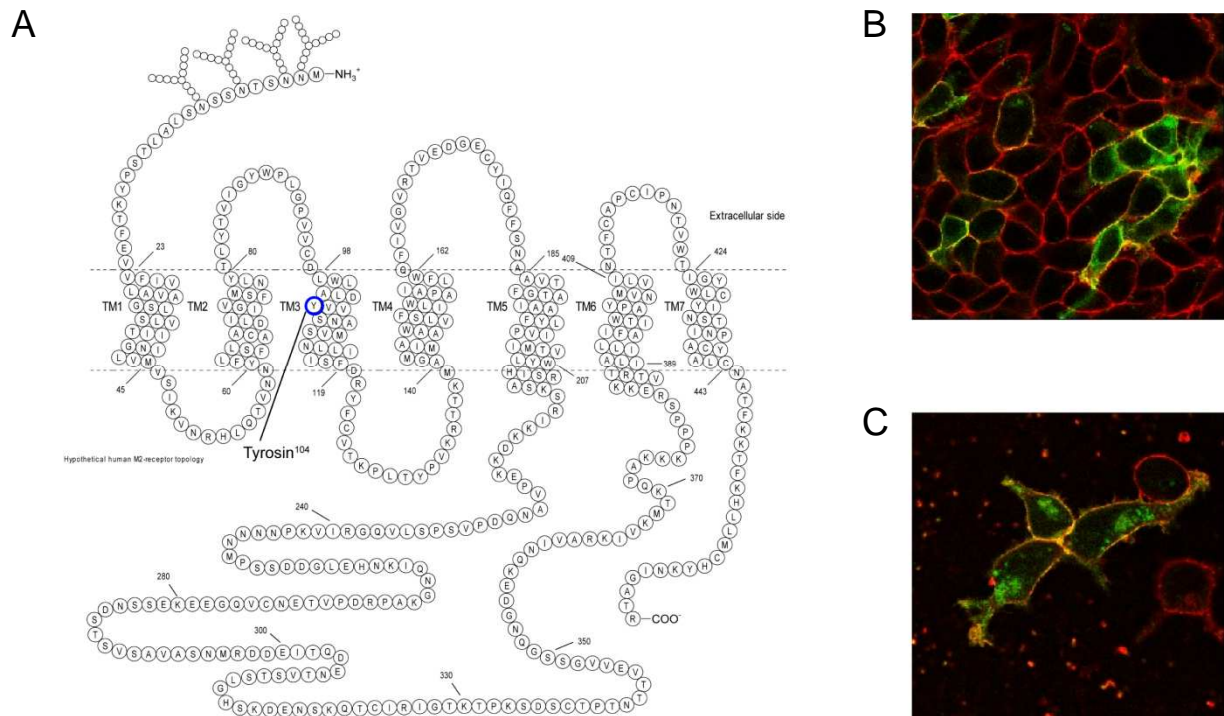


Abb. 79: Schematische Darstellung des M₂ Rezeptors (A) und konfokalmikroskopische Aufnahmen des M₂i3-N-(B) und M₂i3-C (C) Rezeptorsensors punktmuiert an Tyr¹⁰⁴Ala.

In den jeweiligen M₂ Y104A Rezeptorsensoren wurde die Aminosäure Tyrosin¹⁰⁴ in TM 3 zu Alanin mutiert (A, Tyrosin blau markiert). Sowohl der M₂i3-N Y104A (B) als auch der M₂i3-C Y104A Rezeptorsensor (C) zeigten eine deutliche Überlagerung (gelb) der CFP-Fluoreszenz (grün) und der Fluoreszenz des Membranmarkers (rot) an der Zellmembran. Beide Sensoren wiesen zudem eine intrazelluläre Rezeptoranreicherung (grün) auf. CFP wurde mit einer UV-Diode bei 405 nm, CellMask™ DeepRed mit der 594 nm Linie eines Argon-Lasers angeregt. Die Detektion erfolgte für CFP in einem Wellenlängenbereich von 450-510 nm, für CellMask™ DeepRed zwischen 650-680 nm.

FRET-Messungen sollten zeigen, ob Iperoxo an den Tyr¹⁰⁴Ala mutierten Rezeptorsensoren in der Lage war eine Aktivierung hervorzurufen.

Dazu wurden HEK TSA-Zellen transient mit dem jeweiligen mutierten Sensor transfiziert und in nachfolgenden FRET-Experimenten mit Iperoxo (100 µM) stimuliert. Zur Kontrolle erfolgte eine Stimulation mit 10 mM ACh. Die Perfusion mit Iperoxo hatte eine messbare Änderung des FRET-Signals in allen Kanälen zur Folge. Dagegen konnte mit ACh lediglich eine geringe Änderung des FRET-Ratio erreicht werden.

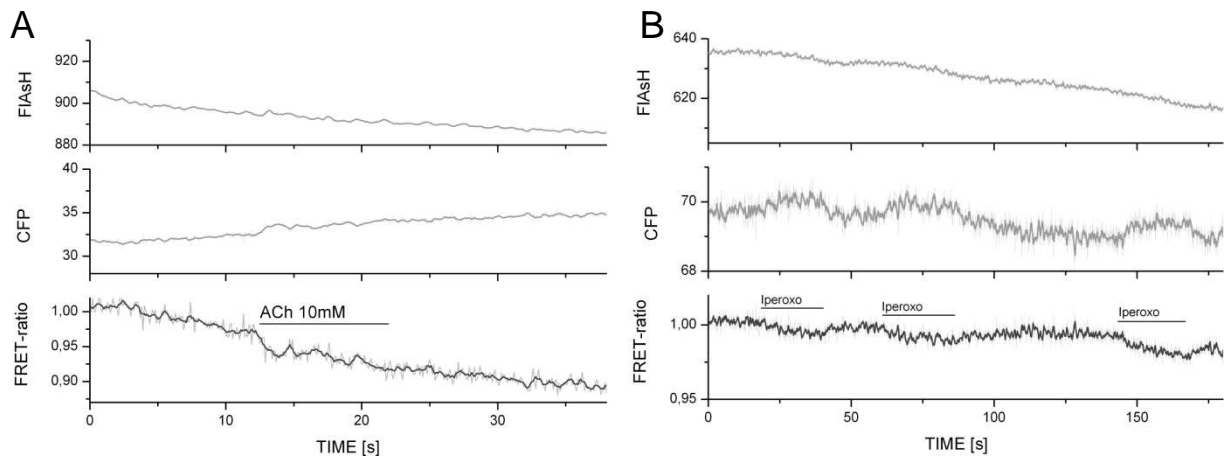


Abb. 80: FRET-Experimente zur Bestimmung der Effekte von Acetylcholin und Iperoxo am M_2i3-N Y104A Rezeptorsensor.

Zellen, die transient mit dem M_2i3-N Y104A Rezeptorsensor transfiziert worden waren, wurden mit 10 mM Ach (A) oder 100 μ M Iperoxo (B) stimuliert. Während die Stimulation mit ACh nur eine äußerst geringe Änderung des FRET-Signals induzierte, führte die Aktivierung des M_2i3-N Y104A Sensors mit Iperoxo zu einer deutlichen Abnahme des FRET-Ratio. Die FRET-Spuren wurden um Falschanregung und Durchbluten korrigiert, normalisiert und geglättet.

Es konnte somit festgestellt werden, dass durch die Mutation der Aminosäure Tyrosin¹⁰⁴ zu Alanin die Aktivität von Iperoxo am M_2 AChR zwar reduziert, aber nicht –wie Falle von ACh– fast vollständig inhibiert wurde.

4.8.2 Mutation der allosterischen Bindestelle

In Abschnitt 4.5.3 wurde gezeigt, dass H 1 und H 2 den M_2 AChR nicht in eine mittels FRET detektierbare, aktive Konformation überführen konnten. Eine mögliche Erklärung bestand darin, dass durch die Bindung des allosterischen Hybridbausteines die Linkerkette und der orthosterische Teil in einer sterisch ungünstigen Position vorlagen, durch die eine Bindung des Iperoxo-Teils an die orthosterische Bindestelle verhindert wurde. In vorhergehenden Studien wurde bereits gezeigt, dass Tyr¹⁷⁷ und Trp⁴²² für die Bindung und die Orientierung der Allosterie eine entscheidende Rolle spielen [254, 350].

Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden Rezeptormutanten der M_2i3-N und M_2i3-C Rezeptorsensoren kloniert, in denen die Aminosäuren Tyrosin¹⁷⁷ und Tryptophan⁴²² einzeln, oder zusammen zu Alanin mutiert wurden. Im Verlauf dieser Arbeit werden die so erzeugten Mutanten als M_2i3-N Y177A, M_2i3-N W422A, oder M_2i3-N Y177A/W422A, beziehungsweise M_2i3-C Y177A, M_2i3-C W422A, oder M_2i3-C Y177A/W422A bezeichnet.

Die Rezeptorsensoren wurden transient in HEK TSA-Zellen transfiziert und mittels Konfokalmikroskopie auf ihre Expression an der Zellmembran untersucht.

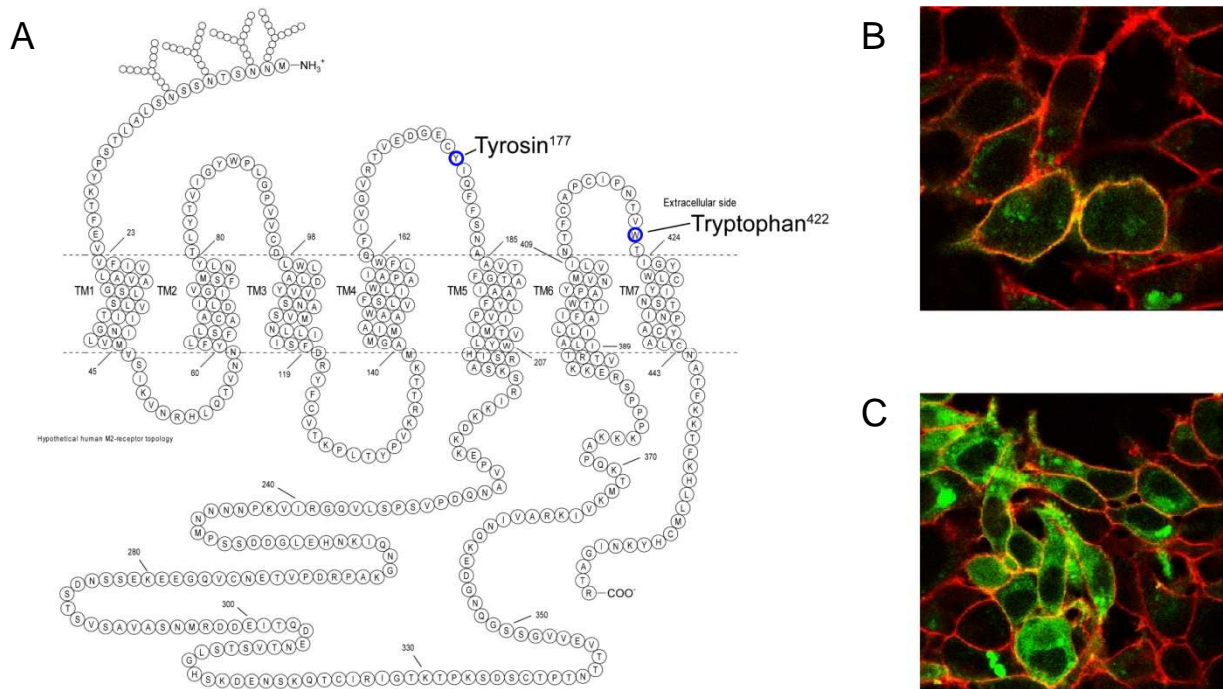


Abb. 81: Schematische Darstellung des M₂ Rezeptors (A) und konfokalmikroskopische Aufnahmen des M₂i3-C Y177A (B) sowie M₂i3-C W422A Rezeptorsensors (C).

In den Rezeptorsensoren wurden die Aminosäuren Tyrosin¹⁷⁷ und Tryptophan⁴²² zu Alanin mutiert (A, mutierte Aminosäuren blau markiert). Die Kontrolle der Membranexpression der Rezeptorkonstrukte erfolgte konfokalmikroskopisch in transient transfizierten HEK TSA-Zellen. (B) Das M₂i3-C Y177A Konstrukt zeigte eine deutlich erkennbare Überlagerung (gelb) der CFP-Fluoreszenz (grün) und der Fluoreszenz des Membranmarkers (rot). Der M₂i3-C W422A Sensor (C) zeigte eine starke zytosolische Anreicherung der CFP-Fluoreszenz (grün). Eine Überlagerung (gelb) von Rezeptorfluoreszenz (grün) und der Fluoreszenz des Membranmarkers (rot) war schwach erkennbar. Die Anregung von CFP erfolgte mit einer UV-Diode bei 405 nm. CellMask™ DeepRed wurde mit der 594 nm Linie eines Argon-Lasers angeregt. CFP wurde in einem Wellenlängenbereich von 450-510nm, CellMask™ DeepRed zwischen 650-680 nm detektiert.

Eine Membranexpression konnte lediglich für das M₂i3-C Y177A Konstrukt detektiert werden. Der M₂i3-C W422A Rezeptorsensor war dagegen fast ausschließlich im Zytosol der Zellen lokalisiert. Eine konfokalmikroskopische Untersuchung der Membranständigkeit der Doppelmutante wurde nicht durchgeführt. In anschließenden FRET-Experimenten konnte allerdings visuell festgestellt werden, dass M₂i3-N Y177A/W422A bzw. M₂i3-C Y177A/W422A hauptsächlich zytosolisch und nur schwach membranständig exprimiert wurden.

4.8.2.1 FRET-Messungen mit allosterisch mutierten Sensoren des muskarinischen M₂ Acetylcholinrezeptors

Mittels FRET-Experimenten sollte untersucht werden, ob nach der Mutation der allosterischen Bindestelle mit H 1 und H 2 eine Überführung der M₂ Rezeptorsensoren in eine detektierbare, aktive Rezeptorkonformation ermöglicht wurde. HEK TSA-Zellen, die transient mit dem entsprechenden Rezeptorsensor transfiziert waren, wurden in FRET-Experimenten mit H 1 und H 2 (100 µM) stimuliert. Zum Vergleich wurden die Zellen außerdem in jeder Messung mit 100 µM ACh und Iperoxo superfundiert. Zusätzlich wurden auch die Substanzen Naph-7-Iper und Naph-8-Iper getestet.

Ergebnisse

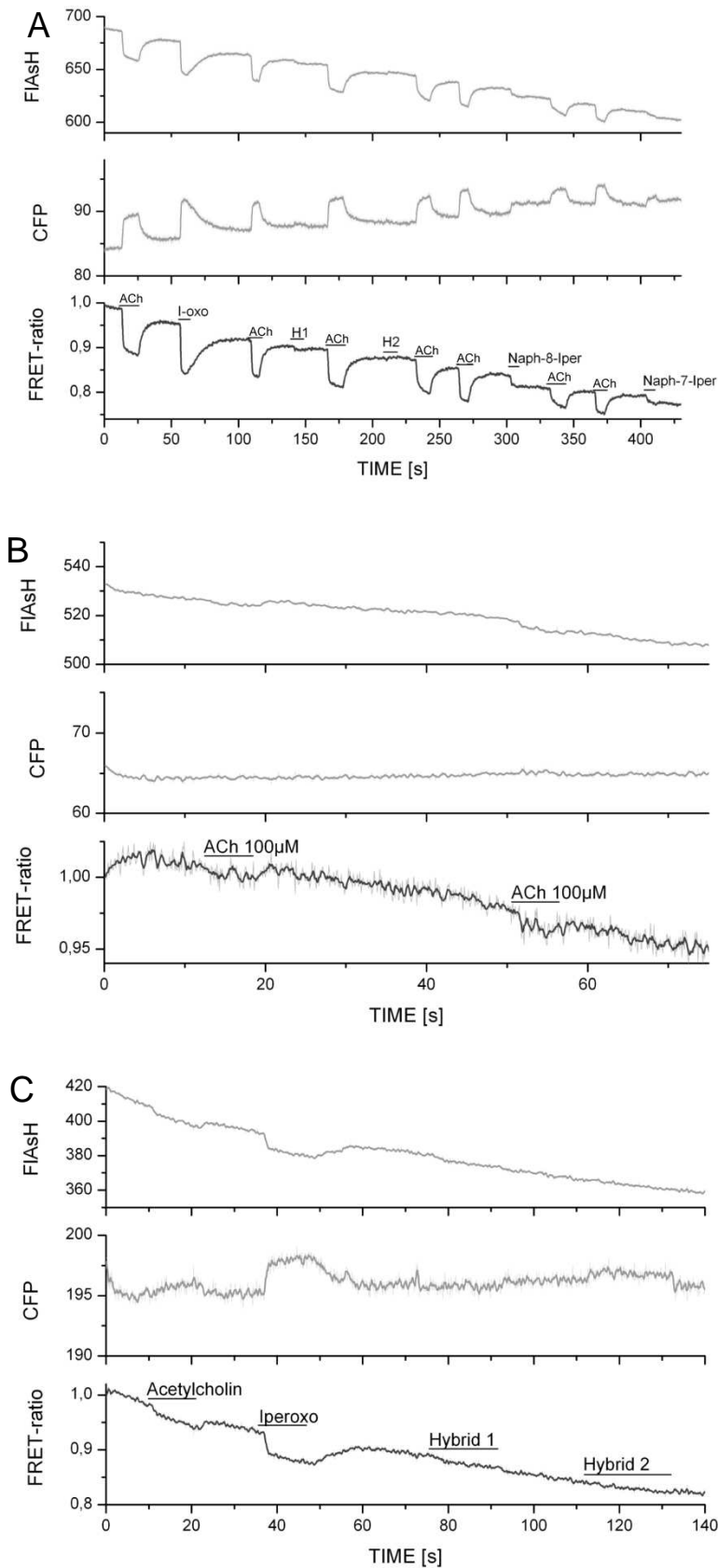


Abb. 82: Exemplarische FRET-Messungen erstellt am M_{2i3}-C Y177A (A), M_{2i3}-C W422A (B) und M_{2i3}-C Y177A/W422A (C) Rezeptor-sensor.

HEK TSA-Zellen, die transient mit den jeweiligen Rezeptorkonstrukten transfiziert worden waren, wurden in FRET-Messungen mit verschiedenen Liganden überspült (Konzentration 100 μ M). Während das M_{2i3}-C Y177A Rezeptorkonstrukt deutliche FRET-Signale nach Orthoster-Zugabe zeigte, konnte für die dualsterischen Liganden nur eine geringe, oder keine Signaländerung detektiert werden (A).

M_{2i3}-C W422A zeigte nur eine geringe FRET-Antwort nach Ligandenzugabe (B).

M_{2i3}-C Y177A/W422A zeigte nur nach orthosterischer Stimulation eine detektierbare FRET-Änderung, H 1 und H 2 blieben ohne messbaren Effekt (C). Alle FRET-Spuren wurden um Falschanregung und Durchbluten korrigiert, normalisiert und geglättet

(I-oxo = Iperoxo, H 1 = Hybrid 1, H 2 = Hybrid 2).

Die Auswertungen der FRET-Experimente ergaben folgende Befunde:

M₂i3-N Y177A bzw. M₂i3-C Y177A:

Sowohl ACh, als auch Iperoxo riefen eine Rezeptoraktivierung hervor, die mit der Aktivierung an den unmutierten Rezeptorkonstrukten vergleichbar war. H 2 zeigte keinen messbaren Effekt. Dagegen induzierten Naph-7-Iper, Naph-8-Iper und H 1 FRET-Antworten, die mit denen der nicht-mutierten Rezeptorkonstrukte vergleichbar waren.

M₂i3-N W422A bzw. M₂i3-C W422A:

ACh nur ein äußerst geringes FRET-Signal erzeugen.

M₂i3-N Y177A/W422A bzw. M₂i3-C Y177A/W422A:

Die Stimulation der Sensoren mit ACh und Iperoxo resultierte in einer detektierbaren Änderung des FRET-Ratio. H 2 konnte keine messbare Änderung des FRET-Ratio induzieren. H 1 rief nur am M₂i3-N Y177A/W422A, nicht dagegen am M₂i3-C Y177A/W422A Rezeptor eine Aktivierung hervor.

5. Diskussion

5.1 Klonierung von Sensoren des muskarinischen M_2 Acetylcholinrezeptors

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine ligandenselektive Beeinflussung der Rezeptorkonformation in verschiedenen Regionen des M_2 AChR in lebenden Zellen zu untersuchen. Forschungsergebnisse der letzten Jahre deuten darauf hin, dass Agonisten, Partialagonisten und auch inverse Agonisten die Konformation verschiedener GPCR selektiv beeinflussen [335, 351-355].

Allgemein führt eine Aktivierung von GPCR zu einer Änderung der Rezeptorkonformation im Bereich der Transmembrandomänen (TM, Kapitel 1.1.3). Untersuchungen der Kristallstruktur von Opsin zeigten, dass es dabei zu einer Entfernung von TM 5 und TM 6 von der Kernregion des Rezeptors kommt, wodurch im helikalen Bündel eine Öffnung entsteht, in die das G-Protein binden kann [356-359]. *Disulfid-Crosslinking* Studien am M_3 AChR ergaben, dass es nach Aktivierung des Rezeptors zu einer Annäherung der zytoplasmatischen Regionen von TM 5 und TM 6 kommt [360, 361]. Jensen *et al.* [362] zeigten am Beispiel des β_2 AR mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen, dass eine Rezeptoraktivierung eine Auswärts- und Aufwärtsbewegung der zytoplasmatischen Region von TM 6 in Richtung der Zellmembran zur Folge hat. Es ist wahrscheinlich, dass sich die Bewegung dieser beiden Transmembrandomänen auch in IL 3 fortsetzt. Hier wird eine Auswärtsbewegung der C-terminalen Region von IL 3 unterhalb von TM 6 postuliert [363-365]. Da mit unterschiedlichen Methoden an verschiedenen GPCR der Klasse A jeweils eine Konformationsänderung im intrazellulären Bereich von TM 5 und TM 6 gezeigt werden konnte, wird vermutet, dass die im Zuge einer Rezeptoraktivierung beobachtete Änderung der Konformation bei allen Mitgliedern der Klasse A GPCR konserviert verläuft.

Um eine ligandenselektive Änderung der Konformation des M_2 AChR zu detektieren, wurden FRET-Messungen in HEK293 Zellen, die verschiedene Sensoren des M_2 AChR exprimierten, durchgeführt. Bei der Generierung der Rezeptorkonstrukte des M_2 AChR lag der Fokus auf IL 3 des M_2 AChR. Hier sind wichtige Interaktionsstellen für die Effektoren nachgeschalteter Signalwege lokalisiert (Kapitel 1.2.1.4). Durch eine ligandenabhängige Konformationsänderung in IL 3 könnten diese für eine selektive Wechselwirkung mit verschiedenen Effektorproteinen exponiert werden.

Die in dieser Arbeit zur Untersuchung einer ligandenselektiven Konformationsänderung verwendeten Sensoren wurden am C-Terminus mit CFP markiert. Die Tetracysteinsequenz CCPGCC wurde in verschiedenen Regionen von IL 3 eingefügt. Die relativ große Länge von IL 3 (> 180 Aminosäuren) des M_2 AChR [341] und die geringe Größe der CCPGCC-Sequenz ermöglichen eine flexible Positionierung des FIAsh-Fluorophors in unterschiedlichen Bereichen von IL 3. Zudem ist eine Beeinflussung der Struktur von IL 3 durch die im Vergleich dazu relativ kleine Tetracysteinsequenz unwahrscheinlich. Beim Einschub des FIAsh-Bindemotivs wurde außerdem darauf geachtet, dass die potentiellen Phosphorylierungsstellen in IL 3 (Abb. 33, Seite 61) erhalten blieben. Durch die Einführung der Tetracysteinsequenz kann darüber hinaus eine akkurate Positionierung von FIAsh in IL 3 erreicht werden. Dies konnte auch durch Untersuchungen am α_{2A} Adrenorezeptor gezeigt werden [335].

