

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE
PROF. DR. JENS SCHLOSSMANN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Interaktionen des humanen β_1 - und β_2 - Adrenorezeptors mit Isoproterenol,
Epinephrin, Norepinephrin und Dopamin.

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nina Weitzl

2010

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE
PROF. DR. JENS SCHLOSSMANN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Interaktionen des humanen β_1 - und β_2 - Adrenorezeptors mit Isoproterenol,
Epinephrin, Norepinephrin und Dopamin.

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Nina Weitzl

2010

Dekan:	Prof. Dr. Bernhard Weber
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Roland Seifert
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Ekkehard Haen
Tag der mündlichen Prüfung:	26.03.2010

MEINEM VATER

1	Einführung.....	1
1.1	Klinische und pharmakologische Relevanz	1
1.1.1	βAR im menschlichen Körper.....	1
1.1.2	Pharmakologische Beeinflussung	2
1.2	Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor.....	3
1.2.1	Grundzüge der Struktur von GPCRs.....	3
1.2.2	Strukturvergleich von β ₁ - und β ₂ AR.....	6
1.3	Der G-Proteinzyklus.....	8
1.3.1	Schema und Beschreibung des Zyklus	8
1.3.2	Ligandenbindung und ligandenspezifische Konformationen	10
1.3.3	Konstitutive Aktivität	14
1.3.4	Einfluss des G _s -Proteins und seiner Splicevarianten	15
1.3.5	Fusionsproteine als Modell zur Analyse des G-Proteinzyklus.....	16
1.4	Liganden und ihre Wirkung	17
1.4.1	Volle und partielle Agonisten.....	17
1.4.2	Affinität, Effektivität und Potenz.....	17
1.4.3	Struktur der verwendeten Liganden	18
1.5	Fragestellung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Materialaufstellung.....	20
2.1.1	Substanzen	20
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	22
2.1.3	Geräte	23
2.2	Zellkultur und Virusinfektion	24
2.3	Membranpräparation.....	24
2.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	25
2.5	Durchführung der [³ H]DHA-Bindung.....	26
2.5.1	[³ H]DHA-Sättigungs-Bindung	27
2.5.2	[³ H]DHA-Kompetitions-Bindung.....	28
2.6	Durchführung des GTPase-Assays.....	29
2.7	Durchführung des AC-Assays	31
2.8	Auswertung der Daten	33

3	Resultate	34
3.1	Ergebnisse der Membranpräparationen	34
3.2	[³ H]DHA-Kompetitions-Bindung	35
3.2.1	Aussagen des Versuchs	35
3.2.2	Liganden an β_1 AR-G _{saL}	36
3.2.3	Liganden an β_1 AR-G _{saS}	37
3.2.4	Liganden an β_2 AR-G _{saL}	38
3.2.5	Liganden an β_2 AR-G _{saS}	39
3.2.6	Zusammenfassung und Übersichtstabelle	40
3.3	GTPase-Assays	42
3.3.1	Aussagen des Versuchs	42
3.3.2	Liganden an β_1 AR-G _{saL}	43
3.3.3	Liganden an β_1 AR-G _{saS}	44
3.3.4	Liganden an β_2 AR-G _{saL}	45
3.3.5	Liganden an β_2 AR-G _{saS}	46
3.3.6	Zusammenfassung und Übersichtstabelle	46
3.4	AC-Assay	48
3.4.1	Aussagen des Versuchs	48
3.4.2	Liganden an β_1 AR-G _{saL}	49
3.4.3	Liganden an β_1 AR-G _{saS}	50
3.4.4	Liganden an β_2 AR-G _{saL}	51
3.4.5	Liganden an β_2 AR-G _{saS}	52
3.4.6	Zusammenfassung und Übersichtstabelle	52
3.5	Gesamtübersicht und ausgewählte Vergleiche	54
3.5.1	Effektivität im GTPase- und AC-Assay	54
3.5.2	Hochaffine Bindung und Effektivität im GTPase-Assay	55
3.5.3	Korrelation EC ₅₀ -Werte GTPase- und AC-Stimulation	56
3.5.4	Korrelation K _{ih} bzw. K _{il} und EC ₅₀ der GTPase-Stimulation	57
4	Diskussion	58
4.1	Modelle zur GPCR-Aktivierung	58
4.2	Offene Fragen	60
4.3	Betrachtung der wichtigsten Ergebnisse	62
4.3.1	Effektivität von EPI, NE und DOP	62
4.3.2	Konstitutive Aktivität	62
4.3.3	Korrelation der E _{max} -Werte der GTPase- und AC-Stimulation	63
4.3.4	Abweichungen in der Korrelation der EC ₅₀ -Werte der GTPase- und AC-Stimulation	64
4.3.5	Stabilität des ternären Komplexes	64

4.3.6	Korrelation der maximalen GTPase-Stimulation zur Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen	65
4.3.7	Unterschiede in der Korrelation der K_i -Werte zur EC_{50} der GTPase-Stimulation	65
4.3.8	Endogene Liganden als volle Agonisten	66
4.4	Allgemeine Schlussfolgerungen	67
5	Zusammenfassung.....	68
6	Veröffentlichung	69
6.1	Abstract.....	69
7	Abkürzungsverzeichnis	70
8	Literaturverzeichnis	72
9	Anhang.....	74
9.1	Danksagung.....	74
9.2	Erklärungen.....	75
9.2.1	Betreuung der Doktorarbeit	75
9.2.2	Selbstständigkeitserklärung	75
9.3	Curriculum vitae	76

1 Einführung

1.1 Klinische und pharmakologische Relevanz

Seit Jahrzehnten werden weit verbreitete Krankheiten wie Hypertonie oder Asthma bronchiale durch die Stimulation bzw. Hemmung von β -adrenergen Rezeptoren (β ARs) erfolgreich behandelt. Beeindruckend ist auch, dass mehr als 50% der momentan verwendeten Medikamente ihre Wirkung an der großen Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) entfalten [5], zu der auch die β ARs gehören. Umso erstaunlicher ist es, dass man sich immer noch nicht völlig über die Wirkmechanismen dieser Rezeptoren im Klaren ist.

1.1.1 β AR im menschlichen Körper

β ARs gehören zur großen Gruppe der Adrenorezeptoren. Anhand von Struktur und pharmakologischem Wirkprofil lassen sich die β ARs in folgende Subtypen einteilen β_1 -, β_2 - und β_3 ARs. β ARs werden in verschiedenen Zellen, Geweben und Organen im menschlichen Körper gefunden. Der β_1 AR wird hauptsächlich im Herzen, in der Niere und im Gastrointestinaltrakt exprimiert. Der β_2 AR kommt hingegen vor allem in der glatten Muskulatur von Trachea und Bronchien, Uterus und den peripheren Gefäßen vor [1]. Den β_3 AR findet man im Fettgewebe.

Endogene Liganden [2] für β ARs sind die Katecholamine. Diese werden in verschiedenen Neuronen und Zellen aus der Aminosäure (AS) Tyrosin hergestellt. Die Synthese erfolgt vom Tyrosin, über Dihydroxyphenylalanin, Dopamin und Norepinephrin bis hin zum Epinephrin. Hierbei kommen dopaminerge Neuronen vor allem im zentralen Nervensystem vor. Noradrenerge Neuronen finden sich hauptsächlich im sympathischen Nervensystem, und so ist Norepinephrin der Hauptüberträgerstoff der postganglionären sympathischen Neuronen. Adrenerge Neuronen kommen ebenfalls im ZNS vor, ihre größte Anzahl liegt jedoch im Nebennierenmark.

Wie später noch ausführlich gezeigt wird, besitzen der β_1 AR und β_2 AR keine ausgeprägte Selektivität für ein gegebenes Katecholamin. Dennoch kann man Aussagen über die durch β AR vermittelten Wirkungen der Katecholamine machen [1,2]. Durch eine Stimulation der β_1 AR kommt es am Herzen zu einer Zunahme der

Herzfrequenz und der Kontraktilität, am Darm erfolgt eine Hemmung der Motilität und an der Niere eine Stimulation der Reninfreisetzung. Durch Stimulation des β_2 AR erschlafft die Muskulatur der Bronchien und Trachea, wodurch die Atemwege erweitert werden. Auch die Muskulatur des Uterus erschlafft. Zusätzlich kann man eine Erweiterung der Gefäße feststellen. Diese Wirkungen deuten bereits darauf hin, wie man sich die Beeinflussung der β ARs therapeutisch zu Nutzen machen kann.

1.1.2 Pharmakologische Beeinflussung

Die Möglichkeiten Agonisten an den β ARs in der Klinik anzuwenden sind zahlreich [2]. Bei der Behandlung des Asthma bronchiale gehören kurzwirksame β_2 AR-Agonisten wie Salbutamol inhalativ angewandt zur Bedarfsmedikation. Langwirksame β_2 AR-Agonisten wie Formoterol können ebenfalls inhalativ in der Langzeitbehandlung angewandt werden.

Bei schwerer Herzinsuffizienz mit drohendem Nierenversagen kann Dopamin eingesetzt werden, genauso wie beim Kreislaufschock. Hierbei wird versucht eine Schädigung der Nieren zu verhindern, indem die Nierendurchblutung gesteigert wird.

Außerdem wird Epinephrin als vasokonstriktorisches Zusatz in Lokalanästhetika eingesetzt. Epinephrin spielt des Weiteren eine Rolle bei der Behandlung eines Kreislaufstillstands. Allerdings werden diese Wirkungen über α ARs vermittelt.

Eine ebenso große Rolle spielen die Antagonisten der β ARs, die so genannten β -Blocker. Sie kommen bei der Behandlung der Hypertonie, der Herzinsuffizienz und bei Patienten nach einem Myokardinfarkt zum Einsatz. Außerdem werden sie als Antiarrhythmika der Klasse II verwendet. Hierzu stehen eine Reihe verschiedener Einzelsubstanzen zur Verfügung, auch solche die eine Selektivität für den β_1 AR besitzen. Auch Patienten mit chronischem Offenwinkelglaukom können mit β -Blockern behandelt werden, genauso Patienten mit Hyperthyreose, um Symptome wie Zittern und Herzrasen zu lindern.

1.2 Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor

Welche herausragende Rolle die GPCRs im menschlichen Körper spielen, wurde durch die genaue Untersuchung des humanen Genoms verdeutlicht [3]. Es gibt über 800 verschiedene GPCRs, wobei nur für einen Teil die endogenen Liganden bekannt sind. Sie spielen bei den unterschiedlichsten Vorgängen, wie dem Seh-, Geruchs- oder Geschmacksinn und der Signalübermittlung durch Hormone eine Rolle, und ihre endogenen Liganden reichen von Photonen, Ionen, organischen Molekülen bis hin zu Peptiden oder Proteinen [13]. Anhand von Ähnlichkeiten in den Aminosäuresequenzen können sie in folgende fünf Familien eingeteilt werden: Die Rhodopsin-, Adhäsions-, Geschmacksinn-, Glutamat- und die Sekretinfamilie [3]. Die Rhodopsinfamilie, zu der auch die β ARs gehören, ist mit etwa 700 Rezeptoren die mit Abstand größte.

1.2.1 Grundzüge der Struktur von GPCRs

Der Name „G-Protein-gekoppelter Rezeptor“ kommt von der Annahme, dass alle diese Rezeptoren ihre Signale durch GTP-bindende Proteine (G-Proteine) weiterleiten. Mittlerweile weiß man aber, dass es auch eine G-Protein-unabhängige Informationsübermittlung gibt [14]. Deshalb wäre es sinnvoll, diese große Gruppe nach ihrem gemeinsamen Strukturmerkmal zu benennen, den sieben Transmembrandomänen (TM).

Diese hydrophoben Sequenzen bestehen jeweils aus 20-25 AS, welche die Zellmembran durchspannen [8], und dabei eine α -Helix bilden. Verbunden werden sie durch hydrophile Sequenzen, die in den Intra- bzw. Extrazellulärraum ragen, und von sehr variabler Länge sind [34]. Grundsätzlich ragt der Aminoterminus in den Extrazellulärraum, der Carboxyterminus ragt in das Zytosol. Die größten Homologien in den Aminosäuresequenzen bestehen in den Transmembrandomänen, die größten Unterschiede gibt es im Amino- und Carboxyterminus und in der dritten intrazellulären Schleife (ICL) [8,34]. Darüber hinaus sind im Aminoterminus mehrere AS bekannt, die glykolysiert werden können. Intrazellulär gibt es Aminosäuren, die phosphoryliert werden können.

Der β_2 AR ist ein typischer Vertreter der GPCRs und viele Erkenntnisse über ihre Struktur wurden durch seine genaue Untersuchung gemacht. An seinem Beispiel

können die Strukturmerkmale eines GPCR in einem einfachen Schema gut aufgezeigt werden.

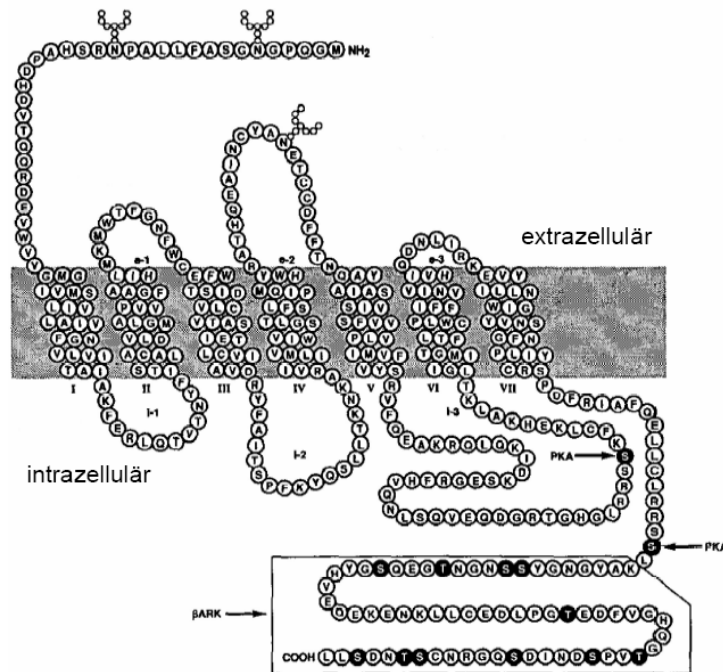


Abbildung 1: Struktur von GPCRs am Beispiel des β_2 AR [34]. Die sieben Transmembrandomänen sind mit römischen Ziffern markiert, schwarz unterlegte Aminosäuren deuten auf Phosphorylierungsstellen hin.

Die dreidimensionale Struktur von GPCRs ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Bis Ende 2007 gelang es nur, die hochauflösende Kristallstruktur von Rhodopsin darzustellen [4]. Dieser Rezeptor diente als Modell für zahlreiche andere GPCRs. Schließlich gelang es Kobilka *et al.* [5] eine hochauflösende Struktur des β_2 AR darzustellen. Hierzu wurde ein Fusionsprotein aus β_2 AR und T4-Lysozym (T4L) erzeugt und in Bindung mit dem partiellen inversen Agonisten Carazolol in einer cholesterolhaltigen Umgebung kristallisiert. Dieses Vorgehen war nötig, um die Stabilität des Rezeptors zu garantieren. Im Vergleich zu früheren Modellen bietet die neue Kristallstruktur einige Überraschungen. So besitzt der β_2 AR zwei zusätzliche helikale Strukturen, die Helix VIII und ein kurzes helikales Stück in der extrazellulären Schleife 2 (ECL2). Zwei Disulfidbrücken scheinen die ECL2 des Rezeptors so zu stabilisieren, dass der Zugang für Liganden zur Bindungstasche ermöglicht wird. Natürlich bietet diese Kristallstruktur nur eine Momentaufnahme des Rezeptors, und kann lediglich Hinweise auf seine flexible Struktur und verschiedenen

Konformationen geben. Aus diesem Grund stellt es eine weitere Herausforderung dar, den Rezeptor in Bindung mit einem Agonisten zu kristallisieren.

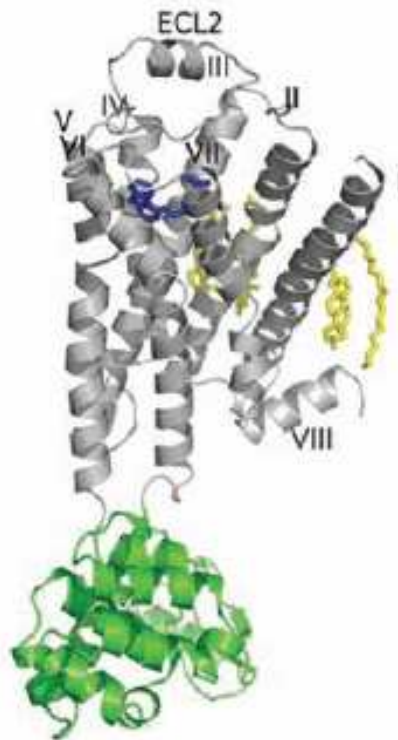


Abbildung 2: Kristallstruktur von β_2 AR-T4L in Bindung mit Carazolol. Der Rezeptor ist grau, das T4L grün, das Carazolol blau und das Lipid gelb dargestellt [5].

1.2.2 Strukturvergleich von β_1 - und β_2 AR

In Anbetracht der Vielzahl an Erkenntnissen, die man mittlerweile über die Struktur von GPCRs hat [5], scheint es vergleichsweise einfach, die Aminosäuresequenzen des β_1 AR und β_2 AR zu vergleichen. Trotzdem ist es interessant, da sich viele Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede aufzeigen lassen [16,6]. Wie bereits erwähnt, besitzen beide Rezeptoren die typischen Merkmale von GPCRs, das heißt sie haben sieben Transmembrandomänen, die durch intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden sind.

Unterschiede bestehen bei der Proteingröße der beiden Rezeptoren. Der β_1 AR wird durch 6750 Basenpaare kodiert, der β_2 AR nur durch 5934 Basenpaare. Am unterschiedlichsten ist die Länge des Aminoterminus, der ICL3 und des Carboxyterminus, welche beim β_1 AR jeweils wesentlich länger sind. Der Carboxyterminus und die ICL3 spielen eine Rolle bei der G-Proteinbindung [20], hier könnte also ein Grund für die Unterschiede in der Kopplung an das G-Protein liegen. Wie Abbildung 3 deutlich macht, liegen in diesen Bereichen auch die größten Unterschiede in den Aminosäuresequenzen.

Am ähnlichsten sind sich der β_1 AR und β_2 AR im Bereich der 3., 5., 6. und 7. Transmembrandomäne. Hier bestehen Homologien in fast allen Aminosäuren. Wie später noch anhand einer Abbildung gezeigt wird, liegt die Bindungstasche für Katecholamine im Bereich TM5, TM6 und TM7. Die AS, welche mit den Katecholaminen interagieren, werden in Abbildung 3 farblich hervorgehoben. Es handelt sich um: Aspartat-113 (Asp), Serin-203 (Ser), Ser-204, Ser-207, Phenylalanin-290 (Phe) und Asparagin-293 (Asn). Trotz dieser Ähnlichkeiten muss davon ausgegangen werden, dass es beim β_1 AR und β_2 AR durchaus Unterschiede in der Ligandenbindung und den ligandenspezifischen Konformationen gibt.

β_1 AR	M	G	A	G	V	L	V	L	G	A	S	E	P	G	N	L	S	S	A	A
β_2 AR	M	G	Q	P	G										N	G	S			
	P	L	P	D	G	A	A	T	A	A	R	L	L	V	P	A	S	P	P	A
	S	L	L	P	P		A	S	E	S	P	E		P	L	S	Q	Q		
	F	L	L	A	P	N	G	S	H	A	P	D	H	D	V	T	Q	Q	R	D
			W	T	A	G	M	G	L	L	M	A	L	I	V	L	L	I	V	A
	E	V	W	V	V	G	M	G	I	V	M	S	L	I	V	L	A	I	V	F
	G	N	V	L	V	I	V	A	I	A	K	T	P	R	L	Q	T	L	T	N
	G	N	V	L	V	I	T	A	I	A	K	F	E	R	L	Q	T	V	T	N

L	F	I	M	S	L	A	S	A	D	L	V	M	G	L	L	V	V	P	F	
Y	F	I	T	S	L	A	C	A	D	L	V	M	G	L	A	V	V	P	F	
G	A	T	I	V	V	W	G	R	W	E	Y	G	S	F	F	C	E	L	W	
G	A	A	H	I	L	M	K	M	W	T	F	G	N	F	W	C	E	F	W	
T	S	V	D	V	L	C	V	T	A	S	I	E	T	L	C	V	I	A	L	
T	S	I	D	V	L	C	V	T	A	S	I	E	T	L	C	V	I	A	V	
D	R	Y	L	A	I	T	S	P	F	R	Y	Q	S	L	L	T	R	A	R	
D	R	Y	F	A	I	T	S	P	F	K	Y	Q	S	L	L	T	K	N	K	
A	R	G	L	V	C	T	V	W	A	I	S	A	L	V	S	F	L	P	I	
A	R	V	I	I	L	M	V	W	I	V	S	G	L	T	S	F	L	P	I	
L	M	H	W	W	R	A	E	S	D	E	A	R	R	C	Y	N	D	P	K	
Q	M	H	W	Y	R	A	T	H	Q	E	A	I	N	C	Y	A	N	E	T	
C	C	D	F	V	T	N	R	A	Y	A	I	A	S	S	V	V	S	F	Y	
C	C	D	F	F	T	N	Q	A	Y	A	I	A	S	S	I	V	S	F	Y	
V	P	L	C	I	M	A	F	V	Y	L	R	V	F	R	E	A	Q	K	Q	
V	P	L	V	I	M	V	F	V	Y	S	R	V	F	Q	E	A	K	R	Q	
V	K	K	I	D	S	C	E	R	R	F	L	G	G	P	A	R	P	P	S	
L	Q	K	I	D	K	S	E	G	R	F										
P	S	P	S	P	V	P	A	P	A	P	P	P	G	P	P	R	P	A	A	
																		H	V	
A	A	A	T	A	P	L	A	N	G	R	A	G	K			R	R	P	S	
Q	N	C	S	Q	V	E	Q	D	R	R	T	G	H	G	L	R	R	S	S	
R	L	V	A	L	R	E	Q	K	A	L	K	T	L	G	I	I	M	G	V	
K	F		C	L	K	E	H	K	A	L	K	T	L	G	I	I	M	G	T	
F	T	L	C	W	L	P	F	F	L	A	N	V	V	K	A	F	H	R	E	
F	T	L	C	W	L	P	F	F	I	V	N	I	V	H	V	I	Q	D	N	
L	V	P	D	R	L	F	V	F	F	N	W	L	G	Y	A	N	S	A	F	
L	I	R	K	E	V	Y	I	L	L	N	W	I	G	Y	V	N	S	G	F	
N	P	I	I	Y	C	R	S	P	D	F	R	K	A	F	Q	R	L	L	C	
N	P	L	I	Y	C	R	S	P	D	F	R	I	A	F	Q	E	L	L	C	
C	A	R	R	A	A	R					R	R	H	A	T	H	G	D	R	P
L	R	R	S	S	L	K	A	Y	G	N	G	Y	S	S	N	G	N	T	G	
R	A	S	G	C	L	A	R	P	G	P	P	P	S	P	G	A	A	S	D	
E	Q	S	G	Y	H	V	E	Q	E	K	E	N	K	L	L	C	E	D	L	
D	D	D	D	D	V	V	G			A	T	P	P	A	R	L	L	E	P	
P	G	T	E	D	F	V	G	H	Q	G	T	V	P	S	D	N	I	D	S	
W	A		G	C	N	G	G	A	A	A	D	S	D	S	S	L	D	E	P	
Q	G	R	N	C	S	T	N	D	S	L	L									
C	R	P	G	F	A	S	E	S	K	V										

Abbildung 3: Vergleich der Aminosäuresequenzen von β_1 AR und β_2 AR. Transmembrandomänen sind grün, intrazelluläre Schleifen blau und extrazelluläre Schleifen rot hinterlegt. Homologien der Aminosäuren sind durch rote Schrift gekennzeichnet. Besonders hervorgehoben (dunkelblau unterlegt) sind die AS der Katecholaminbindestelle.

