

Aus der Abteilung Neuro- und Sinnesphysiologie
(PD Dr. phil. nat. M. Niebert)
im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Auswirkungen der Rezeptor-Dimerisierung auf
das Calcium-*imaging* muskarinerger Acetylcho-
linrezeptoren M1, M3 und M5**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Ilya Edip Zengin

aus Hamburg

Göttingen

2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: PD Dr. phil. nat. M. Niebert

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Prüfungskommission

Referent*in: PD Dr. phil. nat. M. Niebert

Ko-Referent*in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Drittreferent*in: Prof. Dr. mult. T. Meyer

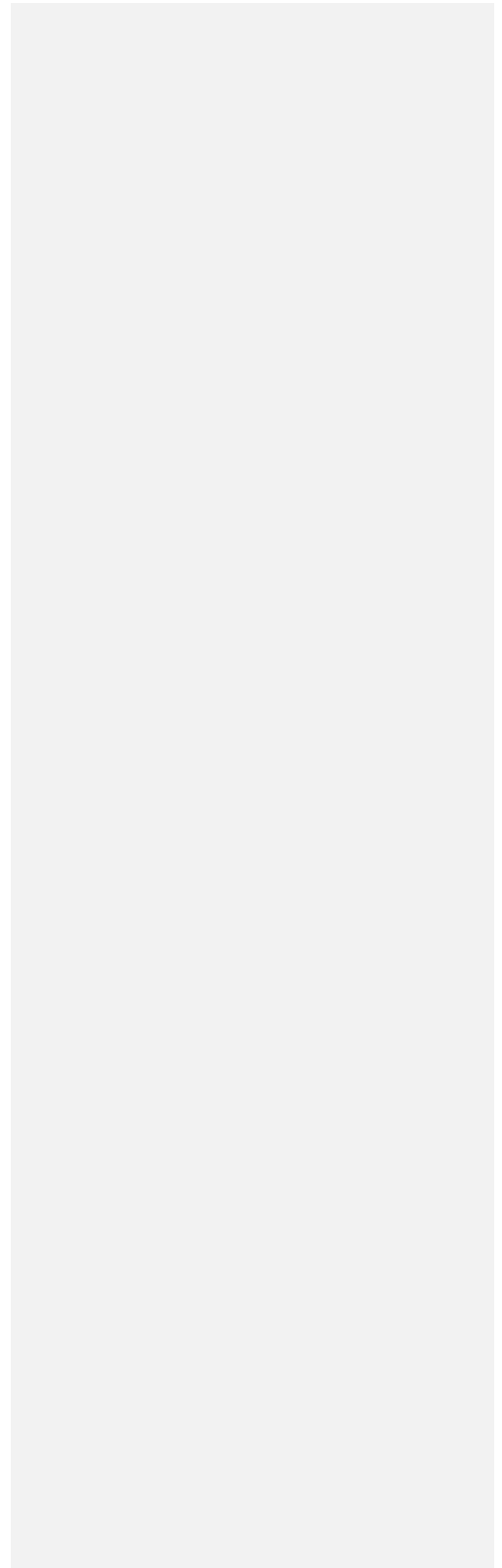
Datum der mündlichen Prüfung: 15.12.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Auswirkungen der Rezeptor-Dimerisierung auf das Calcium-imaging muskarinerges Acetylcholinrezeptoren M1, M3 und M5“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)



Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	2
1.2. Muskarinerge Acetylcholinrezeptoren	5
1.2.1. Physiologie und klinische Bedeutung von M1, M3 und M5	6
1.3. Rezeptor-Dimerisierung	10
1.3.1. Dimere unter GPCRs	10
1.3.2. Effekte der Dimerisierung	12
1.3.3. Dimere unter mAChRs	13
1.4. Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Materialien	15
2.2. Methoden	19
2.2.1. Kultivierung von N1E-Zellen	19
2.2.2. FACS (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)	19
2.2.3. Transfektion von Calciumsensor- und Rezeptor-DNA	20
2.2.4. Calcium- <i>imaging</i>	21
2.2.5. Agonisten/ Antagonisten	24
2.2.6. Auswertung	25
2.2.7. Forcierte Dimerisierung	27
2.2.8. Klonierung	28
2.2.9. FRAP (<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>)	34
3. Ergebnisse	37
3.1. Linearität zwischen Transfektion und Rezeptorexpression in N1E-Zellen	38
3.2. Nachweis forcierter Dimere	40
3.3. Einzeltransfektion von M1-, M3- oder M5-mAChRs; Homodimere im Vergleich	41
3.3.1. Wirkungsbereich der mAChRs M1, M3 und M5 für ACh	41
3.3.2. Dimerisierungsrate in M1-, M3-, M5-transfizierten N1E-Zellen	42
3.3.3. Ca ²⁺ -Signal in M1-, M3-, M5-transfizierten N1E-Zellen	44
3.4. Co-Transfektion von M1-, M3- und M5-mAChRs; Heterodimere im Vergleich	47
3.4.1. Dimerisierungsrate in M1+M3-, M1+M5-, M3+M5-co-transfizierten N1E-Zellen	47

3.4.2.	Ca ²⁺ -Signal in M1+M3-, M1+M5-, M3+M5-co-transfizierten N1E-Zellen.....	48
3.5.	Isolierte mAChR-Stimulation und Inhibition in co-transfizierten N1E-Zellen	51
3.5.1.	M1-Stimulation mittels McN-A-343.....	52
3.5.2.	M1-Antagonisierung mit Telenzepin hydrochlorid.....	55
3.5.3.	M3-Antagonisierung mit DAU 5884 hydrochlorid.....	58
4.	Diskussion.....	60
4.1.	Erfolg der forcierten Dimerisierung.....	61
4.2.	M1- und M3- Homodimere beeinflussen die Aktivierungskinetik	63
4.3.	M1+M3-, M3+M5-Heterodimere beeinflussen die Aktivierungskinetik.....	65
4.4.	Co-Expression von mAChRs bewirkt potentielle Kopplungsmechanismen.....	67
4.4.1.	Isolierte M1-Stimulation in M1+M5 führt zur Abschwächung des Ca ²⁺ -Signals	67
4.4.2.	Isolierte M1-Stimulation in M1+M3 führt zur Aufrechterhaltung des Ca ²⁺ -Signals	68
4.4.3.	Isolierte M3-Stimulation in M1+M3 führt zur Abschwächung des Ca ²⁺ -Signals	69
4.4.4.	Isolierte M5-Stimulation in M1+M5 führt zur Aufrechterhaltung der Ca ²⁺ -Signalstärke bei reduzierter Aktivierungskinetik	70
4.4.5.	Isolierte M5-Stimulation in M3+M5 führt zur Abschwächung der Ca ²⁺ -Signalstärke.....	71
4.5.	Limitationen der Interpretation.....	72
4.5.1.	Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse.....	75
4.6.	Möglichkeiten und Ausblick	77
5.	Zusammenfassung	79
6.	Literaturverzeichnis	80

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines M1-mAChR eingebettet in die Zellmembran.....	3
Abbildung 2: Familien- und Subgruppen-Einteilung im acetylcholinergen System.....	6
Abbildung 3: Immunhistochemischer Nachweis von M1 und M3 im Mäusehirn.....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Konfokal-Mikroskops.....	22
Abbildung 5: Spannvorrichtung für Glasplatten.....	22
Abbildung 6: Beispiel der Darstellung des Calcium- <i>imaging</i> s.....	23
Abbildung 7: Beispiel einer Ca ²⁺ -Signal-Auswertung.....	26
Abbildung 8: Vergleich IgG-Antikörper vs. <i>nanobody</i>	27
Abbildung 9: Schematische Darstellung NB- und GFP-gekoppelter mAChR.....	28
Abbildung 10: Vektorverdau von pcDNA3.1(-).....	29
Abbildung 11: <i>Gibson Assembly Reaktion</i>	30
Abbildung 12: Schematische Darstellung einer FRAP-Messung.....	35
Abbildung 13: Rezeptorlegende.....	37
Abbildung 14: Ergebnisse der FACS-Messung Einzelexpression.....	38
Abbildung 15: Ergebnisse der FACS-Messung Co-Expression.....	39
Abbildung 16: Nachweis forcierter Dimere.....	40
Abbildung 17: Ca ²⁺ -Signal von M1, M3, M5 nativ mit Darstellung des Wirkungsbereichs.....	41
Abbildung 18: Ergebnisse der FRAP-Messung mit CD28 und CD86 transfizierten Zellen.....	43
Abbildung 19: Ergebnisse der FRAP-Messungen mit Einzel-Rezeptor transfizierten Zellen.....	44
Abbildung 20: Ergebnisse des Calcium- <i>imaging</i> s für M5, M5-GFP und M5-NB im Vergleich.....	45
Abbildung 21: AUC der Einzel-Expression von M1, M3 und M5 forciert und unforciert.....	45
Abbildung 22: TTP der Einzel-Expression von M1, M3 und M5 forciert und unforciert.....	46
Abbildung 23: Ergebnisse der FRAP-Messungen co-transfizierter Rezeptoren.....	47
Abbildung 24: AUC der Co-Expression von M1, M3 und M5 forciert und unforciert.....	48
Abbildung 25: TTP der Co-Expression von M1, M3 und M5 forciert und unforciert.....	49
Abbildung 26: Schematische Darstellung der Anwendung von Agonisten/Antagonisten.....	51
Abbildung 27: Ca ²⁺ -Signal von McN mit Kreuztest.....	52
Abbildung 28: Selektive Stimulation von M1 in M1+M5 exprimierenden Zellen mittels McN.....	53
Abbildung 29: Selektive Stimulation von M1 in M1+M3 exprimierenden Zellen mittels McN.....	54
Abbildung 30: Ca ²⁺ -Signal bei Telenzepin-Antagonisierung mit Kreuztest.....	55
Abbildung 31: Selektive Stimulation von M3 in M1+M3 exprimierenden Zellen mittels Telenzepin-Antagonisierung.....	56
Abbildung 32: Selektive Stimulation von M5 in M1+M5 exprimierenden Zellen mittels Telenzepin-Antagonisierung.....	57
Abbildung 33: Ca ²⁺ -Signal bei DAU-Antagonisierung mit Kreuztest.....	58
Abbildung 34: Selektive Stimulation von M5 in M3+M5 exprimierenden Zellen mittels DAU- Antagonisierung.....	59
Abbildung 35: Graphische Darstellung verschiedener Transfektionsprinzipien.....	73
Abbildung 36: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse.....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien.....	15
Tabelle 2: Kits	15
Tabelle 3: Software	16
Tabelle 4: Biologische Materialien.....	16
Tabelle 5: Restriktionsendonukleasen	16
Tabelle 6: Puffer/Medien	16
Tabelle 7: Material	17
Tabelle 8: Geräte.....	18
Tabelle 9: Darstellung der mAChR-Agonisten/ Antagonisten mit zugehöriger Strukturformel und CAS-Nr.....	24
Tabelle 10:Darstellung der für das Gibson-Assembly verwendeten Primer mit Bezeichnung und Basenabfolge.....	31

Abkürzungsverzeichnis

a.E.	arbiträre Einheit
ACh	Acetylcholin
Ak	Antikörper
Ag	Antigen
AT	Angiotensin
ATP	Adenosintri-phosphat
AUC	<i>area under the curve</i>
Bp	Basenpaar
BRET/FRET	Biolumineszenz/Förster-Resonanzenergietransfer
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
D	Diffusionskoeffizient
DAG	Diacylglycerin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GH	<i>growth hormone</i>
GTP	Guanosintri-phosphat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelte/r Rezeptor/en (<i>G-protein coupled receptor</i>)
HA	Hämagglutinin
IP ₃	Inositoltri-phosphat

IL3	<i>intracellular loop 3</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
mAChR	Muskarinernerger Acetylcholin Rezeptor
NB	<i>nanobody</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
ROI	<i>region of interest</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TIR-FM	<i>total internal reflectance fluorescence microscopy</i>
TM	Transmembrandomäne
TTP	<i>time to peak</i>
UE	Untereinheit
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

1. Einleitung

Bereits Erkenntnisse aus den 70er Jahren deuteten darauf hin, dass, anders als bis dahin angenommen, Rezeptoren nicht zwingend als monomere Einheiten agieren, sondern ebenfalls als Zusammenlagerung mehrerer Rezeptoren vorkommen. Das Phänomen der Dimerisierung ist im Rahmen zahlreicher Forschungen mittlerweile zwar anerkannt, zählt jedoch nach wie vor zu den nicht vollends verstandenen Prozessen der Rezeptorbiologie.