Um die ligandenselektive Konformationsänderung zu detektieren, wurde die CCPGCC-Sequenz zum einen unterhalb von TM 5, zum anderen unterhalb von TM 6 in IL 3 eingefügt. In ersten FRET-Versuchen zeigten die Konstrukte $M_{2i3-C-1}$ bis $M_{2i3-C-4}$ lediglich eine geringe FRET-Antwort. Nach Stimulation des $M_{2i3-C-1}$ - und $M_{2i3-C-4}$ Sensors war eine

Abnahme des FRET-Ratio zu beobachten, dagegen trat mit den M₂i3-C-2- und M₂i3-C-3 Sensoren eine leichte Zunahme des FRET-Signals auf (Abb. 36, Seite 63 und Abb. 37, Seite 64).

Wegen der geringen Signalintensität der Rezeptorsensoren M₂i3-C-1 bis M₂i3-C-4 wurde in einem weiteren Schritt die Tetracyclinequenz zwischen den Aminosäuren Aspartat³⁵⁵ und Glutamat³⁵⁶ eingefügt (M₂i3-C Sensor). Der M₂i3-N Sensor wurde durch Einschub der CCPGCC-Sequenz zwischen den Aminosäuren Aspartat²²⁹ und Prolin²³⁰ erhalten (Abb. 33, Seite 61 und Abb. 40, Seite 65). Die Untersuchung der Membranexpression der Rezeptorsensoren zeigte eine ausgeprägte Membranlokalisation beider Konstrukte, sichtbar an der deutlichen Überlagerung der Fluoreszenz von Rezeptor und Membranmarker (Abb. 34, Seite 62 und Abb. 39, Seite 65).

Der M₂i3-N- und M₂i3-C Rezeptorsensor zeigten in FRET-Messungen mit sättigenden Konzentrationen von ACh eine Abnahme des FRET-Signals mit hohen Signalamplituden und einem lediglich geringen Rauschen (Abb. 35, Seite 62 und Abb. 38, Seite 64). Da durch das große Signal-Rausch Verhältnis auch die Detektion kleiner ligandenselektiver FRET-Änderungen möglich war, wurden diese Sensoren im weiteren Verlauf der Arbeit verwendet, um eine ligandenselektive Konformationsänderung im Bereich von IL 3 aufzuklären.

5.2 Charakterisierung der M₂ AChR-Sensoren hinsichtlich Ligandenaffinität und Funktionalität

Die funktionelle Charakterisierung des M₂i3-N- und M₂i3-C Sensors erfolgte mittels Radioligandenbindungsstudien, Messung der konzentrationsabhängigen Ca²⁺-Freisetzung und Bestimmung der ACh-induzierten Translokation von β -Arrestin2 zur Zellmembran.

5.2.1 Radioligandenbindungsstudien

Radioligandenbindungsstudien (Kapitel 4.3.1) wurden mit dem M₂i3-N-, M₂i3-C- und M₂CFP Rezeptor durchgeführt. Da es sich bei diesen um fluoreszenzmarkierte Rezeptorkonstrukte handelt, konnte vor der Membranpräparation die gleichmäßige Expression und Membranlokalisation der jeweiligen Sensoren überprüft werden.

Die in den Sättigungsexperimenten ermittelten K_D-Werte (Tab. 1, Seite 66) zeigten keine statistisch signifikante Abweichung der getesteten Rezeptoren voneinander und auch in den Verdrängungsexperimenten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem M₂i3-N- und dem M₂i3-C Sensor detektiert werden ($p < 0,01$). Die ermittelten K_i-Werte (Tab. 2, Seite 67) der beiden Rezeptorsensoren waren zudem mit bereits publizierten Werten vergleichbar [202, 337]. Es war somit gelungen, im Rahmen dieser Arbeit FRET-Sensoren des M₂ AChR zu klonieren, die hinsichtlich der Ligandenaffinität keinen Unterschied zum wt M₂ AChR zeigen.

5.2.2 Bestimmung der G-Protein Aktivierung

Da die Charakterisierung G_i gekoppelter GPCR mittels Messung der cAMP-Inhibition fehleranfällig und nur schwer reproduzierbar ist, wurde als zweite Methode zur Charakterisierung der M₂ Rezeptorsensoren die Bestimmung der konzentrationsabhängigen Ca²⁺-Freisetzung nach Stimulation mit Carbachol gewählt.

Unter physiologischen Bedingungen führt eine Stimulation des G_i gekoppelten M₂ AChR nicht zu einer Freisetzung von Kalziumionen. Dies kann jedoch durch die Co-Transfektion

des chimären $G_{\alpha q}$ G66Di5 Proteins ermöglicht werden. Nach Aktivierung eines G_i gekoppelten Rezeptors bindet das $G_{\alpha q}$ G66Di5 Protein an diesen, hemmt dann aber nachfolgend nicht die Adenylylzyklase, sondern aktiviert den G_q -vermittelten Phospholipase C-Signalweg [340]. Somit kann in Anwesenheit des chimären G-Proteins eine Aktivierung von M_2 AChR als Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration detektiert werden.

Bei der Charakterisierung der Rezeptorsensoren mittels G-Protein Aktivierung konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyprezeptor detektiert werden ($p < 0,05$; Tab. 3, Seite 68). Die Funktionalität des M_{2i3-N} - und des M_{2i3-C} Sensors konnte somit im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Bestimmung der G-Protein Aktivierung belegt werden.

5.2.3 Translokation von β -Arrestin2

Die Funktionalität der Rezeptorkonstrukte wurde darüber hinaus mittels konfokalmikroskopischer Messung der β -Arrestin2 Translokation nach Rezeptorstimulation mit 100 μ M ACh überprüft. In diesen Versuchen wurden die M_2 CFP-, Flag- M_2 -sl3-FIAsH-GSGEG-CFP-, M_{2i3-N} - und M_{2i3-C} Rezeptoren miteinander verglichen.

In Vorversuchen am M_2 CFP Rezeptor wurden die Versuchsbedingungen zur Induktion einer β -Arrestin2 Translokation optimiert. Die β -Arrestin2 Rekrutierung wurde in Abwesenheit von G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) und Anwesenheit der ubiquitär exprimierten GRK2 und GRK5 untersucht [366]. Ohne GRK konnte keine Rekrutierung von β -Arrestin2 an die Zellmembran beobachtet werden. Während auch in Gegenwart von GRK5 keine β -Arrestin2 Translokation auftrat, führte eine Co-Expression von M_2 CFP mit GRK2 zu einer detektierbaren Translokation von β -Arrestin2 an die Zellmembran (Abb. 44, Seite 70). Dies korreliert mit Daten aus früheren Studien wonach der M_2 AChR ein sehr gutes Substrat für GRK2 und GRK3 darstellt, wohingegen er nur in geringem Ausmaß durch GRK5 und GRK6 phosphoryliert wird [367-370]. Wu *et al.* [341] postulierten, dass auch unabhängig von einer Rezeptorphosphorylierung eine Interaktion zwischen β -Arrestin2 und dem M_2 AChR beobachtet werden kann. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Außer Flag- M_2 -sl3-FIAsH-GSGEG-CFP induzierten alle Sensoren des M_2 AChR nach Stimulation eine vergleichbare Translokation von β -Arrestin2 zur Zellmembran (Abb. 45, Seite 71). Somit zeigten die Rezeptorsensoren M_{2i3-N} und M_{2i3-C} hinsichtlich der β -Arrestin2 Translokation keine Unterschiede gegenüber dem wt M_2 Rezeptor. Durch das Einfügen der FIAsH-Bindesequenz waren folglich keine der für eine Interaktion mit β -Arrestin2 wichtigen Bereiche in IL 3 des M_2 AChR beeinträchtigt worden.

Schlador und Nathanson [370] und Wu *et al.* [341] konnten bereits zeigen, dass IL 3 sowohl bei der Interaktion des M_2 AChR mit β -Arrestin1 als auch bei der Wechselwirkung mit β Arrestin2 eine wichtige Rolle spielt. Die Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des um IL 3 trunkierten Flag- M_2 -sl3-FIAsH-GSGEG-CFP Sensors hinsichtlich einer Translokation von β -Arrestin2 erhalten wurden, bekräftigen diese Aussage.

Die Charakterisierung der verschiedenen Sensoren des M_2 AChR mittels Ligandenbindung, G-Protein Aktivierung und β -Arrestin2 Translokation ergab dass sich die Sensoren hinsichtlich Ligandenaffinität und Funktionalität vergleichbar zum wt M_2 AChR verhalten. Damit wurde gezeigt, dass bezüglich der untersuchten Parameter die Funktionalität der M_{2i3-N} - und M_{2i3-C} Konstrukte durch den Einschub der Tetracysteinsequenz und des CFP nicht beeinflusst wird.

5.3 Charakterisierung der verwendeten Liganden

5.3.1 Superagonistisches Verhalten des orthosterischen Liganden Iperoxo

Bislang wurden die Eigenschaften des orthosterischen Liganden Iperoxo unter anderem in [³⁵S] GTPγS-Assays und funktionellen Experimenten an Blutgefäßen und am Herzen untersucht [371, 372]. Das Verhalten von Iperoxo in FRET-Messungen an lebenden Zellen war nicht bekannt. Deshalb wurden in dieser Arbeit Konzentrations-Wirkungskurven dieses von Oxotremorin abgeleiteten Liganden mittels FRET-Experimenten erstellt. Der Vergleich zwischen Iperoxo und dem endogenen Liganden ACh zeigte eine deutliche Linksverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve von Iperoxo gegenüber ACh. $EC_{50/Iperoxo}$ war mit $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$ signifikant niedriger, als $EC_{50/ACh}$ ($EC_{50/ACh} = 6,3 \pm 0,7 \mu\text{M}$, $p < 0,01$). Zudem erzielte Iperoxo in den FRET-Messungen einen höheren Maximaleffekt, als die Vergleichssubstanz (Abb. 46, Seite 72). Auf Grund dieser Datenlage konnte mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit konstruierten Sensoren des M_2 AChR das superagonistische Verhalten [373] von Iperoxo, wie es bereits von Klöckner *et al.* [371] beschrieben wurde nun auch in FRET-Experimenten bestätigt werden.

5.3.2 Charakterisierung der allosterischen Testliganden als negative allosterische Modulatoren

Um die allosterischen Testliganden (Abb. 51 und 52, Seite 78) in dieser Studie zielgerichtet einsetzen zu können, wurden deren Affinität zum M_2 AChR und die maximale Wirkstärke in FRET-Experimenten bestimmt. Da allosterische Modulatoren allein in FRET-Experimenten keine messbaren Effekte hervorrufen [337], war es nötig eine Kombination aus allosterischen Modulatoren zusammen mit einem orthosterischen Agonisten einzusetzen. In Vorüberlegungen wurde die optimale Konzentration an orthosterischen Liganden zur Detektion selbst kleiner Effekte der allosterischen Modulatoren ermittelt. Dazu wurde angenommen, dass es sich bei den allosterischen Testliganden um negative allosterische Modulatoren (NAM) handelte. Mit NAM konnte bereits in vorhergehenden FRET-Experimenten eine partielle Inhibition der orthosterisch-vermittelten Rezeptoraktivierung gezeigt werden [337]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit der Erarbeitung des sogenannten Zahnschemas (Abb. 50, Seite 76) ein Messschema entwickelt, das sich optimal zur Charakterisierung allosterischer Modulatoren in FRET-Experimenten eignet. Um die Effekte der Allosterie am M_2 AChR sichtbar zu machen, war eine Vorstimulation des Rezeptors erforderlich. Um darüber hinaus ein ausreichend großes Detektionsfenster zur Sichtbarmachung geringer Einflüsse der allosterischen Testsubstanzen zu schaffen, wurden die orthosterischen Agonisten ACh und Iperoxo in Konzentrationen eingesetzt, die eine ca. 80%-ige Aktivierung des M_2 AChR induzieren (Iperoxo $10 \mu\text{M}$, ACh $30 \mu\text{M}$).

In Anwesenheit von ACh wurden die Konzentrations-Wirkungskurven der allosterischen Modulatoren am M_2i3 -N Sensor bestimmt. Am M_2i3 -N- und M_2i3 -C Konstrukt erfolgte darüber hinaus die Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurven der Allosterie mit Iperoxo. Alle allosterischen Testsubstanzen minderten die Aktivierung der Rezeptorsensoren konzentrationsabhängig (Abb. 53, Seite 79). Somit konnte mit Hilfe der FRET-Methode die negative Kooperativität zwischen den allosterischen Liganden und ACh bzw. Iperoxo belegt werden. Gleichzeitig konnte die Existenz einer *probe dependency* der allosterischen Liganden mit ACh und Iperoxo, wie sie beispielsweise für die Substanz LY2033298 am M_4 AChR gezeigt

wurde [203], ausgeschlossen werden. Um darüber hinaus das Auftreten einer *probe dependency* der allosterischen Substanzen mit anderen orthosterischen Liganden am M_2 AChR zu untersuchen, wären ergänzende Experimente mit Kombinationen aus allosterischen und weiteren orthosterischen Liganden notwendig.

Außer JK 337 zeigten alle allosterischen Testliganden in Kombination mit Iperoxo eine Sättigung des Hemmeffekts auf die Rezeptorstimulation (Abb. 63, Seite 90). Mit JK 337 konnte eine vollständige Inhibition der Rezeptoraktivierung beobachtet werden. Dies legt nahe, dass es sich bei dieser Substanz um einen stark negativen allosterischen Modulator handelt. Entsprechend ist aus Radioligandenbindungsstudien und funktionellen Experimenten bekannt, dass im Falle starker negativer Kooperativität eine Unterscheidung zwischen allosterischer Modulation und orthosterischer Kompetition nicht mehr zweifelsfrei möglich ist [197].

Um die Messbedingungen zu überprüfen, wurde in FRET-Messungen der konzentrationsabhängige Hemmeffekt des orthosterischen Antagonisten Atropin auf den mit Iperoxo vorstimulierten M_2 AChR untersucht. Hier trat eine vollständige Deaktivierung des vorstimulierten Rezeptors auf (Abb. 56, Seite 82). Eine Sättigung des Atropin-vermittelten Hemmeffekts war demnach nicht zu beobachten.

Das Auftreten eines *Ceiling*-Effekts zählt zu einem wesentlichen Kriterium, nach dem allosterische und orthosterische Liganden voneinander unterschieden werden können [188]. Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten FRET-Messungen konnte die allosterische Identität und negative Kooperativität der Testsubstanzen anhand des Auftretens eines sättigbaren Hemmeffekts belegt werden.

Die Kombination aus EHW 477 und Iperoxo zeigte eine stärkere Hemmung am M_2i3 -N-, verglichen mit dem M_2i3 -C Sensor. Gegenteilige Effekte konnten mit den Kombinationen aus Iperoxo und Seminaph bzw. JK 337 detektiert werden. Alle anderen allosterischen Liganden wiesen kombiniert mit Iperoxo an beiden Rezeptorkonstrukten eine vergleichbare Hemmwirkung auf (Abb. 53 A und B, Seite 79 und Abb. 63, Seite 90).

JK 289 und Seminaph, die tatsächlichen allosterischen Bausteine von H 1 und H 2 (Abb. 51 und 52, Seite 78) erzielten jeweils die geringste Hemmung an den Sensoren des M_2 AChR. Eine chemische Veränderung von JK 289 und Seminaph, gleich welcher Art, resultierte folglich in einer Affinitätszunahme der allosterischen Liganden zum M_2 AChR. Die stärkste Hemmung konnte mit JK 337, JK 338 und $\frac{1}{2}$ W84 beobachtet werden. Dies wäre am Beispiel von JK 337 durch das Vorhandensein einer zweiten, positiv geladenen Stickstofffunktion, die zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Rezeptor ermöglicht, erklärbar. JK 338 und $\frac{1}{2}$ W84 stellen Derivate des JK 289 dar, die um zusätzliche Kohlenstoffgruppen ergänzt wurden. Diese könnten zur Ausbildung zusätzlicher hydrophober Kontakte zwischen Substanz und M_2 AChR beitragen.

Die Inhibition, die durch das JK 289-„Dimer“ W 84 am M_2 AChR hervorgerufen wurde, war um ca. den Faktor 2 stärker, als die durch JK 289 induzierte. Ein möglicher Erklärungsansatz besteht in dem Vorhandensein einer zweiten, positiv geladenen Stickstofffunktion und eines zusätzlichen Ringsystems. Diese könnten zusätzliche polare und hydrophobe Wechselwirkungen zwischen W 84 und dem M_2 AChR ermöglichen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass W 84 als Dimer des JK 289 die doppelte Anzahl an bindenden Gruppen zur Verfügung stellt und somit in zwei verschiedenen Orientierungen binden kann. Verglichen mit JK 337, JK 338 und $\frac{1}{2}$ W84 betrug die Hemmwirkung von W84 allerdings nur ca. 50%. Dies könnte eventuell daraus resultieren, dass durch die Größe von W 84 eine effektive Kopplung an den M_2 AChR sterisch gehindert wird.

Während für die Derivate des JK 289 ein Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und maximal erreichbarer Rezeptorinhibition hergestellt werden kann, zeigten die Analoga des Seminaph kaum Unterschiede in dem Ausmaß, in dem sie den vorstimulierten M₂AChR inhibieren.

Der Vergleich der EC₅₀-Werte der allosterischen Testsubstanzen (Tab. 4, Seite 80 und Tab. 5, Seite 81) zeigte, dass das M₂i3-N Konstrukt durch eine Kombination aus JK 289 bzw. JK 338 mit ACh in geringeren Konzentrationen inhibiert wird, als in Kombination mit Iperoxo. Alle anderen Allosterie hemmten den M₂i3-N Sensor unabhängig von dem orthosterischen Liganden mit jeweils vergleichbaren effektiven Konzentrationen. Beim Vergleich der EC₅₀-Werte der allosterischen Substanzen in Kombination mit Iperoxo an den jeweiligen Rezeptorsensoren wurde beobachtet, dass JK 289, JK 338, ½ W84 und EHW 477 eine höhere Affinität zum M₂i3-C Sensor aufweisen, als zum M₂i3-N. Alle übrigen Testliganden zeigen ähnliche mittlere effektive Konzentrationen an beiden Sensoren. Unabhängig von dem eingesetzten Testliganden zeigte JK 289 sowohl am M₂i3-C-, als auch am M₂i3-N Rezeptorkonstrukt die geringste Affinität.

Die Affinität der Allosterie zu der Rezeptorsensoren M₂i3-N und M₂i3-C nahm unabhängig von den orthosterischen Liganden in folgender Reihenfolge zu:

JK 289 < ½ W84 < JK 338 < JK 519 < W 84/Seminaph < EHW 477/JK 337 < Naphmethonium

Die Betrachtung der Struktur-Wirkungsbeziehungen der allosterischen Substanzen ergab, dass das Vorhandensein einer zweiten, positiv geladenen Amin-Funktion, sowie die Verlängerung der Kohlenstoffkette in einer Affinitätszunahme zum Rezeptor resultieren. Das Vorhandensein einer Dimethylgruppe hat dagegen nur wenig Einfluss auf die Ligandenaffinität.

Sowohl W 84, als auch Naphmethonium beinhalten einen JK 289-Baustein. Während es sich bei W 84 um das Dimer des JK 289 handelt, wird Naphmethonium aus JK 289 und Seminaph gebildet. Die mittlere effektive Konzentration von Naphmethonium war um den Faktor 10 niedriger als die des W 84. Somit bindet Naphmethonium den M₂AChR mit höherer Affinität als W 84. Diese Affinitätszunahme kann mutmaßlich durch das ausgeprägte Ringsystem verursacht werden, durch das mehr Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand gebildet werden können.

Die in dieser Arbeit gemessenen Daten charakterisieren alle getesteten allosterischen Liganden als negative allosterische Modulatoren des M₂AChR. Unabhängig von dem eingesetzten orthosterischen Liganden konnte eine negative Kooperativität beobachtet werden, dies schließt die Existenz einer *probe dependency* der allosterischen Liganden in Kombination mit Iperoxo und ACh aus. Außer JK 337 erfüllten alle allosterischen Liganden das Kriterium des *Ceiling*-Effekts. Ein direkter Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und Wirkstärke sowie Affinität der allosterischen Testliganden konnte in FRET-Experimenten nicht zweifelsfrei ermittelt werden. *Docking*-Experimente, oder Kristallstrukturen des M₂AChR gebunden an Allosterie können dabei helfen, das Auftreten zusätzlicher Wechselwirkungen zwischen den allosterischen Liganden und dem M₂AChR zu belegen. Die Erarbeitung einer möglichen Korrelation zwischen der Wirkstärke allosterischer Liganden und deren chemischer Struktur und somit die Erstellung von Struktur-Wirkungsbeziehungen könnte bei der Entwicklung neuer, selektiver Arzneistoffe für den M₂AChR hilfreich sein.

5.3.3 Vergleich der Kinetik der Rezeptordeaktivierung mit allosterischen Modulatoren und Atropin

Da allosterische Modulatoren an eine zweite Bindestelle im Rezeptor binden, tritt in Gegenwart eines orthosterischen Liganden keine Konkurrenz um die orthosterische Bindestelle auf. Dagegen binden orthosterische Agonisten und Antagonisten an dieselbe Stelle des Rezeptors und treten somit in Konkurrenz zueinander. Im Falle eines Antagonisten muss erst der orthosterische Agonist aus der Bindestelle dissoziieren, bevor der Antagonist selbst an den Rezeptor binden kann. Folglich können Allosterische einen aktivierten Rezeptor mit einer schnelleren Kinetik inhibieren als orthosterisch bindende Antagonisten. Dies konnte bereits in früheren Studien am M₂ AChR mit den allosterischen Liganden Gallamin, Dimethyl-W 84 und dem orthosterischen Antagonisten Atropin gezeigt werden ($\tau_{\text{Gallamin/ACh}} = 87,2 \pm 6,6 \text{ ms}$, $\tau_{\text{Dimethyl-W84/ACh}} = 212 \pm 46 \text{ ms}$, $\tau_{\text{Atropin/ACh}} = 677 \pm 68 \text{ ms}$) [337]. Wie diese Ergebnisse zeigen, stellt die beschleunigte Kinetik der allosterisch-vermittelten Rezeptordeaktivierung eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit zwischen allosterischen und orthosterischen Modulatoren dar.

Zur weiteren Charakterisierung der Eigenschaften der allosterischen Testsubstanzen wurde deshalb in FRET-Messungen die Deaktivierungskinetik der unterschiedlichen Liganden am M₂ AChR bestimmt.

Es wurde beobachtet, dass alle in dieser Arbeit verwendeten allosterischen Liganden den mit 10 μM Iperoxo vorstimulierten M₂i3-C Sensor signifikant schneller deaktivierten als Atropin ($p < 0,01$; Abb. 58, Seite 84).

Tab 9: Deaktivierungskinetik allosterischer Modulatoren und orthosterischer Antagonisten.

Aus den FRET-Messungen zur Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurven der allosterischen Modulatoren und Atropin wurde die *Off*-Kinetik der einzelnen Liganden ermittelt und statistisch analysiert ($n \geq 12$).

Ligand	Nummer	Deaktivierungskinetik [ms]
Atropin	18	1110 \pm 130
JK 289	20	300 \pm 26
JK 338	22	370 \pm 30
JK 337	21	440 \pm 40
W 84	24	445 \pm 41
EHW 477	26	450 \pm 30
Naphmethonium	28	540 \pm 60
Seminaph	25	580 \pm 60
JK 519	27	600 \pm 35

Die Deaktivierungsgeschwindigkeit der Derivate von JK 289 nimmt tendenziell mit zunehmender Kettenlänge ab, eine statistisch signifikante Aussage ist allerdings nicht möglich. Beim Vergleich zwischen den chemischen Strukturen und der Deaktivierungskinetik der Seminaph-Derivate konnte ein solcher Zusammenhang dagegen nicht beobachtet werden. Darüber hinaus wurde der aktivierte M₂i3-C Sensor durch den tatsächlichen H 1-Baustein JK 289 schneller inhibiert als durch den H 2-Baustein Seminaph ($p < 0,01$). Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis besteht darin, dass JK 289 durch die kleinere Ring-

struktur einfacher und schneller an die allosterische Bindestelle bindet, während das größere Ringsystem von Seminaph die Wechselwirkungen zwischen Ligand und Rezeptor erschwert. Vergleicht man die in dieser Arbeit ermittelten τ -Werte mit den Literaturwerten [337], so fällt auf, dass die publizierten Deaktivierungskinetiken schneller sind, als die in dieser Studie gemessenen. Dies könnte das Resultat unterschiedlicher Messbedingungen sein, so erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Bestimmung der Deaktivierungskinetik nicht in Gegenwart von 100 μM ACh, sondern mit 10 μM Iperoxo. Diese Konzentration induziert allerdings eine ca. 120%-ige Rezeptoraktivierung verglichen mit 100 μM ACh (Abb. 46, Seite 72). Da sowohl $\tau_{\text{Atropin/Iperoxo}}$, als auch $\tau_{\text{W84/Iperoxo}}$ ca. um den Faktor 2 im Vergleich zu den τ -Werten aus Maier-Peuschel *et al.* [337] verlangsamt sind, ist eine interne Vergleichbarkeit der Messwerte jedoch gegeben.