1.3 Der G-Proteinzyklus

GPCRs und die Art ihrer Signaltransduktion sind schon seit Jahrzehnten im Fokus der Wissenschaft. So erkannten beispielsweise schon Sutherland et al. [7], dass in einer Präparation aus Herzmuskelzellen die Konzentration an zyklischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) ansteigt, wenn eine Stimulation mit Epinephrin erfolgt. Seither wurden viele neue Erkenntnisse hinzugewonnen, wenn auch noch lange nicht alle Mechanismen verstanden sind. Im Folgenden soll auf verschiedene Modelle der GPCR-Aktivierung eingegangen werden.

1.3.1 Schema und Beschreibung des Zyklus

Schon lange bekannt und vielfach beschrieben ist folgendes Modell der GPCR-Aktivierung [8]: Durch die Bindung eines Agonisten am Rezeptor wird die Interaktion mit seinem spezifischen G-Protein stimuliert. Im Fall der β ARs handelt es sich um ein stimulierendes G-Protein (G_s -Protein), dessen Effektorsystem die Adenylatzyklase (AC) ist [9]. Im inaktiven Zustand ist Guanosin-5'-diphosphat (GDP) an die α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins gebunden. Durch die Bindung des Agonisten erfolgt ein Austausch von GDP gegen Guanosin-5'-triphosphat (GTP). Das G-Protein wird durch die GTP-Bindung aktiviert und dissoziiert sodann in seine α -Untereinheit und einem Komplex aus β - und γ -Untereinheit. Die α -Untereinheit entkoppelt vom Rezeptor und aktiviert das Effektorenzym AC. Die AC katalysiert die Bildung von cAMP aus Adenosin-5'-triphosphat (ATP). Diese Aktivierung der AC kann so lange erfolgen, bis das GTP, welches an die α -Untereinheit des G-Proteins gebunden ist, wieder in GDP und P_i hydrolysiert wird [34]. Diese Hydrolyse wird durch die GTPase der α -Untereinheit katalysiert. Schließlich können nun die α -, β - und γ -Untereinheit des G-Proteins reassoziieren und der Zyklus kann von neuem beginnen.

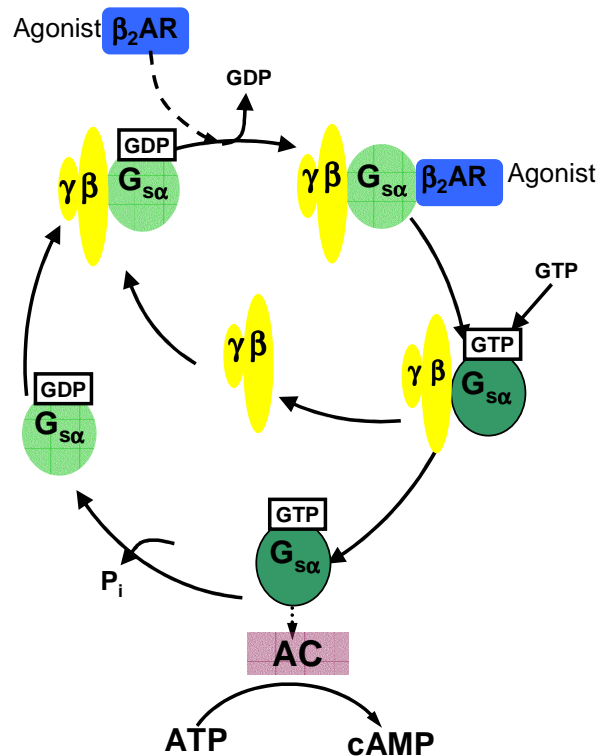


Abbildung 4: G-Protein-Zyklus am Beispiel der β_2 AR-G_s-AC-Interaktion.

Für die Aktivierung der GPCRs gibt es verschiedene Modelle, die versuchen den verschiedenen Beobachtungen an den Rezeptoren gerecht zu werden [10]. Das einfache Zwei-Zustands-Modell [11] geht davon aus, dass der Rezeptor zuerst im inaktiven Zustand R vorliegt, und durch die Bindung eines Agonisten in den aktiven Zustand R^* isomerisiert. Agonisten stabilisieren also den Zustand R^* , inverse Agonisten hingegen den Zustand R. Wie effektiv ein Agonist ist, hängt von seiner Fähigkeit ab, das Gleichgewicht zwischen R und R^* zu verschieben.

Eine Erweiterung dieses Modells ist das Ternäre-Komplex-Modell [34,11]. Als ternärer Komplex wird der Komplex aus agonistenbesetztem Rezeptor und nukleotidfreiem G-Protein bezeichnet [28]. Der ternäre Komplex besitzt eine hohe Affinität zum Agonisten. Durch die Bindung von GTP dissoziiert der ternäre Komplex, und der Rezeptor verliert seine hohe Affinität für den Agonisten. Das Ternäre-Komplex-Modell geht davon aus, dass die Effektivität eines Agonisten damit zusammenhängt, wie gut er den ternären Komplex stabilisieren kann [12].

All diese Modelle können jedoch nicht die zahlreichen Versuchsergebnisse an GPCRs erklären und sagen auch nichts zu den molekularen Mechanismen der

GPCR-Aktivierung. Viele funktionelle Untersuchungen [31,12] und Ergebnisse verschiedener fluoreszenzspektroskopischer Untersuchungen [11,13] machen die Existenz von ligandenspezifischen Konformationen sehr wahrscheinlich.

1.3.2 Ligandenbindung und ligandenspezifische Konformationen

GPCRs werden oft als Moleküle gesehen, die entweder in einem inaktiven oder aktiven Zustand vorliegen. Dies mag zwar beispielsweise für den Rhodopsinrezeptor zutreffen, bei dem ein einziges Lichtphoton zu einer vollständigen Aktivierung führen kann. Wie Kobilka *et al.* [14] zeigten, sind die Mechanismen für die meisten anderen GPCRs wesentlich komplexer und man geht davon aus, dass es ligandenspezifische Konformationen gibt. Der β_2 AR ist ein typischer Vertreter der GPCRs und viele Erkenntnisse wurden durch seine genaue Untersuchung gewonnen. So konnte beispielsweise durch verschiedene Mutationsversuche und durch Versuche mit modifizierten Liganden seine Bindungsstelle für Katecholamine identifiziert werden [15,34]. Wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit gelten diese Ergebnisse wohl auch für verschiedene andere GPCRs.

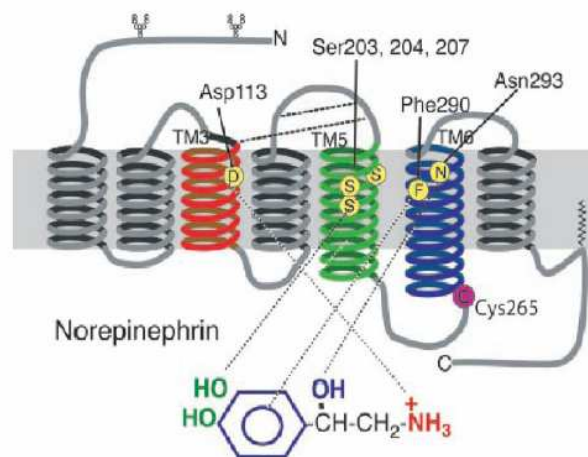


Abbildung 5: Ligandenbindungsstelle für Katecholamine am Beispiel von Norepinephrin am β_2 AR [11].

Dass Rezeptoren keine starren Proteine, sondern sehr dynamische Moleküle sind, kann auf verschiedene Weise nachgewiesen werden. Erfolgt die Darstellung der unterschiedlichen Rezeptorkonformationen als theoretische Energielandskarte [14], so stellen die Achsen jeweils ein Kontinuum zwischen nicht vorhandener und maximaler Rezeptoraktivität sowie niedrigem und hohem Energieniveau dar. Dabei kann man sich die basale Konformation des agonistenfreien Rezeptors als einen

niederenergetischen Zustand vorstellen, den aktivierten Rezeptor als einen hochenergetischen Zustand. Ob nun eine Konformationsänderung erfolgt, hängt einerseits von der Höhe der Energiebarriere zwischen den zwei Zuständen und andererseits vom absoluten Energieunterschied zwischen den Zuständen ab. Außerdem können verschiedene Zwischenzustände erreicht werden. Bindung verschiedener Agonisten kann nun entweder die Energiebarriere mindern oder die Energie des aktiven Zustands herabsetzen [14].

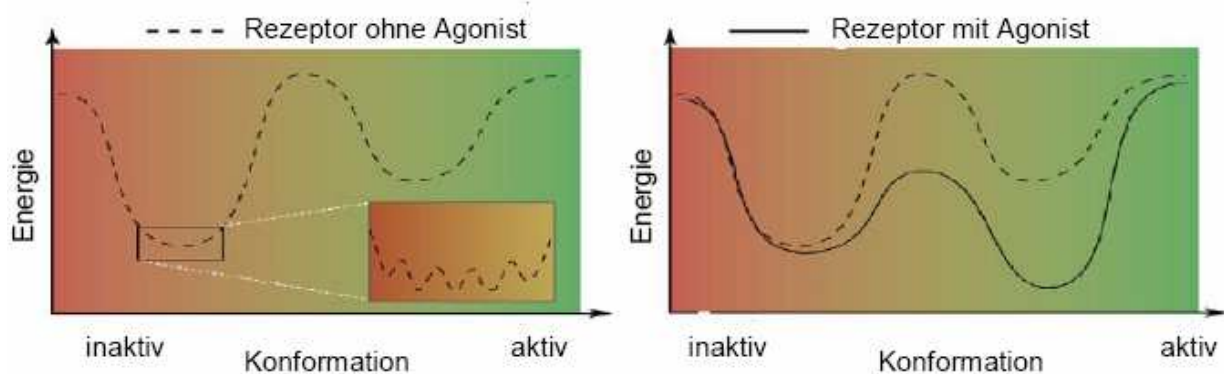


Abbildung 6: Theoretische Energielandskarte eines GPCR mit und ohne Agonisten [14].

Durch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen konnten am β_2 AR zwei verschiedene nichtkovalente intramolekulare Veränderungen erkannt werden, die unabhängig voneinander nach der Ligandenbindung erfolgen können. Dies ist zum einen das Aufbrechen des „ionic lock“, der aus einer Aminosäuresequenz im zytoplasmatischen Ende vom TM3 und einer sauren AS im zytoplasmatischen Ende von TM6 besteht und den Rezeptor in einer inaktiven Konformation stabilisiert. Als „rotamer toggle switch“ wird eine Konformationsänderung bezeichnet, bei der es durch eine Rotation von aromatischen AS um das Prolin-288 (Pro) der TM6 zu einer Bewegung des zytoplasmatischen Endes von TM6 relativ zu TM5 kommt [16].

Swaminath *et al.* [17] stimulierten einen an Cystein-265 (Cys) mit Tetramethylrhodamin (TMR) fluoreszenzmarkierten β_2 AR mit verschiedenen Agonisten. Verwendet wurden Catechol (Strukturbestandteil der Katecholamine), verschiedene Katecholamine und der Nicht-Katecholamin-Agonist Salbutamol, wobei Änderungen der Fluoreszenzintensität gemessen wurden. Diese Änderungen in der Fluoreszenz entsprechen Konformationsänderungen des Rezeptors. Bei den Versuchen wurde erkannt, dass Katecholamine eine biphasische Konformationsänderung bestehend aus einer schnellen und langsamen Komponente

erzeugen. Catechol erzeugte nur die schnelle Komponente, und Salbutamol, welches sich von den Katecholaminen in der Struktur des aromatischen Rings unterscheidet, nur die langsame Komponente. Außerdem erzeugte Catechol auch eine Fluoreszenzänderung, wenn der Rezeptor bereits Salbutamol gebunden hatte [14,17]. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die schnelle Komponente dem „rotamer toggle switch“ entspricht und der Katecholring für diese Konformationsänderung verantwortlich ist. Außerdem deutet alles darauf hin, dass der aromatische Ring von Salbutamol an einer anderen Stelle bindet als der der Katecholamine.

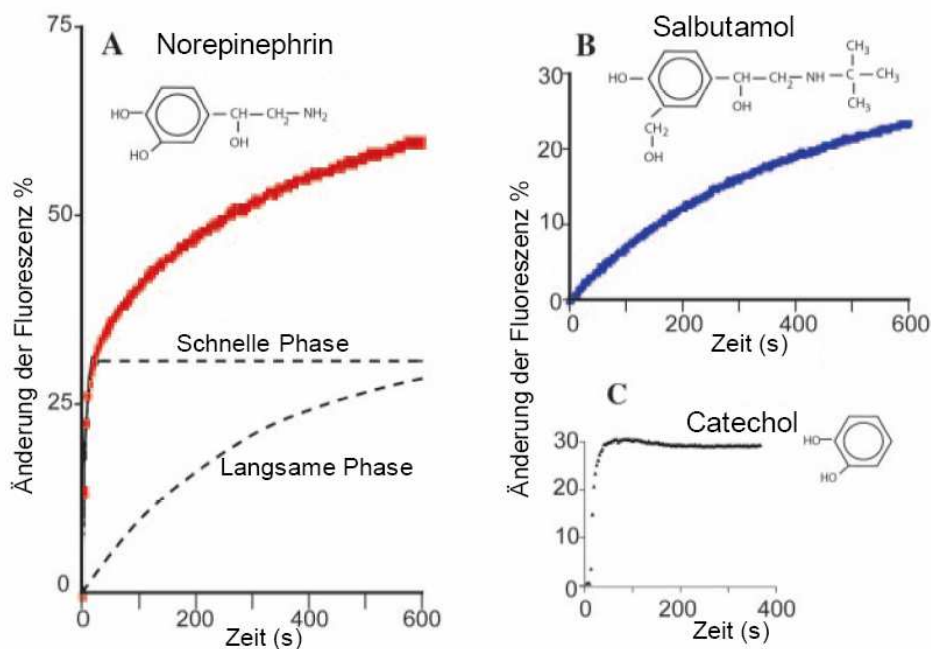


Abbildung 7: Liganden-induzierte Änderung der Fluoreszenz am Rezeptor TMR-β₂AR [17].

Auch bei der Untersuchung von TMR-β₂AR mit ISO, EPI, NE und DOP wurden Unterschiede in der Geschwindigkeit der Fluoreszenzänderung festgestellt [11]. Es konnten nur Liganden mit einem asymmetrischen β-Kohlenstoff-Atom eine biphasische Fluoreszenzänderung erzeugen und die Geschwindigkeit der langsamen Komponente wurde durch die Substituenten am Stickstoff-Atom beeinflusst.

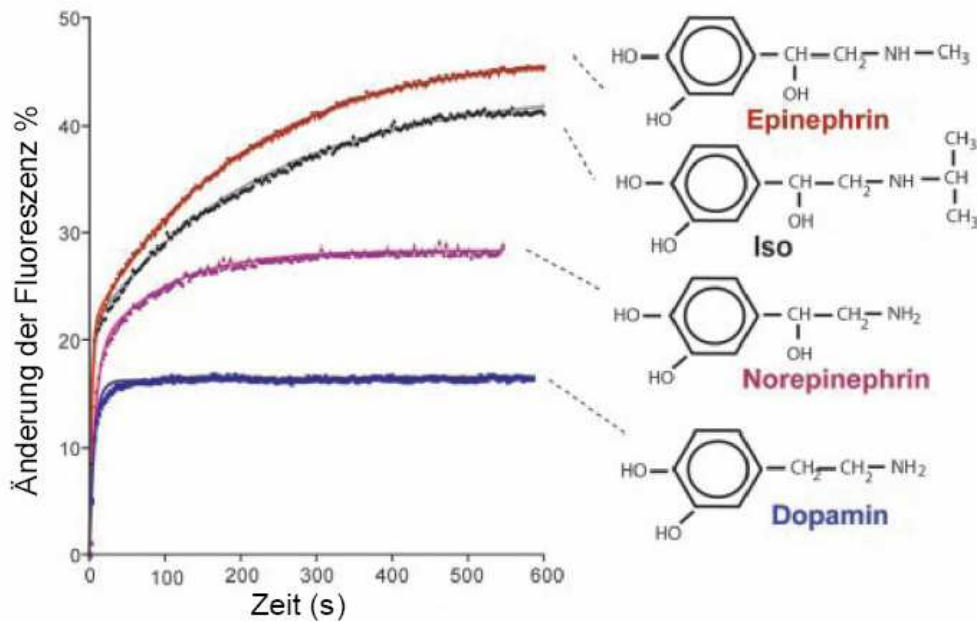


Abbildung 8: Fluoreszenzänderung an TMR-b2AR durch verschiedene Katecholamine [11].

Zur Untersuchung des „ionic lock“ wurde ein β_2 AR erzeugt, dessen Alanin-271 zu Cys-271 mutiert und an dieser Stelle fluoreszenzmarkiert wurde. Die Untersuchungen zeigten, dass Katecholamine und Salbutamol in der Lage sind, den „ionic lock“ zu öffnen, nicht aber Catechol. Daraus kann geschlossen werden, dass der „rotamer toggle switch“ und der „ionic lock“ unabhängig voneinander existieren, und diese Konformationsänderungen nichts mit der Effektivität des Liganden zu tun haben [13]. Interessant ist auch der Unterschied zwischen der Bindung von Catechol und Dopamin, da beide Moleküle als Teilstrukturen der Katecholamine betrachtet werden können. Dopamin ist im Gegensatz zu Catechol in der Lage, den „ionic lock“ und den „rotamer toggle switch“ zu öffnen. Da Dopamin in verschiedenen funktionellen Testsystemen nur ein partieller Agonist ist, muss man daraus schließen, dass es noch weitere Konformationsänderungen gibt [17].

Molekulares Modeling zeigt, dass die Katecholamine und Catechol an einer tiefen Stelle der Bindungstasche binden, indem sie mit den aromatischen Aminosäuren Phe-289 und Phe-290 in TM6, sowie mit Ser-203, Ser-204 und Ser-207 in TM3 interagieren. Salbutamol hingegen bindet an einer hohen Stelle der Bindungstasche, indem es mit den Aminosäuren Tyrosin-175 (Tyr) und Phe-193 in der ECL2 und mit Tyr-299 in TM5 interagiert [17].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es bei der Aktivierung des β_2 AR zu mindestens zwei unterschiedlichen aktiven Zuständen kommt, die sich auch energetisch unterscheiden lassen [14]. Hierfür sind unterschiedliche Strukturbestandteile der verschiedenen Agonisten verantwortlich, indem sie bestehende nichtkovalente intramolekulare Interaktionen öffnen und neue ermöglichen. Diese unterschiedlichen Konformationen können unabhängig voneinander gebildet werden. Allerdings ist es wahrscheinlich, dass die verschiedenen Konformationen über eine Sequenz verschiedener Zwischenstufen erreicht werden, wobei die eine Änderung die nächste wahrscheinlicher macht. Dies wird auch durch ein sequenzielles Bindungsmodell für Katecholamine verdeutlicht [11,13]: Hier geht der Rezeptor durch Interaktion mit dem Katecholring schnell von seinem inaktiven Zustand R in den Zustand R^1 über. Durch Interaktion mit der Aminogruppe erfolgt ein schneller Übergang in R^2 . Schließlich wird der Zustand R^3 langsam durch Wechselwirkungen mit der β -Hydroxylgruppe erreicht.

1.3.3 Konstitutive Aktivität

Eine besondere Eigenschaft vieler GPCRs, darunter auch β_1 AR und β_2 AR, ist die konstitutive Aktivität. Darunter versteht man eine basale Aktivität, die von der Anwesenheit eines Agonisten unabhängig ist [14]. Der Rezeptor ist also auch ohne Agonisten in der Lage das G-Protein zu aktivieren.

Einen Beweis für das Vorliegen einer konstitutiven Aktivität geben konstitutiv aktive Mutanten, die es für verschiedene GPCRs gibt [18], so auch für den β_2 AR. Das Ternäre-Komplex-Modell besagt, dass es durch die Mutation zu Änderungen in stabilisierenden Strukturen kommt und das Verhältnis zwischen R und R^* stark auf die Seite von R^* verschoben wird [12].

Auch die Betrachtung theoretischer Energielandkarten für verschiedene GPCRs, bietet Erklärungen für die Unterschiede in der konstitutiven Aktivität [14]. Hohe basale Aktivität kann durch eine niedrige Energiebarriere und niedrige Energieunterschiede zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand erklärt werden. Diese können leicht auch spontan überwunden werden und der Rezeptor gelangt in den aktiven Zustand. Rezeptoren mit niedriger konstitutiver Aktivität haben hingegen hohe Energiebarrieren bzw. große Energieunterschiede zwischen dem inaktiven und aktiven Zustand.

1.3.4 Einfluss des G_s-Proteins und seiner Splicevarianten

G-Proteine dienen der Signaltransduktion zwischen dem Rezeptor und den zellulären Effektorsystemen. So wie es verschiedenste GPCRs gibt, gibt es auch unterschiedliche G-Proteine. Bekannt sind unter anderem stimulierende G-Proteine (G_s), inhibierende G-Proteine (G_i) und G_q-Proteine [9]. Diese unterschiedlichen G-Proteine sind in der Lage verschiedene Effektorsysteme zu aktivieren oder deaktivieren, wie beispielsweise die AC, Phospholipasen oder Ionenkanäle. Der β₂AR ist in der Lage, sowohl an G_q-, G_i- und G_s-Proteine zu koppeln [10]. Hauptsächlich koppeln βARs jedoch an G_s-Proteine und stimulieren das Enzym AC. Für die Spezifität der G-Proteinbindung scheinen Aminosäuresequenzen in der dritten zytoplasmatischen Domäne verantwortlich zu sein [34]. Neben der ICL3 sind auch die zweite ICL und der Carboxyterminus in die G-Proteinbindung involviert [20].