Dimerisierung beschreibt eine räumliche, sowie zeitliche Annäherung zweier Rezeptoren, die gleichen (Homodimer) oder unterschiedlichen (Heterodimer) Typs sind und temporär konstitutiv interagieren. Ein aus zwei Rezeptoren bestehender Rezeptor-Komplex wird als Dimer bezeichnet, während Oligomere aus der Aggregation von mehr als zwei Rezeptoren bestehen.

Ende der 80er Jahre konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Rezeptoren aus der Familie der Wachstumsfaktor-Rezeptoren, z. B. der EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor*), nach Ligandenbindung Dimere formen und diese Formation für die Autophosphorylierung und schließlich auch für die Signaltransduktion dieser Rezeptoren eine wesentliche Rolle spielt (Böni-Schnetzler und Pilch 1987; Yarden und Schlessinger 1987). In zahlreichen Arbeiten wurde im Anschluss versucht, Dimerisierung auch in weiteren Rezeptorklassen nachzuweisen und zu entschlüsseln, welche nachgelagerten Effekte die Dimerisierung zweier Rezeptoren vermittelt.

Zu den am intensivsten untersuchten Rezeptorfamilien zählen die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Sie sind u. a. an der Regulation eines Großteils der physiologischen Prozesse in unserem Körper beteiligt und fungieren als Vermittler für Hormone der neurohumoralen Signaltransduktion, des zellulären Metabolismus, der zellulären Differenzierung, der Immunantwort und auch der parasympathischen Aktivierung von Drüsen (Grando et al. 2015; Fujii et al. 2017).

GPCRs wurden lange Zeit einer streng monomeren Rezeptorkonformation zugeordnet, weshalb sich das Konzept der Dimerisierung für die GPCRs zunächst nicht durchsetzen konnte. Im Laufe der letzten zwei Jahrzehnte mehrten sich jedoch Hinweise darauf, dass es durchaus zu Dimerisierungen unter einzelnen GPCRs kommt. Auffällige Liganden-Bindungs-Assays und eine ungewöhnlich hohe Anzahl an verdichteten Rezeptor-Komplexen in Versuchen mit Gel-Elektrophorese ließen die Idee der Dimerisierung in GPCRs aufleben (Wreggett und Wells 1995).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Dimerisierungsverhalten der muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren (mAChR) M1, M3 und M5, welche ebenfalls zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zählen. Erkenntnisse der letzten Jahre lieferten Aufschluss über die kristalline Struktur der Rezeptoren und konnten das Vorliegen von Dimeren unter mAChRs bestätigen (Kruse et al. 2012; Thal et al. 2016; Marsango et al. 2018). Über potenzielle Auswirkungen der Dimerisierung auf die Funktionalität der Rezeptoren und den resultierenden Effekten auf die Zelle ist jedoch bislang wenig bekannt.

Im Fokus standen die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren unter den mAChRs M1, M3 und M5, sowie gezielt die Fragestellung, ob (Homo- oder Hetero-) Dimerisierung unter mAChRs Auswirkungen auf die nachgeschaltete Signalkaskade bzw. die Aktivierungskinetik der Rezeptoren hat. Im Bereich der mAChRs hat es diesbezüglich kaum vergleichbare Versuche gegeben. Die Auswirkungen der Dimerisierung auf die Signalkaskade der mAChRs wurden anhand der Messung des intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegs vorgenommen. Die Erfassung des intrazellulären Ca^{2+} erfolgte anhand des sog. Ca^{2+} -*imaging*, einer Methode, welche sich der fluoreszierenden Eigenschaft des Ca^{2+} bindenden, modifizierten GFP (*green fluorescent protein*)-Konstrukt GcAMP6s bedient. Für die Überprüfung der Fragestellung wurde weiterhin ein System zur Kontrolle der Dimerisierung benötigt. Mit der Anwendung Rezeptor-gekoppelter *nanobodies* (NB) konnte in Anwesenheit eines entsprechenden Rezeptor-gekoppelten Antigens (GFP) erstmals ein System geschaffen werden, indem oberflächlich exprimierte Rezeptoren mittels der Antigen-Antikörper (Ag-Ak)-Bindung in eine räumliche Nähe gezwungen werden und sog. forcierte Dimere bilden. Mithilfe des *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) konnte der Erfolg der forcierten Dimerisierung überprüft werden. Im anschließenden Vergleich der Signalantwort forciert und unforciert Rezeptoren untereinander wurden die Ergebnisse im Hinblick auf potentielle Effekte der Dimerisierung auf die zelluläre Signalkaskade interpretiert.

1.1. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stellen die größte Fraktion der membranständigen Rezeptoren dar. Bisher wurden ca. 800 verschiedene Gene identifiziert, welche für GPCRs kodieren. Etwa die Hälfte der Gene kodiert für sensorische (olfaktorisch, optisch) und die andere Hälfte für nicht-sensorische Rezeptoren der Familie (Bjarnadóttir et al. 2006; Scholz et al. 2019). Diverse physiologische Reaktionen in Säugetieren, wie bspw. die Verschaltung von Hormonkaskaden, die Regulation des zellulären Metabolismus und der Differenzierung, sowie der Sekretion in Drüsen, beruhen auf Interaktionen von Botenstoffen mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Durch ihre Beteiligung an diesen und weiteren zahlreichen physiologischen Prozessen stellen

GPCRs einen essentiellen Ansatz der medikamentösen Therapie in der modernen Medizin dar (Bouvier 2001; Rios et al. 2001). Etwa 1/4 aller heutzutage verwendeten Medikamente zielt auf die Modulation von GPCRs ab (Hauser et al. 2017).

Die Einteilung der GPCRs erfolgt anhand bestimmter Kriterien in definierten Klassen. Eine der am weitesten verbreiteten und anerkannten Klassifizierungen teilt die GPCRs anhand der Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenzen und rezeptorspezifischen Eigenschaften in Gruppen von A-F (Scholz et al. 2019). Rezeptoren der Klasse A bilden die sog. Rhodopsin-Familie und stellen mit etwa 80% den größten Teil der GPCRs dar. Zu ihnen gehören u. a. auch die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (Fredriksson et al. 2003; Hu et al. 2017).

Die funktionelle Einheit eines GPCRs (s. Abb. 1) setzt sich aus der Rezeptoreinheit, einem G-Protein und dem anhängenden Effektormolekül zusammen. Der Rezeptor besteht aus sieben Transmembranhelices (TM1-TM7), welche über drei extra- und drei intrazelluläre Schleifen untereinander verbunden sind und die Plasmamembran durchspannen (Hulme et al. 1990).

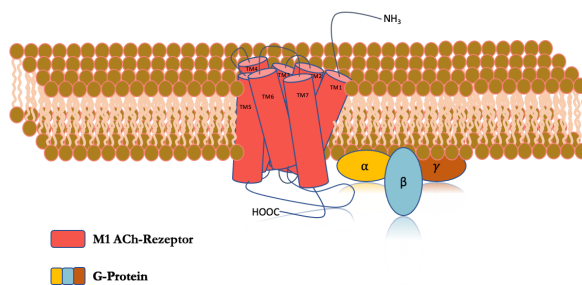


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines M1-mAChR eingebettet in die Zellmembran. Die 7TM-Helices sowie die Helix 8 sind rot gefärbt. Das zugehörige G-Protein mit seinen Untereinheiten steht in räumlicher Nähe zum Rezeptor (gelb: α-UE, türkis:βγ-UE)

Die Bindestelle der Rezeptoren für endogene Liganden (orthosterische Bindestelle) liegt an der aminoterminalen extrazellulären Domäne (Schwartz 1994), während die carboxyterminale intrazelluläre Domäne an die G-Proteine gekoppelt ist und nach Ligandenbindung für die Auslösung der Signalkaskade sorgt (Hedin et al. 1993; Wess 1997). Die orthosterischen Bindestellen aller fünf mAChR weisen eine hohe Konservierung auf, wodurch die Entwicklung selektiver orthosterischer Liganden, die spezifisch nur einen Rezeptor aktivieren, eine bis heute nicht zufriedenstellend gelöste Herausforderung darstellt (Kruse et al. 2012; Thal et al. 2016). Zahlreiche Rezeptoren weisen allerdings auch Bindestellen für allosterische Liganden auf. Diese allosterischen Bindestellen sind in den weniger stark konservierten extrazellulären Schleifen lokalisiert.

siert, wodurch sich eine höhere Subtypen-Spezifität und somit auch ein breites Spektrum pharmakologischer Angriffspunkte an den Rezeptoren ergibt (Holzgrabe et al. 2006). Die Bindung allosterischer Liganden an ihre Bindestelle kann entweder als allosterischer Modulator (moduliert die Rezeptorfunktion in Anwesenheit des orthosterischen Liganden) oder als allosterischer Agonist/Antagonist (übt aktivierende/hemmende Funktion in Abwesenheit des orthosterischen Liganden aus) erfolgen.

G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten (UE): Einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit (s. Abb. 1), welche zusammen auch als trimeres G-Protein bezeichnet werden (Oldham und Hamm 2008). Die G_{α} -UE hat im inaktiven Zustand stets ein Guanosindiphosphat-Molekül (GDP) gebunden. Die Bindung eines Liganden führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, durch welche die benachbarte α -Untereinheit die Affinität zum GDP-Molekül verliert und anstelle dessen ein Guanosintriphosphat-Molekül bindet. Die G_{α} -UE wird hierdurch aktiviert und dissoziiert von der $G_{\beta\gamma}$ -UE des G-Proteins (Dohlman et al. 1991). Sowohl die aktivierte G_{α} -UE, als auch die in der Zellmembran verbliebene $G_{\beta\gamma}$ -UE, sind in der Lage, nachgeschaltete Effektormoleküle zu aktivieren. Zu diesen Effektormolekülen gehören beispielsweise die Phospholipase C/D, die Adenylatzyklase, Phosphodiesterasen und Ionen-Kanäle (Bouvier 2001). Sie werden auch als *second messenger* bezeichnet. Die Einteilung der G-Proteine erfolgt anhand der G_{α} -Untereinheiten und ihrer *second messenger*-assoziierten Eigenschaften, verschiedene Signalproteine zu aktivieren oder zu inhibieren und somit diverse intrazelluläre Signalwege zu triggern. Es existieren (je nach Nomenklatur) vier Familien der α -UE zu denen G_{α_s} , G_{α_i} , G_{α_o} , $G_{\alpha_{12}}$ zählen (Syrovatkina et al. 2016). Die zu G_{α_s} gehörige Gruppe der olfaktorischen G-Proteine $G_{\alpha_{olf}}$ wird häufig auch als eigenständige Familie gezählt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Hormon-Rezeptoren, G-Proteine und Effektor-Enzyme (wie z. B. die Adenylatzyklase) diffus und unabhängig voneinander in der Membran diffundieren, entstanden Theorien zur Kopplung dieser drei Einheiten (Pfeuffer und Helmreich 1975). Die gängigsten Modelle bestanden aus der Überlegung, dass frei in der Membran diffundierende Rezeptoren erst nach Ligandenbindung an ihr jeweiliges G-Protein und Effektormolekül binden (Jacobs und Cuatrecasas 1976). Dieses Modell wurde als *collision coupling* zusammengefasst und lange Zeit als Erklärungsansatz für die Aktivierungskinetik der GPCRs akzeptiert (Gilman 1987). Im Laufe der Jahre folgten widersprüchliche Ergebnisse in Coimmunoprecipitations-Studien, welche zeigten, dass Rezeptor und G-Protein unabhängig von der Anwesenheit eines Agonisten im gebundenen Zustand vorlagen (Lachance et al. 1999; Hein und Bünemann 2009). Mit Etablierung neuerer Methoden wie den *bioluminescence/fluorescence resonance energy transfer*

(BRET/FRET) konnten Hinweise für das Vorliegen von bereits gekoppelten Rezeptor/G-Protein Komplexen in einigen Rezeptorklassen bestätigt werden (Galés et al. 2005). Ebenfalls in BRET-Assays konnte für β_2 -adrenerge Rezeptoren gezeigt werden, dass eine Kopplung der Rezeptoren an ihr zugehöriges G-Protein bereits im Endoplasmatischen Retikulum (ER), bzw. während des Golgi-Transports stattfindet (Dupré et al. 2006). Dieses neuere Modell der Rezeptor/G-Protein-Kopplung wurde als sog. *pre-coupling* eingeführt (Hein und Bünemann 2009).