Weitere Möglichkeiten die allosterischen Testliganden zu charakterisieren bestehen beispielsweise in der Durchführung von Radioligandenbindungsstudien mit dem Tritium-markierten orthosterischen Antagonisten [^3H] NMS, oder dem radioaktiven Alloster [^3H] Dimethyl-W84. Der orthosterische Radioligand ermöglicht die Detektion der allosterisch-vermittelten Verzögerung oder Beschleunigung der [^3H] NMS-Dissoziationsrate [270]. Mit [^3H] Dimethyl-W84 können hingegen die K_i -Werte der verschiedenen allosterischen Liganden in Verdrängungsexperimenten bestimmt werden [374]. Auch die Durchführung funktioneller Experimente wäre denkbar. Hier könnte beispielsweise der Einfluss allosterischer Liganden auf die Aktivierung des G_i -Proteins, oder die Inhibition der cAMP-Bildung untersucht werden.

5.4 Ligandenselektive Beeinflussung der Konformation des muskarinischen M_2 Acetylcholinrezeptors

Kenntnisse über die Induktion von ligandenselektiven Rezeptorkonformationen sind von großem Interesse für die pharmazeutische Industrie. Sie können zu der Entwicklung stärker wirksamer und selektiver bindender Pharmaka beitragen, wodurch letztlich auch das Auftreten von unerwünschten Arzneimittelwirkungen verhindert bzw. reduziert wird.

5.4.1 Einfluss orthosterischer Liganden

Zur Detektion von Änderungen der Rezeptorkonformation mittels FRET ist generell ein Rezeptor-Sensor, in dem Donor- und Akzeptorfluorophor in unterschiedlichen Regionen des Rezeptors eingebracht sind, ausreichend. Die Bindung eines Liganden beeinflusst die Konformation des Rezeptors, wodurch sich die relative Position der beiden Fluorophore zueinander verändert. Dies kann in FRET-Messungen als Änderung des Ratio erfasst werden. Legt man die Abstandsabhängigkeit des FRET-Ereignisses zu Grunde, kann davon ausgegangen werden, dass eine Abnahme des FRET-Ratio aus einer Entfernung der beiden Fluorophore voneinander resultiert. Da bei einer Zunahme der Distanz zwischen Akzeptor und Donor weniger Energie vom Donor- auf das Akzeptorfluorophor übertragen wird, nimmt auch das FRET-Ratio ab.

Soll die ligandenselektive Änderung der Konformation eines Rezeptors untersucht werden, sind mindestens zwei Sensoren desselben Rezeptors nötig [335, 375]. Der Vergleich der FRET-Signale, die durch Testliganden an beiden Rezeptorsensoren hervorgerufen werden, lässt Rückschlüsse auf die selektive Beeinflussung der Rezeptorkonformation durch unterschiedliche Liganden zu. Werden beide Rezeptorsensoren durch alle Liganden im jeweils gleichen Ausmaß beeinflusst, wird gemäß der theoretischen Überlegungen (Kapitel 1.4.2.2)

erwartet, dass bei der grafischen Gegenüberstellung der ligandenspezifischen FRET-Antworten an den jeweiligen FRET-Sensoren alle Messpunkte auf der Winkelhalbierenden zwischen x- und y-Achse liegen. Daraus kann geschlossen werden, dass in beiden Sensoren die relative Distanzänderung der beiden Fluorophore zueinander ähnlich ist. Dies gibt erste Hinweise darauf, dass in dem durch Akzeptor und Donor markierten Bereich des Rezeptors keine ligandenselektive Änderung der Rezeptorkonformation auftritt.

Werden die Rezeptorsensoren durch verschiedene Liganden in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst, wird entsprechend der theoretischen Vorüberlegungen beim grafischen Vergleich der FRET-Signale, die von den jeweiligen Liganden an beiden Sensoren hervorgerufen werden, keine Orientierung der einzelnen Messwerte an der Winkelhalbierenden erwartet. Die Beobachtung ligandenselektiver Unterschiede der FRET-Signale an beiden Rezeptorkonstrukten, deutet auf eine sensorspezifische Änderung der relativen Distanz zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor hin. Ist beispielsweise das Ausmaß der FRET-Antwort in Sensor A geringer als in Sensor B, so erlaubt dies die Annahme, dass der Abstand zwischen Donor und Akzeptor in Sensor B stärker zunimmt, als in Sensor A. Diese Beobachtung liefert Hinweise auf eine ligandenselektive Beeinflussung der Rezeptorkonformation.

Bei der Generierung der Sensoren des M_2 AChR war zu beachten, dass Donor und/oder Akzeptor in Rezeptorbereiche eingebracht werden müssen, die wahrscheinlich einer ligand-induzierten Bewegung unterliegen. Hinweise auf zur Fluoreszenzmarkierung geeignete Regionen lieferte dabei die Untersuchung der Konformationsänderung des Rhodopsin nach Aktivierung zu Opsin [365].

Bereits in früheren Untersuchungen am M_3 AChR wurde gezeigt, dass mit Hilfe der FRET-Technik ligandenselektive Änderungen der Rezeptorkonformation detektiert werden können [376]. Hier riefen die Partialagonisten Muskarin, Pilocarpin und 5-Methylfurmethiodid eine Konformationsänderung hervor, die sich von der durch ACh induzierten unterscheidet. Ziel dieser Arbeit war es nun, zu untersuchen, ob auch die Konformation des M_2 AChR durch verschiedene orthosterische Liganden beeinflusst wird. Dazu wurden mit Hilfe der FRET-Mikroskopie Agonisten, Partialagonisten und Antagonisten am M_2i3 -C- und M_2i3 -N Konstrukt getestet. Die Konzentration der eingesetzten Liganden (100 μ M) wurde dabei so gewählt, dass eine sättigende Rezeptorbesetzung erreicht wurde (www.iuphar-db.org). Als Referenzsubstanz diente der endogene Ligand ACh. Die durch eine Stimulation mit ACh hervorgerufene Änderung des FRET-Ratio wurde an beiden Rezeptorsensoren als 100%-Wert festgelegt.

Die Stimulation der Rezeptorkonstrukte M_2i3 -C bzw. M_2i3 -N mit Agonisten und Partialagonisten führte zu einer Abnahme der FIAsh-Fluoreszenz und reziprok zu einer Zunahme der CFP-Fluoreszenz. Dies resultierte in einer Abnahme des FRET-Ratio (Abb. 59, Seite 85). Nach Superfusion mit Antagonisten, bzw. inversen Agonisten konnte keine Änderung der FRET-Signale detektiert werden.

Aus früheren Studien ist bekannt, dass Rezeptoren nach Antagonistenbindung nicht in eine aktive Konformation überführt werden. Dies konnte am Beispiel des β_1 und β_2 AR gezeigt werden, an denen Antagonisten durch ihre relativ große Struktur die zur Aktivierung des Rezeptors nötige Kontraktion der orthosterischen Bindetasche verhindern [83, 377]. Da viele der Aminosäuren, die eine Agonistbindung mit nachfolgenden Änderungen der Rezeptorkonformation verlinken, in den GPCR der Klasse A hoch konserviert sind, geht man davon aus, dass die Kontraktion der orthosterischen Bindetasche in allen Klasse A GPCR eine Voraussetzung zur Annahme einer aktiven Rezeptorkonformation darstellt [378]. Entsprechend wird eine derartige Konformationsänderung als Folge einer Agonistbindung auch für den M_2 AChR

postuliert. Untersuchungen der 3D-Struktur des M₂ AChR ergaben, dass der Antagonist QNB bei einer Bindung an den M₂ AChR zwar Wechselwirkungen mit vielen Aminosäuren eingeht, die auch von Agonisten gebunden werden, eine Kontraktion der orthosterischen Bindetasche des M₂ AChR wird aber wegen der Größe des Liganden verhindert [6]. Der Übergang des Rezeptors von der inaktiven in die aktive, detektierbare Rezeptorkonformation ist demnach nicht möglich.

Das fehlende Auftreten von FRET-Signalen nach Bindung von Antagonisten kann auch aus dem Messaufbau resultieren. Eine Möglichkeit dies zu testen stellt beispielsweise die Verwendung konstitutiv aktiver Mutanten des M₂ AChR dar. Auf diese Weise können inverse Agonisten hinsichtlich ihrer Fähigkeit ligandenselektive Rezeptorkonformationen zu induzieren untersucht werden [379]. Der Effekt von Antagonisten auf die Änderung der Rezeptorkonformation könnte beispielsweise mit vorstimulierten Rezeptoren getestet werden. Alternativ können auch Rezeptorsensoren des M₂ AChR, in die Akzeptor- und Donorfluorophore an anderen Regionen eingebracht sind, zur Aufklärung beitragen. *Disulfid-Crosslinking* Studien am M₃ AChR geben dabei erste Anhaltspunkte, dass es nach Bindung inverser Agonisten an den Rezeptor zu einer Annäherung zwischen Helix 8 im C-Terminus und TM 1 kommt [355]. Die Fluoreszenzmarkierung der M₂ AChR Sensoren in IL 3 und am C-Terminus erlaubt die Detektion einer solchen Bewegung mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wahrscheinlich nicht.

Der Vergleich der Amplitudenhöhe der FRET-Signale (Abb. 61, Seite 87 und Abb. 62, Seite 89), die durch die unterschiedlichen Testliganden hervorgerufen wurden, ermöglichte eine Unterteilung der Liganden in drei Gruppen (Gruppe A-B):

Tab. 10: Unterteilung der orthosterischen Testliganden in drei Gruppen anhand der maximal hervorgerufenen Rezeptoraktivierung.

Abhängig von dem Ausmaß, in dem die verschiedenen Liganden in FRET-Experimenten die M₂ AChR Sensoren aktivierten, wurden sie in drei Gruppen (A-B) unterteilt. Die genauen Werte zur Rezeptoraktivierung können Tabelle 6 (Seite 88) entnommen werden.

Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
Rezeptoraktivierung ≥ 80%	Rezeptoraktivierung < 80%, ≥ 10%	Rezeptoraktivierung < 10%
ACh	5-Methylfurmethiodid	Acetylthiocholin
Acetyl-β-methylcholin	Arecaidin	Atropin
Carbachol	Arecolin	Ipratropium
Iperoxo	Carbamyl-β-methylcholin	McN-A 343
Muscarin	Oxotremorin	Pirenzepin
OxotremorinM	Pilocarpin	Scopolamin
		Telenzepin

Der Vergleich der maximalen Rezeptoraktivierung, die durch die verschiedenen Liganden an den beiden Rezeptorsensoren erreicht wurde, zeigt, dass die einzelnen Messwerte nur gering von der Winkelhalbierenden zwischen x- und y-Achse abweichen (Abb. 62, Seite 89). Es kann somit geschlussfolgert werden, dass die relative Distanzänderung zwischen Donor und Akzeptor abhängig vom eingesetzten Liganden in beiden Sensoren jeweils vergleichbar ist.

Partialagonisten (Gruppe B) induzierten am M_2 AChR eine geringere Änderung des FRET-Signals, als der endogene Ligand ACh. Die FRET-Signale zeigten allerdings an beiden Rezeptorsensoren ligandenabhängig die gleiche Intensität. Dies erlaubt die Hypothese, dass die Liganden der Gruppe B die Konformation des M_2 AChR in geringerem Ausmaß änderten, als ACh.

Basierend auf dem Zwei-Stadien Modell liegen GPCR nur in zwei unterschiedlichen Konformationen vor (aktiv und inaktiv). Demnach ist es möglich, dass die Partialagonisten der Gruppe B anders als ACh, nur einen Teil der Rezeptoren in eine aktive Konformation überführen. Dies spiegelt sich in einer geringeren Intensität der FRET-Signale wieder.

Entsprechend neueren Erkenntnissen geht man mittlerweile jedoch davon aus, dass GPCR in mehreren verschiedenen Konformationen vorliegen können. Diese Vermutung wird von Untersuchungen von Swaminath *et al.* [217] gestützt. Diese zeigten, dass die Konformationsänderung des β_2 AR von der Art des verwendeten Liganden abhängig ist. Während Agonisten den β_2 AR in eine vollaktive Konformation überführen, können Partialagonisten lediglich Intermediärstadien einer vollaktiven Rezeptorkonformation induzieren. Auch am β_1 AR konnten Belege für die Existenz unterschiedlicher Rezeptorkonformationen gefunden werden. So zeigte die Untersuchung der 3D-Strukturen des β_1 AR gebunden an Agonisten, Antagonisten und Partialagonisten, dass Partialagonisten im Vergleich zu Agonisten weniger Wechselwirkungen mit dem Rezeptor eingehen und deshalb nicht die vollaktive Rezeptorkonformation, sondern lediglich Zwischenstadien hervorrufen [377]. Selbiges konnte auch anhand der Kristallstruktur des A_{2A} Adenosinrezeptors nachgewiesen werden. Hier induzieren die Liganden Adenosin und NECA ebenfalls nur ein Zwischenstadium zwischen einer inaktiven und einer vollaktiven Rezeptorkonformation [380]. Übertragen auf die in der vorliegenden Studie gemessenen Daten bedeutet das, dass die Liganden der Gruppe B keinen der Rezeptoren in eine vollaktive Konformation überführen, sondern lediglich eine teilaktive Rezeptorkonformation induzieren, durch die in FRET-Messungen geringere Signale hervorgerufen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche ermöglichen keine zweifelsfreie Unterscheidung zwischen beiden Erklärungsansätzen (z.T. vollaktiviert, z.T. inaktiv vs. Intermediärstadien). Da allerdings zunehmend Belege für die Existenz von Intermediärstadien in verschiedenen GPCR erbracht werden, ist es wahrscheinlich, dass Partialagonisten auch im M_2 AChR Zwischenstadien einer vollaktiven Rezeptorkonformation hervorrufen. Ergänzende Untersuchungen beispielsweise der Kristallstruktur des M_2 AChR gebunden an unterschiedliche Liganden, oder mittels *Disulfid-Crosslinking* könnten zu einer vollständigen Aufklärung dieser Fragestellung beitragen.

Nachdem die Stimulation mit Liganden der Gruppe C in FRET-Messungen nur zu einer äußerst geringen bzw. zu keiner Änderung des FRET-Ratio führte, kann in der vorliegenden Arbeit keine verlässliche Aussage über die Induktion einer ligandenselektiven Rezeptorkonformation gemacht werden. Aus Studien am M_2 AChR, β_1 und β_2 AR lässt sich vermuten, dass durch die Bindung von Antagonisten der Übergang des Rezeptors von einer inaktiven in eine aktive Konformation wegen der sperrigen Struktur der Liganden nicht mehr möglich ist. Es ist somit denkbar, dass tatsächlich keine messbare Änderung der Rezeptorkonformation beobachtet werden kann.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass mit den angewandten Methoden kein Beleg für die Induktion einer ligandenselektiven Konformationsänderung des M_2 AChR mit den getesteten orthosterischen Liganden gefunden wurde.

5.4.2 Beeinflussung der Rezeptorkonformation durch allosterische Liganden

Bei der Entwicklung allosterisch modulierender Pharmaka konnten bereits einige Erfolge erzielt werden. Das Ziel einer pharmakologischen Therapie mit allosterischen Modulatoren besteht darin, eine höhere Rezeptorsubtypen-Selektivität zu erreichen. Darüber hinaus wird durch die Anwendung von allosterischen Liganden die zirkadiane Rhythmik physiologischer Systeme nicht beeinflusst. Nachdem allosterische Modulatoren nur in Anwesenheit des endogenen Liganden ihre Wirkung entfalten, bleibt die Gefahr von Überdosierungen und damit verbundenen Nebenwirkungen aus.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob allosterische Liganden des M_2 AChR die Konformation des Rezeptors unterschiedlich beeinflussen. Dazu wurden in FRET-Experimenten die Rezeptorsensoren M_2i3 -C und M_2i3 -N mit einer Kombinationslösung aus 10 μ M Iperoxo und allosterischen Liganden in sättigender Konzentration stimuliert.

Der Vergleich der FRET-Signale, die durch die unterschiedlichen allosterischen Liganden an den Konstrukten M_2i3 -C und M_2i3 -N hervorgerufen wurden (Abb. 63, Seite 90) zeigte, dass die allosterischen Substanzen JK 337, Seminaph und EHW 477 in Kombination mit Iperoxo beide Konstrukte in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen. Eine Perfusion der Zellen mit JK 337 und Seminaph rief an M_2i3 -N eine geringere Inhibition des durch Iperoxo induzierten FRET-Signals hervor, als am M_2i3 -C Sensor. Dies ist gleichbedeutend mit einer stärkeren Bewegung von IL 3 unterhalb von TM 6, als TM 5. EHW 477 erzeugte eine stärkere Signaländerung am M_2i3 -N, als am M_2i3 -C Sensor. Folglich zeigte TM 5 eine intensivere Bewegung, als TM 6. Die übrigen allosterischen Testliganden induzierten an beiden M_2 AChR Konstrukten vergleichbare Signalintensitäten.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Daten zeigen, dass in lebenden Zellen mit verschiedenen allosterischen Modulatoren ligandenselektive Konformationsänderungen des M_2 AChR existieren. Da bereits in Studien am β_2 AR lediglich ein geringer Beitrag des C-Terminus zu der Änderung der Rezeptorkonformation nach Stimulation [309] beobachtet werden konnte und auch die Untersuchungen am α_{2A} AR nur geringe Bewegungen im C-Terminus nach Ligandenbindung vermuten [335] lassen, ist es vorstellbar, dass auch im M_2 AChR nur eine geringe Änderung der Konformation des C-Terminus auftritt und somit der Hauptanteil der ligandenselektiven Konformationsänderung aus Bewegungen von TM 5, TM 6 und IL 3 resultiert. Dafür spricht auch, dass der C-Terminus des M_2 AChR mit 23 Aminosäuren eine ähnliche Größe aufweist, wie der des α_2 AR (20 Aminosäuren) [341]. Während im Falle von EHW 477 hauptsächlich der N-terminale Bereich von IL 3 einer Konformationsänderung unterliegt, rufen JK 337 und Seminaph primär in der C-terminalen Region von IL 3 eine Änderung der Rezeptorkonformation hervor (Abb. 63, Seite 90).

5.4.3 Einfluss ausgewählter dualsterischer Liganden

Neben der ligandenselektiven Konformationsänderung des M_2 AChR mit orthosterischen und allosterischen Liganden wurde auch der Einfluss der dualsterischen Liganden Hybrid 1 und 2 (H 1, H 2) auf die M_2 AChR Konformation untersucht.

Für H 2 konnte bereits gezeigt werden, dass die Kombination der allosterischen und orthosterischen Bausteine (Seminaph + Iperoxo) eine ligandenselektive Konformationsänderung induziert (Kapitel 5.4.2). Die für die Bausteine von H 1 (JK 289 + Iperoxo) gemessenen Daten ließen eine derartige Schlussfolgerung nicht zu. Eine Möglichkeit besteht eventuell darin, dass auch die Linkerkette, mit der JK 289 und Iperoxo in H 1 miteinander verknüpft

sind, die Konformation des M_2 AChR beeinflusst. Möglich wäre auch, dass in den vorangehenden Experimenten mit einer Kombinationslösung von Iperoxo und JK 289 nicht alle M_2 AChR beide Liganden gleichzeitig gebunden hatten. Diese Hypothesen wurden in FRET-Messungen mit den dualsterischen Liganden H 1 und H 2 untersucht. H 1 rief nur eine äußerst geringe Änderung des FRET-Signals hervor (M_{2i3-N} : $3,2 \pm 1,4\%$, M_{2i3-C} : $6,9 \pm 2,7\%$). Nachdem H 1 an beiden Sensoren des M_2 AChR vergleichbare FRET-Signale induzierte kann auch hier die Existenz einer ligandenselektiven Konformationsänderung des M_2 AChR ausgeschlossen werden. Die Linkerkette scheint somit keinen maßgeblichen Einfluss auf die Änderung der Rezeptorkonformation zu haben. H 2 zeigte an keinem der beiden Rezeptorsensoren ein messbares FRET-Signal. Aus diesem Grund kann für H 2 die Fragestellung nach der Induktion einer ligandenselektiven Konformationsänderung nicht abschließend beantwortet werden.

Dualsterische Liganden können prinzipiell in verschiedenen Orientierungen binden. So kann sowohl eine rein allosterische, als auch eine dualsterische Bindung auftreten (Kapitel 1.3.6). Das fehlende Auftreten der FRET-Signale könnte folglich damit erklärt werden, dass die Hybridsubstanzen nur die allosterische Bindestelle besetzen und somit keine Rezeptoraktivierung induzieren. Allerdings wurde am Beispiel von H 2 bereits gezeigt, dass die Hybridsubstanzen eine dualsterische Bindung des M_2 AChR bevorzugen [270].

5.5 Untersuchung der funktionellen Selektivität und nachgeschalteter Signalwege

Sowohl Studien am β_2 AR, als auch am μ -Opioidrezeptor zeigen einen direkten Zusammenhang zwischen der Induktion einer ligandenselektiven Rezeptorkonformation und der selektiven Aktivierung einzelner nachgeschalteter Signalwege [217, 381]. Dieses Phänomen wird als funktionelle Selektivität bezeichnet. Untersuchungen an verschiedenen Subtypen der mAChR geben erste Hinweise auf die Existenz einer funktionellen Selektivität in dieser GPCR-Untergruppe. So wurde in Studien am M_3 AChR gezeigt, dass verschiedene Antagonisten einen *ligand-bias* bezüglich der G-Protein Kopplung aufweisen [382]. Untersuchungen am M_2 AChR deuten auch hier auf die Existenz einer funktionellen Selektivität hin. Dies konnte in Mutationsexperimenten mit orthosterischen und bitopischen Liganden gezeigt werden [280]. Auch die dualsterischen Liganden H 1 und H 2 weisen funktionelle Selektivität bezüglich der G-Protein Kopplung auf [270, 383]. Bisher konnte allerdings keine Korrelation zwischen der bevorzugten Aktivierung verschiedener Signalwege und der Existenz einer ligandenselektiven Konformationsänderung der mAChR hergestellt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die allosterischen Liganden, die eine selektive Änderung der Rezeptorkonformation des M_2 AChR hervorrufen, verschiedene Signalwege bevorzugt modulieren. Darüber hinaus sollte gezeigt werden, ob ein Zusammenhang zwischen der maximalen Wirkstärke der orthosterischen Liganden und deren Effekt auf nachgeschaltete Signalwege hergestellt werden konnte.

5.5.1 Einfluss orthosterischer Liganden auf die β -Arrestin2 Translokation

Die orthosterischen Liganden wurden dahingehend untersucht, ob zwischen ihrer Effizienz, den M_2 AChR zu aktivieren und dem Ausmaß, in dem sie eine Translokation von β -Arrestin2 zur Zellmembran induzieren, eine Korrelation besteht.