Bei den G_s-Proteinen handelt es sich um heterotrimere Moleküle, die aus drei Untereinheiten bestehen. Die α-Untereinheit ist in der Lage GTP zu binden und durch ihre GTPase-Funktion wieder zu hydrolysieren, außerdem wird die AC durch die α-Untereinheit aktiviert [34]. Auch der Komplex aus β- und γ-Untereinheit ist in der Lage Effektorsysteme zu aktivieren.

Die α-Untereinheit des stimulierenden G-Protein (G_{sα}) existiert in einer langen (G_{sαL}) und einer kurzen (G_{sαS}) Splicevariante. Es ist bekannt, dass diese Splicevarianten in unterschiedlichen Geweben in unterschiedlicher Höhe exprimiert werden. Seifert *et al.* [19,28] zeigte, dass die Splicevariante auch Einfluss auf die Funktion des Rezeptors hat. So zeigten der β₁AR und der β₂AR konstitutive Aktivität, wenn sie an G_{sαL} koppeln, nicht aber bei einer Kopplung an G_{sαS}. Ein Grund hierfür ist, dass G_{sαL} häufiger GDP-frei vorliegt, und somit besser den aktiven Zustand R* stabilisieren kann [20]. Ein Einfluss auf die Bildung des ternären Komplexes scheint nicht zu bestehen, dafür gibt es Unterschiede in der Aktivierung der AC.

1.3.5 Fusionsproteine als Modell zur Analyse des G-Proteinzyklus

Über lange Zeit war die Untersuchung von G_s -gekoppelten GPCRs unbefriedigend und schwierig, da es beispielsweise nicht möglich ist, in Säugetierzellen eine GTPase-Aktivität zu messen [25]. Ein großer Fortschritt war die Einführung von Fusionsproteinen eines GPCR und der α -Untereinheit des G-Proteins (GPCR-G α), was zuerst Bertin *et al.* [21] mit der Konstruktion von β_2AR -G $_{s\alpha}$ gelang. Bei Fusionsproteinen ist der Carboxyterminus des GPCR kovalent mit dem Aminoterminus der α -Untereinheit des G-Proteins verbunden. Dieses Konstrukt bietet viele Vorteile, beispielsweise eine strenge 1:1-Stöchiometrie zwischen Rezeptor und G-Protein [20]. *In vivo* scheinen zwar einzelne Rezeptoren zumindest mit mehreren G-Proteinen zu interagieren [27], wobei die 1:1-Kopplung der *in vivo* Situation wahrscheinlich noch näher entspricht als ursprünglich angenommen [29]. Ein weiterer Vorteil ist die geringe räumliche Entfernung zwischen GPCR, G-Protein und der Zellmembran [20], wodurch eine effiziente Kopplung ermöglicht ist. Außerdem können durch ihre Anwendung viele funktionelle Untersuchungen wie GTPase-Assays, AC-Assays und Bindungsversuche unabhängig von der Expressionshöhe der Fusionsproteine durchgeführt werden [19,29].

Sehr häufig werden Fusionsproteine in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Insektenzellen exprimiert. Diese Zellen stellen sehr geeignete Expressionssysteme dar, da sie selbst nur in geringer Höhe G_s -ähnliche Proteine exprimieren, und nur eine geringe endogene GTPase-Aktivität messbar ist [25].

Trotz all dieser Vorteile sollte nicht vergessen werden, dass es sich bei Fusionsproteinen um ein künstlich hergestelltes Konstrukt handelt. Bisher konnte in zahlreichen Untersuchungen gezeigt werden, dass es im Bezug auf die Ligandenaffinität und –effektivität keine großen Unterschiede zwischen fusionierten und unfusionierten Rezeptoren gibt [19]. Auch die Eigenschaften der Ligandenbindung zeigten keine großen Unterschiede [28, 29, 33]. Obwohl Fusionsproteine nicht physiologisch vorkommen, sollten die Ergebnisse ihrer Untersuchungen demnach auf unfusionierte Systeme übertragbar sein.

1.4 Liganden und ihre Wirkung

Als Liganden werden Moleküle bezeichnet, die am Rezeptor binden und ihn entweder aktivieren oder deaktivieren. Für GPCRs ist dies eine sehr heterogene Gruppe von Molekülen, die sich von einzelnen Photonen bis hin zu großen Proteinen erstreckt [13]. Um die Wirkung verschiedener Liganden besser verstehen zu können, sollen im Folgenden einige Grundbegriffe geklärt werden.

1.4.1 Volle und partielle Agonisten

Um die Wirkung zu beschreiben, die ein Ligand auf einen Rezeptor bzw. sein Effektorsystem hat, sind die Begriffe Agonisten und Antagonisten gebräuchlich [13]. Unter vollen Agonisten versteht man Substanzen, die in der Lage sind, den Rezeptor maximal zu stimulieren. Auch partielle Agonisten stimulieren den Rezeptor, aber ihr Effekt ist auch in gesättigten Konzentrationen submaximal. Wie bereits beschrieben besitzen viele GPCRs konstitutive Aktivität. Substanzen, die als inverse Agonisten bezeichnet werden, hemmen diese. Antagonisten haben hingegen keinen Einfluss auf diese basale Aktivität, aber sie blockieren die Bindung von Agonisten und inversen Agonisten am Rezeptor.

Bezogen auf das Ternäre-Komplex-Modell kann man davon ausgehen, dass volle Agonisten den aktiven Zustand R^* stabilisieren, inverse Agonisten jedoch den inaktiven Zustand R . Partielle Agonisten sind weniger in der Lage das Gleichgewicht der Zustände in Richtung R^* zu verschieben als volle Agonisten [13].

1.4.2 Affinität, Effektivität und Potenz

Kenakin beschäftigte sich mit zwei wichtigen Begriffen in der Diskussion über die Wirkung von Liganden an Rezeptoren. Demnach handelt es sich bei der Affinität um die Fähigkeit des Liganden am Rezeptor zu binden [22]. Unter Effektivität wird die Fähigkeit eines Liganden, eine endogene oder pharmakologische Antwort zu erzeugen, verstanden [23]. Grundsätzlich können diese zwei Begriffe aber unabhängig voneinander vorkommen, das heißt ein Ligand der zwar Affinität besitzt, also am Rezeptor bindet, muss nicht gleichzeitig auch eine Wirkung auf Effektorsysteme und damit Effektivität haben [22]. Von diesen Begriffen sollte der

Ausdruck Potenz unterschieden werden. Für die Potenz eines Liganden spielt sowohl seine Fähigkeit am Rezeptor zu binden, als auch die Fähigkeit Effektorsysteme zu aktivieren eine Rolle.

1.4.3 Struktur der verwendeten Liganden

Um ein besseres Verständnis der Daten zu ermöglichen, soll hier kurz auf die Struktur der in dieser Arbeit verwendeten Liganden eingegangen werden. Wie bereits erwähnt handelt es sich um Katecholamine, wobei Dopamin, Norepinephrin und Epinephrin sowohl endogen vorkommen, als auch als Pharmaka eingesetzt werden. Isoprenalin ist eine synthetische Substanz. Sie stellen alle Agonisten an β ARs dar.

Allen vier Substanzen gemeinsam ist ein Catecholring, Unterschiede liegen in den jeweiligen Substituenten. So verfügen Isoprenalin, Epinephrin und Norepinephrin über ein asymmetrisches β -Kohlenstoff-Atom. An dieses Chiralitätszentrum ist eine OH-Gruppe gebunden. In dieser Arbeit wurde jeweils das Enantiomer in der (-)-Konformation der Substanzen verwendet. Außerdem gibt es Unterschiede in der Größe der Substituenten am Stickstoff-Atom. Dopamin besitzt kein chirales Kohlenstoff-Atom und kann somit als Strukturbestandteil der anderen Katecholamine gesehen werden. Wie später deutlich wird, gehen diese strukturellen Unterschiede Hand in Hand mit Unterschieden in der Wirkung der Liganden an den Rezeptoren.

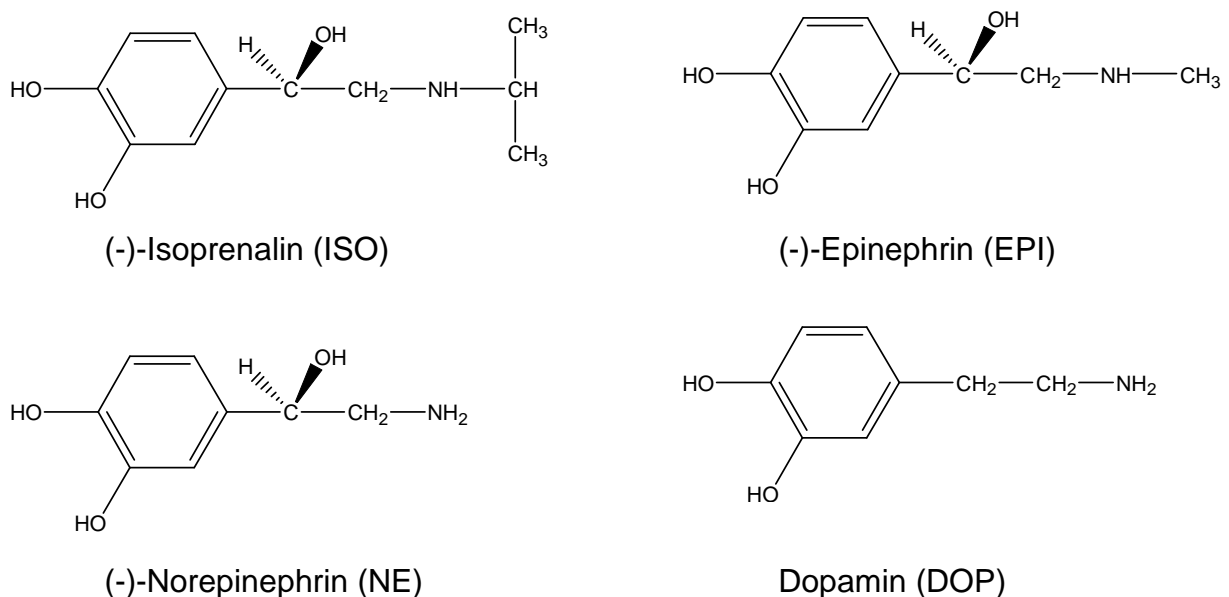


Abbildung 9: Struktur der verwendeten Liganden.

1.5 Fragestellung

β AR spielen eine herausragende Rolle im menschlichen Körper und ihre pharmakologische Beeinflussung ist bedeutend für die Behandlung häufiger Krankheiten wie beispielsweise Asthma bronchiale, Hypertonie oder Herzinsuffizienz. Bisher wurde ein großer Teil der funktionellen Daten dieser Rezeptoren mit synthetischen Liganden erhoben. Aus diesem Grund erfolgte in dieser Arbeit eine systematische Untersuchung mit den endogenen Katecholaminen Epinephrin, Nor-epinephrin und Dopamin, sowie mit Isoprenalin. Außerdem wurde untersucht, welchen Einfluss die Kopplung des Rezeptors an die unterschiedlichen Splicevarianten des $G_{s\alpha}$ -Proteins hat, um einen kleinen Beitrag zum Verständnis der Liganden-Rezeptor-Interaktion zu leisten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialaufstellung

2.1.1 Substanzen

Aktivkohle	Sigma, Steinheim, Deutschland
Albumin, Bovin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Alprenolol	Sigma, Steinheim, Deutschland
Aluminium, MPAlumina N-Super I	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
AppNHp	Roche, Mannheim, Deutschland
ATP	Roche, Mannheim, Deutschland
Benzamid 99%	Sigma, Steinheim, Deutschland
cAMP	Sigma, Steinheim, Deutschland
DC Protein Assay Reagent A, B und S	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Dihydroalprenololhydrochlorid, levo-[ring,propyl- ³ H(N)]	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
EDTA, TitriplexIII	Merck, Darmstadt, Deutschland
(-)-Epinephrin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Fetales Rinderserum	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

Gentamycin	Lonza, Walkersville, MD, USA
GTP	Roche, Mannheim, Deutschland
3-Hydroxy-Tyramin (Dopamin)	Sigma, Steinheim, Deutschland
(-)-Isoproterenol	Sigma, Steinheim, Deutschland
Kreatinkinase (CK)	Roche, Mannheim, Deutschland
Leupeptin Hemisulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-(-)-Norepinephrin	Sigma, Steinheim, Deutschland
MgCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
Myokinase	Sigma, Steinheim, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma, Steinheim, Deutschland
Phosphocreatinedisodiumsalt (CP)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Phosphoenolpyruvat	Sigma, Steinheim, Deutschland
Pyruvatkinase	Sigma, Steinheim, Deutschland
SF-900 II SFM	Invitrogen, Auckland, Neuseeland

Szintillationslösung Rotiszint eco plus	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	USB, Cleveland, OH, USA
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	
Chromatographiesäulen, CC-09,M	E+K Scientific, Santa Clara, CA, USA
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filter Whatman GF/C	Schleicher+Schuell, Maidstone, Kent, UK
Insulinspritzen 1 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Kanülen, grau 27G und gelb 20G	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Kolben, 500 ml	Schott, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen, diverse	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Probenröhren neutral, 4 ml	Kabe Labortechnik, Nümbrecht, Deutschland
Spritze 20 ml	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Szintillationsgefäße Mini vial, 6 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Szintillationsgefäße, 20 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Transferpipette, 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Geräte

Computerprogramm (Datenauswertung)	Graph Pad Prism 5.0	GraphPad, San Diego, CA, USA
Harvester	M-48R	Brandel, Gaithersburgh, MD, USA
Heizblock	Digital Heatblock	VWR, West Chester, PA, USA
Mikroskop	Olympus CK2	Olympus, Tokyo, Japan
Photometer	Bio-Photometer ECOM-P 4153	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttler	innova2000, platform shaker	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Scintillation-Counter	Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800 TR	PerkinElmer, Waltham, MA, USA
Vortexer	Reax 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Zellinkubator	C24 KC Refrigerated Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA
Zentrifugen	Heraeus Multifuge 3 _{L-R}	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
	Jouan GR4i Centrifuge	Thermo Electron Corporation, Waltham, MA, USA
	Sorvall Super T ₂₁	Kendro, Newtown, CT, USA
	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2 Zellkultur und Virusinfektion

Die Sf9-Zellkultur [25] erfolgte in 250 ml-Erlenmeyerkolben. Als Medium diente SF-900 II-Medium mit 5% (Vol./Vol.) fetalem bovines Serum (FBS) und Gentamycin (50 µg/ml). Dieses Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt, wobei die Zellen immer auf eine Konzentration von $0,5-0,75 \cdot 10^6$ Zellen pro ml verdünnt wurden. Um gutes Wachstum zu erlangen, wurden die Zellen bei 28°C im Schüttelinkubator gehalten, wobei die Verdopplungszeit 24-48 Stunden betrug. Zu dem Zeitpunkt, als die Sf9-Zellen eine Konzentration von $4-6 \cdot 10^6$ /ml erreicht hatten, wurden sie auf $3 \cdot 10^6$ /ml verdünnt.

Dies ist die ideale Konzentration, um die Zellen mit Baculovirus zu infizieren. Je nachdem, ob später eine hohe oder niedrige Expressions der Zellmembran gewünscht war, wurde eine 1:100- oder 1:1000-Verdünnung des Virus verwendet. Allerdings muss beachtet werden, dass durch die Variation der Virusverdünnung keine bestimmte Expressionshöhe garantiert werden kann [24].

Die infizierten Zellen wurden nun nochmals für 48 Stunden inkubiert. Vor der anschließenden Membranpräparation wurden die Zellen unter dem Mikroskop betrachtet. Zeichen für eine gute Infektion sind eine veränderte Zellform, zerstörte Zellen und Viruseinschlusskörperchen. Auch eine eventuelle Kontamination mit Bakterien kann hierbei festgestellt werden.

2.3 Membranpräparation

Für eine Membranpräparation [25] aus Sf9-Insektenzellen, die mit einem Baculovirus infiziert wurden, sind mehrere Puffer nötig, welche sich wie folgt zusammensetzen. Der PBS-Puffer besteht aus NaCl (100 mM), Na_2HPO_4 (80 mM) und NaH_2PO_4 (20 mM). Er wird auf pH 7,4 eingestellt. Um die Zellen aufzubrechen wird Lysis-Puffer benötigt. Hierzu werden Ethylendinitril-tetraessigsäure (EDTA) (1 mM), Phenylmethylsulfonylfluorid (200 µM), Benzamidin (10 µg/ml) und Leupeptin (10 µg/ml) in 10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) /HCl, pH 7,4 gelöst. Dabei ist es wichtig, dass der Proteaseinhibitor erst am Versuchstag zugegeben wird. Wie bei vielen anderen Arbeiten wird auch hier Bindungspuffer (BB) gebraucht. Er besteht aus MgCl_2 (12,5 mM) und EDTA (1 mM) in Tris/HCl, pH 7,4 (75 mM).

Folgende Beschreibung bezieht sich auf 50-ml-Zellsuspension, allerdings ist es sinnvoll, an einem Arbeitstag sechs bis acht Zellmembranen parallel herzustellen.

Alle Arbeitsschritte wurden konsequent auf Eis durchgeführt. Zuerst wurden die infizierten Zellen in einem 50-ml-Röhrchen bei 4°C, 1000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das zurückbleibende Sediment wurde in 50 ml PBS-Puffer resuspendiert und nochmals auf gleiche Weise zentrifugiert. Das Sediment wurde nun in 15 ml Lysis-Puffer im Dounce-Homogenisator 25mal homogenisiert.

Diese Suspension wurde bei 4°C, 500 rpm für 5 min zentrifugiert, wobei die übrigen Zellbestandteile ein Sediment bilden und die Membranen sich im Überstand befinden. Dieser Überstand wurde vorsichtig mit einer Transferpipette in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und in der Sorvall-Zentrifuge bei 4°C, 18.000 rpm für 20 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 20 ml Lysis-Puffer aufgenommen, mit der Transferpipette homogenisiert und nochmals in der Sorvall-Zentrifuge zentrifugiert. Schließlich wurde das Sediment in 12-25 ml BB aufgenommen (je nachdem ob eine hohe oder niedrige Proteinkonzentration gewünscht war) und durch eine 20-ml-Spritze mit gelber Kanüle (20 G) 15mal homogenisiert.

Die fertige Membran wurde nun möglichst rasch in 1-ml-Portionen bei -80°C eingefroren. Unter diesen Bedingungen können die Zellmembranen mehrere Jahre ohne Funktionsverlust gelagert werden.

2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der DC Protein Assay von Bio-Rad verwendet. Als Standard wurde zuerst aus einer 2 mg/ml bovines Serumalbumin (BSA)-Stammlösung eine Verdünnungsreihe in BB hergestellt. Sinnvoll sind fünf bis sechs Konzentrationen in einem Bereich von 100-1000 µg/ml BSA.

Es wurden je 20 µl der Standardreihe, 20 µl der suspendierten Membran oder 20 µl BB als Leerwert mit jeweils 100 µl Reagenz A` (bestehend aus 1 ml Reagenz A und 20 µl Reagenz S) und 800 µl Reagenz B vermischt. Dieser Ansatz wurde 20 min inkubiert, bevor die Proteinkonzentrationen der Standardreihe und die der Membran mit dem Biophotometer im Programm Lowry bestimmt wurden.

2.5 Durchführung der [³H]DHA-Bindung

Grundsätzlich sind die Durchführung der Sättigungs- und der Kompetitions-Bindung recht ähnlich. Deshalb sollen die Arbeitsschritte, die bei beiden Versuchen nötig sind, zuerst beschrieben werden. Alle folgenden Beschreibungen orientieren sich an den Arbeitsanweisungen von Seifert *et al.* [25] und wurden teilweise modifiziert.

Zur Vorbereitung der Zellmembranen wurden diese nach dem Auftauen mit einer Insulinspritze (Kanüle 27 G) vorsichtig 20mal auf Eis resuspendiert. Die benötigte Menge Protein (20-30 µg/Eppendorfgefäß) wurde entnommen und mit 1 ml kaltem BB für 10 min bei 4°C und 13.000•g zentrifugiert. Dieses zusätzliche Waschen ist nötig um möglicherweise vorhandene zelleigene Guaninnukleotide zu entfernen, denn auch diese Nukleotide könnten mit den G-Proteinen wechselwirken und so die Versuchsergebnisse verfälschen. Nach der Zentrifugation wurden die Membranen nochmals auf selbe Weise in der benötigten Menge BB resuspendiert, bis eine homogene Suspension erreicht war. Nur so können optimale Ergebnisse erreicht werden.

Nach abgelaufener Reaktionszeit wurden sowohl die Sättigungs- als auch die Kompetitions-Bindungsansätze mit dem Brandel-Harvester abgestoppt. Hierbei konnten alle 48 Proben gleichzeitig über GF/C-Filter abgesaugt werden. Nach dreimaligem Spülen mit je 1 ml kaltem BB wurden die ausgestanzten Filter mit 4 ml Szintillationslösung in 6 ml Szintillationsgefäße gegeben. Nie vergessen werden sollte ein solches Gefäß, welches nur das verwendete Volumen der [³H]DHA-Lösung enthält, um die absolute Menge an zugegebener Radioaktivität zu bestimmen.

Die Radioaktivität wurde erst nach ca. 4 Stunden bestimmt, damit sichergestellt war, dass sich die am Filter gebundenen Moleküle lösen konnten. Im Anschluss wurde die Radioaktivität mit dem Szintillations-Counter mit einem für [³H] geeigneten Programm bestimmt. Hierbei wurde jede Probe 3 min gezählt.

2.5.1 [³H]DHA-Sättigungs-Bindung

Um bei der Bestimmung der Expressionshöhe der Fusionsproteine in den Zellmembranen durch eine Sättigungs-Bindung verlässliche Ergebnisse zu bekommen, wurde der Versuch in Triplikaten durchgeführt. Jedes der Probenröhrchen enthielt 300 µl BB und 50 µl suspendierte Membran (20 µg/50 µl). Das gesamte Reaktionsvolumen betrug 500 µl.

Um die spezifische Bindung des [³H]DHA zu bestimmen, wurden 100 µl H₂O und 50 µl einer 100 nM [³H] Dihydroalprenolol (DHA)-Lösung (10 nM final, spezifische Aktivität 85-90 Ci/mmol) in das Reaktionsgefäß gegeben. Für die Bestimmung der unspezifischen Bindung enthielten die Reaktionsgefäße 100 µl einer 50 µM Alprenolol-Lösung (10 µM final) und ebenfalls 50 µl der 100 nM [³H]DHA-Lösung.

Um eine sinnvolle Reihenfolge einzuhalten, wurden zuerst BB, dann H₂O bzw. Alprenolol-Lösung und schließlich die Membran in die Reaktionsgefäße pipettiert. Die Reaktionszeit begann mit der Zugabe des [³H]DHA. Der Ansatz des Versuchs wurde für 90 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (250 rpm) inkubiert. Das Abstoppen und das Bestimmen der Radioaktivität erfolgten wie in 2.4 beschrieben.