Die Ergebnisse der einzelnen Arbeitsgruppen weisen z. T. große Differenzen untereinander auf. Während bspw. für den α_{2A} -adrenergen Rezeptor im Coimmunoprecipitationssay *pre-coupling* postuliert wurde, stellte man in einige Jahre später durchgeführten FRET-Messungen fest, dass α_{2A} -adrenerge Rezeptoren und ihr zugehöriges G-Protein in Form von *collision-coupling* miteinander interagieren (Okuma und Reisine 1992; Hein et al. 2005). Die Kenntnis über o. g. Kopplungsmechanismen spielt in der Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich der Aktivierungskinetik der mAChRs eine maßgebliche Rolle.

1.2. Muskarinerge Acetylcholinrezeptoren

Acetylcholinrezeptoren werden in muskarinerge und nikotinerge ACh-Rezeptoren unterteilt. Die muskarinergen ACh-Rezeptoren lassen sich durch ihre strukturelle Ähnlichkeit mit Rhodopsin in die Gruppe A der GPCRs einordnen (Marsango et al. 2018) und sind Gegenstand dieser Doktorarbeit. Die nikotinergen ACh-Rezeptoren zählen zu den ligandengesteuerten Ionenkanal-Rezeptoren und sind funktionell sowie strukturell nicht mit den mAChRs zu vergleichen. mACh-Rezeptoren werden in fünf Untergruppen von M1-M5 aufgeteilt (Caulfield und Birdsall 1998). M1, M3 und M5 gehören zu den G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren, wohingegen sich M2 und M4 als G_i -Protein-gekoppelte Rezeptoren von den übrigen Untergruppen hinsichtlich ihrer Physiologie unterscheiden (Caulfield 1993). Mit der Ausweitung phylogenetischer Untersuchungen konnte diese Aufteilung der mAChRs in zwei Subgruppen auch auf zwei verschiedene Ursprungsgene zurückgeführt werden (Pedersen et al. 2018).

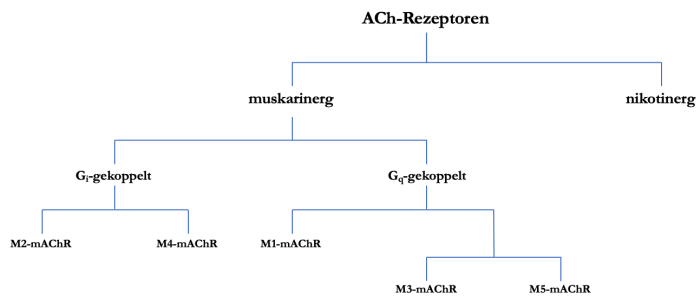


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Familien- und Subgruppen-Einteilung im acetylcholinergen System (modifiziert nach Pedersen et al. (2018)).

Die ersten Erkenntnisse zu der Existenz von Untergruppen im muskarinergen System erlangten R. Hammer und seine Arbeitsgruppe Anfang der 80er Jahre durch die Entdeckung des Antagonisten Pirenzepin und seiner von bekannten Antagonisten abweichenden Bindungskapazität. (Hammer et al. 1980). Sie verglichen die Bindungskurven des radiomarkierten Antagonisten ^3H -N-methylscopolamin mit und ohne Applikation des Antagonisten Pirenzepin und stellten fest, dass Pirenzepin je nach untersuchtem Gewebe variierende Bindungskapazitäten aufweist. Dies ließe sich durch eine Subtypen-Spezifität des Antagonisten erklären.

1.2.1. Physiologie und klinische Bedeutung von M1, M3 und M5

Die α -UE der G_q -Proteine aktiviert die Phospholipase C, welche ihrerseits die Aufspaltung des membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) bewirkt. Das Inositoltriphosphat diffundiert in das Zytosol und aktiviert IP_3 -sensitive Rezeptoren am ER, die als Ca^{2+} -Kanäle fungieren. Als Folge kommt es zu einer intrazellulären Freisetzung von Ca^{2+} , das als Co-Aktivator in zahlreichen zelleigenen Prozessen eine essenzielle Rolle spielt. Es bildet in höherer Konzentration Komplexe mit Proteinen und bewirkt dadurch eine Änderung ihrer Konformation. Ein wichtiges Beispiel für ein solches Protein ist das Calmodulin. Es reguliert in seiner Ca^{2+} -gebundenen Form diverse intrazelluläre Abläufe, u. a. die Aktivierung von membranständigen Ca^{2+} -ATPasen und Calmodulin-Kinasen, welche ihrerseits in den zellulären Stoffwechsel eingreifen und Proteine des synaptischen Apparates regulieren oder die Muskelkontraktion beeinflussen. Calmodulin ist weiterhin für diese Arbeit von Bedeutung, da es in modifizierter Version ein essenzieller Bestandteil des von uns verwendeten Ca^{2+} -Sensors ist (s.S. 21). Das in der Membran verbleibende DAG löst ebenfalls eine Signalkaskade aus, indem es die Proteinkinase C aktiviert (Berridge und Irvine 1984). Sie

stellt ein äußerst wichtiges Element der Proteinaktivierung dar und hat somit Einfluss auf Wachstum und Morphologie der Zelle.

Die Entdeckung spezifischer Antikörper gegen die fünf bekannten Subtypen der mAChRs ermöglichte eine grobe Zuteilung der Rezeptoren zu bestimmten Regionen des Körpers (Caulfield und Birdsall 1998). Eine ausschließliche Zuteilung der Untergruppen M1-M5 zu einem bestimmten Organsystem ist nicht möglich, da sie ubiquitär und parallel auf der Zellmembran verschiedener Gewebetypen exprimiert sind. Es wurde jedoch festgestellt, dass in einzelnen Organen durchaus höhere Konzentrationen einer Untergruppe vorkommen, wodurch diese einen entsprechenden Einfluss auf die Funktion des jeweiligen Gewebes ausüben (Weiner et al. 1990; Fukamauchi et al. 1993). Beispielsweise kommen M1- und M3-Rezeptoren nebeneinander in Speicheldrüsen, sowie im ZNS der Maus vor und spielen beide eine entscheidende Rolle in der Regulation vegetativer und kognitiver Prozesse (Gautam et al. 2004). Das parallele Vorhandensein der mAChRs in einem Gewebe wird in Abbildung 3 beispielhaft für M1 und M3 anhand eines Hirnschnittes der Maus dargestellt.

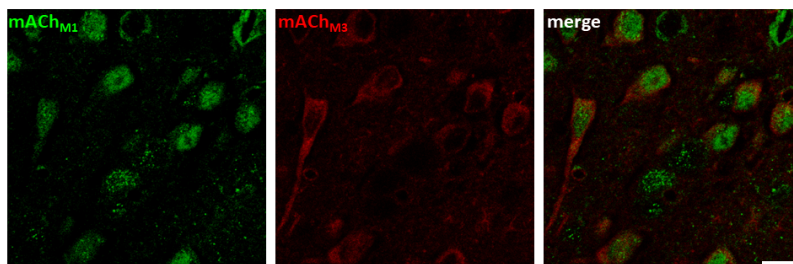


Abbildung 3: Immunhistochemischer Nachweis der Co-Expression von ACh-Rezeptoren M1 und M3 im Mäusehirn. PFA-fixiertes Gewebe (Gehirn Maus) wurde nach Permeabilisierung mit Antikörpern gegen M1 und M3 (Santa Cruz) gefärbt. Die Visualisierung erfolgte mit Sekundär-Antikörpern (A-21447, Molecular Probes; 771-165-152, Jackson Immuno Research). Der Maßbalken entspricht 10 μ m.

M1-mAChRs werden beim Menschen überwiegend im zentralen Nervensystem exprimiert, mit der höchsten Dichte im frontalen Cortex, im Hippocampus, sowie im Striatum (Levey 1993). Anhand von M1-mAChR-*knock-out*-Mäusen konnten Anagnostaras et al. die Bedeutung des M1-mAChR für die kognitive Leistung und die Gedächtnisfunktion aufzeigen (Anagnostaras et al. 2003). Kongruent zu diesen Ergebnissen zeigte sich in einem Ratten-Modell mit spezifischen M1-Antagonisten der M1-mAChR relevant zur Aufrechterhaltung der kognitiven Leistungsfähigkeit (Hagan et al. 1987). Die Rolle des M1-mAChR in der Pathophysiologie der Alzheimer'schen Erkrankung, sowie der Einfluss auf den kognitiven Leistungsabbau bei Schizophrenie

niepatienten wurden in diesem Zusammenhang mehrfach nachgewiesen. Beide Patientengruppen zeigten zusätzlich eine Degradierung des cholinergen Systems in verschiedenen Hirngebieten und profitierten gleichzeitig im Bezug auf kognitive Leistungseinbußen durch die Einnahme von Acetylcholinesterasehemmern (Langmead et al. 2008). Durch die erheblichen Nebenwirkungen, die einer unspezifischen cholinergen Aktivierung folgen können, ergibt sich die Notwendigkeit hochselektiver M1-mAChR-Agonisten, um eine gezieltere medikamentöse Interventionsmöglichkeit zu ermöglichen (Fisher 2008).

Der **M3-mAChR** wird im zentralen Nervensystem im Vergleich zu den anderen mAChRs geringer exprimiert und nimmt dadurch auch eine weniger bedeutende Rolle in der Regulation zentraler Prozesse ein (Levey 1993). In M3-mAChR-*knock-out*-Mäusen zeigte sich ein hypoplastischer vorderer Hypophysenanteil mit einer niedrigen Konzentration an *growth hormone* (GH) und Prolaktin. Die betroffenen Mäuse stellten sich als kleinwüchsig heraus. Der Einfluss des M3-Rezeptors auf die GH-Ausschüttung könnte zukünftig besonders für die Therapie GH-defizienter Patienten von großer Bedeutung sein (Gautam et al. 2009).

M3-*knock-out*-Mäuse zeigten ebenfalls eine Hypophagie, kombiniert mit einer Störung der Nahrungsaufnahme (Gautam et al. 2008). Diese Beobachtung könnte zum einen auf der besonders hohen Konzentration an M3-Rezeptoren im Hypothalamus, welcher für die Regulation von Nahrungsaufnahme, Schlaf-Wach-Zustand, Wasserhaushalt etc. verantwortlich ist, beruhen (Eglen 2012). Zum anderen konnten Studien den M3-Rezeptor auch in pankreatischen Zellen nachweisen und anhand einer selektiven Blockade dieser pankreatischen M3-Rezeptoren feststellen, dass diese Mäuse Störungen im Glucose-Haushalt und der Insulin-Ausschüttung entwickelten. Weitere Studien konnten belegen, dass M3-*knock-out*-Mäuse vermehrt zu metabolischen Störungen, Unregelmäßigkeiten im Energiehaushalt und einer verringerten Nahrungsaufnahme neigten (Gautam et al. 2008).

In weiterführenden Untersuchungen konnte das Vorkommen des M3-Rezeptors in der glatten Muskulatur in diversen Versuchsreihen bestätigt werden. So zeigten beispielsweise Lungengewebe von M2/M3 *knock-out*-Mäusen Defizite in der Kontraktilität der glatten Bronchialmuskulatur nach muskarinerger Stimulation (Roffel et al. 1990; Struckmann et al. 2003). Weiterhin konnte aufgezeigt werden, dass in zerebralen Blutgefäßen der Maus die Regulation der Gefäßweite ausschließlich mittels M3-mAChR über eine Ca^{2+} gesteuerte Beeinflussung der Stickstoffmonoxidausschüttung erfolgt (Zuccolo et al. 2017).