Ein Vergleich zwischen der maximalen Rezeptoraktivierung (Abb. 62, Seite 89) und dem Effekt der orthosterischen Liganden auf die Sequestrierung von β -Arrestin2 (Abb. 65A,

Seite 93) ergab einen direkten Zusammenhang zwischen Rezeptoraktivierung und β -Arrestin2 Translokation (Abb. 65, Seite 93). Die Unterteilung der orthosterischen Liganden anhand der maximal induzierten Rezeptorstimulation in drei Gruppen (Tab. 10, Seite 116) kann nahezu unverändert auf die Translokation von β -Arrestin2 übertragen werden. Die Liganden der Gruppe A translozierten β -Arrestin2 zu $\geq 35\%$ verglichen mit dem Anfangswert, während Liganden der Gruppe B eine Translokation von ca. 12-35% hervorriefen. Für die Liganden der Gruppe C war nur eine äußerst geringe β -Arrestin2 Translokation detektierbar. Lediglich für 5-Methylfurmethiodid konnte keine Korrelation zwischen der maximalen Rezeptoraktivierung und dem Ausmaß an β -Arrestin2 Translokation hergestellt werden. Obwohl 5-Methylfurmethiodid in FRET-Messungen eine 50-60%-ige Rezeptoraktivierung induzierte, konnte lediglich eine sehr geringe Rekrutierung von β -Arrestin2 an die Zellmembran beobachtet werden (Tab. 11).

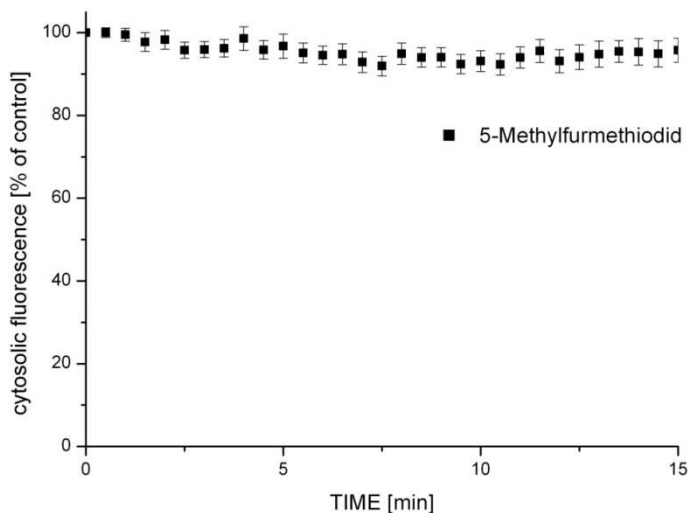


Abb. 83: Translokation von β -Arrestin2 nach Stimulation des M₂CFP mit 100 μ M 5-Methylfurmethiodid.

Die Translokation des β -Arrestin2YFP zur Zellmembran nach Aktivierung von M₂CFP mit 5-Methylfurmethiodid, gemessen als Abnahme der YFP-Fluoreszenz im Zytosol, wurde zeitabhängig gemittelt und als Zeitverlauf aufgetragen (n = 11). 5-Methylfurmethiodid induzierte eine geringe β -Arrestin2 Translokation.

Da 5-Methylfurmethiodid im Vergleich zu ACh zwar eine ca. halbmaximale Rezeptoraktivierung, aber nur $<10\%$ Translokation von β -Arrestin2 hervorrufen konnte, besteht die Möglichkeit, dass mit dieser Substanz andere Signalwege als die β -Arrestin2-vermittelten bevorzugt aktiviert werden.

Anhand der Ergebnisse aus den Untersuchungen der Translokation von β -Arrestin2 kann eine erneute Einteilung der orthosterischen Testliganden in drei Gruppen (1-3) vorgenommen werden.

Tab. 11: Einteilung der orthosterischen Liganden in drei Gruppen gemäß des absoluten Ausmaßes an β -Arrestin2 Translokation.

Anhand der Absolutwerte der β -Arrestin2 Translokation wurden die orthosterischen Liganden in drei Gruppen (1-3) eingeteilt.

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Translokation: $\geq 35\%$	Translokation: 35 - 10%	Translokation: < 10%
ACh Acetyl- β -methylcholin Carbachol Iperoxo Muscarin OxotremorinM	Arecaidin Arecolin Carbamyl- β -methylcholin Oxotremorin	5-Methylfurmethiodid Acetylthiocholin Atropin Ipratropium McN-A 343 Pilocarpin Pirenzepin Scopolamin Telenzepin

Da alle orthosterischen Testliganden, verglichen mit dem endogenen Ligand ACh, die gleiche Konformationsänderung des M_2 AChR hervorriefen, konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen einer ligandenselektiven Änderung der Rezeptorkonformation und einer bevorzugten Modulation bestimmter Signalwege hergestellt und somit keine Aussage über eine eventuelle funktionelle Selektivität gemacht werden. Es gilt jedoch festzuhalten, dass –abgesehen von 5-Methylfurmethiodid- zwischen der maximalen Rezeptoraktivierung, die von den jeweiligen orthosterischen Testliganden induziert wurde, und dem Ausmaß an β -Arrestin2 Translokation eine direkte Korrelation besteht.

5.5.2 Einfluss allosterischer Liganden auf die G-Protein Aktivierung und β -Arrestin2 Translokation

Die funktionelle Selektivität der allosterischen Testliganden wurde mittels FRET-Messungen untersucht. Es wurden dabei sowohl die Aktivierung des inhibitorischen G-Proteins, als auch die Rekrutierung von β -Arrestin2 zum M_2 AChR getestet.

Bei der Messung der G_i Aktivierung wie auch der β -Arrestin2 Translokation konnte eine Hemmung der durch einen orthosterischen Agonisten hervorgerufenen Effekte beobachtet werden (Abb. 66, Seite 94 und Abb. 67, Seite 95). Dabei war das Ausmaß der Inhibition jeweils von dem eingesetzten Alloster abhängig. So konnte beispielsweise mit JK 289 eine partielle Inhibition der G_i -Protein Aktivierung, aber kein Effekt auf die Translokation von β -Arrestin2 detektiert werden. Dagegen hemmte JK 337 lediglich die β -Arrestin2 Rekrutierung, zeigte aber keinen Einfluss auf die Aktivierung des G_i -Proteins.

Untersuchungen des M_3 AChR ergaben, dass unterschiedliche Liganden in der Lage sind, eine ligandenselektive Änderung der Rezeptorkonformation zu induzieren [376]. Weiterhin zeigten Butcher *et al.* [384], dass die Stimulation des M_3 AChR eine ligandenabhängige, selektive Phosphorylierung des Rezeptors zur Folge hat. Sowohl die ligandenselektive Konformationsänderung als auch die ligandenselektive Phosphorylierung eines Rezeptors können mit dem Auftreten einer funktionellen Selektivität in Zusammenhang gebracht werden [10, 385, 386]. Die Induktion einer selektiven Rezeptorkonformation des M_2 AChR

durch JK 337, EHW 477 und Seminaph könnte auch hier die Phosphorylierung des Rezeptors in einem ligandenspezifischen Muster zur Folge haben und somit in einer funktionellen Selektivität resultieren. Eine nähere Betrachtung der durch JK 337 hervorgerufenen Effekte auf die Rezeptoraktivierung und die Regulation nachgeschalteter Signalwege zeigte, dass eine Stimulation mit einer Kombination von Iperoxo mit JK 337 eine stärkere Konformationsänderung im Bereich von TM 6 hervorruft als in der TM 5-Region. Zudem konnte gezeigt werden, dass JK 337 lediglich die β -Arrestin2 Translokation beeinflusst, wogegen es keine Auswirkung auf die Aktivierung des G_i -Proteins hat. Diese Zusammenhänge können auf mögliche Korrelationen zwischen der Induktion einer ligandenselektiven Rezeptorkonformation und der selektiven Beeinflussung nachgeschalteter Signalwege und somit auf die Existenz einer funktionellen Selektivität am M_2 AChR mit ausgewählten Liganden hinweisen.

5.6 FRET-mikroskopische Untersuchung von mutierten Sensoren des muskarinischen M_2 Acetylcholinrezeptors

5.6.1 Mutation der orthosterischen Bindestelle

Bereits bei der Erstellung der Konzentrations-Wirkungskurven von ACh und Iperoxo konnte Iperoxo auf Grund seiner verglichen mit ACh niedrigeren EC_{50} -Werte und der stärkeren Rezeptoraktivierung als Superagonist identifiziert werden (Abb. 46, Seite 72). Eine Ursache für dieses Verhalten könnte darin liegen, dass Iperoxo stärkere Wechselwirkungen mit dem M_2 AChR eingeht als ACh oder über zusätzliche Bindestellen im Rezeptor verfügt. Dies scheint wahrscheinlich, da Iperoxo über zwei positiv geladene Stickstofffunktionen verfügt. Es wäre also möglich, dass durch die zweite positive Aminogruppe weitere polare Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor ermöglicht werden.

Um die molekulare Grundlage der superagonistischen Eigenschaften von Iperoxo näher zu untersuchen, wurde die für eine orthosterische Bindung essentielle Aminosäure Tyrosin¹⁰⁴ im M_2 i3-N- und M_2 i3-C Sensor zu Alanin mutiert. Diese Mutation resultiert in einer mehr als zehnfachen Abschwächung der Wechselwirkung zwischen dem M_2 AChR und orthosterischen Liganden [6]. Mit Hilfe konfokalmikroskopischer Untersuchungen konnte die Expression der mutierten Sensoren an der Zellmembran detektiert werden (Abb. 79, Seite 102). In FRET-Experimenten konnte durch ACh in einer Konzentration von 10 mM nur ein äußerst geringes Signal hervorgerufen werden. Dagegen zeigte Iperoxo in einer Konzentration von 100 μ M immer noch eine deutlich messbare Änderung des FRET-Ratio.

Da eine Mutation von Tyrosin¹⁰⁴ zu Alanin die Bindung von ACh an den Rezeptor stärker beeinflusste als die des Iperoxo, ist es wahrscheinlich, dass Iperoxo, verglichen mit ACh, über weitere Bindestellen im M_2 AChR verfügt oder, zwar an dieselben Aminosäuren bindet wie ACh, dort aber stärkere Wechselwirkungen eingeht. Die Durchführung weiterer FRET-Experimente an M_2 Sensoren, in denen über Tyrosin¹⁰⁴ hinaus noch weitere Aminosäuren der orthosterischen Bindestelle mutiert sind (z.B. Tryptophan¹⁵⁵, Aspartat¹⁰³, Tyrosin⁴³⁰, Cystein⁴²⁹, Tyrosin⁴²⁶, Tyrosin⁴⁰³, Tryptophan⁴⁰⁰, Threonin¹⁸⁷, oder Threonin¹⁹⁰) [6, 87] könnte dazu beitragen, diese Vermutung zu unterstützen.

5.6.2 Mutation der allosterischen Bindestelle

Um zu untersuchen, weshalb nach einer Aktivierung des M_2 AChR mit H 1 und H 2 kaum eine Änderung des FRET-Signals detektiert werden konnte, wurden unterschiedliche

Ansätze verfolgt. Eine dualsterische Bindung von H 1 bzw. H 2 könnte den Übergang des M₂AChR von einer inaktiven Rezeptorkonformation in die aktive hemmen, da beide Bausteine unterschiedliche Rezeptorkonformationen favorisieren. Um dies zu testen, wurden Mutanten des M₂AChR generiert, in denen die an der allosterischen Bindestelle beteiligten Aminosäuren Tyrosin¹⁷⁷ und Tryptophan⁴²² zu Alanin mutiert wurden. Durch die Mutation der allosterischen Bindestelle wird die Bindung des allosterischen Hybridbausteins verhindert und der Iperoxo-Anteil kann die aktive Rezeptorkonformation stabilisieren. Folglich wurde in FRET-Experimenten mit den allosterisch mutierten Rezeptorsensoren eine messbare Rezeptoraktivierung durch H 1 und H 2 erwartet.

In konfokalmikroskopischen Messungen zeigten M_{2i3}-N Y177A und M_{2i3}-C Y177A eine deutliche Membranexpression, während M_{2i3}-C W422A hauptsächlich zytosolisch exprimiert wurde (Abb. 81, Seite 104). Eine Stimulation der Y177A-mutierten Rezeptorsensoren mit ACh bzw. Iperoxo rief FRET-Signale vergleichbarer Intensität wie am M_{2i3}-N- und M_{2i3}-C Sensor hervor. Auch Naph-7-Iper, Naph-8-Iper und H 1 zeigten am M_{2i3}-N Y177A- bzw. M_{2i3}-C Y177A Konstrukt ähnliche Effekte, verglichen mit dem M_{2i3}-N- und M_{2i3}-C Rezeptor. Eine Stimulation der mutierten Rezeptorkonstrukte mit H 2 führte zu keiner messbaren Änderung des FRET-Signals (Abb. 82, Seite 105). FRET-Experimente mit den M₂Sensoren, in denen Tryptophan⁴²² zu Alanin mutiert wurde, zeigten lediglich ein sehr geringes FRET-Signal nach Rezeptoraktivierung mit ACh oder Iperoxo. Auch durch die Stimulation mit H 1 und H 2 konnte in diesen Rezeptorkonstrukten kein messbares FRET-Signal hervorgerufen werden. Dies kann allerdings mit der mangelnden Membranlokalisation der verschiedenen Rezeptor-Sensoren erklärt werden.

In den allosterisch mutierten Rezeptorsensoren des M₂AChR ist eine dualsterische Bindung beider Hybridanteile unwahrscheinlich. Nachdem in FRET-Messungen an den Sensoren M_{2i3}-N Y177A und M_{2i3}-C Y177A die erwartete detektierbare Rezeptoraktivierung durch H 1 und H 2 dennoch ausblieb, kann eine dualsterische Bindung der Hybride als Ursache für die Stabilisierung der inaktiven Rezeptorkonformation ausgeschlossen werden.

5.7 FRET-mikroskopische Untersuchungen von Analoga der Hybridsubstanzen

Wie bereits in Kapitel 1.3.6 dargestellt, kann die Rezeptorkonformation auch durch die Linkerkette zwischen allosterischem und orthosterischem Baustein beeinflusst werden.

Um zu untersuchen, ob eine zu kurze Linkerkette die dualsterischen Liganden an der allosterischen Bindestelle fixiert, wodurch eine orthosterische Rezeptoraktivierung und somit die Induktion einer aktiven Rezeptorkonformation verhindert wird (Abb. 68, Seite 96), wurden Derivate von H 1 und H 2 mit verlängerter Linkerkette getestet. In Iper-8-Phth wurde die Kohlenstoffkette zwischen beiden Bausteinen von H 1 um zwei C-Atome verlängert. In Derivaten von H 2 wurde eine schrittweise Elongation der Linkerkette um ein (Naph-7-Iper) bzw. zwei C-Atome (Naph-8-Iper) vorgenommen.

In anschließenden FRET-Experimenten mit diesen Hybrid-Analoga an M_{2i3}-N zeigte sich, dass die Verlängerung der Kohlenstoffkette in beiden Fällen zu einer Zunahme der detektierbaren Rezeptoraktivität führte. Während Iper-8-Phth den M₂AChR zu $24,8 \pm 2,7\%$ im Vergleich mit ACh aktivierte, zeigte Naph-7-Iper eine agonistische Aktivität von $21,7 \pm 2,3\%$. Naph-8-Iper rief eine $41,3 \pm 13,5\%$ -ige Änderung des FRET-Signals verglichen mit $100 \mu\text{M}$ ACh hervor.

Am Beispiel von Naph-7-Iper und Naph-8-Iper wurde auch die Tendenz ersichtlich, dass die schrittweise Verlängerung der Linkerkette in einem Zugewinn an Rezeptoraktivierbarkeit resultiert.

Die FRET-Messungen mit Iper-8-Phth, Naph-7-Iper und Naph-8-Iper lieferten somit einen Anhaltspunkt dafür, dass die Linkerkette in H 1 und H 2 nicht ausreichend lang war, um eine gleichzeitige Bindung beider Bausteine an die jeweilige allosterische und orthosterische Bindung zu ermöglichen und den M_2 AChR in eine aktive Konformation zu überführen. Diese Annahme könnte durch ergänzende Versuche wie beispielsweise die Kristallisation und anschließende Charakterisierung des M_2 AChR gebunden an dualsterische Liganden unterstützt werden.

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für die mangelnde Detektierbarkeit von H 1 und H 2 in FRET-Experimenten besteht darin, dass die orthosterische Bindestelle nach Rezeptoraktivierung durch eine räumliche Neuorientierung von Aminosäuren im Bindekanal des M_2 AChR zum extrazellulären Bereich hin abgetrennt wird (Abb. 73, Seite 99). Die Bindung der Hybridsubstanzen beeinträchtigt diese räumliche Umorientierung, da die Linkerketten den durch die Transmembrandomänen gebildeten Kanal blockieren. Der Übergang des M_2 AChR in seine aktive Konformation wird somit gehemmt.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde Iperoxo-Hexamethonium (Abb. 74, Seite 99) durch Entfernen des allosterischen Bausteins von H 1 bzw. H 2 synthetisiert. Die sechs C-Atome lange Linkerkette, sowie die zweite, positiv geladene Stickstofffunktion blieben allerdings erhalten. In FRET-mikroskopischen Konzentrations-Wirkungs-Experimenten an den Sensoren M_2i3 -N und M_2i3 -C konnte mit sättigenden Konzentrationen der Testsubstanz eine $57,7 \pm 4,6\%$ -ige (M_2i3 -N) bzw. $63,6 \pm 7,8\%$ -ige (M_2i3 -C) Aktivierung des M_2 AChR verglichen mit $100 \mu\text{M}$ ACh erreicht werden (Abb. 75, Seite 100).

Dies erlaubt die Interpretation, dass sich der Bindekanal nach orthosterischer Aktivierung tatsächlich schließt. Durch die Entfernung des allosterischen Bausteins existiert allerdings die Option einer dualsterischen Bindung nicht mehr. Es ist deshalb möglich, dass Iperoxo-Hexamethonium eine partiell aktivierte Konformation des M_2 AChR induziert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die mangelnde Detektierbarkeit der Effekte von H 1 und H 2 keine abschließende Erklärung gefunden werden konnte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen allerdings vermuten, dass die Ursache in einer zu kurzen Linkerkette beziehungsweise in der Schließung des Bindekanals besteht.

6. Zusammenfassung/Summary

6.1 Zusammenfassung

Zahlreiche experimentelle Befunde lassen vermuten, dass G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) nach ihrer Aktivierung einer ligandenselektiven Änderung der Rezeptorkonformation unterliegen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es dieses Phänomen am Subtyp 2 der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (M_2 AChR) zu untersuchen.

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren (mAChR) können in fünf Subtypen (M_1 - M_5) unterschieden werden. Durch die Beteiligung der mAChR an zahlreichen physiologischen Prozessen stellen sie wichtige Zielstrukturen pharmakologischer Therapien dar. Da die orthosterische Ligandenbindestelle (= Bindestelle des endogenen Liganden) in allen fünf Subtypen hoch konserviert ist, wird ihr pharmakologischer Nutzen derzeit allerdings durch die unselektive Rezeptormodulation und dem damit verbundenen Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen stark limitiert. Ein Ansatz zur Erzielung subtypeselektiver Effekte besteht in der Verwendung allosterischer Modulatoren. Da die allosterische Bindestelle der mAChR eine geringere Sequenzhomologie aufweist, können so gezielt einzelne Subtypen der mAChR reguliert werden. Der M_2 AChR stellt hinsichtlich allosterischer Modulation ein gut charakterisiertes Modellsystem dar. Für ihn wurde bereits eine Vielzahl allosterischer Liganden entwickelt. Auch bitopische Liganden, die sowohl einen allosterischen als auch einen orthosterischen Anteil enthalten, wurden für den M_2 AChR bereits beschrieben.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene FRET-Sensoren des M_2 AChR generiert und charakterisiert. Als FRET-Paar wurden das cyan fluoreszierende Protein (CFP) und der niedermolekulare fluorescein-basierte Fluorophor FIAsH (*fluorescein arsenical hairpin binder*) gewählt. CFP wurde in den Sensoren am Ende des C-Terminus angefügt. Die zur Markierung mit FIAsH nötige Tetracysteinsequenz wurde in verschiedenen Bereichen der dritten intrazellulären Rezeptorschleife (IL) eingebracht. Die auf diese Weise erstellten Rezeptorsensoren trugen das Tetracysteinmotiv in der N-terminalen (M_2i3 -N) bzw. in der C-terminalen Region (M_2i3 -C) von IL 3. Die Charakterisierung der Rezeptorsensoren bezüglich Ligandenbindung, G_i -Protein Aktivierung und β -Arrestin2 Translokation ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen M_2i3 -N, M_2i3 -C und M_2 CFP oder Wildtyp M_2 AChR. Zunächst wurden sowohl unterschiedliche orthosterische, als auch allosterische Liganden hinsichtlich ihrer mittleren effektiven Konzentration und ihrer maximalen Wirkstärke an den Rezeptorsensoren untersucht. Mit Hilfe von FRET-Messungen konnte ein superagonistisches Verhalten des orthosterischen Testliganden Iperoxo gezeigt werden. Die Eigenschaften der allosterischen Substanzen wurden durch Messung der Rezeptordeaktivierungskinetik und des maximalen Hemmeffekts auf einen vorstimulierten Rezeptor charakterisiert. Alle allosterischen Liganden deaktivierten den vorstimulierten M_2 AChR mit einer schnelleren Kinetik als Atropin. Die EC_{50} -Werte der unterschiedlichen Substanzen waren unabhängig von der Markierungsposition im verwendeten Rezeptorsensor vergleichbar. Ausnahmen bildeten die allosterischen Liganden JK 289, JK 338, $\frac{1}{2}$ W84 und EHW 477, die liganden- und sensorabhängig unterschiedliche mittlere effektive Konzentrationen aufwiesen.

Bei der Untersuchung der Konformationsänderung des M_2 AChR konnte kein ligandenselektiver Unterschied zwischen den FRET-Signalen für 19 getestete orthosterische Liganden beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass alle orthosterischen Testliganden eine dem Acetylcholin (ACh) vergleichbare Änderung der M_2 AChR Konformation induzierten. Um zu untersuchen, ob für die orthosterischen Testliganden eine Korrelation zwischen

ihrer maximalen Wirkstärke hinsichtlich Rezeptoraktivierung in FRET-Experimenten und der Aktivierung nachgeschalteter Signalwege besteht, wurde die orthosterisch-vermittelte Translokation von β -Arrestin2 mit Hilfe der Konfokalmikroskopie bestimmt. Bis auf 5-Methylfurmethiodid translozierten alle orthosterischen Liganden β -Arrestin2 in einem Ausmaß, das mit der maximalen Rezeptoraktivierung vergleichbar war. Dagegen rief 5-Methylfurmethiodid verglichen mit dem endogenen Liganden ACh zwar eine ca. halbmaximale Rezeptoraktivierung, aber nur eine äußerst geringe β -Arrestin2 Translokation hervor.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Allosterer auf eine ligandenselektive Konformationsänderung des M_2 AChR untersucht. Die allosterischen Liganden JK 337 und Seminaph beeinflussten den M_2i3 -C Sensor signifikant stärker, als das M_2i3 -N Konstrukt. Dagegen zeigte EHW 477 eine stärkere Beeinflussung der Rezeptorkonformation des M_2i3 -N-, als des M_2i3 -C Sensors. Dies erlaubt die Vermutung, dass JK 337 und Seminaph eine stärkere Bewegung unterhalb von Transmembrandomäne (TM) 6, als unterhalb von TM 5 hervorriefen. Die Ergebnisse für EHW 477 legen nahe, dass TM 5 eine größere Bewegung eingeht, als TM 6. FRET-basierte Untersuchungen der Einflüsse der allosterischen Testliganden auf nachgeschaltete Signalwege ergaben, dass sowohl die Aktivierung des G_i Proteins, als auch die β -Arrestin2 Translokation selektiv durch einzelne allosterische Liganden beeinflusst werden. Auch ein Zusammenhang zwischen Rezeptoraktivierung und der Regulation nachgeschalteter Signalwege war erkennbar. Allerdings waren auf Grund der Versuchsbedingungen keine quantitativen Aussagen möglich.