Die Expressionshöhe kann mit Formel 1 bestimmt werden. Hierbei sind:

cpm_{total} :	Gemessene Radioaktivität der Proben, die H ₂ O und [³ H]DHA enthalten
$cpm_{unspezifisch}$:	Gemessene Radioaktivität der Proben, die Alprenolol und [³ H]DHA enthalten
$pmol_{[3H]DHA}$:	Absolute Menge an [³ H]DHA, die ein Reaktionsgefäß enthält, hier: 5 pmol
$cpm_{zugegeben}$:	Gemessene Radioaktivität von 50 µl der [³ H]DHA-Lösung in 4 ml Szintillationslösung
$mg_{Protein}$:	Zugegebene Menge an Protein (0,02-0,03 mg/Reaktionsgefäß)

$$Expression [pmol / mg] \equiv \frac{(cpm_{total} - cpm_{unspezifisch}) \cdot pmol_{[3H]DHA}}{cpm_{zugegeben} \cdot mg_{Protein}}$$

Formel 1: Bestimmung der Expressionshöhe von Fusionsproteinen.

2.5.2 [³H]DHA-Kompetitions-Bindung

Um in einer Kompetitions-Bindung die Bildung des ternären Komplexes und die Kompetitionsisotherme (K_i -Werte) zu bestimmen, sollten Membranen mit relativ hoher Expression (ca. 5-10 pmol/mg) verwendet werden. Andernfalls kann die Proteinkonzentration von 20 µg auf 30-35 µg pro Eppendorfgefäß erhöht werden. Die Durchführung des Versuchs erfolgte in Triplikaten.

Es wurde eine logarithmische Konzentrationsreihe mit 1 mM HCl des zu untersuchenden Agonisten vorbereitet. Es bietet sich auch an, zwei Zwischenkonzentrationen herzustellen. Diese gesamte Konzentrationsreihe wurde nun zweimal in je 24 Probenröhrchen (50 µl Ligand pro Gefäß) pipettiert.

In die erste Hälfte der Reaktionsgefäße wurde nun je 400 µl BB, in die zweite Hälfte je 400 µl einer 1,25 mM GTP-Lösung in BB (1 mM final) gegeben. Als nächster Schritt folgte die Zugabe von je 25 µl der vorbereiteten Membran (20-30 µg/25 µl).

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl einer 20 nM [³H]DHA-Lösung (1 nM final, spezifische Aktivität 85-90 Ci/mmol) gestartet. Der Ansatz wurde nun für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (250 rpm) inkubiert. Da die verwendeten Liganden teilweise lichtempfindlich sind, erfolgte die Inkubation unter Ausschluss von Licht. Schließlich wurde der Versuch abgestoppt (siehe 2.4) und vermessen.

Die absolute Agonistenbindung wurde mit Formel 2 bestimmt. Hierbei sind:

cpm_{total} :	Gemessene Radioaktivität der Proben, welche die Liganden enthalten
$cpm_{unspezifisch}$:	Gemessene Radioaktivität der Proben, die den Liganden in maximaler Konzentration enthalten
$pmol_{[3H]DHA}$:	Absolute Menge an [³ H]DHA, die ein Reaktionsgefäß enthält, hier: 0,5 pmol
$cpm_{zugegeben}$:	Gemessene Radioaktivität von 25 µl der [³ H]DHA-Lösung in 4 ml Szintillationslösung
$mg_{Protein}$:	Zugegebene Menge an Protein (0,02-0,03 mg/Reaktionsgefäß)

$$Bindung [pmol / mg] \equiv \frac{(cpm_{total} - cpm_{unspezifisch}) \cdot pmol_{[3H]DHA}}{cpm_{zugegeben} \cdot mg_{Protein}}$$

Formel 2: Bestimmung der absoluten Agonistenbindung.

2.6 Durchführung des GTPase-Assays

Folgende Beschreibung basiert auf einem Versuchsprotokoll von Seifert *et al.* [25], welches bereits erfolgreich für verschiedene Rezeptoren etabliert wurde. Bei der Durchführung des GTPase-Assays ist es sinnvoll sich möglichst viele Arbeitsschritte vorzubereiten, und außerdem wurden der Versuchsansatz sowie alle Reagenzien stets auf Eis gehalten. Da in einem Ansatz leicht 70-90 Einzelproben behandelt werden können, ist es möglich, vier bis fünf verschiedene Liganden zu untersuchen und ihre kompletten Konzentrations-Wirkungskurven zu erstellen. Hierzu wurden für jeden Liganden Konzentrationsreihen mit 1 mM HCl in logarithmischer Skala und unter Lichtausschluss vorbereitet. Um sichere Ergebnisse zu produzieren, wurden einzelne Konzentrationen in Duplikaten oder Triplikaten untersucht.

Vorab hergestellt wurde auch die benötigte Menge (50 µl/Eppendorfgefäß) Reaktionsmix, welcher in finalen Konzentrationen folgendes enthält: 50 mM Tris/HCl, pH 7,4, 100 µM Adenosin-5'-[β,γ-imido]triphosphat (AppNHp), 100 nM GTP, 100 µM ATP, 1 mM MgCl₂, 100 µM EDTA, 5 mM Kreatinphosphat, 40 µg Kreatinkinase und 0.2% (Vol./Vol.) BSA in 50 mM Tris/HCl, pH 7,4. Zu beachten war, dass sogleich das benötigte Volumen Reaktionsmix als Lösungsmittel für das [γ-³²P]GTP entnommen und durch 20 mM Tris/HCl, pH 7,4 ersetzt wurde.

Nachdem alle Vorbereitungen getroffen waren, wurden jeweils 10 µl Ligand und 50 µl Reaktionsmix in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Nicht vergessen werden durften zwei bis drei Gefäße mit 10 µl GTP (1 mM final) und 50 µl Reaktionsmix, um die nicht-enzymatische [γ-³²P]GTP-Hydrolyse zu bestimmen.

Da die benötigten Zellmembranen temperaturempfindlich sind, wurden sie erst zu diesem Zeitpunkt aufgetaut und auf Eis wie in 2.4 beschrieben homogenisiert. Allerdings mit dem Unterschied, das diesmal nicht BB sondern 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 zum Waschen und Lösen verwendet wurde. Die Konzentration der Proteinlösung wurde so berechnet, dass jedes Reaktionsgefäß 10 µg Membran enthielt (10 µg/20 µl). Schließlich wurden 20 µl Proteinlösung in jedes Eppendorfgefäß pipettiert.

Der Versuchsansatz wurde exakt 20 min bei 25°C inkubiert. Deshalb war es sinnvoll, die Reaktion nach einer Vorinkubation von 2 min in 10-15 s Intervallen durch die Zugabe von 20 µl [γ-³²P]GTP (0,1-0,2 µCi/Ansatz) in Reaktionsmix (100 nM final) zu starten. Nach der Zugabe wurde jede Probe gut gevortext.

Nach Ablauf der 20 min wurde der Versuch wieder in 10 bzw. 15 s Intervallen durch Zugabe von 900 µl gekühlte Kohlelösung (5% Masse/Vol.) abgestoppt. Damit

sich die Kohle nicht absetzen konnte, war es nötig sie ständig zu rühren, und die Pipettenspitze wurde schräg abgeschnitten, um ein Verstopfen zu verhindern.

Anschließend wurden die Proben 7 min bei 15.000•g und 4°C zentrifugiert. Aus jedem Eppendorfgefäß wurden 600 µl des Reaktionsansatzes entnommen und mit 3 ml H₂O in ein 6 ml Szintillationsgefäß gegeben. Außerdem durfte nicht vergessen werden, in ein solches Gefäß 20 µl der [γ -³²P]GTP-Lösung in 3 ml H₂O zu geben, um die absolute Menge der zugegebenen Radioaktivität zu bestimmen. Der Versuch wurde nun im Szintillations-Counter mit einem für [³²P] geeigneten Programm vermessen, wobei jede Probe 3 min gezählt wurde.

Die GTPase-Aktivität wurde mit Formel 3 bestimmt. Hierbei sind:

cpm _{total} :	Gemessene Radioaktivität aller Proben, die einen Liganden enthalten
cpm _{GTP} :	Gemessene Radioaktivität der Proben, die GTP (1 mM final) statt des Liganden enthalten
pmol _{GTP} :	Absolute Menge an GTP, die ein Reaktionsgefäß enthält, hier: 10 pmol (100 nM/100 µl Reaktionsvolumen)
1,43:	Korrekturfaktor, da von den 1000 µl Reaktionsansatz nur 600 µl vermessen werden
cpm _{zugegeben} :	Gemessene Radioaktivität von 25 µl der [γ - ³² P]GTP-Lösung in 3 ml H ₂ O
min _{Inkubationszeit} :	Reaktionszeit 20 min
mg _{Protein} :	Zugegebene Menge an Protein (0,01 mg/Reaktionsgefäß)

$$\text{Aktivität} \left[\frac{\text{pmol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \right] = \frac{(\text{cpm}_{\text{total}} - \text{cpm}_{\text{GTP}}) \cdot \text{pmol}_{\text{GTP}} \cdot 1,43}{\text{cpm}_{\text{zugegeben}} \cdot \text{min}_{\text{Inkubationszeit}} \cdot \text{mg}_{\text{Protein}}}$$

Formel 3: Berechnung der GTPase-Aktivität.

2.7 Durchführung des AC-Assays

Die Bestimmung der Aktivität der AC kann sowohl in Versuchssystemen mit einer oder zwei Säulen erfolgen. Die besten Ergebnisse können hierbei mit einer Methode von Alvarez und Daniels [26] erzielt werden, wobei das neu gebildete [^{32}P]cAMP von [α - ^{32}P]ATP über nur eine mit Aluminiumoxid gefüllte Säule getrennt wird. Folgendes bezieht sich auf eine Versuchsbeschreibung von Seifert *et al.* [25], die nur leicht modifiziert wurde.

Bei der Durchführung des AC-Assays ist es von großer Bedeutung die geeigneten Zellmembranen zu wählen. Es sollten nur solche mit niedriger Expressionshöhe (1-3 pmol/mg) verwendet werden, da in Membranen die Konzentration des Enzyms AC wesentlich geringer als die Konzentration der G-Proteine ist [27]. Die AC-Moleküle sind also der limitierende Faktor. Außerdem ist die AC sehr temperaturempfindlich. Deshalb wurden die Membranen und alle Reagenzien sowie der gesamte Versuchsansatz ständig auf Eis gehalten. Aus eben diesem Grund war es auch sinnvoll, sich folgende Arbeitsschritte vorzubereiten.

Da in einem Versuch ohne Schwierigkeiten bis zu 90 Einzelproben behandelt werden konnten, war es möglich mehrere verschiedene Liganden in einem Ansatz zu vergleichen. Hierzu stellte man sich für jeden Liganden eine logarithmische Konzentrationsreihe in 500 μM HCl her. Die Eppendorfgefäße wurden mit Alufolie umhüllt, da einige Liganden lichtempfindlich sind. Jede Konzentration wurde in Triplikaten untersucht, da beim AC-Assay das Signal-Rausch-Verhältnis nicht besonders gut ist.

Auch die benötigte Menge an Reaktionsmix (20 μl /Eppendorfgefäß) wurde vorab hergestellt. Dieser enthielt in finalen Konzentrationen: 40 μM ATP, 10 μM GTP, H_2O und AC-Mix. Dieser wurde in größeren Mengen hergestellt und in kleinen Portionen bei -80°C aufbewahrt. Er enthielt: Phosphoenolpyruvat (2,7 mM final), Pyruvatkinase (0,125 IU), Myokinase (1 IU) und cAMP (0,1 mM final).

Nun wurden in jedes Eppendorfgefäß 10 μl des Liganden pipettiert. Dabei durfte nicht vergessen werden, zwei bis drei Proben mit 500 μM HCl, die außerdem keine Membran sondern 20 μl BB enthielten, herzustellen, um den Leerwert zu bestimmen.

Erst zu diesem Zeitpunkt wurden die Zellmembranen aufgetaut und mit BB wie in 2.4 beschrieben homogenisiert und gewaschen. War eine absolut homogene Suspension erreicht, konnten in jedes Eppendorfgefäß 20 μl gegeben werden. Die finale Konzentration an Protein betrug dabei 30 μg /Eppendorfgefäß.

Schließlich konnte der Reaktionsmix durch Zugabe von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (40 μM final) vervollständigt werden, wobei jedes Reaktionsgefäß 0,5-1,0 μCi /Ansatz enthielt. Der Start der Reaktion erfolgte nach 2 min Vorinkubation durch Zugabe von 20 μl Reaktionsmix im 10-15 s Takt, wobei jede Probe gut gevortext wurde. Die Reaktionszeit betrug 20 min, die Reaktionstemperatur konstant 37°C.

Nach Ablauf der Zeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 μl 2,2N HCl in 10-15 s Intervallen gestoppt und die Proben kurz zentrifugiert, damit problemlos 65 μl des Reaktionsvolumens entnommen werden konnten. Dieses Volumen wurde vorsichtig auf Chromatographiesäulen, die Aluminiumoxid enthielten, aufgetragen. Anschließend wurde das gebildete $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cAMP}$ mit 4 ml 0.1 M Ammoniumacetat, pH 7,0 in 20 ml Szintillationsgefäße eluiert.

Nach Zugabe von 10 mL H_2O wurde die Radioaktivität im Szintillations-Counter mit einem für $[\text{}^{32}\text{P}]$ geeigneten Programm bestimmt, wobei jede Probe 3 min gezählt wurde. Nicht vergessen werden durfte die Bestimmung der absoluten Menge an zugegebener Radioaktivität durch Vermessung von 6.5 μl Reaktionsmix in 10 ml H_2O (= 10% der absoluten Menge).

Die AC-Aktivität wurde mit Formel 4 bestimmt. Hierbei sind:

$\text{cpm}_{\text{total}}$:	Gemessene Radioaktivität aller Proben, die einen Liganden enthalten
$\text{cpm}_{\text{Leerwert}}$:	Gemessene Radioaktivität der Proben, die nur HCl (100 μM final) und BB, aber keine Membran enthalten
pmol_{ATP} :	Absolute Menge an ATP, die ein Reaktionsgefäß enthält, hier: 2000 pmol (40 μM /50 μl Reaktionsvolumen)
1,35:	Korrekturfaktor, da von den 70 μl Reaktionsansatz nur 65 μl vermessen werden und die Zählbeute nicht 100% beträgt
$\text{cpm}_{\text{zugegeben}}$:	Gemessene Radioaktivität von 65 μl der $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ -Lösung in 10 ml H_2O
$\text{min}_{\text{Inkubationszeit}}$:	Reaktionszeit 20 min
$\text{mg}_{\text{Protein}}$:	Zugegebene Menge an Protein (0,03 mg/Reaktionsgefäß)

$$\text{Aktivität} \left[\frac{\text{pmol}}{\text{mg} \cdot \text{min}} \right] = \frac{(\text{cpm}_{\text{total}} - \text{cpm}_{\text{Leerwert}}) \cdot \text{pmol}_{\text{ATP}} \cdot 1,35}{\text{cpm}_{\text{zugegeben}} \cdot \text{min}_{\text{Inkubationszeit}} \cdot \text{mg}_{\text{Protein}}}$$

Formel 4: Berechnung der AC-Aktivität.

2.8 Auswertung der Daten

Die Auswertung sämtlicher Daten erfolgte mit dem Programm Graph Pad Prism 5.0. Hierbei wurden auf die Optionen lineare bzw. nichtlineare Regression zurückgegriffen. Auch alle Abbildungen wurden mit Prism 5.0 erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte durch Angabe der Mittelwerte und des 95% Konfidenzintervalls.

Des Weiteren wurden die E_{\max} -Werte des GTPase- und AC-Assays statistisch untersucht. Die Analyse erfolgte ebenso mit Graph Pad Prism 5.0, unter Verwendung der Varianzanalyse ANOVA (**A**nalysis **o**f **v**arinace) und des „Dunnett’s multiple comparison post test“. Als Bezugspunkt dienten die Werte von ISO.

3 Resultate

3.1 Ergebnisse der Membranpräparationen

Auf Grund der hohen Anzahl an einzelnen Experimenten, wurde eine große Menge an Membranen benötigt. Einerseits konnte auf bereits vorhandene Zellmembranen zurückgegriffen werden, andererseits wurden mehrmals frische Membranen hergestellt. Hierbei wurden 1:100- bzw. 1:1000-Verdünnungen des Baculovirus verwendet. Anschließend wurden die Proteinkonzentration und die Expressionshöhe mit folgenden Ergebnissen bestimmt. Wie bereits erwartet, gelang es nicht das Konstrukt $\beta_2\text{AR-G}_{\text{saS}}$ in hohen Konzentrationen zu exprimieren [28,29].

Konstrukte	Membran- nummer	Anzahl Eppendorfgefäße (mit je 1 ml) und Zellvolumen	Protein- konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Expressions- höhe (pmol/mg)	Virus- verdünnung
<u>$\beta_1\text{AR-G}_{\text{saL}}$</u>	1311	11 aus 50 ml	3870	1,05	1:1000
	1312	11 aus 50 ml	2737	2,04	1:1000
	1478	22 aus 100 ml	2187	4,70	1:100
<u>$\beta_1\text{AR-G}_{\text{saS}}$</u>	1313	11 aus 50 ml	2941	1,91	1:1000
	1314	11 aus 50 ml	2820	1,23	1:1000
	1315	11 aus 50 ml	1681	5,23	1:100
	1479	22 aus 100 ml	2110	3,80	1:100
<u>$\beta_2\text{AR-G}_{\text{saL}}$</u>	1316	11 aus 50 ml	3730	1,70	1:1000
	1317	11 aus 50 ml	3622	1,13	1:1000
	1480	22 aus 100 ml	2560	5,10	1:100
<u>$\beta_2\text{AR-G}_{\text{saS}}$</u>	1318	11 aus 50 ml	2064	1,43	1:100
	1481	22 aus 100 ml	2095	1,50	1:100

Tabelle 1: Übersicht über die Ergebnisse der Membranpräparationen.

3.2 [³H]DHA-Kompetitions-Bindung

3.2.1 Aussagen des Versuchs

Ein guter Ausgangspunkt, um die Bindungseigenschaften verschiedener Liganden an unterschiedlichen Fusionsproteinen zu untersuchen, ist die [³H]DHA-Kompetitions-Bindung, da sie an einem der ersten Schritte im G-Proteinzyklus ansetzt.

[³H]DHA ist hierfür ein geeigneter Radioligand, da es mit hoher Affinität an β_1 AR- G_{saL} (K_d 1,6 nM), β_1 AR- G_{saS} (K_d 1,9 nM), β_2 AR- G_{saL} (K_d 0,36 nM) und β_2 AR- G_{saS} (K_d 0,36 nM) bindet und seine Bindung nicht durch Guaninnukleotide beeinflusst wird [25]. Durch die Zugabe einer ansteigenden Konzentrationsreihe verschiedener Agonisten wird das [³H]DHA immer mehr aus seiner Bindung verdrängt und damit das radioaktive Signal immer schwächer.

Mit Hilfe des Programms Prism 5.0 wurde aus diesen Daten im Modus „nichtlineare Regression“ eine Kompetitionsbindungskurve erstellt, welche in Abwesenheit von GTP für alle Konstrukte biphasisch verläuft. Durch Normalisierung der Daten wurden einzelne Experimente untereinander vergleichbar.

Die Auswertung der Daten erfolgte durch Angabe verschiedener Werte. Aus den K_d -Werten von [³H]DHA an den einzelnen Konstrukten und der Ligandenkonzentration können verschiedene Dissoziationskonstanten für den hochaffinen und niedrigaffinen Zustand des Rezeptors (K_i -Werte) berechnet werden. So sind K_{ih} (hochaffine Bindung) und K_{il} (niedrigaffine Bindung) ein Maß für die Bildung des ternären Komplexes (bestehend aus Ligand, Rezeptor und nukleotidfreiem G-Protein), welcher eine hohe Agonistenaffinität besitzt [28]. Durch Angabe dieser K_i -Werte werden die Affinitäten einzelner Liganden vergleichbar. Das nur ein Teil der Rezeptormoleküle den ternären Komplex stabilisiert, kann durch Angabe der Fraktion an hochaffinen Bindungsstellen ($\%R_h$) illustriert werden [30].

Durch Zugabe von 1 mM GTP wurden die Kompetitionsbindungskurven nach rechts verschoben. Außerdem erschien sie bei einigen Konstrukten nicht mehr biphasisch sondern monophasisch. Der Grund hierfür ist die Bindung von GTP an das G-Protein. Durch die Bindung dissoziiert der ternäre Komplex und der Rezeptor verliert seine hohe Affinität für den Agonisten [28]. Je nachdem, ob die Kurve mono- oder biphasisch verläuft, werden auch hier K_{ih} - und/oder K_{il} -Werte angegeben.

3.2.2 Liganden an β_1AR-G_{saL}

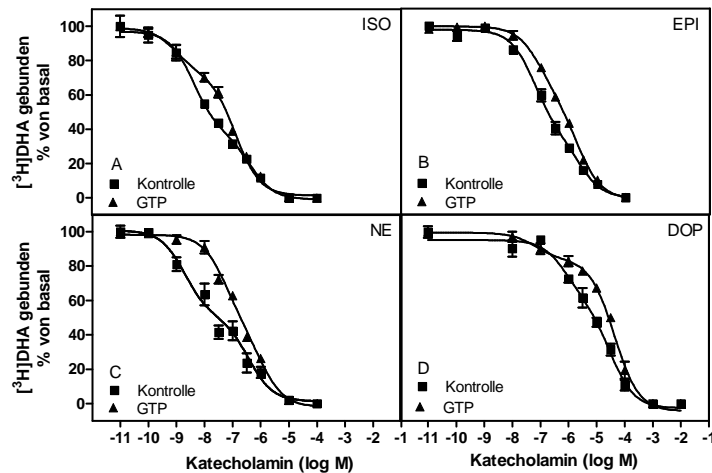


Abbildung 10: Konkurrenz von 1 nM [3 H]DHA und ISO, EPI, NE bzw. DOP in aufsteigender Konzentration an β_1AR-G_{saL} und Effekte von 1 mM GTP. Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Einzelexperimenten in Triplikaten an Membranen mit unterschiedlicher Expressionshöhe (4,4-10,7 pmol/mg) dar.