Der **M5-mAChR** ist der letzte der fünf mAChRs, welcher erfolgreich kloniert wurde (Bonner et al. 1988). Immunoprecipitationsstudien an Ratten konnten zeigen, dass der M5-Rezeptor

überwiegend im zentralen Nervensystem lokalisiert ist, wenngleich in deutlich niedrigerer Konzentration als andere mAChRs (Yasuda et al. 1993). Mittels *in-situ*-Hybridisierung konnte die Lokalisation der höchsten Konzentration an M5-mAChR-mRNA auf bestimmte Bereiche des Rattengehirns zurückgeführt werden, zu denen einerseits dopaminerge Neurone der Pars compacta der Substantia Nigra, die Area tegmentalis ventralis, sowie der Hippocampus gehören (Vilaró et al. 1990; Weiner et al. 1990; Yasuda et al. 1993). Die genaue Rolle des M5-Rezeptors kann bis heute aufgrund des Mangels an hoch selektiven Liganden nur schwer untersucht werden (Eglen und Nahorski 2000; Lebois et al. 2018). Anfang der 2000er konnte allerdings mittels eines gezielten M5-mAChR-*knock-out* Maus-Modells nachgewiesen werden, dass der M5-mAChR entscheidend für Regulierung zerebraler Blutgefäße ist und die Steuerung des Belohnungszentrums mit der Expression von M5-mAChR eng in Verbindung steht (Raffa 2009). Besonders letzteres ist aus neuropharmakologischer Sicht Gegenstand vieler aktueller Studien zum M5-Rezeptor im Hinblick auf das Thema Suchtbekämpfung. Basile et al zeigt mittels M5-*knock-out* Mäusen, dass das Belohnungsverhalten durch Morphin-Stimulation bei M5-defizienten Mäuse deutlich schlechter ausfiel, als bei der Kontrollgruppe, die analgetischen Eigenschaften des Morphins aber dennoch erhalten blieben (Basile et al. 2002). In einer ähnlichen Arbeit verglichen Yamada et al. die Dilatationsfähigkeit zerebraler Arterienpräparate zwischen M5-*knock-out* Mäusen und einer unmanipulierten Kontrollgruppe und konnten feststellen, dass Präparate der M5-*knock-out*-Mäuse keine vasodilatativen Funktionen durch ACh-Stimulus ausüben konnten (Yamada et al. 2003). In Alzheimerpatienten konnte eine im Vergleich zu gesunden Probanden verminderte zerebrale Perfusion, besonders frontal-kortikaler Hirnanteile nachgewiesen werden, welche auf eine cholinerge Denervation der zerebralen Gefäße zurückzuführen war. Eine direkte Verbindung der cholinergen Denervation, der konsekutiv verminderten Blutversorgung und dem Absterben von Neuronen wird in der Pathphysiologie der Alzheimer Erkrankung angenommen und als möglicher medikamentöser Therapieansatz diskutiert (Geaney et al. 1990; Tong und Hamel 1999).

Das acetylcholinerge System spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung des kindlichen Gehirns und ist auch im Alter für die Aufrechterhaltung vieler kognitiver und basaler Prozesse im ZNS von großer Bedeutung. Die Anwendung acetylcholinergere Pharmaka zur Bekämpfung kognitiver Leistungseinschränkung bei Demenz- und Schizophreniepatienten macht dies deutlich. Doch nicht nur im Hinblick auf neurologische Erkrankungen spielen die mAChR eine entscheidende Rolle. Der Erfolg von mAChR-Modulatoren bei der Behandlung von Asthma, kardialen Erkrankungen, Motilitätsstörungen des Darms etc. zeigt die Bedeutsamkeit dieser Rezeptorgruppe in der Regulation unzähliger Abläufe in den unterschiedlichsten Organsystemen

unseres Körpers (Caulfield und Birdsall 1998). Dabei hat sich die Etablierung gezielter orthostereischer Liganden aufgrund der hoch konservierten und somit strukturell stark ähnlichen Bindestellen der drei mAChRs als durchaus problematisch erwiesen. Allosterische Liganden/Modulatoren weisen eine deutlich größere Subtypen-Spezifität auf und sind zum Schwerpunkt der Forschung an mAChRs geworden.

Unter dem gesonderten Aspekt der extrem stark konservierten Bindestellen stellt sich jedoch die Frage, wozu von den G_q-Protein-gekoppelten mAChRs drei äußerst homologe Rezeptoren mit identischer Signalkaskade existieren. Welchen Zweck erfüllen Dimere unter diesen Rezeptoren, besonders unter Berücksichtigung der Tatsache, dass monomere Rezeptoren ihr G-Protein eigenständig aktivieren können (Whorton et al. 2007)? Ein möglicher Aspekt wären evolutionsgenetische Erklärungsansätze, in denen zur Erhaltung der Spezies drei Kopien eines Rezeptortyps in einem Organismus existieren. Die Funktion eines defekten Rezeptors könnte in diesem Fall durch das parallele Vorhandensein weiterer intakter Rezeptoren auf der Zelloberfläche aufrechterhalten werden. Ähnliche Effekte konnten bereits für andere Rezeptorklassen nachgewiesen werden und unterliegen einer direkten Protein-Protein-Interaktion (Dimerisierung) zwischen den beiden beteiligten Rezeptoren. Dabei müssen solche Interaktionen nicht ausschließlich die Signalkaskade beeinflussen. Effekte der Dimerisierung unter GPCRs wurden ebenfalls für den Transport der Rezeptoren zur Zelloberfläche oder die Internalisierung beschrieben (Jordan und Devi 1999).

Da sich für andere Rezeptorklassen bereits ein Einfluss der Dimerisierung auf die Funktion der dimerisierten Rezeptoren gezeigt hat, stellt sich die Frage, welchen Einfluss die Rezeptor-Dimerisierung auf die Funktion der mAChRs M1, M3 und M5 haben könnte.

1.3. Rezeptor-Dimerisierung

1.3.1. Dimere unter GPCRs

Im Fokus der Rezeptorforschung standen zu Beginn die Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (z. B. EGF-Rezeptoren) und Zytokin-Rezeptoren, für welche gezeigt werden konnte, dass eine Dimerbildung essentiell für die Funktion der Rezeptoren ist und dass diese erst nach Bindung eines Liganden dimerisieren (Böni-Schnetzler und Pilch 1987; Yarden und Schlessinger 1987). Die Anlagerung beider Rezeptoren führt nach Agonistenbindung zur gegenseitigen Aktivierung mittels Phosphorylierung durch zugehörige Rezeptor-Kinasen. Die intrazellulär gelegenen, phosphorylierten Rezeptorabschnitte sind somit zugänglich für weitere Effektormoleküle und

können diese aktivieren (Ullrich und Schlessinger 1990; Ferguson 2008). Für GPCRs ging man bis zu diesem Zeitpunkt nicht von der Ausbildung dimerer Rezeptorkomplexe aus. Limbird und Lefkowitz zeigten jedoch erstmals mittels Ligandenbindungstests, dass unter β -adrenergen Rezeptoren (Klasse A GPCR) negative Kooperationsmechanismen wirkten, welche durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion erklärbar waren (Limbird und Lefkowitz 1976). Es folgten vereinzelt weitere Erkenntnisse wie beispielsweise die Entdeckung oligomerer Strukturen in mAChR mittels Photoaffinitätsmarkierung in kortikalen und hippocampalen Neuronen (Avissar et al. 1983). Hazum et al. konnten für eine weitere Gruppe der GPCRs, den Opioid- und Enkephalin-Rezeptoren, erstmals zeigen, dass die Co-Expression der beiden Rezeptoren zu einer erhöhten Affinität für ihre jeweiligen Liganden führt, als einzeln exprimierte Rezeptoren (Hazum et al. 1982). Neue Aufmerksamkeit erlangte die Diskussion um die Dimerisierung von GPCRs durch die Studie von Maggio und seiner Arbeitsgruppe. Sie generierten zwei funktionslose chimäre Rezeptoren aus α_2 - und M3-Rezeptor-Anteilen und exprimierten diese in COS-7 Zellen. Einzeln exprimiert zeigte sich keine Bindekapazität für Rezeptor-Liganden, bei Co-Expression beider Chimären in einer Zelle jedoch, konnten die Ligandenbindestellen und somit die Rezeptorfunktion wiederhergestellt werden. Diese Beobachtungen deuteten auf eine Wechselwirkung der beiden chimären Rezeptoren miteinander hin (Maggio et al. 1993).

Einen eindeutigen biochemischen Nachweis für die Existenz von Dimeren unter den GPCRs erbrachten Hebert et al. mit Co-Immunoprecipitationsstudien an Epitop-markierten β_2 -Adrenorezeptoren. Gleichzeitig postulierten sie in ihrer Arbeit auch das Vorhandensein einer Dimer-Bindestelle in der sechsten Transmembrandomäne (Hebert et al. 1996). Mithilfe von BRET/FRET-Studien konnte auch in lebenden Zellen nachgewiesen werden, dass GPCRs sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden (Goin und Nathanson 2006; Aslanoglou et al. 2015). Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Klasse C GPCRs überwiegend konstitutive Dimere bilden (Kniazeff et al. 2011). Als konstitutive Dimere werden Rezeptorpaare bezeichnet, welche lediglich als Dimer eine Funktionalität aufweisen und nicht als Monomere funktionieren. Die Rezeptoren sind an der Zelloberfläche als feste Dimere präsent. Für Klasse A GPCR ließ sich die Existenz von konstitutiven Dimeren nicht nachweisen. Es existieren im Gegenteil Studien, welche auf das Vorhandensein von Klasse A GPCRs als strikte Monomere hindeuten (Whorton et al. 2007; Kuszak et al. 2009). Die Anzahl an kontroversen Ergebnissen macht deutlich, weshalb Dimerbildung in GPCRs lange Zeit als nicht gesichert galt. Folglich bildete sich der Konsens, dass Klasse A GPCRs dazu tendieren spontan temporäre Dimere zu bilden und wieder zu dissoziieren (Milligan und Bouvier 2005). Die ersten Hinweise zu diesem Phänomen lieferten Hern et al., indem sie anhand der *single-molecule total internal reflectance fluorescence microscopy* (TIR-FM) in

der Lage waren, einzelne Moleküle, in diesem Fall M1-mAChR, zu erfassen und deren Position und Bewegung durch die Membran zu bestimmen. Sie konnten damit zeigen, dass etwa ein Drittel der exprimierten M1-mAChR Dimere bilden, die nicht etwa konstitutiv, sondern temporär existieren (Hern et al. 2010; Pediani et al. 2016). Dies könnte auch die teilweise widersprüchlichen Entdeckungen mit unterschiedlichen Methoden auf dem Gebiet der GPCR-Dimerisierung erklären.

1.3.2. Effekte der Dimerisierung

Dass GPCRs nicht nur Dimere bilden können, sondern Dimerisierung auch ein essentieller Bestandteil der Rezeptorfunktion sein kann, zeigten zunächst Beobachtungen der Klasse C GPCRs. Zu diesen gehören u. a. metabotrope Neurotransmitter-Rezeptoren und Ca^{2+} -sensitive Rezeptoren. Bereits 1998 konnten Kaupmann et al. belegen, dass unter den GABA-B Rezeptoren zwei Isoformen existieren, welche als Monomere unfunktional sind und zwangsweise als Dimer fungieren. GABA-B1 ist entscheidend für die Bindung des Agonisten, GABA-B2 für die Bindung des G-Proteins. Keiner der beiden Subtypen kann ohne den anderen funktionieren, womit sie gutes Beispiel für konstitutive Dimere darstellen (Jones et al. 1998; Kaupmann et al. 1998). Doch auch unter temporären Dimeren bestätigten sich Mechanismen der Rezeptormodulation. Ein Jahr später zeigten Jordan und Devi, dass Heterodimere aus κ - und δ - Opioidrezeptoren (Klasse A GPCRs) neue funktionale Einheiten bilden. Die Rezeptoren bilden als Monomere zwar funktionelle Einheiten, können co-transfiziert aber auch Heterodimere bilden. Selektive Rezeptorstimulation dieser Dimere, führte zur Aktivierung beider Rezeptoren und zu einer synergistischen, verstärkten Signaltransduktion (Jordan und Devi 1999). Das Konzept der Rezeptor-Rezeptor-Interaktion schien diesem Phänomen zugrunde zu liegen (Bouvier 2001).