Im Folgenden wurden die bitopischen Liganden Hybrid 1 und 2 (H 1, H 2) hinsichtlich ihres Effekts auf die Konformationsänderung des M_2 AChR untersucht. Während eine Stimulation mit H 1 vergleichbare FRET-Signale an beiden Sensoren ergab, konnte mit H 2 weder am M_2i3 -N-, noch an M_2i3 -C Sensor eine FRET-Änderung detektiert werden. Um den mangelnden Effekt der Hybridsubstanzen in FRET-mikroskopischen Untersuchungen aufzuklären, wurden verschiedene Ansätze gewählt:

Mit kettenverlängerten Derivaten der Hybridsubstanzen konnte in FRET-Messungen eine Änderung des FRET-Signals detektiert werden. Die Entfernung des allosterischen Bausteins führte in FRET-Experimenten zu einer verglichen mit dem endogenen Liganden ACh etwa halbmaximalen Aktivierung beider Sensoren. Dagegen resultierte die Mutation der allosterischen Bindestelle in nachfolgenden FRET-Untersuchungen mit H 1 und H 2 in keiner Signaländerung des FRET-Ratio. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die Linkerkette, die orthosterischen und allosterischen Baustein der Hybride miteinander verbindet, zu kurz war um eine gleichzeitige Bindung an die allosterische und orthosterische Bindestelle zu ermöglichen. Ein anderer Erklärungsansatz besteht darin, dass nach Bindung des Orthosters der Kanal zwischen orthosterischer und allosterischer Bindestelle durch die Konformationsänderung des Rezeptors verschlossen wird, weshalb keine dauerhafte, dualsterische Bindung der Hybridsubstanzen an den M_2 AChR möglich ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen mittels FRET-Experimenten die Existenz einer ligandenselektiven Rezeptorkonformation des M_2 AChR mit allosterischen Liganden nachzuweisen. Darüber hinaus konnte auch ein Bezug zum Auftreten einer funktionellen Selektivität mit allosterischen Liganden hergestellt werden. Die Untersuchung von 19 orthosterischen Liganden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Rezeptorkonformation des M_2 AChR ergab keinen Hinweis auf eine ligandenselektive Konformationsänderung. Die Betrachtung der orthosterisch-vermittelten Translokation von β -Arrestin2 zeigte, dass zwischen der Effizienz der orthosterischen Testliganden, den M_2 AChR zu aktivieren und dem Ausmaß, in dem sie eine β Arrestin2 Translokation induzierten eine direkte Korrelation besteht. Lediglich 5-Methylfurmethiodid rief eine ungleich geringere β -Arrestin2 Translokation

hervor, verglichen mit dem Ausmaß an Rezeptoraktivierung. Diese Beobachtung deutet auf die Existenz eines *signaling-bias* für diesen Liganden hin. Die Untersuchung der dualsterischen Liganden H 1 und 2 bezüglich ihrer Fähigkeit zur Rezeptoraktivierung ergab, dass erst durch eine Verlängerung der Linkerkette, durch die orthosterischer und allosterischer Baustein miteinander verbunden sind eine Konformationsänderung des M₂AChR hin zu einer aktiven Konformation erreicht werden kann. Es kann somit angenommen werden, dass in den ursprünglichen Hybrids-substanzen H 1 und H 2 eine zu kurze Linkerkette, durch die keine dualsterische Bindung der Hybride an die allosterische und orthosterische Bindestelle möglich ist, ursächlich für die mangelnde Rezeptoraktivierung des M₂AChR war.

6.2 Summary

A large body of experimental evidence suggests that upon receptor activation G-protein coupled receptors are subject to ligand-specific changes of receptor conformation. The aim of this study was to investigate this phenomenon using the muscarinic M₂ acetylcholine receptor (M₂AChR).

Muscarinic acetylcholine receptors (mAChR) can be subdivided into five different subtypes (M₁-M₅). Their involvement in various physiological processes makes them an important target of pharmacological therapies. With the orthosteric binding site (= binding site of the endogenous ligand) being highly conserved across all five mAChR subtypes, the unselective receptor modulation can lead to severe side effects. Thus the clinical use of drugs modulating muscarinic receptors is currently limited. Allosteric modulation is one attempt to achieve subtype-selective receptor regulation. Since the allosteric binding site of mAChR is less well conserved, it is possible to selectively target one mAChR subtype. As far as allosteric modulation is concerned, the M₂AChR represents a well characterized model with a large number of allosteric modulators being available. For the M₂AChR bitopic ligands which contain an allosteric as well as an orthosteric binding block have been developed as well.

In the first part of this study several FRET-sensors of the M₂AChR were designed and characterized. The cyan fluorescent protein (CFP) was fused to the C-terminus of both sensors while the FIAsh (fluorescein arsenical hairpin binder) binding site was inserted into the N-terminal (M₂i3-N) or the C-terminal (M₂i3-C) region of the third intercellular loop (IL). The receptor sensors were characterized concerning ligand affinity, activation of the G_i protein and β -arrestin2 translocation and did not display any significant differences compared to the wildtype M₂ or the M₂CFP receptor. Various orthosteric as well as allosteric ligands were investigated regarding their affinity and efficacy at both sensors. Using FRET-measurements iperoxo was proven to behave as a superagonist. The characteristics of the allosteric ligands were investigated by measuring the receptor deactivation kinetics and their maximum inhibitory effect on a pre-stimulated receptor. All allosteric test substances displayed faster deactivation kinetics compared to the antagonist atropine and similar EC₅₀ values at both receptor sensors.

When investigating the change of receptor conformation of the M₂AChR upon ligand binding there were no ligand selective differences in the FRET-signal detected for either of the 19 orthosteric ligands at both M₂ sensors. This data suggest that all orthosteric ligands induced a change in receptor conformation comparable to acetylcholine (ACh). In order to correlate the efficacy of various orthosteric ligands to activate the M₂AChR in FRET-experiments with their effect on downstream signaling pathways, the translocation of β -arrestin2 upon receptor activation with orthosteric ligands was investigated using confocal microscopy. Except for

5-methylfurmethiodide all orthosteric ligands induced β -arrestin2 translocation to an extent which was comparable to the maximal receptor activation observed with each other ligand, respectively. In contrast 5-methylfurmethiodide evoked a half maximal receptor activation compared to the endogenous ligand ACh while only a minimal translocation of β -arrestin2 was observed.

The second aim of this study was to investigate the effects of allosteric ligands on the change of receptor conformation of the M_2 AChR. The allosteric ligands JK 337 and seminaph more strongly influenced the M_2i3 -C than the M_2i3 -N, whilst EHW 477 behaved just the opposite way. This data suggest that the orthosteric ligands induce a conformation of the M_2 AChR comparable to ACh. JK 337 and seminaph seem to evoke a greater movement underneath TM 6 compared to TM 5 whereas EHW 477 probably induces a larger movement beneath TM 5. The allosteric ligands were tested via FRET-measurements concerning their ability to activate the G_i protein and to translocate β -arrestin2. The activation of the G_i protein as well as the β -arrestin2 translocation were selectively influenced by all allosteric ligands. However, due to the experimental setup, a quantification of the effects was not possible.

Furthermore the bitopic ligands hybrid 1 and 2 (H 1, H 2) were tested regarding their effect on the receptor conformation of the M_2 AChR. While stimulation with H 1 induced FRET-signals that were comparable for both receptor sensors, it wasn't possible to detect any change in the FRET ratio neither of the M_2i3 -N nor of the M_2i3 -C with H 2. The lack of effect of H 1 and H 2 in the FRET-experiments was explored using two different approaches: Derivatives of H 1 and H 2, in which the carbon linker between the allosteric and the orthosteric building block had been elongated, were able to induce changes in the FRET-ratio. Upon the removal of the allosteric building block a half-maximal activation of both receptor sensors could be detected. However, the mutation of the allosteric binding site did not result in any change of the FRET-signals upon stimulation of the receptor mutants with H 1 or H 2. These data suggest that the carbon linker, which connects the allosteric and the orthosteric building block, is not long enough to enable a simultaneous binding to the allosteric and the orthosteric binding site. Another explanation would be that upon binding of an orthoster the channel between the orthosteric and the allosteric binding site of the M_2 AChR is closed because of the change in receptor conformation, hence a stable, dual-steric binding of the hybrid substances to the M_2 AChR would not be possible.

In the course of this study it was possible to prove the existence of a ligand selective receptor conformation of the M_2 AChR with allosteric ligands using FRET-experiments. In addition a connection was found to the occurrence of a functional selectivity with allosteric ligands. The investigation of 19 orthosteric ligands regarding their influence on the receptor conformation of the M_2 AChR did not reveal any evidence of the existence of a ligand selective change of the receptor conformation. Regarding the translocation of β -arrestin2 induced by orthosteric ligands there was a direct correlation between the efficiency of the orthosteric ligands to activate the receptor and the extend of β -arrestin2 translocation observed. With the only exception being 5-methylfurmethiodide which induced far less β -arrestin2 translocation compared to the magnitude of the conformational change of the receptor. This data suggest the existence of a signaling bias for this ligand. The analysis of the dualsteric ligands H 1 and H 2 concerning their ability to activate the M_2 AChR revealed that an activation of the M_2 AChR could just be observed upon elongation of the linker which connects the orthosteric with the allosteric building block. This suggests that the short linker chain of the original hybrid substances inhibited a dualsteric binding to the orthosteric and the allosteric binding site and thus caused the difficiency of H 1 and H 2 to activate the M_2 AChR.

7. Abkürzungsverzeichnis

τ	Geschwindigkeitskonstante
AR	Adrenorezeptor
[³ H] NMS	Tritium markiertes N-Methylscopolamin
Å	Angström
ACh	Acetylcholin
Ala	Alanin
AP-2	Adapterprotein 2
Asp	Aspartat
ATCM	allosterisches ternäres Komplexmodell (<i>allosteric ternary complex model</i>)
ATSM	allosterisches Zwei-Zustands Modell (<i>allosteric two state model</i>)
BFP	blau fluoreszierendes Protein (<i>blue fluorescent protein</i>)
bp	Basenpaare
BRET	Biolumineszenz-Resonanz-Energietransfer
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cystein
Ca ²⁺	zweiwertiges Kalziumion
CaCl ₂	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphate</i>)
CCVs	Stachelsaumbläschen (<i>clathrin-coated vesicles</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CFP	cyan fluoreszierendes Protein (<i>cyan fluorescent protein</i>)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (<i>cyclic guanosine monophosphate</i>)
CHO	Ovarzellen des chinesischen Hamsters (<i>chinese Hamster Ovary</i>)
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EC ₅₀	effektive Konzentration
eCFP	<i>enhanced CFP</i>
EDT	1,2-Ethandithiol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced GFP</i>
EL	extrazelluläre Rezeptorschleife (<i>extracellular loop</i>)
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
EtOH	Ethanol
FKS/FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FIAsH	biarsenischer Fluorophor (<i>fluorescein arsenical hairpin binder</i>)
FLIM	Fluoreszenz-Lebenszeit Mikroskopie (<i>fluorescence lifetime microscopy</i>)
FRET	Fluoreszenz/Förster-Resonanz-Energietransfer
G	Glycin
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	GTP-Austauschfaktor (<i>GTP exchange factor</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
G _i	inhibitorisches G-Protein
GIRK-Kanäle	G-Protein gekoppelte einwärts gleichgerichtete Kaliumkanäle (<i>g-protein coupled inward rectifying potassium channels</i>)
Glu, E	Glutamat
GPCR	G-Protein gekoppelte(r) Rezeptor(en) (<i>g-protein coupled receptor</i>)
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
G _s	stimulatorisches G-Protein

Abkürzungsverzeichnis

GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H	Histidin
H 1	Hybrid 1
H 2	Hybrid 2
H ₂ O	Wasser
HA- <i>tag</i>	Hämagglutinin-Signalsequenz
HEK	humane embryonale Nierenzellen (<i>human Embryonic Kidney</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hu	human
IC ₅₀	inhibitorische Konzentration
IL	intrazelluläre Rezeptorschleife (<i>intracellular loop</i>)
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
Iper/ I-oxo	Iperoxo
Iso	Isoleucin
kb	Kilo-Basenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kalium-Dihydrogenphosphat
KO	<i>Knock-out</i>
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth</i> -Medium
Leu, L	Leucin
Lys, K	Lysin
M	Methionin
M/V	Masse pro Volumen
M ₁ AChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor, Subtyp M ₁
M ₂ AChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor, Subtyp M ₂
M ₃ AChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor, Subtyp M ₃
M ₄ AChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor, Subtyp M ₄

Abkürzungsverzeichnis

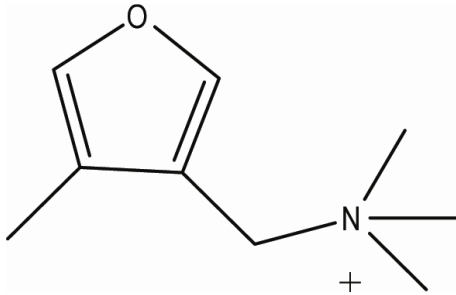
M ₅ AChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor, Subtyp M ₅
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MWC-Modell	Monod-Wyman-Changeux Modell
N	Asparagin
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NAM	negativer allosterischer Modulator (<i>negative allosteric modulator</i>)
NaOH	Natriumhydroxid
NSF	N-Ethylmaleimid-sensitives Fusionsprotein (<i>N-Ethylmaleimide sensitive fusion protein</i>)
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
P	Prolin
PAM	positiver allosterischer Modulator (<i>positive allosteric modulator</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDE6	Phosphodiesterase 6
PEG 3000	Polyethylenglycol 3000
Phe, F	Phenylalanin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PTX	Pertussistoxin
Q _D	Quantenausbeute des Donors
QNB	3-Quinuclidinylbenzilat
R	Arginin

Abkürzungsverzeichnis

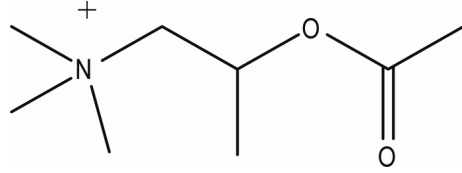
R ₀	Förster-Radius
ReAsH	roter biarsenischer Fluorophor (<i>red fluorescein arsenical hairpin binder</i>)
RFP	rot fluoreszierendes Protein (<i>red fluorescent protein</i>)
ROI	<i>region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
Src Tyrosinkinase	<i>sarcoma tyrosin kinase</i>
T	Threonin
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TCM	ternäres Komplexmodell (<i>ternary complex model</i>)
Thr, W	Threonin
TIRF microscopy	<i>total internal refraction fluorescence microscopy</i>
TM	Transmembrandomäne
TR-FRET	zeitauflösendes FRET (<i>time resolved FRET</i>)
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymetyl)-propan-1,2-diol
Tyr, Y	Tyrosin
V/V	Volumen pro Volumen
Val	Valin
wt	Wildtyp
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (<i>yellow fluorescent protein</i>)
ZNS	zentrales Nervensystem

8. Anhang

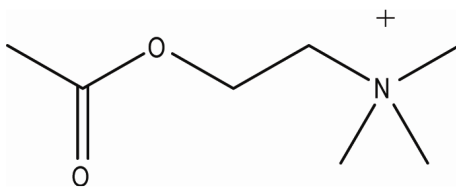
8.1 Strukturformeln orthosterischer Liganden



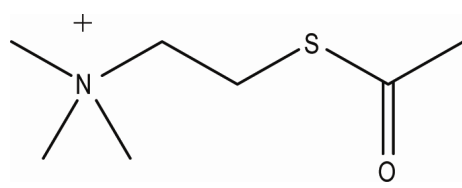
5-Methylfurfurmethiodid



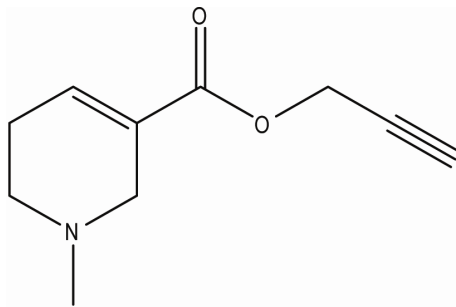
Acetyl- β -methylcholin



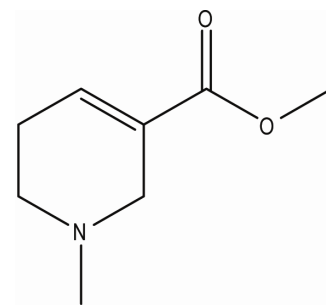
Acetylcholin



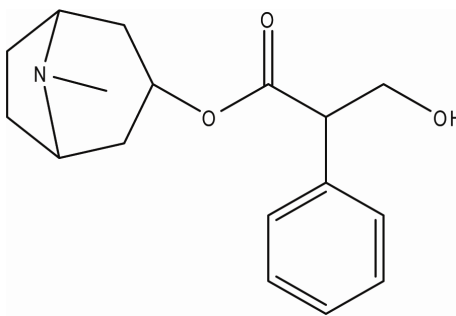
Acetylthiocholin



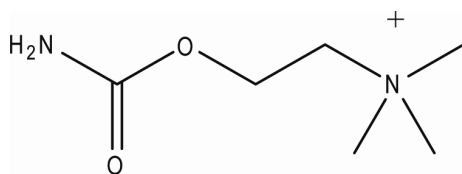
Arecaidin-2-ynylester Tosylat



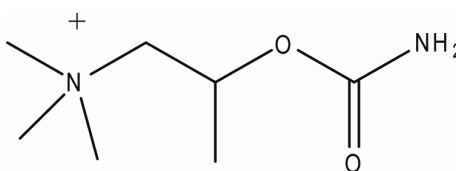
Arecolin



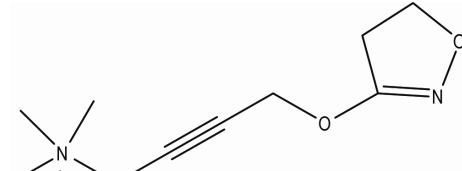
Atropin



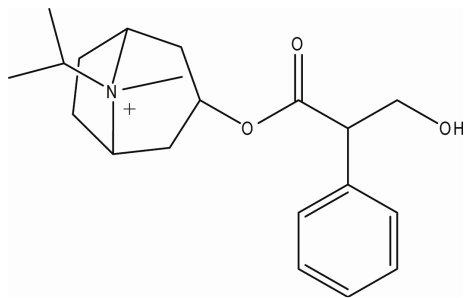
Carbachol



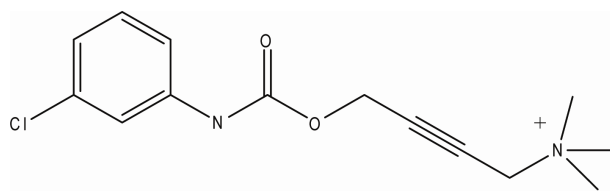
Carbamyl- β -methylcholin



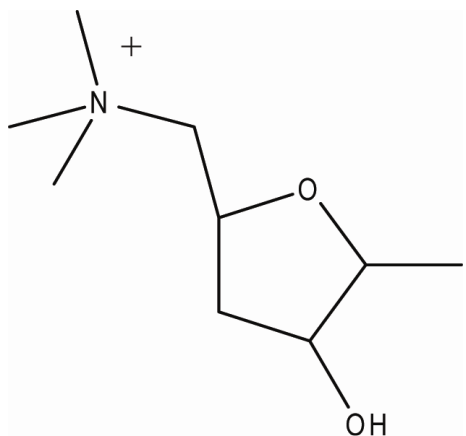
Iperoxo



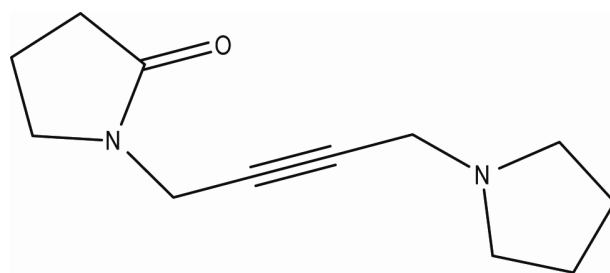
Ipratropium



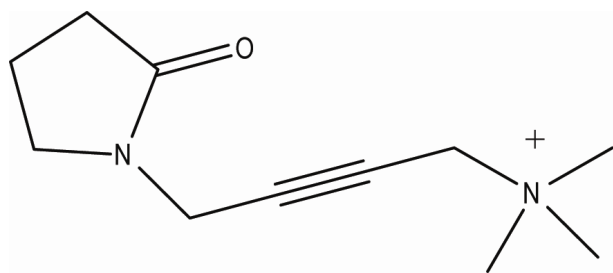
McN-A 343



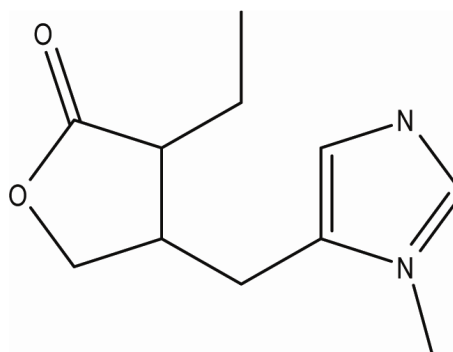
Muskarin



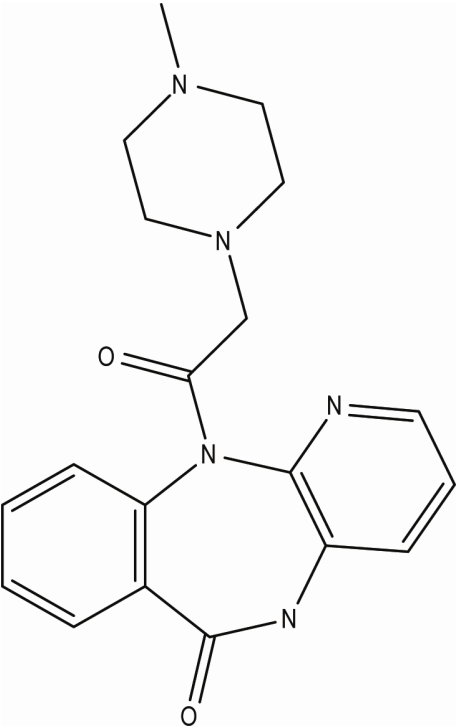
Oxotremorin



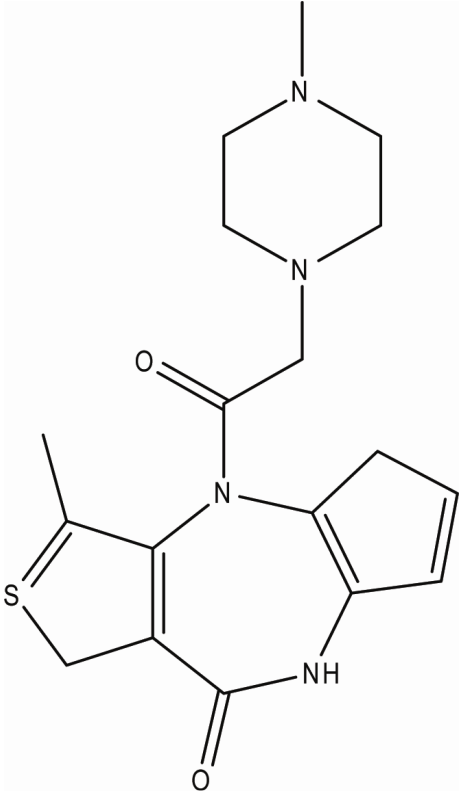
OxotremorinM



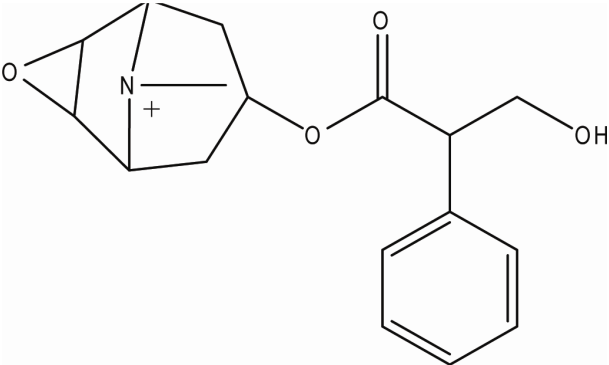
Pilocarpin



Pirenzepin



Telenzepin



Scopolamin

9. Literaturverzeichnis

1. Insel, P., et al., *GPCR expression in tissues and cells: Are the optimal receptors being used as drug targets?* British journal of pharmacology, 2012. **165**(6): p. 1613-6.
2. Hopkins, A.L. and C.R. Groom, *The druggable genome*. Nature reviews. Drug discovery, 2002. **1**(9): p. 727-30.
3. Palczewski K., e.a., *Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor*. . American journal of ophthalmology, 2000. **130**(6): p. 865.
4. Cherezov, V., et al., *High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor*. Science, 2007. **318**(5854): p. 1258-65.
5. Katragadda, M., M.W. Maciejewski, and P.L. Yeagle, *Structural studies of the putative helix 8 in the human beta(2) adrenergic receptor: an NMR study*. Biochimica et biophysica acta, 2004. **1663**(1-2): p. 74-81.
6. Haga, K., et al., *Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist*. Nature, 2012. **482**(7386): p. 547-51.
7. Beqollari, D. and P.J. Kammermeier, *Venus fly trap domain of mGluR1 functions as a dominant negative against group I mGluR signaling*. Journal of neurophysiology, 2010. **104**(1): p. 439-48.
8. Fredriksson, R., et al., *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. Molecular pharmacology, 2003. **63**(6): p. 1256-72.
9. Trzaskowski, B., et al., *Action of Molecular Switches in GPCRs - Theoretical and Experimental Studies*. Current medicinal chemistry, 2012. **19**(8): p. 1090-109.
10. Kobilka, B.K. and X. Deupi, *Conformational complexity of G-protein-coupled receptors*. Trends in pharmacological sciences, 2007. **28**(8): p. 397-406.
11. Vauquelin, G. and I. Van Liefde, *G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations*. Fundamental & clinical pharmacology, 2005. **19**(1): p. 45-56.
12. Ballesteros, J.A., et al., *Activation of the beta 2-adrenergic receptor involves disruption of an ionic lock between the cytoplasmic ends of transmembrane segments 3 and 6*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(31): p. 29171-7.
13. Bhattacharya, S., et al., *Ligand-stabilized conformational states of human beta(2) adrenergic receptor: insight into G-protein-coupled receptor activation*. Biophysical journal, 2008. **94**(6): p. 2027-42.
14. Bhattacharya, S., S.E. Hall, and N. Vaidehi, *Agonist-induced conformational changes in bovine rhodopsin: insight into activation of G-protein-coupled receptors*. Journal of molecular biology, 2008. **382**(2): p. 539-55.
15. Farrens, D.L., et al., *Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin*. Science, 1996. **274**(5288): p. 768-70.
16. Gether, U., et al., *Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor*. The EMBO journal, 1997. **16**(22): p. 6737-47.
17. Ghanouni, P., et al., *Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(11): p. 5997-6002.
18. Nygaard, R., et al., *Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures*. Trends in pharmacological sciences, 2009. **30**(5): p. 249-59.
19. Altenbach, C., et al., *High-resolution distance mapping in rhodopsin reveals the pattern of helix movement due to activation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(21): p. 7439-44.
20. Hamm, H.E., *The many faces of G protein signaling*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(2): p. 669-72.
21. Vogel, S.S., et al., *G proteins in Aplysia: biochemical characterization and regional and subcellular distribution*. Brain research, 1989. **478**(2): p. 281-92.