Durch die Analyse der Konkurrenzbindungskurven können zahlreiche Aussagen über die Bindungseigenschaften verschiedener Liganden gemacht werden. Am Fusionsprotein β_1AR-G_{saL} zeigte NE ein sehr klassisches Verhalten. Die Konkurrenzbindungskurve verlief biphasisch und besaß ca. 50% hochaffine Bindungsstellen. Durch Zugabe von GTP wurde die Kurve stark nach rechts verschoben, blieb aber biphasisch. Die Affinität des Fusionsproteins für NE sank erheblich. Die Stabilisierung des ternären Komplexes war demnach GTP-sensitiv. ISO, EPI und DOP zeigten ein völlig anderes Bild. Zwar verliefen auch hier die Konkurrenzbindungskurven biphasisch und alle Liganden stabilisierten den ternären Komplex mit einem Teil der Fusionsproteine, allerdings erfolgte kaum eine Rechtsverschiebung durch GTP, die Affinität der Liganden sank damit nur geringfügig. ISO und EPI zeigten in etwa 60% hochaffine Bindungsstellen, DOP nur halb so viele. Grundsätzlich war die Affinität an β_1AR-G_{saL} für NE und ISO etwa gleich hoch, gefolgt von EPI und schließlich DOP.

3.2.3 Liganden an $\beta_1\text{AR-G}_{\text{saS}}$

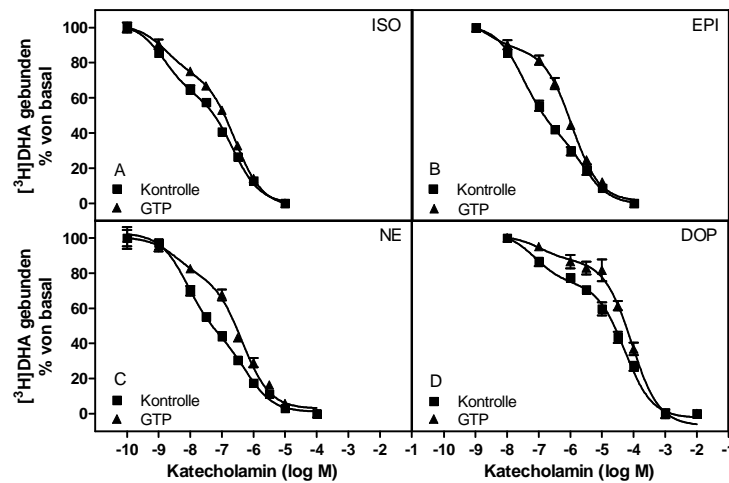


Abbildung 11: Konkurrenz von 1 nM [^3H]DHA und ISO, EPI, NE bzw. DOP in aufsteigender Konzentration an $\beta_1\text{AR-G}_{\text{saS}}$ und Effekte von 1 mM GTP. Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Einzelexperimenten in Triplikaten an Membranen mit unterschiedlicher Expressionshöhe (3,8-9,7 pmol/mg) dar.

Am Fusionsprotein $\beta_1\text{AR-G}_{\text{saS}}$ zeigte ISO die höchste Affinität, gefolgt von NE und EPI. DOP hatte im Vergleich zu ISO eine ca. 50-fach niedrigere Affinität. Alle Liganden waren in der Lage an diesem Konstrukt den ternären Komplex und damit hochaffine Bindungsstellen zu stabilisieren. Allerdings schwankte die Anzahl dieser Bindungsstellen zwischen 60% für EPI und etwa 30% für DOP. Durch Zugabe von 1 mM GTP wurde bei allen Liganden die Konkurrenzbindungskurve nach rechts verlagert, bleibt aber biphasisch. Durch GTP dissoziierte also der ternäre Komplex nur teilweise und die Affinität von $\beta_1\text{AR-G}_{\text{saS}}$ für die Liganden sank. Am größten war diese Rechtsverschiebung für NE und DOP, am geringsten für ISO.

3.2.4 Liganden an $\beta_2\text{AR-G}_{\text{s}\alpha\text{L}}$

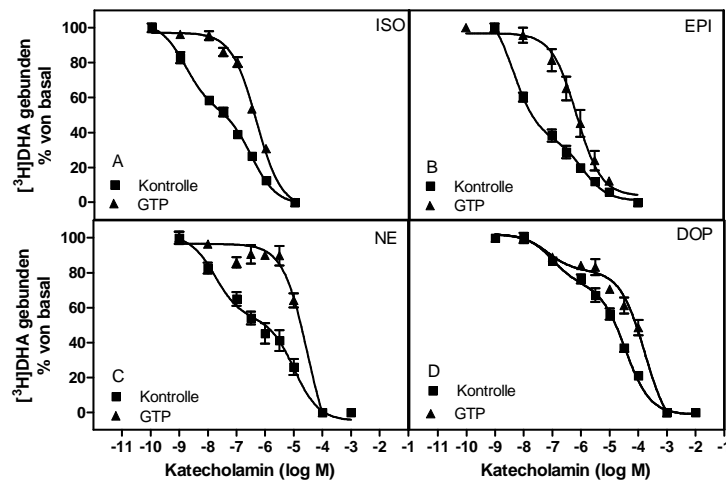


Abbildung 12: Konkurrenz von 1 nM $[^3\text{H}]\text{DHA}$ und ISO, EPI, NE bzw. DOP in aufsteigender Konzentration an $\beta_2\text{AR-G}_{\text{s}\alpha\text{L}}$ und Effekte von 1 mM GTP. Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Einzelexperimenten in Triplikaten an Membranen mit unterschiedlicher Expressionshöhe (4,8-7,0 pmol/mg) dar.

Am Fusionsprotein $\beta_2\text{AR-G}_{\text{s}\alpha\text{L}}$ zeigte sich ein völlig anderes Bild als am $\beta_1\text{AR-G}_{\text{s}\alpha\text{L}}$. Grundsätzlich zeigte dieses Konstrukt eine sehr hohe Affinität für alle Liganden. Die Reihenfolge war $\text{ISO} > \text{EPI} > \text{NE} > \text{DOP}$. Alle Katecholamine waren in der Lage den ternären Komplex zu stabilisieren, allerdings mit einer unterschiedlichen Anzahl an Rezeptormolekülen. So besaß EPI mit 70% mehr als doppelt so viele hochaffine Bindungsstellen wie DOP. Durch Zugabe von GTP wurden die Wettbewerbsbindungskurven aller Liganden nach rechts verschoben, allerdings verlief die Kurve für ISO, EPI und NE monophasisch. Nur bei DOP blieb sie biphasisch. Die Rechtsverschiebung war bei allen Liganden sehr groß, die Affinität für NE sank beispielsweise um das über 1000-fache.

3.2.5 Liganden an $\beta_2AR-G_{s\alpha S}$

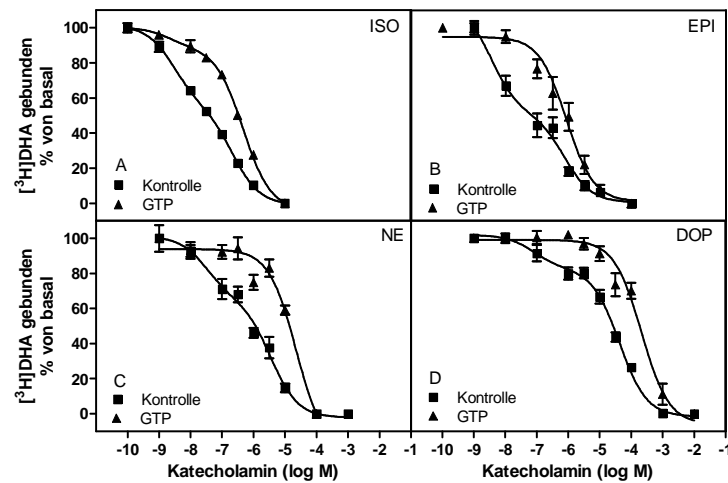


Abbildung 13: Konkurrenz von 1 nM $[^3H]DHA$ und ISO, EPI, NE bzw. DOP in aufsteigender Konzentration an $\beta_2AR-G_{s\alpha S}$ und Effekte von 1 mM GTP. Die gezeigten Daten stellen Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Einzelexperimenten in Triplikaten an Membranen mit unterschiedlicher Expressionshöhe (1,5-6,9 pmol/mg) dar.

An $\beta_2AR-G_{s\alpha S}$ zeigten sowohl ISO, EPI als auch NE eine sehr hohe Affinität. Im Vergleich zu ISO war die Affinität von DOP um das ca. 20-fache geringer. Die Anzahl der Fusionsproteine mit denen die einzelnen Liganden jeweils den ternären Komplex stabilisieren konnten, unterschied sich allerdings stark. So besaß EPI ca. 55% hochaffine Bindungsstellen, DOP nur etwa 20%. Auffällig war außerdem, dass nach Zugabe von GTP alle Wettbewerbsbindungskurven stark nach rechts verlagert wurden und monophasisch verliefen. Der ternäre Komplex wurde also vollständig destabilisiert. Nur bei ISO verlief die Kurve nach wie vor biphasisch. Die Affinität für die einzelnen Liganden sank beträchtlich, für DOP sogar um das über 2000-fache.

3.2.6 Zusammenfassung und Übersichtstabelle

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über alle Ergebnisse der Kompetitions-Bindungs-Versuche. Auf die auffälligsten Unterschiede soll kurz hingewiesen werden.

Durch Vergleich der K_{ih} -Werte kann eine Aussage über die Affinität der einzelnen Liganden an den verschiedenen Fusionsproteinen gemacht werden. Grundsätzlich hatten alle Katecholamine eine höhere Affinität zum β_2 AR, wobei die Splicevariante des $G_{s\alpha}$ -Proteins keinen Einfluss auf die Affinität hatte. Auffällig ist auch, dass EPI an β_1 AR eine wesentlich niedrigere Affinität hatte als am β_2 AR, wo es immerhin die zweitniedrigsten K_{ih} -Werte hatte. DOP zeigte an allen Konstrukten die niedrigste Affinität.

Ein weiterer Unterschied liegt im Ausmaß der Rechtsverschiebung durch Zugabe von 1 mM GTP. Beim β_2 AR dissoziierte bei fast allen Liganden der ternäre Komplex vollständig und die Kompetitionsbindungskurven verliefen monophasisch. Darüber hinaus war die Rechtsverschiebung beim β_2 AR grundsätzlich größer als beim β_1 AR. Ein regelhafter Einfluss der Splicevarianten ließ sich nicht erkennen. Auch die einzelnen Liganden stabilisieren den ternären Komplex an den verschiedenen Konstrukten unterschiedlich stark.

Durch Vergleiche der $\%R_h$ werden Unterschiede in der Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen deutlich. An fast allen Fusionsproteinen konnte EPI die meisten hochaffinen Bindungsstellen stabilisieren, nur an β_1 AR- $G_{s\alpha L}$ war es ISO. Die geringste Anzahl stabilisierte an jedem Konstrukt DOP. Darüber hinaus lassen sich folgende Tendenzen erkennen: Im Vergleich zu den Fusionsproteinen mit der langen Splicevariante wurden an denjenigen mit der kurzen Splicevariante weniger hochaffine Bindungen gefunden. Außerdem gab es mit wenigen Ausnahmen an den Konstrukten des β_2 AR weniger hochaffine Bindung als am β_1 AR.

Agonist	K_{ih} (nM)	K_{il} (nM)	% R_h (%)	K_{ihGTP} (nM)	K_{ilGTP} (nM)
β_1AR-G_{saL}					
ISO	2,5 (1,3-4,8)	260 (120-580)	60 (51-69)	0,6 (0,2-1,8)	79 (57-110)
EPI	35 (18-68)	1400 (520-3500)	61 (47-75)	53 (25-110)	1200 (760-2000)
NE	1,2 (0,4-3,7)	230 (88-590)	51 (39-62)	33 (13-86)	630 (200-2000)
DOP	490 (100-2300)	19000 (8000-46000)	36 (16-56)	40 (3,4-470)	26000 (18000-38000)
β_1AR-G_{saS}					
ISO	1,0 (0,5-1,8)	150 (110-200)	40 (35-41)	1,0 (0,5-2,5)	170 (140-220)
EPI	21 (11-39)	1600 (810-3200)	59 (50-67)	1,5 (0,1-640)	710 (550-920)
NE	5,3 (3,2-8,8)	390 (230-690)	57 (49-64)	2,4 (0,2-25)	290 (190-460)
DOP	52 (16-160)	35000 (25000-48000)	27 (21-34)	77 (3,9-1500)	59000 (41000-85000)
β_2AR-G_{saL}					
ISO	0,4 (0,2-0,7)	82 (58-120)	48 (43-52)	-	120 (100-140)
EPI	1,2 (0,7-2,1)	320 (150-680)	69 (63-74)	-	190 (130-300)
NE	4,9 (1,6-15)	2800 (1300-6300)	44 (36-52)	-	8200 (5100-13000)
DOP	25 (7,8-78)	9300 (6500-13000)	28 (22-34)	29 (5,7-150)	54000 (34000-86000)
β_2AR-G_{saS}					
ISO	0,8 (0,4-1,5)	60 (41-87)	45 (39-51)	0,6 (0,1-8,4)	130 (97-160)
EPI	0,9 (0,2-4,9)	200 (69-570)	55 (44-67)	-	270 (170-410)
NE	8,6 (1,3-57)	960 (440-2100)	34 (22-47)	-	6000 (3500-10000)
DOP	21 (2,8-160)	11000 (7900-16000)	19 (11-27)	-	61000 (34000-110000)

Tabelle 2: Übersicht über die Ergebnisse der [3 H]DHA-Komptitions-Bindung. Gezeigt werden die Mittelwerte und in Klammern der 95%-Konfidenzintervall der Experimente.

3.3 GTPase-Assays

3.3.1 Aussagen des Versuchs

Der GTPase-Assay ist eine geeignete Methode, die konstitutive Aktivität von GPCRs sowie die Potenz und Effektivität von Agonisten im Gleichgewichtszustand zu untersuchen. Der Versuch betrachtet die Auswirkungen der Rezeptor-isomerisierung vom inaktiven Zustand R zum aktiven Zustand R* an einem sehr frühen Punkt der Signaltransduktion, nämlich der G-Proteinebene [31] und nicht an einem distalen Punkt wie der Effektoraktivierung oder der Regulation der Genexpression. Die α -Untereinheit des G-Proteins besitzt GTPase-Aktivität, d.h. das an das $G\alpha$ -Protein gebundene GTP wird zu GDP und P_i hydrolysiert, wodurch der Zyklus zu seinem Ausgangspunkt zurückkehrt [25]. Beim GTPase-Assay wird das radioaktive $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$ in $[\text{}^{32}\text{P}]\text{P}_i$ und GDP hydrolysiert und die Menge an $[\text{}^{32}\text{P}]\text{P}_i$ bestimmt.

Mit Hilfe des Programms Prism 5.0 kann die absolute GTPase-Aktivität berechnet und Konzentrations-Wirkungskurven mit der Option „nichtlineare Regression“ erstellt werden. Da die absolute Enzymaktivität von der Expressionshöhe der Fusionsproteine abhängig ist [25], wurden alle Liganden auf den vollen Agonisten ISO bezogen. Durch diese Normalisierung wurden auch verschiedene Einzelerperimente untereinander vergleichbar.

Die Auswertung der Daten erfolgte durch Angabe verschiedener Werte. Die EC_{50} für Agonisten beschreibt die Konzentration, bei der die Stimulation der GTPase durch den Liganden halbmaximal ist und ist somit ein Maß für die Potenz. Eine Aussage über die Effektivität (E_{max}) der einzelnen Liganden erfolgte durch prozentuale Angabe der maximalen Stimulation bezogen auf ISO.

3.3.2 Liganden an $\beta_1\text{AR-G}_{\text{saL}}$

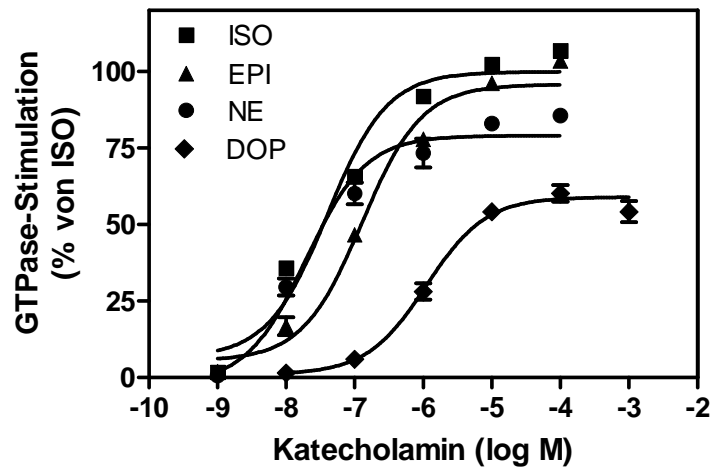


Abbildung 14: Stimulation der GTPase durch die Agonisten ISO, EPI, NE und DOP an $\beta_1\text{AR-G}_{\text{saL}}$. Die dargestellten Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD von sechs Einzelerperimenten in Dupli- oder Triplikaten an Membranen mit unterschiedlichen Expressionshöhen (2,0-10,7 pmol/mg). Alle Werte beziehen sich auf das E_{max} von ISO.

Am Fusionsprotein $\beta_1\text{AR-G}_{\text{saL}}$ wurden folgende Ergebnisse erzielt. Die Effektivität des vollen Agonisten ISO wurde als 100% gewertet. Im Vergleich dazu erzielte auch EPI annähernd volle Effektivität, NE zeigte die Eigenschaften eines starken partiellen Agonisten und DOP zeigte die geringste Effektivität. Anhand eines Vergleichs der EC_{50} -Werte wurde eine etwa gleich hohe Potenz für ISO und NE festgestellt. EPI zeigte eine etwas geringere, DOP die mit Abstand geringste Potenz.

3.3.3 Liganden an $\beta_1\text{AR-G}_{\text{scS}}$

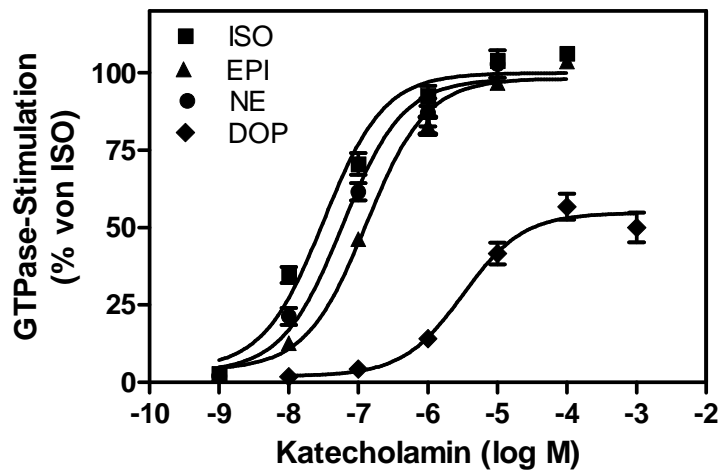


Abbildung 15: Stimulation der GTPase durch die Agonisten ISO, EPI, NE und DOP an $\beta_1\text{AR-G}_{\text{scS}}$. Die dargestellten Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD von fünf Einzelexperimenten in Dupli- oder Triplikaten an Membranen mit unterschiedlichen Expressionshöhen (2,0-9,7 pmol/mg). Alle Werte beziehen sich auf das E_{max} von ISO.

Vergleicht man die E_{max} -Werte an $\beta_1\text{AR-G}_{\text{scS}}$, so zeigten sowohl ISO, EPI als auch NE die Eigenschaften eines vollen Agonisten. DOP war ein partieller Agonist. Allerdings wurde anhand der EC_{50} -Werte ein Unterschied in der Potenz der einzelnen Liganden festgestellt. Die höchste Potenz zeigte ISO, gefolgt von NE, EPI und schließlich mit großem Abstand DOP.

3.3.4 Liganden an $\beta_2\text{AR-G}_{\text{sL}}$

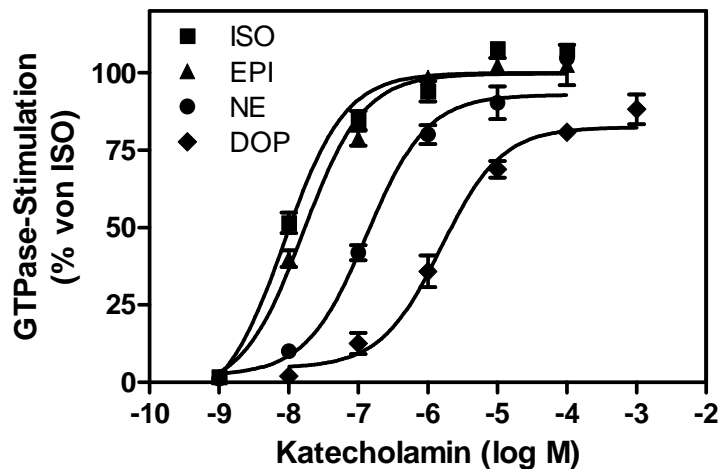


Abbildung 16: Stimulation der GTPase durch die Agonisten ISO, EPI, NE und DOP an $\beta_2\text{AR-G}_{\text{sL}}$. Die dargestellten Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD von sechs Einzelerperimenten in Dupli- oder Triplikaten an Membranen mit unterschiedlichen Expressionshöhen (1,1-7,0 pmol/mg). Alle Werte beziehen sich auf das E_{max} von ISO.

Auch an $\beta_2\text{AR-G}_{\text{sL}}$ waren ISO und EPI volle Agonisten. NE erreichte fast die Effektivität eines vollen Agonisten. Auffällig war, dass an diesem Fusionsprotein auch DOP einen sehr hohen E_{max} -Wert erreichte. Vergleiche der EC_{50} -Werte zeigten für ISO und EPI eine in etwa gleiche Potenz. Die Potenz von NE war etwa 10-fach niedriger als die von ISO und EPI, die von DOP ca. 100-fach niedriger.

3.3.5 Liganden an β_2AR-G_{saS}

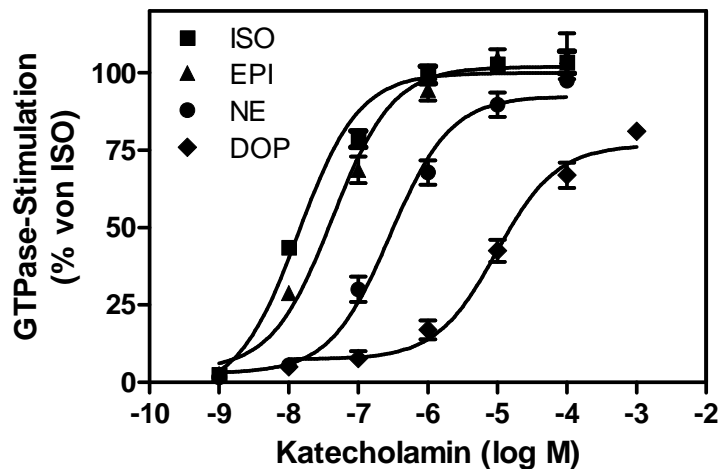


Abbildung 17: Stimulation der GTPase durch die Agonisten ISO, EPI, NE und DOP an β_2AR-G_{saS} . Die dargestellten Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD von fünf Einzelexperimenten in Dupli- oder Triplikaten an Membranen mit unterschiedlichen Expressionshöhen (1,5-6,9 pmol/mg). Alle Werte beziehen sich auf das E_{max} von ISO.