Der Zeitpunkt und Ort der Bildung von Dimeren kann ab dem Moment der Proteinfaltung im ER, über die Membranbeständigkeit, bis hin zur Internalisierung und schließlich dem Abbau des Rezeptors variieren. So konnte beobachtet werden, dass für einige GPCRs Homodimerisierung einen entscheidenden und essentiellen Schritt in der korrekten Proteinfaltung und dem Transport zur Zelloberfläche im und vom ER einnimmt (Salahpour et al. 2004; Dupré et al. 2006; Herrick-Davis et al. 2006). Für membranständige Rezeptordimere liegen kontroverse Studien vor, ob sich diese erst durch Ligandenbindung induzieren lassen, oder bereits konstitutiv an der Membran vorkommen (Angers et al. 2002; Herrick-Davis et al. 2013). Im Hinblick auf Heterodimerisierung konnte man für zahlreiche GPCRs nachweisen, dass es bei Co-Expression zweier heterologer Rezeptoren nach selektiver Ligandenstimulation des einen Rezeptors zur

Co-Internalisierung beider Rezeptoren (z. B. Cannabinoid-CB1-Rezeptor und Orexin-OX1-Rezeptor, oder Adenosin- α_{2A} -Rezeptor und Dopamin-D2-Rezeptor) kommt (Hillion et al. 2002; Ward et al. 2011). Die zahlreichen Erkenntnisse bestätigen, dass die Entstehung von GPCR-Dimeren an nahezu jedem Punkt des Zyklus eines Rezeptors stattfinden kann.

1.3.3. Dimere unter mAChRs

Die ersten Hinweise darauf, dass auch mAChRs Dimere/Oligomere bilden, gab es bereits in den frühen 80er Jahren durch Photoaffinität-Markierungs-Assays, gefolgt von Ligandenbindungs-Assays durch Potter und seine Arbeitsgruppe in den 90er Jahren (Avissar et al. 1983; Potter et al. 1991; Hirschberg und Schimerlik 1994). Zu den neueren Methoden zum Nachweis von mAChR-Dimeren gehören unter anderem die BRET/FRET-Messungen, *fluorescence correlation spectroscopy* (FCS), *spatial intensity distribution analysis* (SpIDA). Die Erkenntnisse der einzelnen Messverfahren variieren hinsichtlich des Anteils an detektierten Homo- und Heterodimeren, bestätigen jedoch die Hypothese, dass Dimerbildung durchaus stattfindet (Goin und Nathanson 2006; Herrick-Davis et al. 2013; Pediani et al. 2016). Anhand von Coimmunoprecipitationsstudien mit modifizierten M3-Rezeptoren konnten Zeng und Wess feststellen, dass zwischen den M3-Mutanten sowohl kovalente als auch nicht kovalente Bindungen existieren (Zeng und Wess 2000). Die Formation von Dimeren eines Rezeptortyps stellt nur einen Aspekt dieser Arbeit dar. Ebenfalls hervorzuheben ist die Interaktion unterschiedlicher mAChRs als Heterodimer, besonders in Anbetracht der gleichen G-Protein-Bindung der drei nahezu identischen mAChRs. Beispielsweise soll an dieser Stelle die Entdeckung heterodimerer und homodimerer Komplexe in M3/M5-transfizierten Zellen erwähnt werden. Anhand erweiterter Coimmunoprecipitations- sowie zusätzlichen BRET-Studien in HEK-293T-Zellen mit co-transfizierten M3 und M5 Rezeptoren, zeigten sich Hinweise auf das parallele Vorkommen von Homo und Heterodimeren der beiden Rezeptorpartner (Borroto-Escuela et al. 2010). Obwohl sich Hinweise auf die Existenz der Dimere in mAChRs verdichten, ist nicht hinreichend geklärt, welchen Nutzen und welche Funktion dieses Phänomen mit sich bringt. Die Forschung am Dimerisierungsverhalten der Rezeptoren dient einem besseren Verständnis des zellinternen Transportes der Rezeptoren zur Zelloberfläche, der Internalisierung und dem Abbau, der Ligandenaffinität, sowie dem Einfluss auf die nachgeschaltete Signalkaskade (*signalling*). Im vorherigen Kapitel wurden die klinische Bedeutung der mAChR und die Beteiligung an diversen Krankheitsprozessen bereits thematisiert. Da vergleichsweise wenig über die Pharmakodynamik der mAChRs bekannt ist, sind Erkenntnisse in diesem Bereich von besonders klinischer Wichtigkeit.

1.4. Zielsetzung

Die Ausbildung von Dimeren unter GPCRs ist mittlerweile unumstritten. Besonders unter Berücksichtigung der Tatsache, dass monomere Rezeptoren ihr G-Protein eigenständig aktivieren können, stellt sich die Frage, welchen Einfluss die Rezeptor-Dimerisierung auf die Funktion der GPCRs hat (Whorton et al. 2007). Trotz intensiverer Forschung ist diese Frage für viele GPCRs bis heute nicht geklärt. Zu diesen zählen u. a. auch die muskarinergen ACh-Rezeptoren. M1, M3 und M5 stellen drei funktionsgleiche Rezeptoren dar, welche als Monomere, sowie als Dimere signalisieren können.

In dieser Doktorarbeit sollen daher folgende Fragestellungen unter Verwendung des neuartigen Systems der forcierten Dimerisierung beleuchtet werden: Welche Einflüsse haben Dimere unter den Gq-gekoppelten mAChRs auf die zelluläre Signalkaskade der Rezeptoren? Gibt es einen Unterschied im Ca^{2+} -*signalling* zwischen homo- und heterodimerisierten mAChRs? Welche Auswirkung auf das Ca^{2+} -*signalling* hat die gezielte Aktivierung eines mAChR in Heterodimeren?

Um diesen Fragen nachzugehen, wurde ein System benötigt, in dem Dimerisierung kontrolliert werden kann. In dieser Arbeit wird mit der forcierten Dimerisierung erstmals ein solches System präsentiert. Die forcierte Dimerisierung zweier mAChRs wird mittels rezeptorgekoppelter Ak-Ag-Bindung ermöglicht. Treffen rezeptorgekoppelte Ak auf rezeptorgekoppelte Ag, wird von einer direkten Bindung beider Rezeptoren ausgegangen. Mittels modernen Klonierungsverfahren konnte sowohl ein GFP als Ag, als auch ein NB als Ak an mAChRs koppeln und durch Co-Transfizierung beider Konstrukte eine forcierte Dimerisierung ermöglichen. Überprüft wird der Erfolg der forcierten Dimerisierung mittels FRAP. Das Ca^{2+} -*imaging* bezeichnet die anschließende Erfassung der zellulären Signalantwort der mit mAChRs und einem Ca^{2+} -Sensor (GcAMP6s) transfizierten Zellen durch ein Konfokalmikroskop. Die gezielte Stimulation eines mAChR in Heterodimeren wird mittels Subtypen-spezifischer Agonisten/Antagonisten gewährleistet. Adäquate Techniken für die funktionale Untersuchung oligomerer Strukturen sind noch nicht verfügbar, weshalb sich diese Arbeit ausschließlich auf Rezeptor-Dimere konzentriert.

Da bisher keine Hinweise dafür existieren, dass mAChRs konstitutive Dimere bilden, können die Signalantworten forciert Homo- bzw. Hetero-Dimere zwischen M1, M3 oder M5 mit denen unforciert exprimierter Rezeptoren verglichen werden. Die Tatsache, dass diverse Klasse A GPCRs Dimere bilden und diese in einigen Fällen einen bedeutenden Einfluss auf die Eigenschaften der Rezeptoren haben können, macht es durchaus erstrebenswert, potentielle Einflüsse auch für Dimere unter mAChRs zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Tabelle 1: Chemikalien

Acetylcholin Chloride $\geq 99\%$ (TLC) MW: 181,66 g/mol	Merck KGaA, Darmstadt, Germany (urspr. Sigma-Aldrich)
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs
One-Taq- DNA-Polymerase	New England Biolabs
Lipofectamin 2000 Reagent, 1,5 ml (1mg/mL)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific
mAChR-M3-Antagonist: DAU 5884 hydrochloride	Tocris Bioscience, Bristol, UK
mAChR-M1-Agonist: McN-A-343	Tocris Bioscience, Bristol, UK
mAChR-M1-Antagonist: Telenzepin dihydrochloride	Tocris Bioscience, Bristol, UK
Ethanol vergäht	Carl Roth GmbH
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH
Ethidium Bromide solution	Merck KGaA, Darmstadt, Germany (urspr. Sigma-Aldrich)
DNA-Leiter (Quick-load ladder (blue, 6x) 1kb)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
dNTP	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D

Tabelle 2: Kits

Plasmidpräparation maxi (Maxi Prep Plasmid DNA Purification Nucleo Bond Xtra Maxi)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems	Promega, Heidelberg, D
Agarose Gel-Aufreinigung: Wizard SV Gel and PCR Clean-up System	Promega, Heidelberg, D Nuclease Free Water Membrane Binding solution Collection tubes Wizard SV Minicolumns

Tabelle 3: Software

ZEN Mikroskopie 2010	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Graph Pad Prism 6.0	Graphpad Software, Inc, San Diego, US
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmond, US
Fiji is just imagej	https://imagej.net/Fiji

Tabelle 4: Biologische Materialien

Vektor-Plasmid pcDNA3.1(-) mit Ampicillin-Resistenzgen	Takara Bio Inc., CA, US
GFP-DNA	GenBank ID: NC_013179
NB-DNA	(Muyldermans 2001; Rothbauer et al. 2008)
mAChR-M1-DNA	cDNA Resource Center (cDNA.org) Bloomsberg University, Pennsylvania, USA
mAChR-M3-DNA	cDNA Resource Center (cDNA.org) Bloomsberg University, Pennsylvania, USA
mAChR-M5-DNA	cDNA Resource Center (cDNA.org) Bloomsberg University, Pennsylvania, USA
GCaMP-6s	(Chen et al. 2013)

Tabelle 5: Restriktionsendonukleasen

XhoI	NEB, 20.000 U/ml, R0146S
------	--------------------------

Tabelle 6: Puffer/Medien

Opti-Mem Reduced Serum Medium 500ml	Gibco by life technologies Sterile A
DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium)	ThermoFischer Scientific
DPBS (Dulbeccos Phosphate Buffered Saline) 500ml	Gibco by life technologies Sterile A
SOC-Medium	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., D
One-Taq Standard Reaction Buffer (5x), 2ml	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., D

Cut Smart Buffer (inkl. BSA), 10x Konzentration	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., D
NEBuffer, 10x Konzentration	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M., D
Agarose-Pulver	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Olen- dorf, D
TAE-Puffer (Tris Acetate-EDTA Puffer) 50x	242,28 g TRIS-Puffer in 750 ml H ₂ O lösen, 60,05 g Essigsäure und 18,6 g EDTA-Na ₂ hinzu
LB(<i>lysogeny broth</i>)-Medium 5x	10 g LB-Pulver in 100 ml H ₂ O, inkl. Autoklavierung
LB-Agar	LB-Medium mit 1 % Agar und 100 µg/ml Ampicillin
Ladepuffer Elektrophorese (loading buffer)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, D
1 molare Acetylcholin-Lösung	Acetylcholin-Chloride (s.Chemikalien) einwiegen und gemäß - Gramm/181,66g/mol * 1000 = x ml - mit Opti-Mem auffüllen

Tabelle 7: Material

Pipetten 1 - 1000 µM	Eppendorf, Hamburg, D
MiniTrays (4 Kammern, 12mm, auch als <i>four-well</i> /bezeichnet) Sterile R Nunclon Delta Surface	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Safe-lock tubes 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
PCR-Reaktionsgefäß 0,2 ml	Brand GmbH und Co. KG, Wertheim, D
Deckgläser, 10 mm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, US eigenständige Sterilisation
Zellkulturschalen, sterile R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Glasbodenzellkulturen µ-Dish 35mm, sterile	Ibidi GmbH, Planegg, D
Pipettenspitzen (0,1-10µl, 1-200µl, 101-1250µl)	TipOne, Starlab GmbH, RNase- DNase- DNA und Pyrogen-free
PCR-cups 0,2ml	Brand, RNase- DNase- DNA-free
Safe-lock tubes 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
Serologische Pipette 5ml	Sarstedt Sterile R
Zentrifugenröhrchen 10ml und 50ml	VWR International, Sterile R