22. Kisselev, O.G., M.V. Ermolaeva, and N. Gautam, *A farnesylated domain in the G protein gamma subunit is a specific determinant of receptor coupling*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(34): p. 21399-402.
23. Vogler, O., et al., *Membrane interactions of G proteins and other related proteins*. Biochimica et biophysica acta, 2008. **1778**(7-8): p. 1640-52.
24. Noel, J.P., H.E. Hamm, and P.B. Sigler, *The 2.2 Å crystal structure of transducin- α complexed with GTP gamma S*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 654-63.
25. Chung, K.Y., et al., *Conformational changes in the G protein Gs induced by the beta2 adrenergic receptor*. Nature, 2011. **477**(7366): p. 611-5.
26. Bunemann, M., M. Frank, and M.J. Lohse, *Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(26): p. 16077-82.
27. Chisari, M., et al., *G protein subunit dissociation and translocation regulate cellular response to receptor stimulation*. PloS one, 2009. **4**(11): p. e7797.
28. Clapham, D.E. and E.J. Neer, *New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling*. Nature, 1993. **365**(6445): p. 403-6.
29. Spiegel, A.M., *Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins*. Molecular and cellular endocrinology, 1987. **49**(1): p. 1-16.
30. Gilman, A.G., *G proteins: transducers of receptor-generated signals*. Annual review of biochemistry, 1987. **56**: p. 615-49.
31. Jakubik, J., et al., *Subtype differences in pre-coupling of muscarinic acetylcholine receptors*. PloS one, 2011. **6**(11): p. e27732.
32. Hein, P., et al., *Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells*. The EMBO journal, 2005. **24**(23): p. 4106-14.
33. Ray, K., et al., *Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits*. The Journal of biological chemistry, 1995. **270**(37): p. 21765-71.
34. Hermans, E., *Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors*. Pharmacology & therapeutics, 2003. **99**(1): p. 25-44.
35. Simon, M.I., M.P. Strathmann, and N. Gautam, *Diversity of G proteins in signal transduction*. Science, 1991. **252**(5007): p. 802-8.
36. Freissmuth, M., P.J. Casey, and A.G. Gilman, *G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1989. **3**(10): p. 2125-31.
37. Stryer, L. and H.R. Bourne, *G proteins: a family of signal transducers*. Annual review of cell biology, 1986. **2**: p. 391-419.
38. Lambert, D.G., *Signal transduction: G proteins and second messengers*. British journal of anaesthesia, 1993. **71**(1): p. 86-95.
39. Milligan, G. and E. Kostenis, *Heterotrimeric G-proteins: a short history*. British journal of pharmacology, 2006. **147 Suppl 1**: p. S46-55.
40. Miller, W.E. and R.J. Lefkowitz, *Expanding roles for beta-arrestins as scaffolds and adapters in GPCR signaling and trafficking*. Current opinion in cell biology, 2001. **13**(2): p. 139-45.
41. Oakley, R.H., et al., *Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(22): p. 17201-10.
42. Scott, M.G., et al., *Differential nucleocytoplasmic shuttling of beta-arrestins. Characterization of a leucine-rich nuclear export signal in beta-arrestin2*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(40): p. 37693-701.
43. Gurevich, E.V., J.L. Benovic, and V.V. Gurevich, *Arrestin2 expression selectively increases during neural differentiation*. Journal of neurochemistry, 2004. **91**(6): p. 1404-16.
44. Zhang, J., et al., *Cellular trafficking of G protein-coupled receptor/beta-arrestin endocytic complexes*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(16): p. 10999-1006.

45. Tobin, A.B., A.J. Butcher, and K.C. Kong, *Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling*. Trends in pharmacological sciences, 2008. **29**(8): p. 413-20.
46. Gurevich, V.V. and J.L. Benovic, *Mechanism of phosphorylation-recognition by visual arrestin and the transition of arrestin into a high affinity binding state*. Molecular pharmacology, 1997. **51**(1): p. 161-9.
47. Tobin, A.B., *G-protein-coupled receptor phosphorylation: where, when and by whom*. British journal of pharmacology, 2008. **153 Suppl 1**: p. S167-76.
48. Krupnick, J.G. and J.L. Benovic, *The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation*. Annual review of pharmacology and toxicology, 1998. **38**: p. 289-319.
49. Gurevich, V.V. and E.V. Gurevich, *The new face of active receptor bound arrestin attracts new partners*. Structure, 2003. **11**(9): p. 1037-42.
50. Liggett, S.B., *Phosphorylation barcoding as a mechanism of directing GPCR signaling*. Science signaling, 2011. **4**(185): p. pe36.
51. Lefkowitz, R.J. and S.K. Shenoy, *Transduction of receptor signals by beta-arrestins*. Science, 2005. **308**(5721): p. 512-7.
52. Shenoy, S.K. and R.J. Lefkowitz, *Receptor regulation: beta-arrestin moves up a notch*. Nature cell biology, 2005. **7**(12): p. 1159-61.
53. McDonald, P.H. and R.J. Lefkowitz, *Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions*. Cellular signalling, 2001. **13**(10): p. 683-9.
54. Pierce, K.L. and R.J. Lefkowitz, *Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors*. Nature reviews. Neuroscience, 2001. **2**(10): p. 727-33.
55. Lefkowitz, R.J. and E.J. Whalen, *beta-arrestins: traffic cops of cell signaling*. Current opinion in cell biology, 2004. **16**(2): p. 162-8.
56. McDonald, P.H., et al., *Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3*. Science, 2000. **290**(5496): p. 1574-7.
57. Daaka, Y., et al., *Essential role for G protein-coupled receptor endocytosis in the activation of mitogen-activated protein kinase*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(2): p. 685-8.
58. Luttrell, L.M., et al., *Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes*. Science, 1999. **283**(5402): p. 655-61.
59. Rajagopal, S., K. Rajagopal, and R.J. Lefkowitz, *Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors*. Nature reviews. Drug discovery, 2010. **9**(5): p. 373-86.
60. Lohse, M.J., et al., *beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function*. Science, 1990. **248**(4962): p. 1547-50.
61. Lohse, M.J., et al., *Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors*. The Journal of biological chemistry, 1990. **265**(6): p. 3202-11.
62. Hausdorff, W.P., M.G. Caron, and R.J. Lefkowitz, *Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1990. **4**(11): p. 2881-9.
63. Lefkowitz, R.J., *G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(30): p. 18677-80.
64. Krupnick, J.G., et al., *Arrestin/clathrin interaction. Localization of the clathrin binding domain of nonvisual arrestins to the carboxy terminus*. The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(23): p. 15011-6.
65. Lin, F.T., et al., *Clathrin-mediated endocytosis of the beta-adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of beta-arrestin1*. The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(49): p. 31051-7.
66. Laporte, S.A., et al., *beta-Arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization: identification of a beta-arrestin binding site in beta 2-adaptin*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(11): p. 9247-54.

67. McDonald, P.H., et al., *Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(16): p. 10677-80.
68. Krueger, K.M., et al., *The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification*. The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(1): p. 5-8.
69. Anborgh, P.H., et al., *Receptor/beta-arrestin complex formation and the differential trafficking and resensitization of beta2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptors*. Molecular endocrinology, 2000. **14**(12): p. 2040-53.
70. Caulfield, M.P. and N.J. Birdsall, *International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors*. Pharmacological reviews, 1998. **50**(2): p. 279-90.
71. Leach, K., et al., *Structure-function studies of muscarinic acetylcholine receptors*. Handbook of experimental pharmacology, 2012. **208**: p. 29-48.
72. van Koppen, C.J. and N.M. Nathanson, *Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function*. The Journal of biological chemistry, 1990. **265**(34): p. 20887-92.
73. Wess, J., *Mutational analysis of muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand/receptor/G protein interactions*. Life sciences, 1993. **53**(19): p. 1447-63.
74. Kubo, T., et al., *Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor*. Nature, 1986. **323**(6087): p. 411-6.
75. Bonner, T.I., et al., *Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes*. Science, 1987. **237**(4814): p. 527-32.
76. Wess, J., *Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function*. Trends in pharmacological sciences, 1993. **14**(8): p. 308-13.
77. Nathanson, N.M., *Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor*. Annual review of neuroscience, 1987. **10**: p. 195-236.
78. Lee, K.B., et al., *Acidic amino acids flanking phosphorylation sites in the M2 muscarinic receptor regulate receptor phosphorylation, internalization, and interaction with arrestins*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(46): p. 35767-77.
79. Hulme, E.C., N.J. Birdsall, and N.J. Buckley, *Muscarinic receptor subtypes*. Annual review of pharmacology and toxicology, 1990. **30**: p. 633-73.
80. Hulme, E.C., *Muscarinic acetylcholine receptors: typical G-coupled receptors*. Symposia of the Society for Experimental Biology, 1990. **44**: p. 39-54.
81. Rosenbaum, D.M., et al., *GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function*. Science, 2007. **318**(5854): p. 1266-73.
82. Warne, T., et al., *Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 486-91.
83. Rasmussen, S.G., et al., *Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor*. Nature, 2011. **469**(7329): p. 175-80.
84. Kruse, A.C., et al., *Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor*. Nature, 2012. **482**(7386): p. 552-6.
85. Hut, R.A. and E.A. Van der Zee, *The cholinergic system, circadian rhythmicity, and time memory*. Behavioural brain research, 2011. **221**(2): p. 466-80.
86. Goodwin, J.A., et al., *Roof and floor of the muscarinic binding pocket: variations in the binding modes of orthosteric ligands*. Molecular pharmacology, 2007. **72**(6): p. 1484-96.
87. Heitz, F., et al., *Site-directed mutagenesis of the putative human muscarinic M2 receptor binding site*. European journal of pharmacology, 1999. **380**(2-3): p. 183-95.
88. Savarese, T.M., C.D. Wang, and C.M. Fraser, *Site-directed mutagenesis of the rat m1 muscarinic acetylcholine receptor. Role of conserved cysteines in receptor function*. The Journal of biological chemistry, 1992. **267**(16): p. 11439-48.
89. Wess, J., D. Gdula, and M.R. Brann, *Site-directed mutagenesis of the m3 muscarinic receptor: identification of a series of threonine and tyrosine residues involved in agonist but not antagonist binding*. The EMBO journal, 1991. **10**(12): p. 3729-34.

90. Wess, J., *Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors*. Critical reviews in neurobiology, 1996. **10**(1): p. 69-99.
91. van Koppen, C.J. and B. Kaiser, *Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling*. Pharmacology & therapeutics, 2003. **98**(2): p. 197-220.
92. Hedin, K.E., K. Duerson, and D.E. Clapham, *Specificity of receptor-G protein interactions: searching for the structure behind the signal*. Cellular signalling, 1993. **5**(5): p. 505-18.
93. Caulfield, M.P., *Muscarinic receptors--characterization, coupling and function*. Pharmacology & therapeutics, 1993. **58**(3): p. 319-79.
94. Rumenapp, U., et al., *The M3 muscarinic acetylcholine receptor expressed in HEK-293 cells signals to phospholipase D via G12 but not Gq-type G proteins: regulators of G proteins as tools to dissect pertussis toxin-resistant G proteins in receptor-effector coupling*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(4): p. 2474-9.
95. Peralta, E.G., et al., *Structural basis of muscarinic acetylcholine receptor subtype diversity*. Trends in pharmacological sciences, 1988. **Suppl**: p. 6-11.
96. Lanzafame, A.A., A. Christopoulos, and F. Mitchelson, *Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors*. Receptors & channels, 2003. **9**(4): p. 241-60.
97. Michal, P., E.E. El-Fakahany, and V. Dolezal, *Muscarinic M2 receptors directly activate Gq/11 and Gs G-proteins*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2007. **320**(2): p. 607-14.
98. Kostenis, E., F.Y. Zeng, and J. Wess, *Structure-function analysis of muscarinic acetylcholine receptors*. Journal of physiology, Paris, 1998. **92**(3-4): p. 265-8.
99. Prenzel, N., et al., *EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF*. Nature, 1999. **402**(6764): p. 884-8.
100. Wess, J., et al., *Muscarinic acetylcholine receptors: structural basis of ligand binding and G protein coupling*. Life sciences, 1995. **56**(11-12): p. 915-22.
101. Hosey, M.M., *Diversity of structure, signaling and regulation within the family of muscarinic cholinergic receptors*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 1992. **6**(3): p. 845-52.
102. Haga, T., et al., *Phosphorylation of muscarinic receptors: regulation by G proteins*. Life sciences, 1993. **52**(5-6): p. 421-8.
103. Kameyama, K., et al., *Activation of a GTP-binding protein and a GTP-binding-protein-coupled receptor kinase (beta-adrenergic-receptor kinase-1) by a muscarinic receptor m2 mutant lacking phosphorylation sites*. European journal of biochemistry / FEBS, 1994. **226**(2): p. 267-76.
104. Wessler, I. and C.J. Kirkpatrick, *Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans*. British journal of pharmacology, 2008. **154**(8): p. 1558-71.
105. Wickman, K., et al., *Structure, G protein activation, and functional relevance of the cardiac G protein-gated K+ channel, IKACH*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1999. **868**: p. 386-98.
106. Mark, M.D. and S. Herlitze, *G-protein mediated gating of inward-rectifier K+ channels*. European journal of biochemistry / FEBS, 2000. **267**(19): p. 5830-6.
107. Eglén, R.M., *Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function*. Autonomic & autacoid pharmacology, 2006. **26**(3): p. 219-33.
108. Wess, J., R.M. Eglén, and D. Gautam, *Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development*. Nature reviews. Drug discovery, 2007. **6**(9): p. 721-33.
109. Koenig, J.A. and J.M. Edwardson, *Intracellular trafficking of the muscarinic acetylcholine receptor: importance of subtype and cell type*. Molecular pharmacology, 1996. **49**(2): p. 351-9.
110. Vogler, O., et al., *Regulation of muscarinic acetylcholine receptor sequestration and function by beta-arrestin*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(18): p. 12333-8.
111. Van Koppen, C.J., et al., *Deletion analysis of the m4 muscarinic acetylcholine receptor. Molecular determinants for activation of but not coupling to the Gi guanine-nucleotide-*

- binding regulatory protein regulate receptor internalization*. European journal of biochemistry / FEBS, 1994. **222**(2): p. 525-31.
112. Moro, O., J. Lamah, and W. Sadee, *Serine- and threonine-rich domain regulates internalization of muscarinic cholinergic receptors*. The Journal of biological chemistry, 1993. **268**(10): p. 6862-5.
113. Lee, K.B., et al., *Arrestin-independent internalization of the m1, m3, and m4 subtypes of muscarinic cholinergic receptors*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(21): p. 12967-72.
114. Tsuga, H., et al., *Sequestration of muscarinic acetylcholine receptor m2 subtypes. Facilitation by G protein-coupled receptor kinase (GRK2) and attenuation by a dominant-negative mutant of GRK2*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(51): p. 32522-7.
115. Claing, A., et al., *Multiple endocytic pathways of G protein-coupled receptors delineated by GIT1 sensitivity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(3): p. 1119-24.
116. Wu, G., et al., *Identification of Gbetagamma binding sites in the third intracellular loop of the M(3)-muscarinic receptor and their role in receptor regulation*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(12): p. 9026-34.
117. Roseberry, A.G. and M.M. Hosey, *Internalization of the M2 muscarinic acetylcholine receptor proceeds through an atypical pathway in HEK293 cells that is independent of clathrin and caveolae*. Journal of cell science, 2001. **114**(Pt 4): p. 739-46.
118. Mundell, S.J. and J.L. Benovic, *Selective regulation of endogenous G protein-coupled receptors by arrestins in HEK293 cells*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(17): p. 12900-8.
119. Jones, K.T., et al., *Agonist mediated internalization of M2 mAChR is beta-arrestin-dependent*. Journal of molecular signaling, 2006. **1**: p. 7.
120. Mosser, V.A., et al., *Differential role of beta-arrestin ubiquitination in agonist-promoted down-regulation of M1 vs M2 muscarinic acetylcholine receptors*. Journal of molecular signaling, 2008. **3**: p. 20.
121. Dessy, C., et al., *Dynamin mediates caveolar sequestration of muscarinic cholinergic receptors and alteration in NO signaling*. The EMBO journal, 2000. **19**(16): p. 4272-80.
122. Wess, J., *Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2004. **44**: p. 423-50.
123. Eglén, R.M., S.S. Hegde, and N. Watson, *Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function*. Pharmacological reviews, 1996. **48**(4): p. 531-65.
124. Brodde, O.E. and M.C. Michel, *Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart*. Pharmacological reviews, 1999. **51**(4): p. 651-90.
125. Felder, C.C., et al., *Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system*. Journal of medicinal chemistry, 2000. **43**(23): p. 4333-53.
126. Yamada, M., et al., *Mice lacking the M3 muscarinic acetylcholine receptor are hypophagic and lean*. Nature, 2001. **410**(6825): p. 207-12.
127. Matsui, M., et al., *Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M3 subtype*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(17): p. 9579-84.
128. Gautam, D., et al., *Beneficial metabolic effects caused by persistent activation of beta-cell M3 muscarinic acetylcholine receptors in transgenic mice*. Endocrinology, 2010. **151**(11): p. 5185-94.
129. Gautam, D., et al., *Beneficial metabolic effects of M3 muscarinic acetylcholine receptor deficiency*. Cell metabolism, 2006. **4**(5): p. 363-75.
130. Eglén, R.M. and S.R. Nahorski, *The muscarinic M(5) receptor: a silent or emerging subtype?* British journal of pharmacology, 2000. **130**(1): p. 13-21.
131. Bonner, T.I., et al., *Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes*. Neuron, 1988. **1**(5): p. 403-10.

132. Weiner, D.M., A.I. Levey, and M.R. Brann, *Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(18): p. 7050-4.
133. Phillips, J.K., M. Vidovic, and C.E. Hill, *Variation in mRNA expression of alpha-adrenergic, neurokinin and muscarinic receptors amongst four arteries of the rat*. Journal of the autonomic nervous system, 1997. **62**(1-2): p. 85-93.
134. Levey, A.I., *Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain*. Life sciences, 1993. **52**(5-6): p. 441-8.
135. Gerber, D.J., et al., *Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(26): p. 15312-7.
136. Bymaster, F.P., et al., *Use of M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system*. Neurochemical research, 2003. **28**(3-4): p. 437-42.
137. Gomeza, J., et al., *Enhancement of D1 dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M(4) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(18): p. 10483-8.
138. Gomeza, J., et al., *Pronounced pharmacologic deficits in M2 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(4): p. 1692-7.
139. Yamada, M., et al., *Cholinergic dilation of cerebral blood vessels is abolished in M(5) muscarinic acetylcholine receptor knockout mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(24): p. 14096-101.
140. Basile, A.S., et al., *Deletion of the M5 muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(17): p. 11452-7.
141. Andersson, K.E., L. Campeau, and B. Olshansky, *Cardiac effects of muscarinic receptor antagonists used for voiding dysfunction*. British journal of clinical pharmacology, 2011. **72**(2): p. 186-96.
142. Brodde, O.E., et al., *Cardiac muscarinic receptors decrease with age. In vitro and in vivo studies*. The Journal of clinical investigation, 1998. **101**(2): p. 471-8.
143. Niihashi, M., et al., *Expression of muscarinic receptor genes in the human coronary artery*. Angiology, 2000. **51**(4): p. 295-300.
144. Konidala, S. and D.D. Gutterman, *Coronary vasospasm and the regulation of coronary blood flow*. Progress in cardiovascular diseases, 2004. **46**(4): p. 349-73.
145. Matsui, M., et al., *Mice lacking M2 and M3 muscarinic acetylcholine receptors are devoid of cholinergic smooth muscle contractions but still viable*. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 2002. **22**(24): p. 10627-32.
146. Jakubik, J. and E.E. El-Fakahany. *Allosteric Modulation of Muscarinic Acetylcholine Receptors*. Pharmaceuticals 2010 [cited 3; 2838-2860].
147. Ruiz de Azua, I., et al., *Novel insights into the function of beta-cell M3 muscarinic acetylcholine receptors: therapeutic implications*. Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 2011. **22**(2): p. 74-80.
148. Kong, K.C., et al., *M3-muscarinic receptor promotes insulin release via receptor phosphorylation/arrestin-dependent activation of protein kinase D1*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010. **107**(49): p. 21181-6.
149. Holland, M.G., *Autonomic drugs in ophthalmology: some problems and promises. Section II: Anticholinergic drugs*. Annals of ophthalmology, 1974. **6**(7): p. 661-4.
150. Kabra, S.K., et al., *Diagnosing and managing cystic fibrosis in the developing world*. Paediatric respiratory reviews, 2006. **7 Suppl 1**: p. S147-50.
151. Abramov, Y. and P.K. Sand, *Oxybutynin for treatment of urge urinary incontinence and overactive bladder: an updated review*. Expert opinion on pharmacotherapy, 2004. **5**(11): p. 2351-9.