Am Fusionsprotein β_2AR-G_{saS} zeigten ISO und EPI die Eigenschaften eines vollen Agonisten. NE war ein sehr starker partieller Agonist. DOP erzielte die geringste Effektivität, war aber trotzdem ein starker partieller Agonist. Die höchste Potenz an β_2AR-G_{saS} besaß ISO, gefolgt von EPI und NE. Die mit Abstand geringste Potenz zeigte DOP.

3.3.6 Zusammenfassung und Übersichtstabelle

Tabelle 3 zeigt eine genaue Zusammenfassung der Ergebnisse, die in den GTPase-Assays erhalten wurden. Auf die wichtigsten Unterschiede zwischen den einzelnen Fusionsproteinen soll kurz hingewiesen werden.

Auffällig ist, dass für den Liganden ISO die EC_{50} -Werte jeweils für β_1AR und β_2AR in ähnlichen Konzentrationsbereichen lagen, unabhängig von der Splicevariante des G-Proteins. Die Potenz war dabei am β_2AR deutlich höher. Die gleiche Beobachtung wurde für den Liganden EPI gemacht. Im Gegensatz dazu zeigt NE eine wesentlich höhere Potenz am β_1AR als am β_2AR . Für DOP zeigte sich ein völlig anderes Bild. Der partielle Agonist zeigte jeweils am Fusionsprotein mit der langen Splicevariante die höhere Potenz.

Dass von den EC_{50} -Werten nicht direkt auf die Effektivität der Liganden geschlossen werden kann, zeigt eine Betrachtung der E_{max} -Werte. So erreichte EPI nach ISO an allen Konstrukten die höchste Effektivität. Besonders auffällig waren die wesentlich höheren E_{max} -Werte für DOP an β_2AR als an β_1AR . Eine ähnliche Regelmäßigkeit konnte für NE nicht festgestellt werden.

Ligand	β_1AR-G_{saL}	β_1AR-G_{saS}	β_2AR-G_{saL}	β_2AR-G_{saS}
EC_{50} (nM)				
ISO	40 (30-54)	32 (23-45)	8.7 (6.4-12)	14 (11-18)
EPI	130 (100-170)	130 (100-170)	16 (12-22)	43 (29-62)
NE	20 (13-30)	60 (40-88)	130 (93-190)	290 (200-430)
DOP	1100 (760-1600)	3200 (1800-5800)	1600 (1000-2400)	9700 (6300-15000)
E_{max} (%)				
ISO	100 (97-103)	100 (96-104)	100 (97-103)	100 (97-103)
EPI	96 (92-99)	98 (95-101)	100 (97-103)	100 (97-107)
NE	79* (75-83)	98 (92-104)	93 (88-98)	92 (87-98)
DOP	59* (55-63)	55* (50-59)	82* (77-88)	77* (71-83)

Tabelle 3: Übersicht über die Ergebnisse des GTPase-Assays. Gezeigt werden die Mittelwerte und in Klammern die 95%-Konfidenzintervalle der Experimente. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den E_{max} -Werten in Bezug auf ISO wurden durch die Verwendung von ANOVA und des „Dunnett’s multiple comparison post test“ berechnet (* $p < 0,01$).

3.4 AC-Assay

3.4.1 Aussagen des Versuchs

Der AC-Assay ist eine lange bekannte Methode, um die Interaktion von Ligand, Rezeptor und G-Protein auf indirekte Art und Weise zu messen [32,33]. Die AC ist ein zelluläres Enzym, welches durch die α -Untereinheit des G_s -Proteins aktiviert wird und die Konversion von ATP in cAMP katalysiert [34]. Beim AC-Assay dient das radioaktive $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ als Substrat für das Enzym und die Menge an gebildetem $[\text{}^{32}\text{P}]\text{cAMP}$ wird gemessen.

Mit Hilfe des Programms Prism 5.0 wurde aus diesen Werten die absolute Enzymaktivität berechnet. Da diese Aktivität allerdings sehr von der Expressionshöhe der Rezeptoren auf den Zellmembranen abhängig ist [27], wurden alle Werte auf den vollen Agonisten ISO bezogen. Durch diese Normalisierung wurden auch Einzelexperimente untereinander vergleichbar. Außerdem wurden Konzentrations-Wirkungskurven für die einzelnen Liganden erstellt.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch Angabe der EC_{50} -Werte und der E_{max} -Werte. Die EC_{50} -Werte sind ein Maß für die Potenz der Liganden am Rezeptor, sie beschreiben die Ligandenkonzentration, bei der die Stimulation halbmaximal ist. Die E_{max} -Werte beschreiben die maximale Enzymstimulation und sind damit ein Maß für die Effektivität der Liganden am Rezeptor. Die Angabe erfolgte in Prozent bezogen auf die maximale Stimulation durch ISO.

3.4.2 Liganden an $\beta_1\text{AR-G}_{\text{sclL}}$

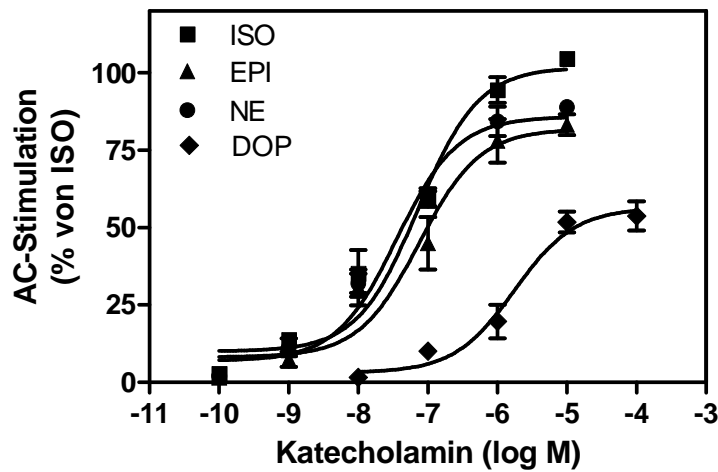


Abbildung 18: Stimulation der AC durch die Agonisten ISO, EPI, NE und DOP an $\beta_1\text{AR-G}_{\text{sclL}}$. Die dargestellten Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD von vier Einzelexperimenten in Triplikaten an Membranen mit unterschiedlichen Expressionshöhen (1,0-2,1 pmol/mg). Alle Werte beziehen sich auf das E_{max} von ISO.

Bezogen auf die AC-Aktivität war ISO am Fusionsprotein $\beta_1\text{AR-G}_{\text{sclL}}$ ein voller Agonist, EPI und NE waren starke partielle Agonisten. Der E_{max} -Wert von DOP lag bei ca. 50% von ISO. DOP war demnach ein partieller Agonist. Die EC_{50} -Werte von ISO und EPI lagen in etwa auf selbem Niveau, NE war etwas potenter als ISO. Die mit Abstand niedrigste Potenz zeigte DOP.

3.4.3 Liganden an β_1AR-G_{saS}

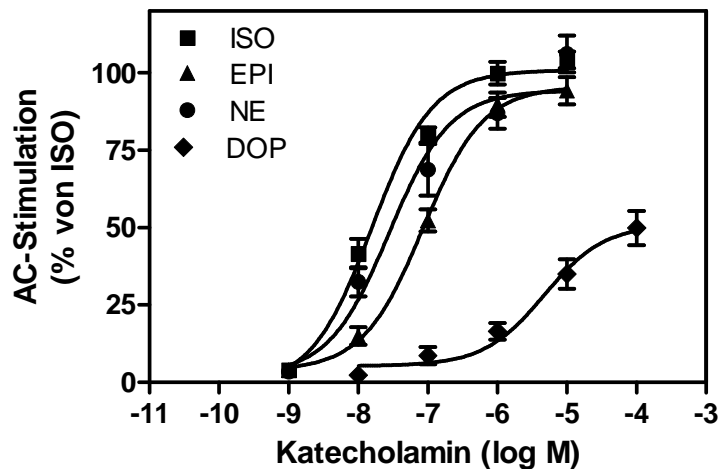


Abbildung 19: Stimulation der AC durch die Agonisten ISO, EPI, NE und DOP an β_1AR-G_{saS} . Die dargestellten Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD von vier Einzelexperimenten in Triplikaten an Membranen mit unterschiedlichen Expressionshöhen (1,2-1,9 pmol/mg). Alle Werte beziehen sich auf das E_{max} von ISO.

ISO, EPI und NE waren am Fusionsprotein β_1AR-G_{saS} volle bzw. sehr starke partielle Agonisten, das heißt die AC-Aktivität lag um die 100%. DOP erreichte einen wesentlich niedrigeren E_{max} -Wert und war nur ein partieller Agonist. Die EC_{50} -Werte zeigten, dass ISO am potentesten war, gefolgt von NE und EPI. DOP hatte die niedrigste Potenz, seine EC_{50} war mehrere 100-fach höher als die von ISO.

3.4.4 Liganden an $\beta_2\text{AR-G}_{\text{s}\alpha\text{L}}$

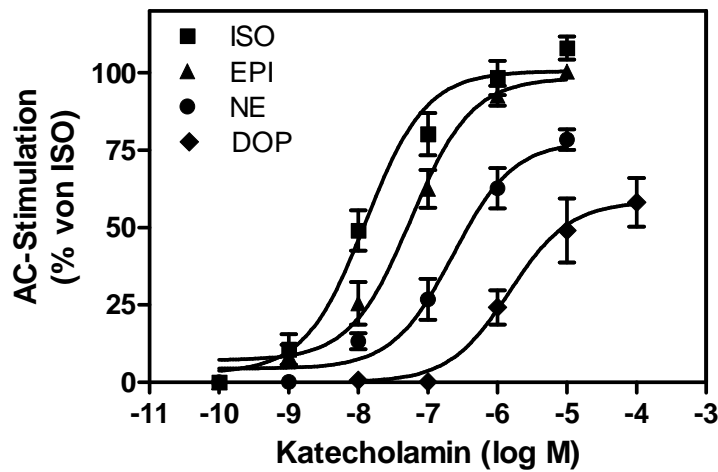


Abbildung 20: Stimulation der AC durch die Agonisten ISO, EPI, NE und DOP an $\beta_2\text{AR-G}_{\text{s}\alpha\text{L}}$. Die dargestellten Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD von drei Einzelerperimenten in Triplikaten an Membranen mit unterschiedlichen Expressionshöhen (1,1-3,0 pmol/mg). Alle Werte beziehen sich auf das E_{max} von ISO.

Am Fusionsprotein $\beta_2\text{AR-G}_{\text{s}\alpha\text{L}}$ waren sowohl ISO als auch EPI volle Agonisten. Die E_{max} -Werte von NE und DOP lagen deutlich darunter, beide Liganden waren partielle Agonisten. Auch die EC_{50} -Werte unterschieden sich deutlich. So war ISO am potentesten, gefolgt von EPI. NE war über 10-fach weniger potent als ISO, DOP sogar ca. 100-fach weniger.

3.4.5 Liganden an $\beta_2\text{AR-G}_{\text{S}\alpha\text{S}}$

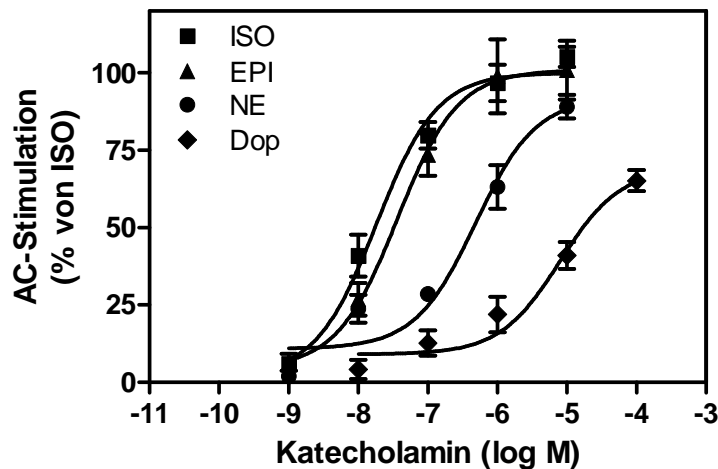


Abbildung 21: Stimulation der AC durch die Agonisten ISO, EPI, NE und DOP an $\beta_2\text{AR-G}_{\text{S}\alpha\text{S}}$. Die dargestellten Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SD von vier Einzelexperimenten in Triplikaten an Membranen mit unterschiedlichen Expressionshöhen (1,4-3,0 pmol/mg). Alle Werte beziehen sich auf das E_{max} von ISO.

ISO und EPI waren am Konstrukt $\beta_2\text{AR-G}_{\text{S}\alpha\text{S}}$ volle Agonisten, sie erreichten E_{max} -Werte um die 100%. NE war hingegen ein starker partieller Agonist, DOP war mit E_{max} -Werten um die 70% ebenfalls ein partieller Agonist. Die EC_{50} -Werte von ISO und EPI lagen in etwa auf selben Niveau, NE war wesentlich weniger, DOP sogar um das ca. 400-fache weniger potent als ISO.

3.4.6 Zusammenfassung und Übersichtstabelle

Tabelle 4 gibt eine genaue Übersicht über die EC_{50} - und E_{max} -Werte, die in den AC-Assays erhalten wurden. Auf die größten Unterschiede und Auffälligkeiten soll hier kurz hingewiesen werden.

Die EC_{50} -Werte von ISO lagen für alle Konstrukte im selben Bereich, nur an $\beta_1\text{AR-G}_{\text{S}\alpha\text{L}}$ war ISO weniger potent. Im Gegensatz dazu zeigte EPI eine höhere Potenz an den Splicevarianten von $\beta_2\text{AR}$, NE zeigte eine höhere Potenz an den Splicevarianten von $\beta_1\text{AR}$. DOP zeigte jedoch die höhere Potenz an den Fusionsproteinen, die mit der langen Splicevariante von $G_{\text{S}\alpha}$ gekoppelt waren. Grundsätzlich zeigte ISO eine sehr hohe, DOP im Gegensatz dazu die niedrigste Potenz an allen Konstrukten.

Ein Vergleich der E_{\max} -Werte machte deutlich, dass ISO an allen Fusionsproteinen ein voller Agonist war. Bezogen auf diese Werte war EPI an β_2 AR ebenfalls ein voller Agonist, an β_1 AR jedoch nur ein starker partieller Agonist. NE war auch ein starker partieller Agonist, erreichte aber an den Konstrukten mit der kurzen Splicevariante von G_{saL} die höheren E_{\max} -Werte. Die Werte von DOP waren im Vergleich zu den anderen Katecholaminen an allen Fusionsproteinen am niedrigsten. Der partielle Agonist DOP war jedoch am β_2 AR effektiver als am β_1 AR.

Ligand	β_1 AR- G_{saL}	β_1 AR- G_{saS}	β_2 AR- G_{saL}	β_2 AR- G_{saS}
EC₅₀ (nM)				
ISO	72 (47-110)	16 (11-22)	13 (7.0-23)	18 (11-32)
EPI	76 (32-180)	85 (60-120)	57 (33-99)	37 (19-71)
NE	36 (23-56)	28 (14-57)	230 (98-540)	490 (230-1000)
DOP	1800 (770-4000)	4700 (1800-13000)	1500 (390-5700)	8000 (3700-17000)
E_{max} (%)				
ISO	100 (95-109)	100 (96-105)	100 (93-108)	100 (93-107)
EPI	82 (69-95)	96 (90-100)	98 (91-106)	100 (90-110)
NE	86 (80-92)	94 (85-104)	78* (65-91)	92 (81-103)
DOP	56* (50-63)	51* (41-61)	58* (47-70)	70* (59-79)

Tabelle 4: Übersicht über die Ergebnisse des AC-Assays. Gezeigt werden die Mittelwerte und in Klammern der 95%-Konfidenzintervall der Experimente. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den E_{\max} -Werten in Bezug auf ISO wurden durch die Verwendung von ANOVA und des „Dunnett’s multiple comparison post test“ berechnet (* $p < 0,01$).

3.5 Gesamtübersicht und ausgewählte Vergleiche

3.5.1 Effektivität im GTPase- und AC-Assay

Eine einfache Möglichkeit, Unterschiede in der Effektivität der einzelnen Liganden an den vier Konstrukten aufzuzeigen, ist die Auftragung der E_{max} -Werte der maximalen AC-Stimulation gegen die E_{max} -Werte bei der GTP-Hydrolyse. Da die Aktivierung der AC direkt von der Interaktion mit dem G-Protein abhängig ist, kann man eine starke Korrelation dieser zwei Werte annehmen [31]. Wie Abbildung 22 zeigt, lagen bei fast allen Fusionsproteinen die Effektivitäten der AC und der GTPase recht nahe um eine gedachte Linie zwischen dem Nullpunkt und der Effektivität von ISO, die jeweils als 100% gewertet wurde. Auffällig ist jedoch, dass am Fusionsprotein β_2AR-G_{soL} die Effektivität der Liganden DOP und NE bei der AC-Stimulation deutlich unterhalb der erwarteten Werte lag. NE erreichte eine maximale GTPase-Stimulation von 93%, im Vergleich dazu jedoch nur eine AC-Stimulation von 78%. Bei DOP war der Unterschied mit 93% GTPase-Stimulation und 58% AC-Stimulation noch größer.

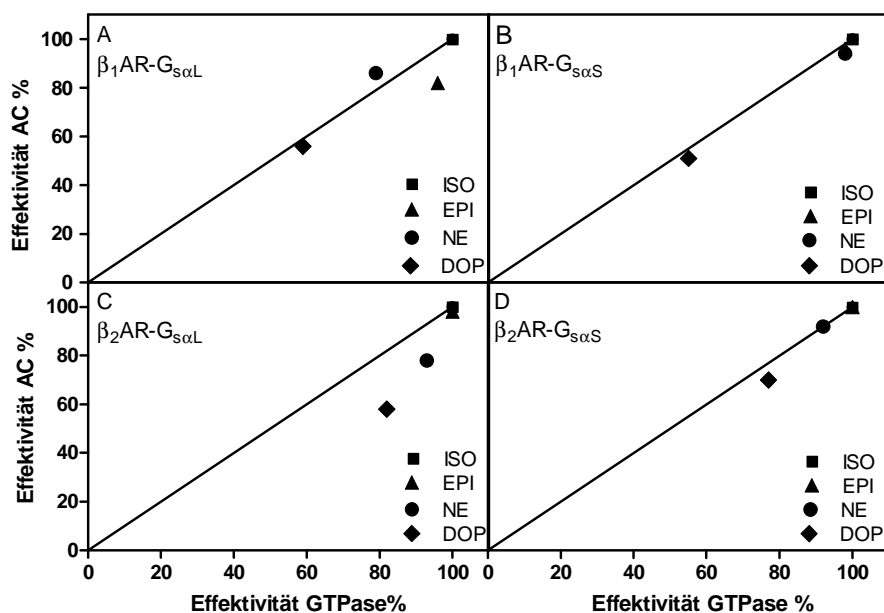


Abbildung 22: Auftragung der E_{max} -Werte der einzelnen Liganden bei der AC-Stimulation gegen die E_{max} -Werte der GTP-Hydrolyse.

3.5.2 Hochaffine Bindung und Effektivität im GTPase-Assay

Dass sich die Liganden an den einzelnen Fusionsproteinen nicht identisch verhalten, kann auch durch eine Auftragung der Effektivität der GTPase gegen die Anzahl an hochaffinen Bindungsstellen (R_h %) bei der Kompetitons-Bindung illustriert werden. In Bezug auf das Ternäre-Komplex-Modell kann davon ausgegangen werden, dass es eine starke Korrelation zwischen der Fähigkeit den ternären Komplex zu stabilisieren und der Fähigkeit Effektorsysteme zu aktivieren gibt [35,12]. Das heißt, dass ein Ligand der in der Lage ist, viele hochaffine Bindungsstellen zu stabilisieren, auch das Enzym GTPase in großem Ausmaß aktivieren sollte. Abbildung 23 zeigt, dass diese Annahme so nicht zutreffend ist. So zeigte sich zwar am Fusionsprotein $\beta_1AR-G_{s\alpha L}$ eine Korrelation, wo alle Datenpunkte annähernd auf einer gedachten Verbindungslinie lagen. Ein völlig anderes Bild zeigte sich jedoch an $\beta_1AR-G_{s\alpha S}$. Hier erreichte ISO eine maximale GTPase-Stimulation, obwohl es vergleichsweise wenig hochaffine Bindungsstellen stabilisierte. Vergleicht man die Lage der Datenpunkte bei den Fusionsproteinen von β_2AR , zeigte sich zwar kein großer Unterschied zwischen den Splicevarianten des $G_{s\alpha}$ -Proteins, jedoch ergab sich ein völlig anderes Bild als am β_1AR . An $\beta_2AR-G_{s\alpha L}$ und $\beta_2AR-G_{s\alpha S}$ zeigte DOP beispielsweise eine sehr hohe maximale GTPase-Stimulation, obwohl es sehr wenige hochaffine Bindungsstellen stabilisierte. Diese Beobachtung stimmt mit der Annahme überein, dass ein stabiler ternärer Komplex weniger oft GTP bindet und damit die GTP-Hydrolyse reduziert wird [12].

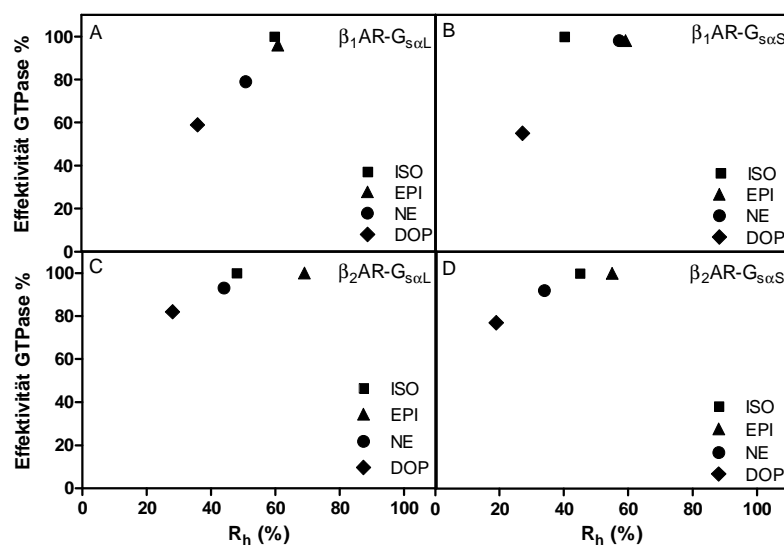


Abbildung 23: Auftragung der Effektivität (E_{max}) der einzelnen Liganden bei der GTP-Hydrolyse gegen die Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen (R_h) in der Kompetitonsbindung.