Tabelle 8: Geräte

Konfokales <i>laser-scanning-microscope</i> LSM 510 Meta	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Wasserbad 37°C, Lauda A100	LAUDA DR. R. WOBSE GMBH & CO. KG, Lauda-Königshofen, D
Zentrifuge, Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge, Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, D
PCR-Cycler	Bio-Rad, CFX96 Real-Time Cycler C1000 Thermal Cycler Peqlab, Advanced Primus 25
Spektralphotometer	Eppendorf Bio-Photometer
Gelelektrophorese-Becken	Agagel Mini Biometra (Biometra biomed. Analytik GmbH Göttingen)
Elektrophorese-Spannungsgenerator, Consort E143	Merck KGaA, Darmstadt, Germany (urspr. Sigma-Aldrich)
Thermomixer comfort 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
CO ₂ -Inkubator MIDI 40	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA 37°C und CO ₂ Konz. 5%
Steriler Arbeitstisch, Safe 2020 EN 12469: 2000, Class II, Safety Cabinet	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Kühlschrank	Bomann 6°C
Kühltruhe	Sanyo Biomedical freezer -25°C
UV-Lampe	Camag, Muttenz, Switzerland
Laborwaage Sartorius handy	Sartorius GmbH Germany
Schüttelinkubator, Minitron	Infors AG, Bottmingen, CH
Maßgefertigte Spannvorrichtung	Werkstatt UMG, Universitätsmedizin Göttingen, D

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung von N1E-Zellen

Die folgenden Versuche wurden mit N1E-115 Neuroblastomzellen (ATCC, Manassas, VA, US) durchgeführt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gelagert und nach Bedarf aufgetaut. Die Kultur der Zellen erfolgte auf „Nunclon Delta Surface“-Zellkulturschalen, welche mit modifiziertem DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles Medium + fetal bovine serum (FBS)*) befüllt wurden. Konfluente Platten wurden im Abstand von 2-3 Tagen regelmäßig unter sterilen Bedingungen geteilt. Nach der Teilung wurden die Zellkulturen im 37° Celsius warmen Brutschrank (ThermoScientific, 5% CO₂) inkubiert. Die Herstellung des N1E-115 Nährmediums wurde gemäß folgendem Schema durchgeführt:

10 g DMEM-Pulver auflösen

+ 1,81 g Hepes
 + 2,52 g NaHCO₃
 + 25 ml MEM-non-essential amino acid solution 100x

→ pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen.
 + H₂O 900 ml, steril filtrieren+ 100 ml (FBS)

Für die weitere Versuchsdurchführung unter dem Konfokal-Mikroskop wurden die Zellen auf Glasplättchen in Nunclon Delta Surface MiniTrays (4 Kammern, 12mm, auch als *four-well* bezeichnet) kultiviert. Jede der vier Kammern wurde mit jeweils 500 µl DMEM und einem Zellbestand aus der o. g. Zellkultur aufgefüllt. Nach Lösung der Zellen von der Platte, wurden pro Kammer eines *four-wells* ca. 50.000 Zellen zu dem in der Kammer befindlichen 500µl DMEM pipettiert und die *four-wells* im Brutschrank für 24 Stunden inkubiert.

2.2.2. FACS (*fluorescence activated cell sorting*)

Fluorescence activated cell sorting (FACS) ist eine vielfältig eingesetzte Methode zur Bestimmung der Oberflächeneigenschaften von Zellen. Beim FACS werden die Zellen zunächst mit entsprechenden Fluorophor-gebundenen Ak markiert, welche das zu untersuchende Oberflächen-Antigen binden. Anschließend werden die markierten Zellen in Medium resuspendiert und einzeln durch eine Kapillare gesogen. Mittels entsprechender Laserstimulation können die fluoreszierenden Komponenten stimuliert und die markierten Oberflächenproteine detektiert werden.

In dieser Arbeit wurde FACS verwendet, um die Menge oberflächlich exprimierter M1-, M3- und M5-Rezeptoren zu detektieren und somit Rückschlüsse auf die Gleichmäßigkeit der Rezeptor-Expression zu schließen. Zu diesem Zweck wurden HA (Hämagglutinin)-gekoppelte mAChRs mit aufsteigenden DNA-Konzentrationen (10-2000ng) in N1E-Zellen transfiziert. Als Transfekt-Agens wurde Lipofectamine® 2000 verwendet.

Nach Transfektion der Rezeptor-DNA erfolgte die Fixierung der Zellen in 2% Formaldehyd/PBS-Lösung. Die fixierten Zellen wurden mit Anti-HA-Ak behandelt, welche sich gegen die HA-Domäne der mAChRs richtet. In einem zweiten Schritt folgte die Zugabe von Fluoreszenz-markierten-Ak (Markierung mit *quantum dots*), die gegen die F_c-Domänen der primär applizierten Anti-HA-Ak gerichtet sind. Die Ergebnisse der FACS-Messung sind im Ergebnisteil unter Kapitel 3.1. dargestellt.

2.2.3. Transfektion von Calciumsensor- und Rezeptor-DNA

Für die Transfektion wurde Lipofectamine® 2000 verwendet. Lipofectamine® enthält ultrafeine kationische Lipidkügelchen, welche die anionischen Bestandteile der DNA binden und aufgrund ihrer Lipophilität in der Lage sind, die negativ geladene DNA durch die ebenfalls negativ geladene Zellmembran zu schleusen. Die bis in den Zellkern transportierten DNA-Stränge werden transkribiert und anschließend von zellständigen Ribosomen abgelesen.

Die Transfektion erfolgte in zwei getrennten Ansätzen.

	25µl Opti-Mem
+	1 µg GcAMP-6s-DNA
+	1 µg mAChR-DNA
<hr style="border: 0.5px solid black;"/>	
	25µl Opti-Mem
+	2µl Lipofectamin (1µl/µg verwendeter DNA-Menge)

Beide Ansätze werden miteinander vermischt und für 30 Min. inkubiert. In dieser Zeit lagert sich die DNA an das Lipofectamin. Das Lipofectamin/DNA Gemisch wird anschließend mit 450µl Opti-Mem auf eine *four-well* Zellkultur pipettiert und über Nacht inkubiert. Opti-Mem ist für die Transfektion mit kationischen Lipiden (Lipofectamin) vorgesehen und enthält essentielle Nährstoffe für die Zellkultur (Prozedere nach Angaben des Herstellers).

Für co-transfizierte Zellen wird die pro Rezeptor verwendete DNA-Menge halbiert, um die Gesamtmenge an DNA im Vergleich zu den Einzel-Transfektionen gleich zu halten (s. Kapitel 3.1.; Abb. 14). Die Menge an Sensor-DNA und Lipofectamin bleiben unverändert.

2.2.4. Calcium-imaging

Die Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gelingt mithilfe des Calcium-Sensor-Proteins GCaMP-6s (Perry et al. 2015). Der Sensor besteht aus einem modifizierten GFP mit einer zusätzlichen Calmodulin-M13-Domäne. Das GFP ist ein fluoreszierendes Protein, welches erstmals in der Quallenart *Aequora victoria* entdeckt wurde und wenig später aus dieser isoliert werden konnte (Shimomura et al. 1962; Morise et al. 1974). Es wird durch blauwelliges Licht im Wellenlängenbereich von 395 bis 470 nm aktiviert und emittiert nach Anregung grünwelliges Licht. Seine Isolierung und Modifizierung ermöglichte die Entwicklung zahlreicher GFP-Varianten, die vielfältig in labortechnischen Untersuchungsmethoden (wie z. B. der Konfokal-Mikroskopie) eingesetzt werden konnten (Chalfie et al. 1994). Calmodulin wurde bereits in der Einleitung erwähnt und spielt als Ca^{2+} -Akzeptor eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion eukaryonter Zellen. M13 ist ein synthetisches Peptid, abgeleitet aus der Myosin-leichten-Ketten-Kinase, welche vom Calmodulin physiologischerweise gebunden und aktiviert wird (Ikura et al. 1992).

Für die Modifizierung der GFPs wurde zirkulär permutiertes GFP (cpGFP) verwendet, welches verbesserte Bindungs- und Fluorophoreigenschaften besitzt als seine unbehandelte Form. Nakai et al. stellten 2001 erstmals G-CaM-P vor, ein GFP-Molekül, modifiziert mit einer Calmodulin-M13-Domäne, welches eine deutlich gesteigerte Affinität zum Ca^{2+} im Vergleich mit bisherigen Versuchen der Calcium-Messung zeigen konnte. Für die Modifizierung wurde an das N-terminale Ende vom cpGFP das M13-Protein und an das C-terminale Ende das Calmodulin gebunden (Nakai et al. 2001). Die Calmodulin-Domäne besitzt vier Ca^{2+} -Bindungsstellen, welche nach Bindung eine Konformationsänderung des Ca^{2+} -Calmodulin-M13-Komplexes bewirken (Stevens 1983). Diese Konformationsänderung überträgt sich auf das gesamte Molekül und bewirkt eine Verbesserung der Fluoreszenz-Eigenschaften, in dem es die Protonierung des Fluorophors im regulären Zustand verhindert und in einen aktiveren Zustand versetzt (Akerboom et al. 2009).

Die Gabe von acetylcholinergen Liganden zu den Zellen löst nach Bindung an die mAChR o. g. Signalkaskade aus, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ansteigt. Je mehr Calcium durch Aktivierung der Signalkaskaden nach Rezeptorbindung in das Zellplasma gelangt, desto mehr GCaMP-6s wird in einen fluoreszierenden Zustand versetzt und umso intensiver ist die gemessene Fluoreszenz unter dem Mikroskop. Gemessen wird dementsprechend der relative Intensitätsanstieg der Fluoreszenz durch das Sensor-Protein nach ACh-Stimulation. Dieser relative Anstieg wird im folgenden Ergebnisteil an der y-Achse als ‚norm. Intensität‘ angezeigt.

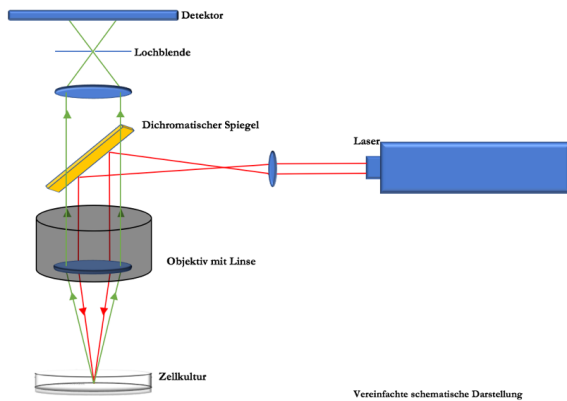


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Konfokal-Mikroskops mit dem Laserstrahlengang (rot), der stimulierten Fluoreszenz (grün) und einem dichroitischen Spiegel (orange).

Für die Messungen wurde das Konfokale-Laser-Scan-Mikroskop LSM 510 Meta der Marke Zeiss benutzt. Die Konfokale-Laser-Scan-Mikroskopie ermöglicht es, die Zellen mit dem Laser zu stimulieren und gleichzeitig die Fluoreszenz der Zellen auf einem Detektor abzubilden, ohne dass der Stimulationslaser ebenfalls auf den Detektor strahlt. Dies wird ermöglicht durch die Eigenschaften eines dichroitischen Spiegels (Abb. 4, orange). Der Aufbau eines konfokalen Mikroskops mit einem dichroitischen Spiegel führt dazu, dass der generierte Laserstrahl durch den Spiegel reflektiert und somit auf die Zellen gelenkt wird, gleichzeitig jedoch durchlässig für Wellenlängen im Bereich der von den Zellen ausgehenden Fluoreszenz ist. Der Strahlengang der Fluoreszenz wird durch eine Lochblende geführt und anschließend auf einem Detektor abgebildet.

Für die Beobachtung der Zellen unter dem Konfokalmikroskop wird eine speziell von der laboreigenen Werkstatt angefertigte Spannvorrichtung verwendet (s. Abb. 5). Diese ermöglicht das wasserdichte Einspannen der zellbeschichteten Glasplatten, um diese während der Messung in 450ml Opti-MEM zu lagern und somit das Überleben der Zellen während der Messung zu gewährleisten. Nach Betrachtung der Zellen durch ein Fluar 20x/0,75 UV-Objektiv



Abbildung 5: Spannvorrichtung für Glasplatten

erfolgte die Umschaltung auf die Stimulation der Fluoreszenz mittels Laser. Die Zellen wurden somit im ‚Acquisition‘-Modus des Aufnahmeprogramms ‚ZEN‘ abgebildet und scharf gestellt. Das zu untersuchende Areal wurde im 1,8s-Takt linear vom Laser abgefahren und eine

Momentaufnahme generiert. Die Aufnahmen erfolgten mit einer Pixelverweildauer von 2,51 μ s, einer Bildgröße von 635 μ m², einem Anregungslaser von 488 nm, einer Laserpower von 30 mW, einem Laser-Output von 25 % und einem Emissionsfilter von 505 nm bei einem Bildabstand von 1 s. Die ersten 30 Aufnahmen nach Beginn der Messung wurden als Referenzkurve aufgenommen, ab der 30. Aufnahme erfolgte die Applikation des Liganden (ACh).