152. Tzefos, M., C. Dolder, and J.L. Olin, *Fesoterodine for the treatment of overactive bladder*. The Annals of pharmacotherapy, 2009. **43**(12): p. 1992-2000.
153. Baldwin, C.M. and G.M. Keating, *Transdermal oxybutynin*. Drugs, 2009. **69**(3): p. 327-37.
154. Tryba, M. and D. Cook, *Current guidelines on stress ulcer prophylaxis*. Drugs, 1997. **54**(4): p. 581-96.
155. Keating, G.M., *Tiotropium bromide inhalation powder: a review of its use in the management of chronic obstructive pulmonary disease*. Drugs, 2012. **72**(2): p. 273-300.
156. Restrepo, R.D., *Use of inhaled anticholinergic agents in obstructive airway disease*. Respiratory care, 2007. **52**(7): p. 833-51.
157. Spinks, A. and J. Wasiak, *Scopolamine (hyoscine) for preventing and treating motion sickness*. Cochrane database of systematic reviews, 2011(6): p. CD002851.
158. Brocks, D.R., *Anticholinergic drugs used in Parkinson's disease: An overlooked class of drugs from a pharmacokinetic perspective*. Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques, 1999. **2**(2): p. 39-46.
159. Yarnall, A., L. Rochester, and D.J. Burn, *The interplay of cholinergic function, attention, and falls in Parkinson's disease*. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society, 2011. **26**(14): p. 2496-503.
160. Lester, D.B., T.D. Rogers, and C.D. Blaha, *Acetylcholine-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders*. CNS neuroscience & therapeutics, 2010. **16**(3): p. 137-62.
161. Doody, R.S., J.L. Cummings, and M.R. Farlow, *Reviewing the Role of Donepezil in the Treatment of Alzheimer's Disease*. Current Alzheimer research, 2011.
162. Tayeb, H.O., et al., *Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors*. Pharmacology & therapeutics, 2012. **134**(1): p. 8-25.
163. Lockhart, I.A., M.E. Orme, and S.A. Mitchell, *The efficacy of licensed-indication use of donepezil and memantine monotherapies for treating behavioural and psychological symptoms of dementia in patients with Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis*. Dementia and geriatric cognitive disorders extra, 2011. **1**(1): p. 212-27.
164. Herrmann, N., et al., *Current and emerging drug treatment options for Alzheimer's disease: a systematic review*. Drugs, 2011. **71**(15): p. 2031-65.
165. Schliebs, R. and T. Arendt, *The cholinergic system in aging and neuronal degeneration*. Behavioural brain research, 2011. **221**(2): p. 555-63.
166. Hasnain, M., *Psychosis in Parkinson's disease: therapeutic options*. Drugs of today, 2011. **47**(5): p. 353-67.
167. Patel, S.S., et al., *Acetylcholinesterase Inhibitors (AChEI's) for the treatment of visual hallucinations in schizophrenia: a review of the literature*. BMC psychiatry, 2010. **10**: p. 69.
168. Singh, J., K. Kour, and M.B. Jayaram, *Acetylcholinesterase inhibitors for schizophrenia*. Cochrane database of systematic reviews, 2012. **1**: p. CD007967.
169. Rubesa, G., L. Gudelj, and N. Kubinska, *Etiology of schizophrenia and therapeutic options*. Psychiatria Danubina, 2011. **23**(3): p. 308-15.
170. Eisenach, J.C., *Epidural neostigmine: will it replace lipid soluble opioids for postoperative and labor analgesia?* Anesthesia and analgesia, 2009. **109**(2): p. 293-5.
171. Yoon, M.H., J.I. Choi, and S.W. Jeong, *Antinociception of intrathecal cholinesterase inhibitors and cholinergic receptors in rats*. Acta anaesthesiologica Scandinavica, 2003. **47**(9): p. 1079-84.
172. Iwamoto, E.T. and L. Marion, *Characterization of the antinociception produced by intrathecally administered muscarinic agonists in rats*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1993. **266**(1): p. 329-38.
173. Duttaroy, A., et al., *Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice*. Molecular pharmacology, 2002. **62**(5): p. 1084-93.
174. Bartolini, A., et al., *Role of muscarinic receptor subtypes in central antinociception*. British journal of pharmacology, 1992. **105**(1): p. 77-82.

175. Spindel, E.R., *Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on cancer*. Handbook of experimental pharmacology, 2012. **208**: p. 451-68.
176. Balakrishnan, S., J. Mathew, and C.S. Paulose, *Cholinergic and glutamergic receptor functional regulation in long-term, low dose somatotropin and insulin treatment to ageing rats: rejuvenation of brain function*. Molecular and cellular endocrinology, 2010. **314**(1): p. 23-30.
177. Winzell, M.S. and B. Ahren, *G-protein-coupled receptors and islet function-implications for treatment of type 2 diabetes*. Pharmacology & therapeutics, 2007. **116**(3): p. 437-48.
178. Sofuoglu, M. and M. Mooney, *Cholinergic functioning in stimulant addiction: implications for medications development*. CNS drugs, 2009. **23**(11): p. 939-52.
179. Wess, J., *Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology*. Trends in pharmacological sciences, 2003. **24**(8): p. 414-20.
180. Fisher, A., *Cholinergic treatments with emphasis on m1 muscarinic agonists as potential disease-modifying agents for Alzheimer's disease*. Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 2008. **5**(3): p. 433-42.
181. Enna, S.J. and M. Williams, *Challenges in the search for drugs to treat central nervous system disorders*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2009. **329**(2): p. 404-11.
182. Eglen, R.M., A. Choppin, and N. Watson, *Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research*. Trends in pharmacological sciences, 2001. **22**(8): p. 409-14.
183. Kenakin, T.P., *Ligand detection in the allosteric world*. Journal of biomolecular screening, 2010. **15**(2): p. 119-30.
184. Monod, J., J.P. Changeux, and F. Jacob, *Allosteric proteins and cellular control systems*. Journal of molecular biology, 1963. **6**: p. 306-29.
185. Tyuma, I., *The Bohr effect and the Haldane effect in human hemoglobin*. The Japanese journal of physiology, 1984. **34**(2): p. 205-16.
186. May, L.T., et al., *Allosteric modulation of G protein-coupled receptors*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2007. **47**: p. 1-51.
187. Canals, M., et al., *A Monod-Wyman-Changeux mechanism can explain G protein-coupled receptor (GPCR) allosteric modulation*. The Journal of biological chemistry, 2012. **287**(1): p. 650-9.
188. Canals, M., P.M. Sexton, and A. Christopoulos, *Allostery in GPCRs: 'MWC' revisited*. Trends in biochemical sciences, 2011. **36**(12): p. 663-72.
189. Fung, J.J., et al., *Ligand-regulated oligomerization of beta(2)-adrenoceptors in a model lipid bilayer*. The EMBO journal, 2009. **28**(21): p. 3315-28.
190. Dorsch, S., et al., *Analysis of receptor oligomerization by FRAP microscopy*. Nature methods, 2009. **6**(3): p. 225-30.
191. Sheffler, D.J., et al., *Allosteric modulation of metabotropic glutamate receptors*. Advances in pharmacology, 2011. **62**: p. 37-77.
192. Smith, N.J. and G. Milligan, *Allostery at G protein-coupled receptor homo- and heteromers: uncharted pharmacological landscapes*. Pharmacological reviews, 2010. **62**(4): p. 701-25.
193. Karlin, A., *On the application of "a plausible model" of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine*. Journal of theoretical biology, 1967. **16**(2): p. 306-20.
194. Leff, P., *The two-state model of receptor activation*. Trends in pharmacological sciences, 1995. **16**(3): p. 89-97.
195. Ehlert, F.J. and M.T. Griffin, *Two-state models and the analysis of the allosteric effect of gallamine at the M2 muscarinic receptor*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2008. **325**(3): p. 1039-60.
196. Langmead, C.J., *Screening for positive allosteric modulators: assessment of modulator concentration-response curves as a screening paradigm*. Journal of biomolecular screening, 2007. **12**(5): p. 668-76.
197. Gregory, K.J., P.M. Sexton, and A. Christopoulos, *Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors*. Current neuropharmacology, 2007. **5**(3): p. 157-67.

198. Avlani, V., et al., *Application of a kinetic model to the apparently complex behavior of negative and positive allosteric modulators of muscarinic acetylcholine receptors*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2004. **308**(3): p. 1062-72.
199. Kenakin, T.P., *Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery*. British journal of pharmacology, 2012. **165**(6): p. 1659-69.
200. Kenakin, T., *Drug efficacy at G protein-coupled receptors*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2002. **42**: p. 349-79.
201. Ellis, J., J. Huyler, and M.R. Brann, *Allosteric Regulation of Cloned M1-M5 Muscarinic Receptor Subtypes*. Biochemical pharmacology, 1991. **42**(10): p. 1927-1932.
202. Jakubik, J., et al., *Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors*. Molecular pharmacology, 1997. **52**(1): p. 172-9.
203. Suratman, S., et al., *Impact of species variability and 'probe-dependence' on the detection and in vivo validation of allosteric modulation at the M4 muscarinic acetylcholine receptor*. British journal of pharmacology, 2011. **162**(7): p. 1659-70.
204. Valant, C., et al., *Probe dependence in the allosteric modulation of a G protein-coupled receptor: implications for detection and validation of allosteric ligand effects*. Molecular pharmacology, 2012. **81**(1): p. 41-52.
205. Price, M.R., et al., *Allosteric modulation of the cannabinoid CB1 receptor*. Molecular pharmacology, 2005. **68**(5): p. 1484-95.
206. Langmead, C.J. and A. Christopoulos, *Allosteric agonists of 7TM receptors: expanding the pharmacological toolbox*. Trends in pharmacological sciences, 2006. **27**(9): p. 475-81.
207. Hall, D.A., *Modeling the functional effects of allosteric modulators at pharmacological receptors: an extension of the two-state model of receptor activation*. Molecular pharmacology, 2000. **58**(6): p. 1412-23.
208. Spalding, T.A., et al., *Discovery of an ectopic activation site on the M(1) muscarinic receptor*. Molecular pharmacology, 2002. **61**(6): p. 1297-302.
209. Sur, C., et al., *N-desmethylozapine, an allosteric agonist at muscarinic 1 receptor, potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(23): p. 13674-9.
210. Kenakin, T. and L.J. Miller, *Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery*. Pharmacological reviews, 2010. **62**(2): p. 265-304.
211. Vaidehi, N. and T. Kenakin, *The role of conformational ensembles of seven transmembrane receptors in functional selectivity*. Current opinion in pharmacology, 2010. **10**(6): p. 775-81.
212. Kenakin, T., *Functional selectivity and biased receptor signaling*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2011. **336**(2): p. 296-302.
213. Magalhaes, A.C., H. Dunn, and S.S. Ferguson, *Regulation of GPCR activity, trafficking and localization by GPCR-interacting proteins*. British journal of pharmacology, 2012. **165**(6): p. 1717-36.
214. Shenoy, S.K., et al., *beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(2): p. 1261-73.
215. Gesty-Palmer, D., et al., *Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(16): p. 10856-64.
216. Galandrin, S., G. Oligny-Longpre, and M. Bouvier, *The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery*. Trends in pharmacological sciences, 2007. **28**(8): p. 423-30.
217. Swaminath, G., et al., *Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(1): p. 686-91.
218. Kenakin, T., *Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem*. Trends in pharmacological sciences, 2003. **24**(7): p. 346-54.

219. Azzi, M., et al., *Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(20): p. 11406-11.
220. Grossmuller, M., et al., *Allosteric site in M2 acetylcholine receptors: evidence for a major conformational change upon binding of an orthosteric agonist instead of an antagonist*. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 2006. **372**(4): p. 267-76.
221. Gilchrist, A., *Modulating G-protein-coupled receptors: from traditional pharmacology to allosterics*. Trends in pharmacological sciences, 2007. **28**(8): p. 431-7.
222. Mailman, R.B., *GPCR functional selectivity has therapeutic impact*. Trends in pharmacological sciences, 2007. **28**(8): p. 390-6.
223. Drake, M.T., et al., *beta-arrestin-biased agonism at the beta2-adrenergic receptor*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(9): p. 5669-76.
224. Kohout, T.A., et al., *Differential desensitization, receptor phosphorylation, beta-arrestin recruitment, and ERK1/2 activation by the two endogenous ligands for the CC chemokine receptor 7*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(22): p. 23214-22.
225. Gesty-Palmer, D. and L.M. Luttrell, *Refining efficacy: exploiting functional selectivity for drug discovery*. Advances in pharmacology, 2011. **62**: p. 79-107.
226. Leach, K., P.M. Sexton, and A. Christopoulos, *Allosteric GPCR modulators: taking advantage of permissive receptor pharmacology*. Trends in pharmacological sciences, 2007. **28**(8): p. 382-9.
227. Stewart, G.D., P.M. Sexton, and A. Christopoulos, *Prediction of functionally selective allosteric interactions at an M3 muscarinic acetylcholine receptor mutant using Saccharomyces cerevisiae*. Molecular pharmacology, 2010. **78**(2): p. 205-14.
228. Valant, C., et al., *The best of both worlds? Bitopic orthosteric/allosteric ligands of g protein-coupled receptors*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2012. **52**: p. 153-78.
229. Leach, K., P.M. Sexton, and A. Christopoulos, *Quantification of allosteric interactions at G protein-coupled receptors using radioligand binding assays*. Current protocols in pharmacology / editorial board, S.J. Enna, 2011. **Chapter 1**: p. Unit 1 22.
230. Lazareno, S. and N.J. Birdsall, *Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors: interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors*. Molecular pharmacology, 1995. **48**(2): p. 362-78.
231. Trankle, C., et al., *Identification of a [3H]Ligand for the common allosteric site of muscarinic acetylcholine M2 receptors*. Molecular pharmacology, 1998. **54**(1): p. 139-45.
232. Christopoulos, A., M.K. Grant, and E.E. El-Fakahany, *Transducer abstraction: a novel approach to the detection of partial agonist efficacy in radioligand binding studies*. Journal of pharmacological and toxicological methods, 2000. **43**(1): p. 55-67.
233. Ehlert, F.J., *Analysis of allosterism in functional assays*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2005. **315**(2): p. 740-54.
234. Kenakin, T.P., *Cellular assays as portals to seven-transmembrane receptor-based drug discovery*. Nature reviews. Drug discovery, 2009. **8**(8): p. 617-26.
235. May, L.T., et al., *Allosteric modulation of G protein-coupled receptors*. Current pharmaceutical design, 2004. **10**(17): p. 2003-13.
236. Christopoulos, A., *Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery*. Nature reviews. Drug discovery, 2002. **1**(3): p. 198-210.
237. Melchiorre, C., et al., *Polymethylene tetraamines as muscarinic receptor probes*. Trends in pharmacological sciences, 1989. **Suppl**: p. 55-9.
238. Johnson, M.P., et al., *Allosteric modulators of metabotropic glutamate receptors: lessons learnt from mGlu1, mGlu2 and mGlu5 potentiators and antagonists*. Biochemical Society transactions, 2004. **32**(Pt 5): p. 881-7.
239. Mohler, H., J.M. Fritschy, and U. Rudolph, *A new benzodiazepine pharmacology*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2002. **300**(1): p. 2-8.

240. Geerts, H. and G.T. Grossberg, *Pharmacology of acetylcholinesterase inhibitors and N-methyl-D-aspartate receptors for combination therapy in the treatment of Alzheimer's disease*. Journal of clinical pharmacology, 2006. **46**(7 Suppl 1): p. 8S-16S.
241. Kebig, A. and K. Mohr, [*Cinacalcet - an allosteric enhancer at the Ca²⁺-receptor*]. Deutsche medizinische Wochenschrift, 2008. **133**(33): p. 1681-3.
242. Marcocci, C. and F. Cetani, *Update on the use of cinacalcet in the management of primary hyperparathyroidism*. Journal of endocrinological investigation, 2012. **35**(1): p. 90-5.
243. Davey, A.E., et al., *Positive and negative allosteric modulators promote biased signaling at the calcium-sensing receptor*. Endocrinology, 2012. **153**(3): p. 1232-41.
244. Parra, J., et al., *Clinical utility of maraviroc*. Clinical drug investigation, 2011. **31**(8): p. 527-42.
245. Garcia-Perez, J., et al., *Allosteric model of maraviroc binding to CC chemokine receptor 5 (CCR5)*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(38): p. 33409-21.
246. Lullmann, H., et al., *Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds*. European journal of pharmacology, 1969. **6**(3): p. 241-7.
247. Clark, A.L. and F. Mitchelson, *The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors*. British journal of pharmacology, 1976. **58**(3): p. 323-31.
248. Ellis, J., J. Huyler, and M.R. Brann, *Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes*. Biochemical pharmacology, 1991. **42**(10): p. 1927-32.
249. Lazareno, S., et al., *Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogues and acetylcholine at muscarinic receptors: radioligand binding studies*. Molecular pharmacology, 1998. **53**(3): p. 573-89.
250. Huang, X.P. and J. Ellis, *Mutational disruption of a conserved disulfide bond in muscarinic acetylcholine receptors attenuates positive homotropic cooperativity between multiple allosteric sites and has subtype-dependent effects on the affinities of muscarinic allosteric ligands*. Molecular pharmacology, 2007. **71**(3): p. 759-68.
251. Leppik, R.A., et al., *Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m2 muscarinic acetylcholine receptor*. Molecular pharmacology, 1994. **45**(5): p. 983-90.
252. Voigtlander, U., et al., *Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: identification of two amino acids in the muscarinic M2 receptor that account entirely for the M2/M5 subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in N-methylscopolamine-occupied receptors*. Molecular pharmacology, 2003. **64**(1): p. 21-31.
253. Gnagey, A.L., M. Seidenberg, and J. Ellis, *Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors*. Molecular pharmacology, 1999. **56**(6): p. 1245-53.
254. Prilla, S., et al., *Allosteric interactions with muscarinic acetylcholine receptors: complex role of the conserved tryptophan M2422Trp in a critical cluster of amino acids for baseline affinity, subtype selectivity, and cooperativity*. Molecular pharmacology, 2006. **70**(1): p. 181-93.
255. Hardy, J.A. and J.A. Wells, *Searching for new allosteric sites in enzymes*. Current opinion in structural biology, 2004. **14**(6): p. 706-15.
256. May, L.T., et al., *Structure-function studies of allosteric agonism at M2 muscarinic acetylcholine receptors*. Molecular pharmacology, 2007. **72**(2): p. 463-76.
257. Mohr, K., C. Trankle, and U. Holzgrabe, *Structure/activity relationships of M2 muscarinic allosteric modulators*. Receptors & channels, 2003. **9**(4): p. 229-40.
258. Lanzafame, A., A. Christopoulos, and F. Mitchelson, *Interactions of agonists with an allosteric antagonist at muscarinic acetylcholine M2 receptors*. European journal of pharmacology, 1996. **316**(1): p. 27-32.
259. Lanzafame, A., A. Christopoulos, and F. Mitchelson, *Three allosteric modulators act at a common site, distinct from that of competitive antagonists, at muscarinic acetylcholine M2 receptors*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1997. **282**(1): p. 278-85.

260. Maass, A. and K. Mohr, *Opposite effects of alcuronium on agonist and on antagonist binding to muscarinic receptors*. European journal of pharmacology, 1996. **305**(1-3): p. 231-4.
261. Jakubik, J., et al., *Subtype selectivity of the positive allosteric action of alcuronium at cloned M1-M5 muscarinic acetylcholine receptors*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1995. **274**(3): p. 1077-83.
262. Zahn, K., et al., *Allosteric modulation of muscarinic receptor signaling: alcuronium-induced conversion of pilocarpine from an agonist into an antagonist*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2002. **301**(2): p. 720-8.
263. Dolezal, V. and S. Tucek, *The effects of brucine and alcuronium on the inhibition of [3H]acetylcholine release from rat striatum by muscarinic receptor agonists*. British journal of pharmacology, 1998. **124**(6): p. 1213-8.
264. Cembala, T.M., et al., *Allosteric interaction of the neuromuscular blockers vecuronium and pancuronium with recombinant human muscarinic M2 receptors*. European journal of pharmacology, 2007. **569**(1-2): p. 37-40.
265. Lazareno, S., A. Popham, and N.J. Birdsall, *Analogs of WIN 62,577 define a second allosteric site on muscarinic receptors*. Molecular pharmacology, 2002. **62**(6): p. 1492-505.
266. Lazareno, S., A. Popham, and N.J. Birdsall, *Allosteric interactions of staurosporine and other indolocarbazoles with N-[methyl-(3)H]scopolamine and acetylcholine at muscarinic receptor subtypes: identification of a second allosteric site*. Molecular pharmacology, 2000. **58**(1): p. 194-207.
267. Trankle, C., et al., *Atypical muscarinic allosteric modulation: cooperativity between modulators and their atypical binding topology in muscarinic M2 and M2/M5 chimeric receptors*. Molecular pharmacology, 2005. **68**(6): p. 1597-610.
268. Gilsbach, R., et al., *Cooperative interactions at M2 muscarinic acetylcholine receptors: structure/activity relationships in stepwise shortened bispyridinium- and bis(ammonio)alkane-type allosteric modulators*. Neurochemical research, 2003. **28**(3-4): p. 667-73.
269. Surig, U., et al., *Muscarinic allosteric modulators: atypical structure-activity-relationships in bispyridinium-type compounds*. Archiv der Pharmazie, 2006. **339**(4): p. 207-12.
270. Antony, J., et al., *Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2009. **23**(2): p. 442-50.
271. Schwyzer, R., *ACTH: a short introductory review*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1977. **297**: p. 3-26.
272. Portoghese, P.S., H. Nagase, and A.E. Takemori, *Only one pharmacophore is required for the kappa opioid antagonist selectivity of norbinaltorphimine*. Journal of medicinal chemistry, 1988. **31**(7): p. 1344-7.
273. Messer, W.S., Jr., *Bivalent ligands for G protein-coupled receptors*. Current pharmaceutical design, 2004. **10**(17): p. 2015-20.
274. Portoghese, P.S., *The bivalent ligand approach in the design of highly selective opioid receptor antagonists*. NIDA research monograph, 1990. **96**: p. 3-20.
275. Portoghese, P.S., et al., *Application of the message-address concept in the design of highly potent and selective non-peptide delta opioid receptor antagonists*. Journal of medicinal chemistry, 1988. **31**(2): p. 281-2.
276. Christopoulos, A., et al., *Synthesis and pharmacological evaluation of dimeric muscarinic acetylcholine receptor agonists*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2001. **298**(3): p. 1260-8.
277. Steinfeld, T., et al., *A novel multivalent ligand that bridges the allosteric and orthosteric binding sites of the M2 muscarinic receptor*. Molecular pharmacology, 2007. **72**(2): p. 291-302.
278. Narlawar, R., et al., *Hybrid ortho/allosteric ligands for the adenosine A(1) receptor*. Journal of medicinal chemistry, 2010. **53**(8): p. 3028-37.