3.5.3 Korrelation EC₅₀-Werte GTPase- und AC-Stimulation

Tabelle 5 zeigt eine Korrelation der EC₅₀-Werte für die GTPase-Stimulation, bezogen auf die EC₅₀-Werte, die bei der AC-Stimulation erhalten wurden. Theoretisch sollte dieser Wert um 1 liegen, wenn man davon ausgeht, dass jeder GDP/ GTP-Austausch eine Aktivierung der AC zur Folge hat. Diese Annahme scheint vereinfacht zu sein, da zahlreiche Werte erhebliche Abweichungen aufweisen. Der Fall einer nahezu idealen Kopplung ließ sich nur für DOP an β_2 AR-G_{s α L} und EPI an β_2 AR-G_{s α S} nachweisen.

Ligand	Quotient $\frac{EC_{50} \text{ GTPase}}{EC_{50} \text{ AC}}$			
	β_1 AR-G _{sαL}	β_1 AR-G _{sαS}	β_2 AR-G _{sαL}	β_2 AR-G _{sαS}
ISO	0,55	2,00	0,67	0,78
EPI	1,71	1,53	0,28	1,16
NE	0,55	2,14	0,57	0,59
DOP	0,61	0,68	1,07	1,21

Tabelle 5: Korrelation der EC₅₀-Werte, die bei der GTPase und AC-Stimulation erhalten wurden.

3.5.4 Korrelation K_{ih} bzw. K_{il} und EC_{50} der GTPase-Stimulation

In Tabelle 6 und Tabelle 7 finden sich die Korrelationen zwischen den K_{ih} - bzw. den K_{il} -Werten, die in den Kompetitions-Bindungen berechnet wurden und den EC_{50} -Werten der GTPase-Stimulation. Die K_{ih} -Werte sind ein Maß für die Affinität der Liganden zum Rezeptor im hochaffinen Zustand, die K_{il} -Werte beschreiben einen niederaffinen Zustand. Die EC_{50} der GTPase-Stimulation beschreibt die Potenz und ist damit ein indirektes Maß für die Affinität der Liganden. Die Werte dieser Korrelation sollten für den Zustand um die 1 liegen, welcher dem Zustand am nächsten kommt, der einen idealen GDP/GTP-Austausch stimuliert. Wie in den Tabellen deutlich wird, ergab sich für die verschiedenen Liganden an den einzelnen Konstrukten kein einheitliches Bild. Eine ideale Kopplung gab es nur am niederaffinen Zustand von $\beta_2AR-G_{s\alpha S}$ für den Liganden DOP.

Ligand	Quotient $\frac{K_{ih}}{EC_{50} \text{ GTPase}}$			
	$\beta_1AR-G_{s\alpha L}$	$\beta_1AR-G_{s\alpha S}$	$\beta_2AR-G_{s\alpha L}$	$\beta_2AR-G_{s\alpha S}$
ISO	0,0625	0,0313	0,0460	0,0571
EPI	0,2692	0,1615	0,0750	0,0201
NE	0,0600	0,0883	0,0377	0,0297
DOP	0,4455	0,0163	0,0131	0,0027

Tabelle 6: Korrelation der K_{ih} -Werte der Kompetitions-Bindung und der EC_{50} -Werte der GTPase-Stimulation.

Ligand	Quotient $\frac{K_{il}}{EC_{50} \text{ GTPase}}$			
	$\beta_1AR-G_{s\alpha L}$	$\beta_1AR-G_{s\alpha S}$	$\beta_2AR-G_{s\alpha L}$	$\beta_2AR-G_{s\alpha S}$
ISO	6,5	4,7	9,4	4,3
EPI	10,8	12,3	20,0	4,7
NE	11,5	6,5	21,5	3,3
DOP	17,3	10,9	5,8	1,1

Tabelle 7: Korrelation der K_{il} -Werte der Kompetitions-Bindung und der EC_{50} -Werte der GTPase-Stimulation.

4 Diskussion

4.1 Modelle zur GPCR-Aktivierung

Seit Jahrzehnten ziehen verschiedenste GPCRs die Aufmerksamkeit der Wissenschaft auf sich. Es wurden immer wieder neue Modelle entwickelt, die versuchten ihre Aktivierung und Funktion zu erklären. Eine genaue Diskussion findet sich bei Kenakin [10], die wichtigsten Modelle sollen dennoch kurz wiederholt werden. Das einfache Zwei-Zustands-Modell geht davon aus, dass der Rezeptor zuerst im inaktiven Zustand R vorliegt und durch die Ligandenbindung in den aktiven Zustand R* übergeht [11]. Weit verbreitet ist auch das Ternäre-Komplex-Modell. Wie bereits beschrieben geht es davon aus, dass es einen Komplex aus Ligand, Rezeptor und nukleotidfreiem G-Protein gibt, der eine hohe Agonistenaffinität besitzt [28]. Am häufigsten diskutiert ist derzeit das Modell der ligandenspezifischen Rezeptorkonformationen [12, 14, 13, 36]. Hierbei sind verschiedenen Liganden in der Lage unterschiedliche Konformationen am Rezeptor zu stabilisieren.

Obwohl das Zwei-Zustands-Modell relativ einfach ist, ist es dennoch in der Lage verschiedene Eigenschaften von GPCRs zu erklären. Demnach ist bei Rezeptoren mit hoher konstitutiver Aktivität das Verhältnis zwischen R und R* mehr auf die Seite des aktiven Zustands verschoben, als bei Rezeptoren mit niedriger konstitutiver Aktivität. Diese Erkenntnis wurde hauptsächlich durch die Analyse von konstitutiv aktiven Mutanten gewonnen [18,12]. Zahlreichen Ergebnissen verschiedenster Untersuchungen wurde dieses einfache Modell jedoch nicht gerecht, womit die Betrachtung eines komplexeren Modells immer notwendiger wurde.

Folgende Untersuchungsergebnisse sprechen dafür, dass das Konzept der ligandenspezifischen Rezeptorkonformationen der Wirklichkeit relativ nahe kommt. Seifert *et al.* [12] fanden in verschiedenen Studien Unterschiede zwischen dem Fusionsprotein $\beta_2AR-G_{s\alpha}$ und der konstitutiv aktiven Mutante $\beta_2AR_{CAM}-G_{s\alpha}$. An $\beta_2AR-G_{s\alpha}$ zeigte sich eine Korrelation zwischen der Effektivität der GTPase-Stimulation und der Anzahl an hochaffinen Bindungsstellen, die durch die verwendeten Liganden (Isoprenalin, Salbutamol, Dobutamin, Ephedrin und Dichlorisoproterenol) stabilisiert wurden. Eine solche Korrelation konnte an $\beta_2AR_{CAM}-G_{s\alpha}$ nicht festgestellt werden, vor allem Dobutamin zeigte wesentlich mehr hochaffine Bindungsstellen als erwartet. Interessante Unterschiede ließen sich auch beim Vergleich von Fusionsproteinen von β_2AR mit der langen bzw. kurzen Splicevariante von $G_{s\alpha}$ feststellen [19]. So

stabilisierten Dobutamin und Salbutamol den ternären Komplex unabhängig von der Splicevariante gleich stark, die GTPase-Stimulation war für diese Liganden an $\beta_2\text{AR-G}_{\text{S}\alpha\text{L}}$ jedoch größer als an $\beta_2\text{AR-G}_{\text{S}\alpha\text{S}}$. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass sich die Konformation, die den ternären Komplex optimal stabilisiert, von derjenigen unterscheidet, die die GTPase maximal stimuliert.

Einen weiteren Hinweis auf ligandenspezifische Rezeptorkonformationen fand Seifert *et al.* [31] durch die Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Nukleotiden auf die Interaktion von Rezeptoren und ihrem G-Protein. Es wurde der Einfluss der Anwesenheit von GTP, Inosin-5'-triphosphat (ITP) und Xanthosin-5'-triphosphat (XTP) auf die AC-Aktivität, sowie die GTPase- und ITPase-Stimulation untersucht. Da die AC-Aktivierung von der Interaktion mit dem G-Protein abhängig ist, sollte sich eine Korrelation zwischen AC- und Nukleotidase-Stimulation ergeben. Dies war jedoch nur für GTP der Fall, eine Korrelation zwischen AC-Aktivität in Anwesenheit von ITP und die ITPase-Stimulation ließ sich nicht feststellen. Außerdem konnte keine ligandenabhängige XTP-Hydrolyse festgestellt werden, jedoch eine liganden-abhängige AC-Stimulation in Anwesenheit von XTP. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die Nukleotide unterschiedlichen Einfluss auf die Dissoziation des ternären Komplexes in Bindungsversuchen mit verschiedenen Liganden hatten, was ebenfalls auf ligandenspezifische Konformationen schließen lässt.

Auch verschiedene fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen machen die Existenz von Rezeptorkonformationen, die vom gebundenen Liganden abhängen, sehr wahrscheinlich [11,17]. Da bereits in der Einführung ausführlich auf dieses Thema eingegangen wurde, soll hier nur noch mal kurz auf die interessanten Unterschiede in der Fluoreszenzänderung durch die Bindung von ISO, EPI, NE und DOP am $\beta_2\text{AR}$ hingewiesen werden. Abbildung 8 verdeutlicht, dass DOP nur in der Lage war, die schnelle Komponente der Fluoreszenzänderung zu aktivieren. ISO, EPI und NE aktivierten eine schnelle und langsame Komponente, wobei sich die langsamen Komponenten jeweils voneinander unterscheiden ließen. Interessant ist, dass sich diese Unterschiede auch in funktionalen Eigenschaften der Liganden widerspiegeln. DOP war bei der Interaktion mit dem G_s -Protein ein starker Partialagonist, konnte aber nicht die Rezeptorinternalisation aktivieren. ISO, EPI und NE waren in der Lage beide Funktionen zu aktivieren [11]. Eine sehr ähnliche Beobachtung wurde von Zastrow *et al.* am μ - und δ -Opioidrezeptor gemacht [37,38].

Auch hier stabilisieren verschiedene Liganden unterschiedliche Konformationen, die sich in unterschiedlicher G-Proteininteraktion und Rezeptorinternalisation widerspiegeln. Grundsätzlich kann davon ausgegangen werden, dass bei einem Rezeptor die verschiedenen Konformationen auch spontan entstehen können, der Ligand dabei jedoch die jeweilige Wahrscheinlichkeit erhöht.

Bemerkenswert ist außerdem, dass sich ein vermeintlich neu entdeckter β_4 AR als eine ligandenspezifische Konformation des β_1 AR herausstellte [39]. Verschiedene pharmakologische Daten hatten die Existenz eines atypischen β AR wahrscheinlich gemacht, bis die Untersuchungen mit dem β AR-Liganden 4-(3-Tertiärbutylamino-2-hydroxypropoxy)-Benzimidazol-2-on-Hydrochlorid (CGP-12177) deutlich machten, dass an Herzgewebe und kultivierten Herzmuskelzellen diese Effekte durch die Stimulation des β_1 AR hervorgerufen wurden.

Eine ausführliche Diskussion zum Thema ligandenselektive Rezeptorzustände findet sich außerdem bei Kenakin [40]. Hier wird anhand verschiedener Beispiele auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Rezeptorkonformationen eingegangen, außerdem werden andere GPCR-Aktivierungsmodelle beschrieben.

4.2 Offene Fragen

Eine Betrachtung der bisher veröffentlichten Literatur verdeutlicht, dass die Erkenntnisse, die man derzeit über die β ARs hat, hauptsächlich durch Untersuchungen am β_2 AR gewonnen wurden. Dies ist einerseits historisch begründet und auf der anderen Seite hat sich der β_2 AR wegen seiner großen Ähnlichkeit zu anderen Rezeptoren zu Recht zu einem beliebten Modell entwickelt. Dennoch ist es weder sinnvoll noch gerechtfertigt, diese Ergebnisse kritiklos auf den β_1 AR zu übertragen, da es durchaus wichtige Unterschiede gibt und auch dieser Rezeptor große pharmakologische Relevanz hat. Ebenso auffällig ist, dass es sehr viele Daten zu synthetischen Liganden wie Isoproterenol, Salbutamol, Dobutamin, Ephedrin, Dichlorisoproterenol und Alprenolol gibt, weniger zu den endogenen Katecholaminen. Bisher wurden wenige funktionelle Daten zu ISO, EPI, NE und DOP erhoben und auch der Einfluss des G-Proteins in ihrer Signaltransduktion wenig untersucht.

Diese Lücken sahen auch Hoffmann *et al.* [41] und setzten sich zum Ziel, verschiedenste Liganden durch Untersuchungen der Bindungseigenschaften in Kompetitions-Bindungsversuchen und der AC-Stimulation am β_1 -, β_2 - und β_3 AR

vergleichbar zu machen. Als Expressionssystem wurden dabei Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) verwendet. Auffällig war dabei, dass sowohl ISO, EPI und NE am β_1 AR und am β_2 AR in Bezug auf die AC-Stimulation volle Agonisten waren. Dieses Ergebnis wurde unabhängig von der Expressionshöhe der Zellmembranen erhalten. Die Potenz der Liganden unterschied sich teilweise erheblich, so waren EPI und NE am β_1 AR gleich potent, am β_2 AR war EPI etwa 10-fach potenter als NE. Ein Grund für die Unterschiede zu den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen könnte in der Wahl des Expressionssystems liegen, da CHO-Zellen sowohl $G_{s\alpha L}$, $G_{s\alpha S}$ und eine andere AC als Sf9-Zellen enthalten. Eine weitere Begründung könnte in der Anwesenheit von zahlreichen „spare receptors“ liegen. Dies bedeutet, dass die Stimulation weniger Rezeptoren ausreicht, um Effektorsysteme vollständig zu aktivieren. In diesem Fall können Partialagonisten als volle Agonisten fungieren. Diese Annahme stimmt mit der Beobachtung von Alousi *et al.* überein, wonach die Anzahl der AC-Moleküle der limitierende Faktor für die Signaltransduktion ist [27]. Aus diesem Grund war auch ein Vergleich der Kompetitionsbindungsdaten erschwert. Außerdem war es Hoffmann *et al.* nicht möglich, K_{ih} -Werte zu berechnen und Aussagen über hochaffine Bindungsstellen zu treffen, da die Versuche in Anwesenheit von 100 μ M GTP durchgeführt wurden.

Um einen Beitrag zu leisten, diese Lücken zu füllen, wurden in dieser Arbeit systematisch die Unterschiede zwischen dem β_1 AR und β_2 AR erarbeitet. Funktionelle Daten zu Bindungseigenschaften wurden in der [3 H]DHA-Kompetitions-Bindung erhalten. Die Effektivität und die Potenz der Liganden wurden anhand der GTPase- und AC-Stimulation untersucht. Durch die Verwendung von Fusionsproteinen mit der langen bzw. kurzen Splicevariante des $G_{s\alpha}$ -Proteins in Sf9-Insektenzellen wurde ein ideales Expressionssystem gewählt und es konnte gut der Einfluss des G-Proteins untersucht werden. Weiterhin sollten die Ergebnisse helfen die Richtigkeit des Modells der ligandenspezifischen Rezeptorkonformationen zu überprüfen.

4.3 Betrachtung der wichtigsten Ergebnisse

4.3.1 Effektivität von EPI, NE und DOP

Wie bereits erwähnt gibt es sehr wenige funktionelle Daten für endogene Katecholamine, sondern hauptsächlich für synthetische Liganden. Zahlreiche Ergebnisse von Seifert *et al.* [12,19,28] können zu diesem Thema betrachtet werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeiten konnte festgestellt werden, dass ISO an allen verwendeten Konstrukten ein voller Agonist war. Bedauerlicherweise stehen hier keine Vergleichsdaten für die EPI, NE und DOP zur Verfügung. Eine systematische Übersicht zur Effektivität der AC-Stimulation von EPI und NE bietet Hoffmann *et al.* [41], allerdings konnte die Annahme, beide seien am β_1 AR und β_2 AR volle Agonisten nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen eher die Schlussfolgerung zu, dass EPI und NE starke partielle Agonisten sind, deren Effektivität nicht nur vom Rezeptor, sondern auch von der Splicevariante des G-Proteins abhängig ist. Die Ergebnisse der maximalen GTPase-Stimulation bestätigen diese Annahme zusätzlich.

Über die pharmakologischen Eigenschaften von DOP ist noch weniger bekannt. Zwar weiß man, dass DOP sowohl am β_1 - als auch am β_2 AR bindet [42]. Bei Kobilka [13] ist von einem partiellen Agonisten die Rede, genauere Angaben sind aber nicht zu finden. Diese Arbeit zeigt, dass DOP ein partieller Agonist ist, der am β_2 AR wesentlich effektiver als am β_1 AR ist. Die maximale Stimulation der GTPase und AC ist jedoch nicht einheitlich von der Splicevariante des G-Proteins abhängig.

4.3.2 Konstitutive Aktivität

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Untersuchungen zur konstitutiven Aktivität des β_1 AR und β_2 AR von Seifert *et al.* und Wenzel-Seifert *et al.* durchgeführt [19,28]. Hierbei wurde festgestellt, dass verschiedene synthetische partielle Agonisten an Fusionsproteinen mit $G_{s\alpha L}$ eine höhere Potenz, also niedrigere EC_{50} -Werte hatten als an solchen mit $G_{s\alpha S}$. Außerdem waren die E_{max} -Werte verschiedener funktioneller Tests für Fusionsproteine mit $G_{s\alpha L}$ grundsätzlich höher als mit $G_{s\alpha S}$. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass der β_1 AR und β_2 AR konstitutiv aktiver sind, wenn sie an die lange Splicevariante von $G_{s\alpha}$ koppeln.

Bei den endogenen Katecholaminen EPI und NE konnten diese Aussagen nicht einheitlich bestätigt werden, was zusätzlich durch die Tatsache, dass es sich um starke partielle bzw. volle Agonisten handelte, erschwert wurde. Theoretisch sollten die Unterschiede in der Effektivität der GTPase-Stimulation für DOP besonders auffällig sein, da es sich um einen Partialagonisten handelte. Wie erwartet waren hier die Werte für die Fusionsproteine mit $G_{s\alpha L}$ deutlich höher. Die maximale Stimulation der AC zeigte kein einheitliches Bild, da am $\beta_2AR-G_{s\alpha S}$ die E_{max} -Werte höher waren als an $\beta_2AR-G_{s\alpha L}$.

4.3.3 Korrelation der E_{max} -Werte der GTPase- und AC-Stimulation

Wie in Abbildung 22 deutlich wird, gab es im Allgemeinen eine starke Korrelation zwischen der maximalen Stimulation der GTPase und der AC. Diese Beobachtung ist nachvollziehbar, wenn man bedenkt, dass die Aktivität der AC direkt von der Interaktion mit dem G-Protein abhängt und das Enzym GTPase umso aktiver ist, je mehr das G-Protein aktiviert wird. Darüber hinaus passt diese Korrelation gut mit dem Zwei-Zustands-Modell überein. Dieses nimmt an, dass ein Rezeptor, der in den aktiven Zustand versetzt wurde, in der Lage ist, das G-Protein sowie den nachgeschalteten Effektor gleich gut zu aktivieren.

Deutliche Abweichungen von dieser Korrelation ließen sich am Fusionsprotein $\beta_2AR-G_{s\alpha L}$ für die Liganden NE und DOP feststellen. Hier wurde das Enzym GTPase wesentlich stärker als die AC stimuliert. Diese Beobachtung führt im Bezug auf das Modell der ligandenspezifischen Rezeptorkonformationen zu der Annahme, dass es am β_2AR für NE und DOP eine Konformation geben muss, die in der Lage ist, das G-Protein und den Effektor AC unterschiedlich stark zu aktivieren. Dass diese Abweichungen nicht durch Unterschiede in der apparenten Ligandenaffinität in den einzelnen Versuchen erklärt werden können, zeigte ein Vergleich der EC_{50} -Werte. Wie Tabelle 5 zeigt, lagen die EC_{50} -Werte von NE und DOP an $\beta_2AR-G_{s\alpha L}$ für die GTPase- und AC-Stimulation jeweils im selben Konzentrationsbereich, die Korrelation lag nahe bei 1. Darüber hinaus schienen diese Konformationen unterschiedlich gut mit der langen bzw. kurzen Splicevariante des $G_{s\alpha}$ -Proteins zu interagieren, da sich die Unterschiede nur an $\beta_2AR-G_{s\alpha L}$ zeigten.

4.3.4 Abweichungen in der Korrelation der EC_{50} -Werte der GTPase- und AC-Stimulation

Wie Tabelle 5 verdeutlicht, gab es teilweise große Unterschiede zwischen den EC_{50} -Werten der GTPase-Stimulation und denen der AC-Stimulation. Liegt der Quotient wie bei EPI an $\beta_2AR-G_{s\alpha L}$ deutlich unter 1, bedeutet dies, dass die EC_{50} für die GTPase-Stimulation deutlich unter der für die AC-Stimulation lag. Der Ligand konnte an diesem Konstrukt demnach die GTPase potenter stimulieren als die AC. Ein Grund hierfür könnte eine schlechte Kopplung des G-Proteins an die AC sein. Ein anderer Grund könnte in einem leer laufenden GDP/GTP-Austausch liegen, der nicht zu einer Aktivierung der AC führt. Liegt die Korrelation wie bei EPI an $\beta_1AR-G_{s\alpha L}$ deutlich über 1, so war der Ligand in der Lage die AC potenter zu stimulieren als die GTPase. Dies spricht dafür, dass es im Gegensatz zu obigen Fall auch eine hocheffiziente G_s -AC-Kopplung geben kann. Zusammenfassend können die Abweichungen dieser Korrelation das Konzept der ligandenspezifischen Rezeptorkonformationen unterstützen. Sie machen deutlich, dass verschiedene Liganden Konformationen stabilisieren, die unterschiedlich gut in der Lage sind, den GDP/GTP-Austausch und die AC zu aktivieren.

4.3.5 Stabilität des ternären Komplexes

Durch eine Betrachtung der Kompetitionsbindungskurven für die einzelnen Konstrukte lassen sich Aussagen über die Stabilität der ternären Komplexe machen. Im Allgemeinen zeigte sich an den Fusionsproteinen mit β_2AR eine wesentlich stärkere Rechtsverschiebung durch Zugabe von 1 mM GTP als bei $\beta_1AR-G_{s\alpha L}$ und $\beta_1AR-G_{s\alpha S}$. Dies zeigt, dass der ternäre Komplex bei β_1AR wesentlich stabiler als bei β_2AR war. Darüber hinaus verliefen auch nach Zugabe von GTP beim β_1AR die Kompetitionsbindungskurven weiterhin biphasisch, was ebenfalls darauf hindeutet, dass der ternäre Komplex an diesen Fusionsproteinen nicht vollständig dissoziierte.