Die von uns durchgeführten Versuche erfolgten mit Applikation von 50 μ l einer ACh-Lösung zu 450 μ l Opti-Mem in der Messchale. Die resultierende 1:10-Verdünnung ist die Konzentration, welche in den folgenden Abbildungen angegeben wird. Zellen wurden demnach mit Konzentrationen von 0,01 μ M bis 20 μ M ACh stimuliert.

Anhand der folgenden Abbildung wird der Ablauf der Messung und die entsprechende Reaktion der Rezeptoren auf das ACh deutlich.

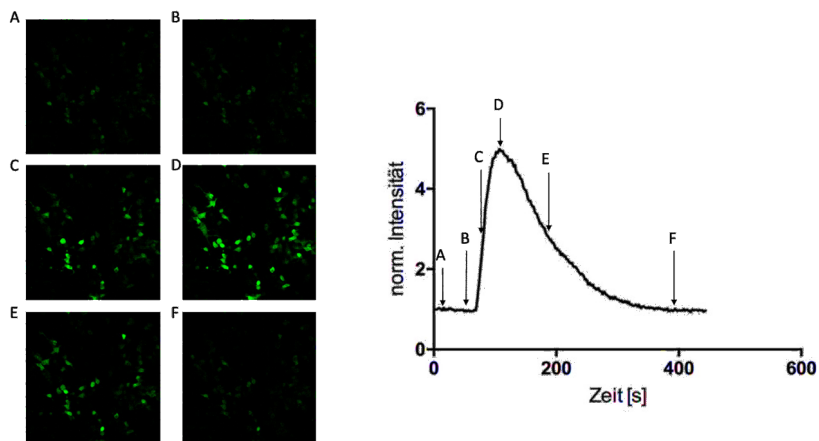


Abbildung 6: Beispiel der Darstellung des Calcium-imagings. Aufnahmen einer mit mAChR-M5 und GCaMP-6s transfizierten N1E-Zellkultur mit anschließender ACh-Stimulation. Die Bilder zeigen Momentaufnahmen der Messung: (A) nach 5 Aufnahmen, (B) nach 30 Aufnahmen mit anschließender ACh-Stimulation, (C) nach 45 Aufnahmen während Fluoreszenz-Anstieg, (D) nach 60 Aufnahmen am Peak, (E) nach 100 Aufnahmen im Abstieg und (F) beim Erreichen des Ausgangswertes nach 215 Aufnahmen.

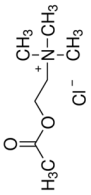
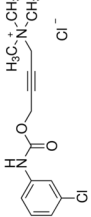
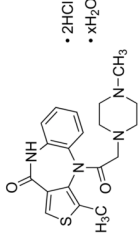
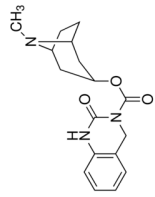
Zu Beginn der Versuchsreihe wurde mit verschiedenen ACh-Konzentrationen eine Dosis-Wirkungskurve erstellt, um die Konzentration zu ermitteln, mit der eine annähernd halbmaximale Rezeptorantwort erreicht werden kann. Die entsprechenden Abbildungen zu den mAChRs M1, M3, M5 finden sich im Kapitel 3.3.1. auf S. 41. Um potentielle Auswirkungen der Laserstimulation auf die Integrität der Zellen und des GCaMP-6s festzustellen, wurden Zellen nach Protokoll transfiziert und ohne Ligandenapplikation unter Laserstimulation beobachtet. Zusätzlich wurden zum Ausschluss eines Ca^{2+} -Signals endogener ACh-Rezeptoren Zellen lediglich mit

GCaMP-6s transfiziert und anschließend mit ACh stimuliert. Es zeigte sich, dass eine von uns genutzte Laserdauer von etwa 10 Minuten keinen messbaren Einfluss auf die Integrität des GCaMP-6s hat und dass eine Aktivierung endogener Rezeptoren zu keinem messbaren Anstieg des Ca^{2+} -Signals führt (Daten nicht gezeigt).

2.2.5. Agonisten/Antagonisten

Für die Stimulation co-exprimierter Rezeptoren mit Agonisten, oder deren Hemmung durch Antagonisten wurden spezifische Liganden der Firma Tocris verwendet.

Tabelle 9: Darstellung der mAChR-Agonisten/Antagonisten mit zugehöriger Strukturformel und CAS-Nr.

	mAChR-Agonist	M1-Agonist	M1-Antagonist	M3-Antagonist
Name	Acetylcholin-Chlorid	McN-A 343	Telenzepin dihydrochloride	DAU 5884 hydrochloride
Strukturformel				
CAS-Nr.	60-31-1	55-45-8	147416-96-4	131780-48-8

McN-A-343 (McN) ist ein erprobter und lange bekannter partieller Agonist aller 5 mAChRs mit höchster Affinität für den M1 und M4 mAChR (Mitchelson 2012). Telenzepin ist ein Derivat des Pirenzepin und wird als hochpotenter selektiver M1-Antagonist genutzt (Londong et al. 1987). DAU 5884 wird in der Literatur, sowie von der Firma Tocris als selektiver M3-mAChR Antagonist beschrieben (Gosens et al. 2004; Rinaldo und Hansel 2013).

Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung waren keine M5-Antagonisten oder M3-Agonisten verfügbar. Der M5-Antagonist VU0488130 war zu diesem Zeitpunkt bereits in einigen Studien erwähnt, jedoch noch nicht ausreichend erforscht und somit nicht geläufig erprobt.

Die Agonisten/Antagonisten wurden nach Herstellerangaben in H₂O gelöst und in verschiedenen Konzentrationen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit getestet. Die Erprobung des M1-Agonisten McN-A 343 erfolgte nach gleichem Schema wie Versuche mit ACh. Für Versuche mit Antagonisten waren, im Unterschied zur Versuchsreihe mit alleiniger ACh-Stimulation, während der Messung zwei Pipettierschritte nacheinander nötig. Im ersten Schritt wurden 50µl Antagonist-Lösung zu 400µl Opti-Mem nach 30 Aufnahmen (54 s) pipettiert. Anschließend erfolgte nach 70 Aufnahmen (126 s) die Gabe von 50µl ACh-Lösung in 450µl Lösung (1 µM) aus Schritt 1. Die im Ergebnisteil angegebenen Antagonisten-Konzentrationen wurden für 500µl Lösung festgelegt.

2.2.6. Auswertung

Die digitale Darstellung der Fluoreszenz-Intensität erfolgte mit dem Programm ZEN 2009, welches über eine Schnittstelle am Computer direkt mit dem Mikroskop verbunden wurde und somit eine live-Darstellung ermöglichte. Reagierende Zellen wurden mit ROIs (*region of interest*) markiert. Die Auswahl der ROIs erfolgte manuell vor Durchführung der Messung. In die Wertung genommen wurden reagierende Zellen, die sich zu Beginn der Messung in einem Bereich von 200 bis max. 2000 arbiträren Einheiten (a. E.) befinden. Zellen mit einer höheren Grundfluoreszenz oder einer während der Messung nicht mehr erfassbaren Fluoreszenz wurden nicht in die Messungen eingeschlossen.

Die Auswertung wurde mit Microsoft Excel durchgeführt. Für den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten zwischen ausgewählten ROIs wurde der relative Anstieg der Intensität im Vergleich zum Beginn der Messung berechnet. Zu diesem Zweck wurde für jede Zelle ein Mittelwert aus den Werten der ersten 20 Aufnahmen erstellt. Die ersten 30 Aufnahmen zeigen Werte ohne Zugabe von ACh. Der Mittelwert wird anschließend mit allen Fluoreszenzwerten dieser Zelle dividiert und somit der relative Anstieg der Fluoreszenz ermittelt. Die Werte können als Graphen dargestellt werden, vereinzelt stark abweichende Ausreißer wurden in der Messung ausgeklammert und in einer zweiten Tabelle abgespeichert.

Die Daten wurden in Graph Pad Prism 6 für Mac OS X eingefügt und ein Durchschnitts-Kurvenverlauf aus allen Zellreaktionen einer Messreihe mit $n = 25-30$ erstellt. N beschreibt die Anzahl der insgesamt abgebildeten ROIs, bzw. die Anzahl der in die Messung einbezogenen Zellen. Im Schnitt wurden für jeden abgebildeten Graphen Messungen von 2-3 verschiedenen Zellkulturen ausgewählt, an denen der identische Versuchsablauf erfolgt ist. Zur Abbildung der Graphen als Balkendiagramm wurde der Mittelwert mit Standardfehler ermittelt.

Um zwei Rezeptoren untereinander zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-U-Test mit einem festgelegten 95% Konfidenzintervall verwendet. Für den Vergleich von drei oder mehr Rezeptoren miteinander wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test ausgewertet. Dabei wird als Referenzgruppe stets der erste in der jeweiligen Graphik angezeigte Balken verwendet und die Funktion *multiple comparisons* angewandt. Die Signifikanz p wird über den verglichenen Balken angegeben. Für multiple Vergleiche im Kruskal-Wallis-Test wird die Gesamtsignifikanz über allen getesteten Balken sowie die jeweilige Signifikanz für jeden einzelnen Balken dargestellt.

$$p^{ns} > 0.05, p^* \leq 0.05, p^{**} \leq 0.01, p^{***} \leq 0.001, p^{****} \leq 0.0001.$$

Die Messungen wurden hinsichtlich ihrer maximalen Ca^{2+} -Ausschüttung (*peak*), ihrer Ca^{2+} -Signalstärke *area under the curve* (AUC), sowie ihrer Aktivierungskinetik *time to peak* (TTP) untersucht. Für die Auswertung der TTP wurde mit Microsoft Excel die Zeit bis zum Erreichen des Peaks für jede in der Messung berücksichtigte Zelle ermittelt und anschließend ein Mittelwert erstellt. Die AUC wurde im Graphik-Programm „Graph Pad Prism 6“ mit Festlegung einer Baseline von 1 (+/- 0,08) erstellt und als arbiträre Einheit (a.E.) angegeben.

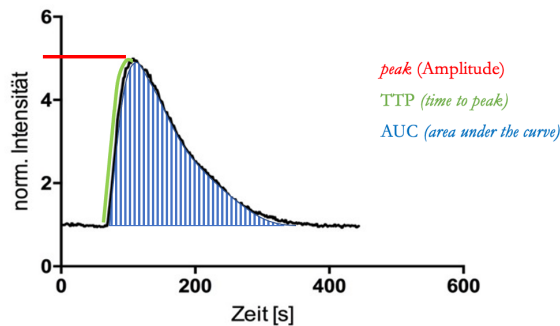


Abbildung 7: Beispiel einer Ca^{2+} -Signal-Auswertung von mAChR-transfizierten Zellen nach Stimulation mit ACh. Der *peak* (rote Horizontale) zeigt den höchsten durchschnittlichen Ca^{2+} -Messwert und beschreibt somit die Amplitude des Ca^{2+} -Signals. Zusammen mit der AUC kann er als Maßstab für die Stärke des Ca^{2+} -Signals verstanden werden. Die *area under the curve* (blaue Schraffur) beschreibt die Fläche unter der Kurve und spiegelt die Gesamtheit des ausgeschütteten Ca^{2+} und somit ein Maßstab der Ca^{2+} -Signalstärke wider. Die im Ergebnisteil verwendete Abkürzung a. E. steht für ‚arbiträre Einheit‘ und stellt die relative Einheit der mit dem Graphikprogramm errechneten Fläche unter dem Graphen dar. Die *time to peak* (grüne Kurve) steht für die Zeit vom Beginn des intrazellulären Ca^{2+} -Anstiegs bis zum Erreichen der höchsten Ca^{2+} -Konzentration (*peak*). Sie gibt Aufschluss über die Aktivierungskinetik der Rezeptoren.