279. Mohr, K., et al., *Rational design of dualsteric GPCR ligands: quests and promise*. British journal of pharmacology, 2010. **159**(5): p. 997-1008.
280. Valant, C., et al., *A novel mechanism of G protein-coupled receptor functional selectivity. Muscarinic partial agonist McN-A-343 as a bitopic orthosteric/allosteric ligand*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(43): p. 29312-21.
281. Daval, S.B., et al., *Fluorescent Derivatives of AC-42 To Probe Bitopic Orthosteric/Allosteric Binding Mechanisms on Muscarinic M1 Receptors*. Journal of medicinal chemistry, 2012. **55**(5): p. 2125-43.
282. Frommer, W.B., M.W. Davidson, and R.E. Campbell, *Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins*. Chemical Society reviews, 2009. **38**(10): p. 2833-41.
283. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. Journal of cellular and comparative physiology, 1962. **59**: p. 223-39.
284. Griffin, B.A., et al., *Fluorescent labeling of recombinant proteins in living cells with FLaSH*. Methods in enzymology, 2000. **327**: p. 565-78.
285. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-5.
286. Piston, D.W. and G.J. Kremers, *Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly*. Trends in biochemical sciences, 2007. **32**(9): p. 407-14.
287. Pakhomov, A.A. and V.I. Martynov, *GFP family: structural insights into spectral tuning*. Chemistry & biology, 2008. **15**(8): p. 755-64.
288. Ormo, M., et al., *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Science, 1996. **273**(5280): p. 1392-5.
289. Yang, F., L.G. Moss, and G.N. Phillips, Jr., *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nature biotechnology, 1996. **14**(10): p. 1246-51.
290. Tsien, R.Y., *The green fluorescent protein*. Annual review of biochemistry, 1998. **67**: p. 509-44.
291. Heim, R., D.C. Prasher, and R.Y. Tsien, *Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(26): p. 12501-4.
292. Nguyen, A.W. and P.S. Daugherty, *Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET*. Nature biotechnology, 2005. **23**(3): p. 355-60.
293. Rizzo, M.A., et al., *An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET*. Nature biotechnology, 2004. **22**(4): p. 445-9.
294. Zhang, J., et al., *Creating new fluorescent probes for cell biology*. Nature reviews. Molecular cell biology, 2002. **3**(12): p. 906-18.
295. Gurskaya, N.G., et al., *GFP-like chromoproteins as a source of far-red fluorescent proteins*. FEBS letters, 2001. **507**(1): p. 16-20.
296. Wang, L., et al., *Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(48): p. 16745-9.
297. Miyawaki, A., A. Sawano, and T. Kogure, *Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores*. Nature cell biology, 2003. **Suppl**: p. S1-7.
298. Hoffmann, C., et al., *Fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins in intact cells*. Nature protocols, 2010. **5**(10): p. 1666-77.
299. Chen, I. and A.Y. Ting, *Site-specific labeling of proteins with small molecules in live cells*. Current opinion in biotechnology, 2005. **16**(1): p. 35-40.
300. Pomorski, A. and A. Krezel, *Exploration of biarsenical chemistry--challenges in protein research*. Chembiochem : a European journal of chemical biology, 2011. **12**(8): p. 1152-67.
301. Adams, S.R., et al., *New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications*. Journal of the American Chemical Society, 2002. **124**(21): p. 6063-76.

302. Griffin, B.A., S.R. Adams, and R.Y. Tsien, *Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells*. Science, 1998. **281**(5374): p. 269-72.
303. Stroffekova, K., C. Proenza, and K.G. Beam, *The protein-labeling reagent FLASH-EDT2 binds not only to CCXXCC motifs but also non-specifically to endogenous cysteine-rich proteins*. Pflugers Archiv : European journal of physiology, 2001. **442**(6): p. 859-66.
304. Madani, F., et al., *Hairpin structure of a biarsenical-tetracysteine motif determined by NMR spectroscopy*. Journal of the American Chemical Society, 2009. **131**(13): p. 4613-5.
305. Zurn, A., et al., *Site-specific, orthogonal labeling of proteins in intact cells with two small biarsenical fluorophores*. Bioconjugate chemistry, 2010. **21**(5): p. 853-9.
306. Gaietta, G., et al., *Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking*. Science, 2002. **296**(5567): p. 503-7.
307. Martin, B.R., et al., *Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity*. Nature biotechnology, 2005. **23**(10): p. 1308-14.
308. Hoffmann, C., et al., *A FIAsh-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells*. Nature methods, 2005. **2**(3): p. 171-6.
309. Granier, S., et al., *Structure and conformational changes in the C-terminal domain of the beta2-adrenoceptor: insights from fluorescence resonance energy transfer studies*. The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(18): p. 13895-905.
310. Lichtman, J.W. and J.A. Conchello, *Fluorescence microscopy*. Nature methods, 2005. **2**(12): p. 910-9.
311. Coling, D. and B. Kachar, *Principles and application of fluorescence microscopy*. Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.], 2001. **Chapter 14**: p. Unit 14 10.
312. Pflieger, K.D. and K.A. Eidne, *New technologies: bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the detection of real time interactions involving G-protein coupled receptors*. Pituitary, 2003. **6**(3): p. 141-51.
313. Chen, Y., J.D. Mills, and A. Periasamy, *Protein localization in living cells and tissues using FRET and FLIM*. Differentiation; research in biological diversity, 2003. **71**(9-10): p. 528-41.
314. Yasuda, R., *Imaging spatiotemporal dynamics of neuronal signaling using fluorescence resonance energy transfer and fluorescence lifetime imaging microscopy*. Current opinion in neurobiology, 2006. **16**(5): p. 551-61.
315. Vogel, S.S., C. Thaler, and S.V. Koushik, *Fanciful FRET*. Science's STKE : signal transduction knowledge environment, 2006. **2006**(331): p. re2.
316. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Annalen der Physik, 1948. **6**(2): p. 55-75.
317. Patterson, G.H., D.W. Piston, and B.G. Barisas, *Forster distances between green fluorescent protein pairs*. Analytical biochemistry, 2000. **284**(2): p. 438-40.
318. Chang, C.W., et al., *Physiological fluorescence lifetime imaging microscopy improves Forster resonance energy transfer detection in living cells*. Journal of biomedical optics, 2009. **14**(6): p. 060502.
319. Chan, F.T., C.F. Kaminski, and G.S. Kaminski Schierle, *HomoFRET fluorescence anisotropy imaging as a tool to study molecular self-assembly in live cells*. Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry, 2011. **12**(3): p. 500-9.
320. Wallrabe, H. and A. Periasamy, *Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy*. Current opinion in biotechnology, 2005. **16**(1): p. 19-27.
321. van Munster, E.B. and T.W. Gadella, *Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM)*. Advances in biochemical engineering/biotechnology, 2005. **95**: p. 143-75.
322. Takanishi, C.L., et al., *GFP-based FRET analysis in live cells*. Brain research, 2006. **1091**(1): p. 132-9.
323. Gordon, G.W., et al., *Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy*. Biophysical journal, 1998. **74**(5): p. 2702-13.

324. Bastiaens, P.I. and A. Squire, *Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell*. Trends in cell biology, 1999. **9**(2): p. 48-52.
325. Takakura, H., et al., *Visualization and Quantitative Analysis of G Protein-Coupled Receptor-beta-Arrestin Interaction in Single Cells and Specific Organs of Living Mice Using Split Luciferase Complementation*. ACS chemical biology, 2012.
326. Aguila, B., M. Simaan, and S.A. Laporte, *Study of G protein-coupled receptor/beta-arrestin interactions within endosomes using FRAP*. Methods in molecular biology, 2011. **756**: p. 371-80.
327. Ayoub, M.A. and K.D. Pflieger, *Recent advances in bioluminescence resonance energy transfer technologies to study GPCR heteromerization*. Current opinion in pharmacology, 2010. **10**(1): p. 44-52.
328. Liu, P., S. Ahmed, and T. Wohland, *The F-techniques: advances in receptor protein studies*. Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 2008. **19**(5): p. 181-90.
329. Ambrosio, M., A. Zurn, and M.J. Lohse, *Sensing G protein-coupled receptor activation*. Neuropharmacology, 2011. **60**(1): p. 45-51.
330. Werthmann, R.C., et al., *Persistent cAMP signaling by internalized TSH receptors occurs in thyroid but not in HEK293 cells*. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2012.
331. Frolich, N., et al., *Distinct pharmacological properties of morphine metabolites at G(i)-protein and beta-arrestin signaling pathways activated by the human mu-opioid receptor*. Biochemical pharmacology, 2011. **81**(10): p. 1248-54.
332. Lohse, M.J., S. Nuber and C. Hoffmann *Fluorescence/Bioluminescence Resonance Energy Transfer Techniques to Study G-Protein-Coupled Receptor Activation and Signaling*. Pharmacological reviews, 2012. **64**(2): p. 299-336.
333. Joo, C., et al., *Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology*. Annual review of biochemistry, 2008. **77**: p. 51-76.
334. Fischer, R.S., et al., *Microscopy in 3D: a biologist's toolbox*. Trends in cell biology, 2011. **21**(12): p. 682-91.
335. Zurn, A., et al., *Fluorescence resonance energy transfer analysis of alpha 2a-adrenergic receptor activation reveals distinct agonist-specific conformational changes*. Molecular pharmacology, 2009. **75**(3): p. 534-41.
336. Luo, J., J.M. Busillo, and J.L. Benovic, *M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms*. Molecular pharmacology, 2008. **74**(2): p. 338-47.
337. Maier-Peuschel, M., et al., *A fluorescence resonance energy transfer-based M2 muscarinic receptor sensor reveals rapid kinetics of allosteric modulation*. The Journal of biological chemistry, 2010. **285**(12): p. 8793-800.
338. Pals-Rylandsdam, R. and M.M. Hosey, *Two homologous phosphorylation domains differentially contribute to desensitization and internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor*. The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(22): p. 14152-8.
339. Nakata, H., et al., *Location of agonist-dependent-phosphorylation sites in the third intracellular loop of muscarinic acetylcholine receptors (m2 subtype)*. European journal of biochemistry / FEBS, 1994. **220**(1): p. 29-36.
340. Kostenis, E., M. Waelbroeck, and G. Milligan, *Techniques: promiscuous Galpha proteins in basic research and drug discovery*. Trends in pharmacological sciences, 2005. **26**(11): p. 595-602.
341. Wu, G., et al., *Interaction of arrestins with intracellular domains of muscarinic and alpha2-adrenergic receptors*. The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(28): p. 17836-42.
342. Birdsall, N.J., et al., *Binding of agonists and antagonists to muscarinic receptors*. Journal of supramolecular structure, 1976. **4**(3): p. 367-71.
343. Birdsall, N.J. and E.C. Hulme, *Biochemical studies on muscarinic acetylcholine receptors*. Journal of neurochemistry, 1976. **27**(1): p. 7-16.

344. Kloeckner, J., J. Schmitz, and U. Holzgrabe, *Convergent, short synthesis of the muscarinic superagonist iperoxo*. Tetrahedron letters, 2010. **51**: p. 3470-3472.
345. Kords, H., et al., *Action of atropine and some hexane-1.6-bis-ammonium derivatives upon the toxicity of DFP in mice*. European journal of pharmacology, 1968. **3**(4): p. 341-6.
346. Muth, M., et al., *Systematic development of high affinity bis(ammonio)alkane-type allosteric enhancers of muscarinic ligand binding*. Journal of medicinal chemistry, 2003. **46**(6): p. 1031-40.
347. Jager, D., et al., *Allosteric small molecules unveil a role of an extracellular E2/transmembrane helix 7 junction for G protein-coupled receptor activation*. The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(48): p. 34968-76.
348. Mohr, M., et al., *Development of a new type of allosteric modulator of muscarinic receptors: hybrids of the antagonist AF-DX 384 and the hexamethonio derivative W84*. Journal of medicinal chemistry, 2004. **47**(12): p. 3324-7.
349. Lohse, M.J., *Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization*. Biochimica et biophysica acta, 1993. **1179**(2): p. 171-88.
350. Gregory, K.J., et al., *Identification of orthosteric and allosteric site mutations in M2 muscarinic acetylcholine receptors that contribute to ligand-selective signaling bias*. The Journal of biological chemistry, 2010. **285**(10): p. 7459-74.
351. Lohse, M.J., S. Nuber, and C. Hoffmann, *Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling*. Pharmacological reviews, 2012. **64**(2): p. 299-336.
352. Brea, J., et al., *Evidence for distinct antagonist-revealed functional states of 5-hydroxytryptamine(2A) receptor homodimers*. Molecular pharmacology, 2009. **75**(6): p. 1380-91.
353. Ghanouni, P., et al., *Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(27): p. 24433-6.
354. Kobilka, B.K., *G protein coupled receptor structure and activation*. Biochimica et biophysica acta, 2007. **1768**(4): p. 794-807.
355. Li, J.H., et al., *Distinct structural changes in a G protein-coupled receptor caused by different classes of agonist ligands*. The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(36): p. 26284-93.
356. Scheerer, P., et al., *Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation*. Nature, 2008. **455**(7212): p. 497-502.
357. Bockaert, J. and J.P. Pin, *Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success*. The EMBO journal, 1999. **18**(7): p. 1723-9.
358. Han, S.J., et al., *Identification of an agonist-induced conformational change occurring adjacent to the ligand-binding pocket of the M(3) muscarinic acetylcholine receptor*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(41): p. 34849-58.
359. Weis, W.I. and B.K. Kobilka, *Structural insights into G-protein-coupled receptor activation*. Current opinion in structural biology, 2008. **18**(6): p. 734-40.
360. Ward, S.D., et al., *Conformational changes that occur during M3 muscarinic acetylcholine receptor activation probed by the use of an in situ disulfide cross-linking strategy*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(3): p. 2247-57.
361. Ward, S.D., et al., *Use of an in situ disulfide cross-linking strategy to study the dynamic properties of the cytoplasmic end of transmembrane domain VI of the M3 muscarinic acetylcholine receptor*. Biochemistry, 2006. **45**(3): p. 676-85.
362. Jensen, A.D., et al., *Agonist-induced conformational changes at the cytoplasmic side of transmembrane segment 6 in the beta 2 adrenergic receptor mapped by site-selective fluorescent labeling*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(12): p. 9279-90.
363. Gurevich, V.V., et al., *Binding of wild type and chimeric arrestins to the m2 muscarinic cholinergic receptor*. The Journal of biological chemistry, 1993. **268**(23): p. 16879-82.

364. Hoffmann, C., et al., *Conformational changes in G-protein-coupled receptors-the quest for functionally selective conformations is open*. British journal of pharmacology, 2008. **153 Suppl 1**: p. S358-66.
365. Hubbell, W.L., et al., *Rhodopsin structure, dynamics, and activation: a perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking*. Advances in protein chemistry, 2003. **63**: p. 243-90.
366. Ohguro, H., et al., *Sequential phosphorylation of rhodopsin at multiple sites*. Biochemistry, 1993. **32**(21): p. 5718-24.
367. Richardson, R.M., et al., *Phosphorylation and desensitization of human m2 muscarinic cholinergic receptors by two isoforms of the beta-adrenergic receptor kinase*. The Journal of biological chemistry, 1993. **268**(18): p. 13650-6.
368. Kunapuli, P., et al., *Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK5*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(2): p. 1099-105.
369. Loudon, R.P. and J.L. Benovic, *Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK6*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(36): p. 22691-7.
370. Schlador, M.L. and N.M. Nathanson, *Synergistic regulation of m2 muscarinic acetylcholine receptor desensitization and sequestration by G protein-coupled receptor kinase-2 and beta-arrestin-1*. The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(30): p. 18882-90.
371. Kloeckner, J., J. Schmitz, and U. Holzgrabe, *Convergent, short synthesis of the muscarinic superagonist iperoxo*. Tetrahedron letters, 2010. **51**(27): p. 3470-3472.
372. Dallanoce, C., et al., *Synthesis and functional characterization of novel derivatives related to oxotremorine and oxotremorine-M*. Bioorganic & medicinal chemistry, 1999. **7**(8): p. 1539-47.
373. Carlier, P.R., et al., *Discovery of non-zwitterionic GABA(A) receptor full agonists and a superagonist*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2002. **12**(15): p. 1985-8.
374. Trankle, C., et al., *Interactions of orthosteric and allosteric ligands with [3H]dimethyl-W84 at the common allosteric site of muscarinic M2 receptors*. Molecular pharmacology, 2003. **64**(1): p. 180-90.
375. Yao, X., et al., *Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta2-adrenoceptor*. Nature chemical biology, 2006. **2**(8): p. 417-22.
376. Baetz, J., et al., *Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-sensors uncover different ligandspecific conformational changes of the M₂ and M₃ muscarinic acetylcholine receptor*. Naunyn-Schmiedebergs Archiv fur experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 2011. **338**.
377. Warne, T., et al., *The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta(1)-adrenergic receptor*. Nature, 2011. **469**(7329): p. 241-4.
378. Deupi, X. and J. Standfuss, *Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors*. Current opinion in structural biology, 2011. **21**(4): p. 541-51.
379. Bond, R.A. and A.P. Ijzerman, *Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery*. Trends in pharmacological sciences, 2006. **27**(2): p. 92-6.
380. Lebon, G., et al., *Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation*. Nature, 2011. **474**(7352): p. 521-5.
381. Keith, D.E., et al., *Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(32): p. 19021-4.
382. Stewart, G.D., P.M. Sexton, and A. Christopoulos, *Detection of novel functional selectivity at M3 muscarinic acetylcholine receptors using a Saccharomyces cerevisiae platform*. ACS chemical biology, 2010. **5**(4): p. 365-75.
383. Kebig, A., et al., *An optical dynamic mass redistribution assay reveals biased signaling of dualsteric GPCR activators*. Journal of receptor and signal transduction research, 2009. **29**(3-4): p. 140-5.
384. Butcher, A.J., et al., *Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(13): p. 11506-18.

385. Busillo, J.M., et al., *Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling*. The Journal of biological chemistry, 2010. **285**(10): p. 7805-17.
386. Torrecilla, I., et al., *Phosphorylation and regulation of a G protein-coupled receptor by protein kinase CK2*. The Journal of cell biology, 2007. **177**(1): p. 127-37.

10. Eidesstattliche Erklärung/Affidavit

10.1 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „FRET-basierte Untersuchungen zur ligandenselektiven Beeinflussung der Rezeptorkonformationen durch orthosterische und allosterische Liganden am Beispiel des muskarinischen M₂ Acetylcholinrezeptors“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

10.2 Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „FRET-based analysis of the ligandselective influence of orthosteric and allosteric ligands on the change of receptor conformation of the muscarinic M₂ acetylcholine receptor“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, den 05.07.2012

11. Publikationen/Konferenzbeiträge

11.1 Publikationen

Zieger N.*, **Bätz J.***, Lohse M.J, Hoffmann C. (2011) *J. Bioorg Med Chem*, **19** (3): p. 1048-1054

FRET-based sensors for the human M₁-, M₃-, and M₅-acetylcholine receptors

* contributed equally

11.2 Konferenzbeiträge

Bätz, J., Ziegler N., Zabel U., Lohse M.J., Hoffmann C. (2010)

Characterization of FRET-based sensors for the human M₁-, M₃-, and M₅-acetylcholine receptors

DPGT-Jahrestagung, Mainz; Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology, **381(Suppl 1)**: p. 13

Bätz J., Ziegler N., Lohse M.J, Hoffmann C. (2010)

FRET-based sensors for the human M₁-, M₃-, and M₅-acetylcholine receptors

„chiasma“, 5th international Symposium, Würzburg

Bätz J., Ziegler N., Zabel U., Frölich N., Heller E., Lohse M.J., Hoffmann C. (2011)

Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-sensors uncover different ligandspecific conformational changes of the M₂ and M₃ muscarinic acetylcholine receptor

DPGT-Jahrestagung, Frankfurt a.M.; Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology, **383 (Suppl 1)**: p. 18

Bätz J., Klöckner J., Ziegler N., Frölich N., Zabel U., Holzgrabe U., Mohr K., Lohse M.J., Hoffmann C. (2011)

How do orthosteric and allosteric ligands influence the conformational change of the M₂ muscarinic acetylcholine receptor differentially?

International Symposium: Molecular Pharmacology of Receptors, Channels, and Transporters, Würzburg

Bätz J., Klöckner J., Ziegler N., Frölich N., Zabel U., Holzgrabe U., Mohr K., Lohse M.J., Hoffmann C. (2011)

How do orthosteric and allosteric ligands influence the conformational change of the M₂ muscarinic acetylcholine receptor?

36th European Symposium on Hormones and Cell Regulation, Mont Ste. Odile, Frankreich

Bätz J., Klöckner J., Ziegler N., Frölich N., Zabel U., Holzgrabe U., Mohr K., Lohse M.J., Hoffmann C. (2012)

Orthosteric and allosteric ligands differentially influence the conformational change of the M₂ muscarinic acetylcholine receptor

DPGT-Jahrestagung, Dresden.; Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology, **385 (Suppl 1)**: p. 9

12. Danksagung

Vielen Dank an alle, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben!

Ich möchte mich besonders bei meinen Betreuern Herrn PD Dr. C. Hoffmann, Herrn Prof. Dr. T. Müller und Herrn Prof. Dr. K. Mohr für die engagierte, fachliche Unterstützung, die wertvollen Diskussionen, aber auch für die Freiheit eigene Ideen umzusetzen, bedanken.

Herrn Prof. Dr. M.J. Lohse danke ich für die Möglichkeit, am Lehrstuhl für Pharmakologie zu promovieren, die hilfreichen Diskussionen und Vorschläge und die Unterstützung bei der Umsetzung meiner Arbeit.

Dank geht auch an Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe und Jessy Klöckner, die mir stets tatkräftig zur Seite standen und diese Arbeit durch anregende Diskussionen bereichert haben.

Darüber hinaus danke ich den Mitgliedern des Arbeitskreises von Prof. Dr. Mohr, Andreas Bock und Ramona Schrage, die mir bei allen Fragen immer behilflich waren und mir bei den „Bonn-Besuchen“ einen Einblick in ihre Arbeitswelt ermöglicht haben.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der AG Hoffmann für die angenehme Zusammenarbeit und das tolle Arbeitsklima. Besonderer Dank geht dabei an Nicole Ziegler und Christiane Winkler für die tatkräftige Unterstützung und „Aufbauarbeit“ und an Susi Nuber für ihr stets offenes Ohr bei Fragen und Problemen jeder Art!

Dr. U. Zabel danke ich für die großartige Unterstützung und die viele Zeit, die sie in diese Arbeit investiert hat.

Zudem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Freundschaften, die in dieser Zeit entstanden sind. Danke vor allem an Anni, Nadine, Sonja und Susi für hilfreiche Kommentare bezüglich dieser Dissertation und viele schöne Stunden auch außerhalb der Pharmakologie!

Ganz besonders danke ich meinen Freunden und meiner Familie, allen voran meinen Eltern für ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre uneingeschränkte Unterstützung. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

13. Curriculum Vitae

Erratum

Hiermit bestätigen wir, dass die Dissertation von Frau Julia Bätz entsprechend der Regularien der Graduate School of Life Science, Universität Würzburg bewertet und angenommen wurde. Einer Korrektur der Dissertation wurde seitens des Promotionskomitees zugestimmt.

Folgende Änderungen wurden vorgenommen:

Tabelle 7, Seite 90

Änderung der Einheit von μM in %, die verbesserte Tabelle lautet nun folgendermaßen:

Tab. 7: Maximale Hemmeffekte der allosteren Modulatoren getestet am $M_2i3\text{-N}$ bzw. $M_2i3\text{-C}$ Sensor in Gegenwart von Iperoxo.

Den Konzentrations-Wirkungskurven der allosteren Modulatoren wurden die maximalen Inhibitionseffekte (Messwert bei einer Rezeptorstimulation mit $10 \mu\text{M}$ Iperoxo kombiniert mit Alloster in sättigender Konzentration) entnommen und selektiv für den transfizierten Rezeptorsensor zusammengefasst ($n = 15$).

allosterer Ligand	Nummer	Iperoxo	
		$M_2i3\text{-N}$ [%]	$M_2i3\text{-C}$ [%]
JK 289	20	$41 \pm 0,5$	$41,2 \pm 3,5$
JK 337	21	$21,1 \pm 3,2$	$4,25 \pm 6,1$
JK 338	22	$9,5 \pm 1,4$	$11,9 \pm 4,9$
$\frac{1}{2}$ W84	23	$19,1 \pm 8,4$	$8,1 \pm 6,5$
W84	24	$23,7 \pm 3,7$	$16,7 \pm 8,7$
Seminaph	25	$46,5 \pm 3,7$	$24,1 \pm 5,8$
EHW 477	26	$15 \pm 1,8$	$26,4 \pm 4,2$
JK 519	27	$21,5 \pm 2,7$	$19,9 \pm 6,6$
Naphmethonium	28	$24,5 \pm 1,3$	$19,4 \pm 11,4$

Würzburg, 14.09.2012

Mitglieder des Promotionskomitees

- Vorsitzende:** Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe
- 1. Betreuer:** PD Dr. Carsten Hoffmann
- 2. Betreuer:** Prof. Dr. Thomas D. Müller
- 3. Betreuer:** Prof. Dr. Klaus Mohr
- 4. Betreuer:** Prof. Dr. Martin J. Lohse