4.3.6 Korrelation der maximalen GTPase-Stimulation zur Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen

In Übereinstimmung mit dem Zwei-Zustands-Modell sollte es eine Korrelation zwischen den Fähigkeiten der Liganden, hochaffine Bindungsstellen zu stabilisieren und Effektorsysteme zu aktivieren, geben. Demnach sollten Liganden, die eine hohe Affinität für einen Rezeptor zeigen, auch die Effektorenzyme stark aktivieren können. Abweichungen davon lassen sich durch die Bildung eines „eingefrorenen“ ternären Komplexes erklären, da Liganden die diesen besonders ausgeprägt stabilisieren, den GTP-Austausch und damit die GTPase-Stimulation mindern.

Abbildung 23 verdeutlicht, dass diese Annahmen vereinfacht sind. Bei einer Auftragung der maximalen GTPase-Stimulation gegen die Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen zeigte jedes Konstrukt eine unterschiedliche Lage der Datenpunkte. Es wurden sowohl Unterschiede zwischen dem β_1 AR und β_2 AR deutlich, als auch zwischen den Splicevarianten von $G_{s\alpha}$. Auffällig ist, dass der Einfluss von $G_{s\alpha L}$ und $G_{s\alpha S}$ am β_1 AR größer war als am β_2 AR. Diese Beobachtungen passen gut zu den Annahmen des Modells der ligandenspezifischen Rezeptorkonformationen und verdeutlichen, dass auch die endogenen Katecholamine in der Lage sind, solche Konformationen zu stabilisieren.

4.3.7 Unterschiede in der Korrelation der K_i -Werte zur EC_{50} der GTPase-Stimulation

Wie in 3.5.4 beschrieben, sollten die Werte einer Korrelation der K_i -Werte zu den EC_{50} -Werten der GTPase-Stimulation um 1 liegen, wenn eine hohe Affinität eines Liganden zum Rezeptor eine gute Aktivierung von Effektorsystemen zur Folge hat. Tabelle 6 macht deutlich, dass für alle Konstrukte im hochaffinen Zustand die Korrelation deutlich unter 1 lag, was bedeutet, dass die K_{ih} -Werte stark unter den EC_{50} -Werten lagen. Für DOP an β_2 AR- $G_{s\alpha L}$ lag der Wert um das etwa 100-fache unter eins, für DOP an β_2 AR- $G_{s\alpha S}$ sogar um das ca. 300-fache. Diese Beobachtung spricht stark dafür, dass der hochaffine Rezeptorzustand zwar messbar ist, aber nicht grundsätzlich für die Effizienz des GDP/GTP-Austausches verantwortlich ist. Auch die Werte der Korrelation der K_{il} -Werte des Rezeptors im niederaffinen Zustand zu den EC_{50} -Werten der GTPase-Stimulation unterschieden sich von 1, allerdings waren die Werte größer und wichen nie mehr als um das 20-fache ab (Tabelle 7). Den

Idealfall einer starken Korrelation fand man bei DOP am β_2 AR- $G_{s\alpha S}$. Diese Beobachtung kann dahin gehend gedeutet werden, dass der Rezeptorzustand, der den GDP/GTP-Austausch ideal stimuliert näher am niederaffinen Zustand als am hochaffinen Zustand des Rezeptors liegt. Darüber hinaus unterschied sich die Korrelation für verschiedene Liganden an unterschiedlichen Konstrukten sowohl für den hochaffinen als auch den niederaffinen Zustand deutlich von 1, was auf weitere mögliche Rezeptorzustände schließen lässt. Diese Ergebnisse passen gut zu denen von Wenzel-Seifert *et al.* [43], welche herausfanden, dass auch der Formylpeptidrezeptor (FPR) in einem niederaffinen Zustand existiert, der effizient an das G-Protein koppelt.

4.3.8 Endogene Liganden als volle Agonisten

Wie die Arbeiten verschiedener Forschergruppen, beispielsweise Seifert *et al.* [12], Hoffmann *et al.* [41] und Bouvier *et al.* [44] deutlich machen, ist es zur Konvention geworden, ISO als vollen Agonisten am β_1 - und β_2 AR zu betrachten, und die Effektivität anderer Liganden darauf zu beziehen. So wurde auch in dieser Arbeit verfahren. Darüber hinaus gilt die Annahme, dass der Körper nur in der Lage ist volle Agonisten zu produzieren. Da diese Arbeit zeigte, dass es sich bei EPI und NE an einigen Fusionsproteinen mit β_1 - bzw. β_2 AR nur um starke partielle Agonisten handelte (siehe Tabelle 3 und Tabelle 4), und DOP nur einen Partialagonisten darstellte, sollten diese Konzepte nochmals überdacht werden. Auf der einen Seite könnte es sinnvoll sein, in Zukunft EPI als vollen Agonisten zu definieren und ISO im Bezug darauf als „Superagonisten“ zu bezeichnen. Auf der anderen Seite könnte von der Annahme, der menschliche Körper könne nur volle Agonisten produzieren, Abstand genommen werden. Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits von Preuss *et al.* [45] gemacht. Hierbei wurde festgestellt, dass die Effektivität von Amthamin im GTPase-Assay am Fusionsprotein des Meerschweinchen-Histamin-2-Rezeptors mit $G_{s\alpha S}$ signifikant über der Effektivität des vollen Agonisten Histamin lag.

4.4 Allgemeine Schlussfolgerungen

Abschließend betrachtet kann bemerkt werden, dass durch die Verwendung von Fusionsproteinen des β_1 AR und β_2 AR mit der langen bzw. kurzen Splicevariante des $G_{s\alpha}$ -Proteins in Sf9-Insektenzellen ein gutes Modell zur Analyse dieser Rezeptoren gewählt wurde. Durch die Anwendung der [3 H]DHA-Kompetitions-Bindung, des GTPase- und des AC-Assays konnten die Rezeptorzustände gut untersucht werden, da diese drei Methoden an unterschiedlichen Stellen des G-Proteinzyklus ansetzen. Es konnten sowohl Aussagen zu den Bindungseigenschaften der Liganden, als auch zu den Effektorsystemen getroffen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass das Modell der ligandenspezifischen Rezeptorzustände nicht nur für synthetische Liganden gilt, sondern auch für endogene Katecholamine angewandt werden kann. Außerdem wurde festgestellt, dass es sich bei DOP um einen Partialagonisten handelte, wovon nicht ausgegangen werden konnte. Natürlich muss beachtet werden, dass es sich bei Fusionsproteinen in Sf9-Insektenzellen wiederum nur um ein Expressionssystem handelt, das versucht die physiologischen Bedingungen nachzuahmen. Aus diesem Grund sollten die Ergebnisse dieser Arbeit nicht kritiklos auf den menschlichen Körper übertragen werden. In weiteren Untersuchungen wird es nötig sein, die endogenen Katecholamine auch *in vitro* zu untersuchen, um ihre physiologischen Eigenschaften genauer zu differenzieren, als es bisher geschehen ist.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit stellt eine systematische pharmakologische Analyse des β AR dar. Zu diesem Zweck wurden die Eigenschaften verschiedener Liganden an den Fusionsproteinen β_1 AR- $G_{s\alpha L}$, β_1 AR- $G_{s\alpha S}$, β_2 AR- $G_{s\alpha L}$ und β_2 AR- $G_{s\alpha S}$ untersucht (siehe 1.1-1.3). Als Liganden dienten die endogenen Katecholamine Dopamin, Norepinephrin und Epinephrin, sowie die Substanz Isoprenalin (siehe 1.4).

Mit der Durchführung der [3 H]DHA-Kompetitions-Bindung (siehe 3.2), des GTPase-Assays (siehe 3.3) und des AC-Assays (siehe 3.4) wurden drei gut etablierte Methoden zur Untersuchung der Liganden-Rezeptorinteraktion gewählt. Dieses Vorgehen erschien besonders sinnvoll, da die einzelnen Untersuchungsmethoden an unterschiedlichen Punkten im G-Proteinzyklus (siehe 1.3) ansetzen. Dies ermöglichte es, sowohl Aussagen zur Affinität, Effektivität und Potenz der Liganden an den unterschiedlichen Konstrukten zu treffen (siehe 1.4.2 und 3.2-3.4).

Die Ergebnisse der maximalen GTPase- und AC-Stimulation zeigten, dass EPI und NE starke partielle Agonisten, DOP jedoch nur ein partieller Agonist war (siehe 3.3, 3.4, 3.5.1 und 4.3.1). Die Effektivität und Potenz der Liganden war nicht nur von den Rezeptoren abhängig, sondern auch von der Splicevariante des $G_{s\alpha}$. Der Quotient der E_{max} -Werte dieser zwei Methoden zeigte teilweise starke Abweichungen vom theoretischen Wert 1 (siehe 4.3.3). Diese Beobachtung unterstützt das Konzept der ligandenspezifischen Rezeptorkonformation. Selbes galt für die Abweichungen des Quotienten der EC_{50} -Werte der GTPase- und AC-Stimulation vom theoretischen Wert 1 (siehe 4.3.4). Die Ergebnisse der [3 H]DHA-Kompetitions-Bindung zeigten eine höhere Stabilität des ternären Komplexes am β_1 AR als am β_2 AR (siehe 3.2 und 4.3.5). Abweichungen in der Korrelation der maximalen GTPase-Stimulation zur Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen ließen sich feststellen (siehe 3.5.2 und 4.3.6), ebenso in der Korrelation der K_i -Werte zur EC_{50} der GTPase-Stimulation (siehe 3.5.4 und 4.3.7).

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit das Konzept der ligandenspezifischen Rezeptorkonformationen unterstützen (siehe 4.1 und 4.4). Darüber hinaus sollten die Ergebnisse ein Anstoß sein, die Annahme, der menschliche Körper könne nur volle Agonisten produzieren, zu überdenken (siehe 4.3.8).

6 Veröffentlichung

Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen die Basis für eine Publikation im *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* mit dem Titel „Distinct Interactions of Human β_1 - and β_2 -Adrenoceptors with Isoproterenol, Epinephrine, Norepinephrine, and Dopamine“ dar:

Nina Weigl and Roland Seifert, *JPET*, **2008**, 327 (3), 760-769.

6.1 Abstract

Fluorescence studies with purified human β_2 -adrenoceptor (β_2 AR) revealed that the endogenous catecholamines, (-)-epinephrine (EPI), (-)-norepinephrine (NE), and dopamine (DOP), stabilize distinct active receptor conformations. However, the functional relevance of these ligand-specific conformations is as yet poorly understood. We addressed this question by studying fusion proteins of the β_1 -adrenoceptor (β_1 AR) and β_2 AR with the short and long splice variants of $G_s\alpha$ ($G_s\alpha_S$ and $G_s\alpha_L$), respectively. Fusion proteins ensure efficient receptor/G-protein coupling and defined stoichiometry of the coupling partners. EPI, NE, DOP, and the prototypical synthetic β AR agonist, (-)-isoproterenol (ISO), showed marked differences in their efficacies at stabilizing the high-affinity ternary complex at β_1 AR- $G_s\alpha$ and β_2 AR- $G_s\alpha$ fusion proteins. Ternary complex formation was more sensitive to disruption by GTP with the β_2 AR than with the β_1 AR. Generally, in steady-state GTPase assays, ISO, EPI, and NE were full agonists, and DOP was a partial agonist. Exceptionally, at β_1 AR- $G_s\alpha_L$, NE was only a partial agonist. Generally, in adenylyl cyclase assays, ISO, EPI, and NE were full agonists, and DOP was a partial agonist. At β_2 AR- $G_s\alpha_L$, NE was only a partial agonist. There was no correlation between efficacy at stabilizing the ternary complex and activating GTPase, and there were also dissociations between K_i values for high-affinity agonist binding and EC_{50} values for GTPase activation. In contrast to synthetic partial agonists, DOP did not exhibit increased efficacy at β AR- $G_s\alpha_L$ versus β AR- $G_s\alpha_S$ fusion proteins. In conclusion, our data with β AR- $G_s\alpha$ fusion proteins show that endogenous catecholamines and ISO stabilize distinct conformations in the β_1 AR and β_2 AR.

7 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
AppNHp	Adenosin-5`-[β,γ -imido]triphosphat
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosin-5`-triphosphat
[α - ³² P]ATP	[α - ³² P] Adenosin-5`-triphosphat
BB	Bindungspuffer
β AR	β -adrenerger Rezeptor
β_1 AR-G _{sαL}	Fusionsprotein von β_1 -Adrenorezeptor mit G _{sαL}
β_1 AR-G _{sαS}	Fusionsprotein von β_1 -Adrenorezeptor mit G _{sαS}
β_2 AR-G _{sαL}	Fusionsprotein von β_2 -Adrenorezeptor mit G _{sαL}
β_2 AR-G _{sαS}	Fusionsprotein von β_2 -Adrenorezeptor mit G _{sαS}
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosin-3`,5`-monophosphat
CGP-12177	4-(3-Tertiärbutylamino-2-hydroxypropoxy)- benzimidazol-2-on-hydrochlorid
CHO-Zellen	Zellen aus den Ovarien des chinesischen Hamsters
Cys	Cystein
DHA	Dihydroalprenolol
DOP	Dopamin
EC ₅₀	Konzentration der halbmaximalen Stimulation
ECL	Extrazelluläre Schleife
EDTA	Ethylendinitril-tetraessigsäure
E _{max}	Maximale Effektivität
EPI	(-)-Epinephrin
FBS	fetales bovines Serum
GDP	Guanosin-5`-diphosphat
G _i	AC-inhibierendes G-Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
G _s	heterotrimeres AC-stimulierendes G-Protein
G _{sα}	α -Untereinheit des stimulierenden G-Protein

$G_{s\alpha L}$	lange Splicevarinate von $G_{s\alpha}$
$G_{s\alpha S}$	kurze Splicevarinate von $G_{s\alpha}$
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$	$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{Guanosin-5`-triphosphat}$
ICL	intrazelluläre Schleife
ISO	(-)-Isoproterenol
K_d	Äquilibriumdissoziationskonstante
K_i -Wert	Dissoziationskonstante
K_{ih}	Dissoziationskonstante für die hochaffine Agonistenbindung
K_{ihGTP}	K_{ih} unter Einfluss von 1 mM GTP
K_{il}	Dissoziationskonstante für die niedrigaffine Agonistenbindung
K_{ilGTP}	K_{il} unter Einfluss von 1 mM GTP
NE	(-)-Norepinephrin
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
% R_h	Anzahl der hochaffinen Bindungsstellen
SD	Standardabweichung
Ser	Serin
Sf9-Insektenzellen	<i>Spodoptera frugiperda</i> Ovarzellen
T4L	T4-Lysozym
TM	Transmembrandomäne
TMR	Tetramethylrhodamin
TMR- β_2 AR	Tetramethylrhodamin-foreszenzmarkierter β_2 AR
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr	Tyrosin
XTP	Xanthosin-5`-triphosphat

8 Literaturverzeichnis

- [1] R. Schmidt, G. Thews, F. Lang. *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag 2000; 28: 340-350
- [2] K. Aktories, U. Förstermann, F. Hofmann, K. Starke. *Pharmakologie und Toxikologie*. Urban und Fischer 2005; 9: 124-200
- [3] R. Fredriksson, M. Lagerstrom, L. Lundin, H. Schioth. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 1256-1272
- [4] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. Behnke, H. Motoshima, B. Fox, I. Trong, D. Teller, T. Okada, R. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano. Crystal structure of rhodopsin: a G-protein-coupled receptor. *Science* 2000; 289: 739-745
- [5] V. Cherezov, D. Rosenbaum, M. Hanson, S. Rasmussen, F. Thian, T. Kobilka, H. Choi, P. Kuhn, W. Weis, B. Kobilka, R. Stevens. High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G-protein-coupled receptor. *Science* 2007; 318: 258-265
- [6] A. Stosberg. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Prot Sci* 1993; 2: 1198-1209
- [7] T. Rall, W. Sutherland. Adenyl Cyclase, the enzymatically catalyzed formation of adenosine-3'-5'-phosphate and inorganic pyrophosphate from adenosinetriphosphate. *Biol Chem* 1961; 237: 228-232
- [8] C. Strader, I. Sigal, R. Dixon. Structural basis of β -adrenergic receptor function. *FASEB J* 1989; 3: 825-832
- [9] L. Birnbaumer, J. Abramowitz, A. Brown. Receptor-effector coupling by G-proteins. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1031: 163-224
- [10] T. Kenakin. The classification of seven transmembrane receptors in recombinant expression systems. *Pharmacological Reviews* 1996; 48: 413-451
- [11] G. Swaminath, Y. Xiang, T. Lee, J. Steenhuis, C. Pernot, B. Kobilka. Sequential binding of agonists to the β_2 adrenoceptor. kinetic evidence for intermediate conformational states. *Biol Chem* 2003; 279: 686-691
- [12] R. Seifert, K. Wenzel-Seifert, U. Gether, B. Kobilka. Functional differences between full and partial agonists: evidence for ligand-specific receptor conformations. *J Pharmacol Exper Ther* 2001; 297: 218-226
- [13] B. Kobilka. G-Protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1768: 794-807
- [14] B. Kobilka, X. Deupi. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 397-406
- [15] G. Liapakis, J. Ballesteros, S. Papachristou, W. Chan, X. Chen, J. Javitch. The forgotten serine. a critical role for Ser2035.42 in ligand binding to and activation of the β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 2000; 275: 37779-37788
- [16] B. Kobilka. G protein coupled receptor structure and activation. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1768: 794-807
- [17] G. Swaminath, X. Deupi, T. Lee, W. Zhun, F. Thian, T. Kobilka, B. Kobilka. Probing the β_2 adrenoceptor binding site with catechol reveals. *J Biol Chem* 2005; 280: 22165-22171
- [18] P. Samama, G. Pei, T. Costa, S. Cotecchia, R. Lefkowitz. A mutation-induced activated state of the β_2 -adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1993; 268: 4625-4636
- [19] R. Seifert, K. Wenzel-Seifert, T. Lee, U. Gether, E. Sanders-Bush, B. Kobilka. Different effects of $G_{s\alpha}$ splice variants on β_2 -adrenoceptor-mediated signaling. *J Biol Chem* 1998; 273: 109-116
- [20] R. Seifert, K. Wenzel-Seifert, B. Kobilka. GPCR- G_{α} fusion proteins: molecular analysis of receptor-G-protein coupling. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 383-389
- [21] B. Bertin, M. Freissmuth, R. Jockers, A. Strosberg, S. Marullo. Cellular signaling by agonist-activated receptor/ $G_{s\alpha}$ fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 8827-8831
- [22] T. Kenakin, O. Onaran. The ligand paradox between affinity and efficacy: can you be there and not make a difference? *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 275-281
- [23] T. Kenakin. Collateral efficacy in drug discovery: taking advantage of the good (allosteric) nature of 7TM receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2007; 28: 407-415
- [24] C. Houston, K. Wenzel-Seifert, T. Bürckstümmer, R. Seifert. The human histamine H_2 -receptor couples more efficiently to Sf9 insect cell G_s -proteins than to insect cell G_q -proteins: limitations of Sf9 cells for the analysis of receptor/ G_q -protein coupling. *J Neurochem*. 2002; 80: 678-696.
- [25] T. Wieland and R. Seifert. *G-protein-coupled receptors*, Wiley-VCH 2005; 1: 81-120
- [26] R. Alvarez, D. Daniels. A single column method for the assay of adenylate cyclase. *Anal Biochem* 1990; 187: 98-103.

- [27] A. Alousi, J. Jasper, P. Insel, H. Motulsky. Stoichiometry of receptor-G_s-adenylate cyclase interactions. *FASEB J* 1991; 5: 2300-2303.
- [28] K. Wenzel-Seifert, H. Liu, R. Seifert. Similarities and differences in the coupling of human β_1 - and β_2 -adrenoceptors to G_{s α} splice variants. *Biochem Pharmacol* 2001; 64: 9-20.
- [29] K. Wenzel-Seifert, R. Seifert. Molecular analysis of β_2 -adrenoceptor coupling to G_s-, G_i- and G_q-proteins. *Mol Pharmacol* 2000; 58:954-966.
- [30] R. Seifert, K. Wenzel-Seifert, B. Kobilka. G-protein-coupled receptors: what limits high-affinity agonist binding? *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 83-84.
- [31] R. Seifert, U. Gether, K. Wenzel-Seifert, B. Kobilka. Effects of guanine, inosine and xanthine nucleotides on β_2 adrenergic receptor/G_s interactions: evidence for multiple receptor conformations. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 348-358
- [32] E. Ross, M. Maguire, T. Sturgill, R. Biltonen, A. Gilman. Relationship between the β -adrenergic receptor and adenylylase. *J Biol Chem* 1977; 252: 761-775
- [33] R. Seifert, T. Lee, T. Lam, B. Kobilka. Reconstitution of β_2 -adrenoceptor-GTP-binding-protein interaction in Sf9 cells. *Eur J Biochem* 1998; 255: 369-382
- [34] B. Kobilka. Adrenergic receptors as models for G-protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* 1992; 15: 87-114
- [35] R. Kent, A. Lean, R. Lefkowitz. A quantitative analysis of beta-adrenergic receptors interactions: resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modeling of ligand binding data. *Mol Pharmacol* 1980; 17: 14-23
- [36] S. Bhattacharya, S. Hall, H. Li, N. Vaidehi. Ligand-stabilized conformational states of human β_2 adrenergic receptor: insights into G-protein-coupled receptor activation. *Biophys J* 2008; 94: 2027-2042
- [37] D. Keith, S. Murray, P. Zaki, P. Chu, D. Lissin, L. Kang, C. Evans, M. Zastrow. Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J Biol Chem* 1996; 271: 21-24
- [38] M. Zastrow. Mechanisms regulating membrane trafficking of G-protein-coupled receptors in the endocytic pathway. *Life Sci* 2003; 74: 217-224
- [39] J. Granneman. The putative β_4 -adrenergic receptor is a novel state of the β_1 -adrenergic receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 43: 199-202
- [40] T. Kenakin. Drug efficacy at G-Protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2002; 42: 349-379
- [41] C. Hoffmann, M. Leitz, S. Oberdorf-Maass, M. Lohse, K. Klotz. Comparative pharmacology of human β -adrenergic receptor subtypes- characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004; 369: 151-159
- [42] G. Ding, R. Wiegerinck, M. Shen, A. Cojoc. Dopamine increases C-type calcium current more in newborn than adult rabbit cardiomyocytes via D₁ and β_2 receptors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; article in press
- [43] K. Wenzel-Seifert, J. Arthur, H. Lui, R. Seifert. Quantitative analysis of formyl peptide receptor coupling to G_{i α 1}, G_{i α 2}, and G_{i α 3}. *J Biol Chem* 1999; 47: 259-266
- [44] G. Rousseau, F. Nantel, M. Bouvier. Distinct receptor domains determine subtype-specific coupling and desensitization phenotypes for human β_1 - and β_2 -adrenergic receptors. *Mol Pharmacol* 1996; 49: 752-760
- [45] H. Preuss, P. Ghorai, A. Kraus, S. Dove, A. Buschauer, R. Seifert. Constitutive activity and ligand selectivity of human, guinea pig, rat, and canine histamine H₂ receptors. *J Pharmacol Exper Ther* 2007; 321: 983-995