2.2.7. Forcierte Dimerisierung

Bei der forcierten Dimerisierung handelt es sich um die erzwungene Anlagerung eines Rezeptor-gekoppelten *nanobody* an ein entsprechend als Antigen fungierendes Rezeptor-gekoppeltes *green fluorescent protein* (GFP). Dieses System der Kontrolle über Dimerisierung zweier Rezeptoren stellt eine neue Methode dar und wird in dieser Arbeit erstmalig von uns vorgestellt.

Die in dieser Doktorarbeit verwendeten NB weisen nach entsprechender Immunisierung eine Antigen-bindende Eigenschaft gegenüber dem GFP auf. GFP ist ein aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliertes Protein, welches nach Anregung durch blauwelliges oder ultraviolettes Licht eine fluoreszierende Eigenschaft aufweist. Es stellt eine sehr vielfältige und mittlerweile weit etablierte Methode der Fluoreszenzmarkierung von Proteinen dar. *Nanobodies* sind kleinste Antikörper-Fragmente, die aus tierischen Schwere-Kette-Antikörpern von Kameliden oder Haien gewonnen werden. Diese Tiere besitzen Antikörper (Ak), die im Gegensatz zu den menschlichen nur aus einer Schwere-Kette bestehen und ihr Antigen (Ag) mittels ihrer variablen Domäne binden (V_{HH}). Nach Immunisierung der erwähnten Tierspezies mit ausgewählten Antigenen können die Antikörper von den Tieren extrahiert und die monomere variable Ag-bindende Domäne isoliert werden (s. Abb. 8). Diese variable Domäne stellt mit einer Molekülmasse von etwa 15 kDa die bisher kleinste isolierbare antigenbindende Einheit dar und wird als *nanobody* bezeichnet (Muyldermans 2001; Rothbauer et al. 2006).

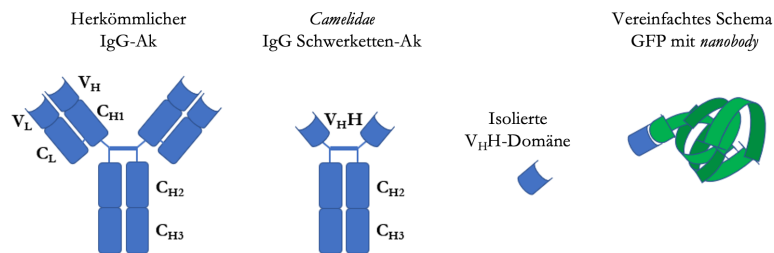


Abbildung 8: Menschlicher IgG-Antikörper (links), IgG-Antikörper aus der Klasse der Camelidae, z. B. Alpaccas (mittig links), isoliertes V_{HH} -Fragment des Kamelid-Ak (mittig rechts), gebunden an sein Antigen, z. B. GFP (rechts); modifiziert nach Rothbauer et al. (2006).

Die Bindung zwischen NB und GFP wurde genutzt, um eine erzwungene Dimerisierung zweier Rezeptoren zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden mittels Klonierung neue mAChR-Populationen entworfen. Eine der mAChR-Populationen beinhaltet Rezeptor-DNA, welche mit

GFP-DNA fusioniert wurde, während in einer weiteren Population Rezeptor-DNA mit NB(Anti-GFP)-DNA fusioniert wurde.

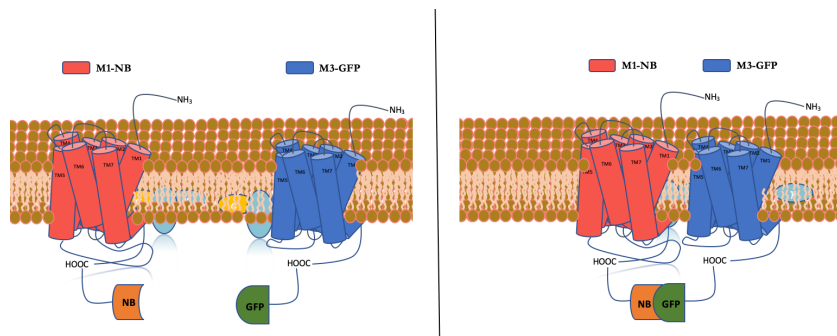


Abbildung 9: Links; schematische Darstellung einer Zellmembran mit einem frei liegendem NB-gekoppeltem (orange) M1-mAChR (rot) und GFP-gekoppeltem (grün) M3-mAChR (blau). Rechts; schematische Darstellung einer Zellmembran mit forcierte Dimerisierung zwischen NB-M1-mAChR und GFP-M3-mAChR.

Die exprimierten Rezeptor-Klone besitzen dementsprechend eine funktionelle Rezeptoreinheit mit einem jeweils zugehörigem GFP oder einem gegen dieses GFP gerichteten NB. Die Bindung von NB an GFP führt zu einer erzwungenen räumlichen Anlagerung der beiden exprimierten Rezeptor-Klone, die im Folgenden als ‚forcierte Dimerisierung‘ bezeichnet wird. Die Erstellung der Rezeptor-Klone wird im Kapitel 2.2.8. erläutert.

2.2.8. Klonierung

Unter Klonierung werden in der Biologie Methoden verstanden, welche die identische Reproduktion von DNA ermöglichen. Zumeist geschieht dies mithilfe von Vektoren, die gewünschte DNA-Konstrukte in Bakterienzellen einschleusen, wo diese vielfach exprimiert werden können. Führt man diese Methode weiter aus, können während der Insertion in den Klonierungsvektor verschiedene DNA-Fragmente miteinander fusioniert werden. Das Resultat ist die Entstehung zweier miteinander gekoppelter Proteine. Dieses Verfahren wurde in dieser Arbeit genutzt, um GFP- und NB-gekoppelte mAChRs zu erstellen.

Als rezeptorständiges Antigen wurde bewusst ein fluoreszierendes Protein (GFP) ausgewählt, um im Anschluss an die Klonierung mittels der FRAP-Methode die Rate an Dimeren und somit den Erfolg der Ag-Ak-Bindung überprüfen zu können. FRAP ist eine vielfach verwendete Methode, welche es ermöglicht, Rückschlüsse auf die relative Größe von fluoreszenzmarkierten Proteinen (z. B. GFP-mAChRs) innerhalb der Zellmembran zu ziehen. Das genaue Prinzip der FRAP-Methode wird in Kapitel 2.2.9. detailliert erläutert (s.S. 34). Die Ausgangsplasmide, die

für die drei mAChRs codieren, wurden vom cDNA Resource Center (cDNA.org) der Bloomberg University in Pennsylvania, USA bezogen. Dabei waren alle drei cDNAs in den Vektor pcDNA3.1(+) kloniert und mit einem N-terminalen 3xHA-tag versehen. Die Sequenz der GFP-DNA ist in der GenDatenbank unter der ID NC_013179 aufgelistet. Für den Ursprung der (Anti-GFP)-NB DNA s. (Rothbauer et al. 2008).

Für die Entwicklung der o. g. GFP/NB-mAChR Konstrukte wird ein Verfahren zur effizienten Zusammenlagerung verschiedener DNA-Fragmente benötigt. Das von Daniel G. Gibson et al. entwickelte *Gibson Assembly* stellt eine solche Methode zur schnellen und effizienten Zusammenlagerung von mehreren DNA-Konstrukten dar (Gibson et al. 2009).

Die Fusion zweier mittels *Gibson Assembly* erstellten DNA-Konstrukte und ihre anschließende Transformation mittels eines Plasmids als Vektor erfolgte in kompetenten E.coli-Zellen.

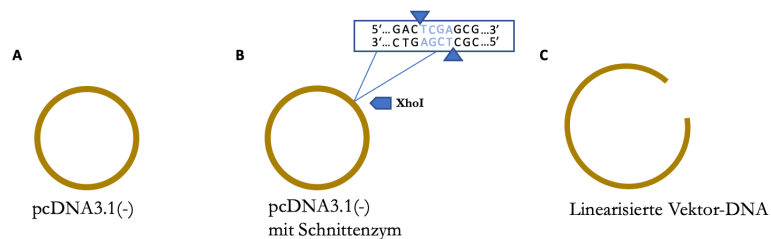


Abbildung 10: Vektor pcDNA3.1(-) in zirkulärer Form (A), Aufpaltung des Vektors mit XhoI (B), linearisierter Vektor (C)

Für die Transformation der gewünschten DNA in kompetente E-Coli-Bakterien wurde der Vektor pcDNA3.1(-) verwendet (Abb. 10 A). Um den Einbau der Ziel-DNA in den Vektor zu gewährleisten, wird das zirkulär angeordnete Plasmid zunächst mithilfe des Schnittenzym XhoI linearisiert bzw. aufgespalten (Vektor-Verdau, Abb. 10 B). Eine Rezirkularisierung des linearisierten Vektors wird durch Dephosphorylierung der beiden Enden mittels Applikation von *Antartic Phosphatase* (NEB) verhindert (Abb. 10 C).

Um eine Anlagerung der beiden zu fusionierenden DNA-Konstrukte, wie z. B. M1-mAChR-DNA und GFP-DNA sowohl untereinander als auch an den linearisierten Vektor (Abb. 10 C), zu gewährleisten, ist vor der Durchführung der *assembly reaction* zunächst die Verlängerung der Konstrukt-DNA um überlappende DNA-Sequenzen erforderlich (Abb. 11, gestreifter Anteil). Für diesen Zweck wurden Primer definiert, welche jeweils aus zwei überlappenden Sequenzen

bestehen. Eine Sequenz überlappt das zu bindende Ende der Konstrukt-DNA (Abb. 11 **A**, ungestreifter Anteil im Primer), das andere überlappt das Ende der Ziel-DNA (gestreifter Anteil im Primer).

- 1ng Konstrukt-DNA (z. B. M1 oder GFP)
- 2µl *forward* Primer
- 2µl *reverse* Primer
- 2µl dNTPs
- 10 µl 5x One Taq Polymerase Puffer
- 0,5 µl Polymerase
- Rest (32,5 µl) H₂O

= 50µl

Die Konzentrationen der resultierenden Konstrukte mit ihren überlappenden Sequenzen werden mithilfe eines Spektralphotometers gemessen und für die anschließende *HiFi-Assembly-Reaction* verwendet. Die Durchführung der *HiFi-Assembly-Reaction* orientiert sich an den Vorgaben durch die Firma NEB (NEBuilder HiFi).

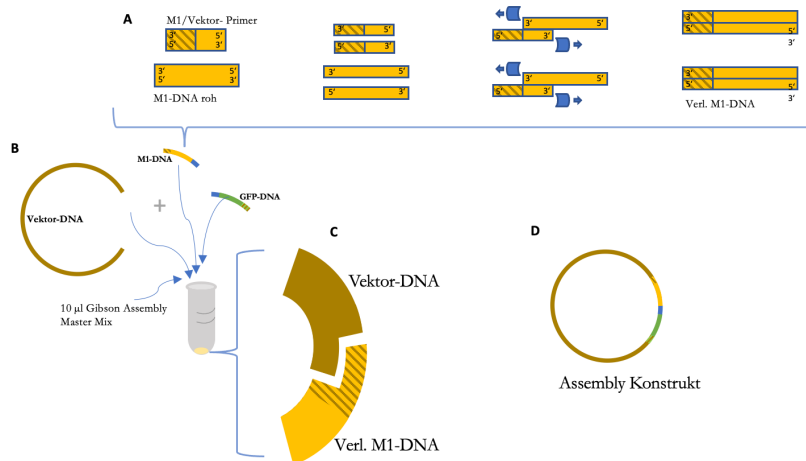


Abbildung 11: Herstellung amplifizierter Konstrukt-DNA mit überlappenden Enden mittels PCR u. spezifischen Primern (**A**), *Gibson Assembly reaction* mit linearisiertem Vektor und amplifizierter Konstrukt-DNA, zusammengefügt in Eppendorf-Tube mit 10µl *Gibson Assembly Master Mix* (**B**), Ausschnitt der *Assembly reaction*, Gelb = M1-mAChR-DNA, Braun = Rezeptor-DNA, gestreift = überlappende Sequenz (**C**), *Assembly* Produkt mit fusionierten Konstrukten im Vektor (**D**)

Für die *Assembly reaction* werden laut dem Manual 0,2 pMol des verlängerten Konstrukts und 0,1 pMol vom Vektor (pcDNA3.1(-)) benötigt. Mit der Formel $pMol = \frac{ng \times 1000}{bp \times 650 \text{ Dalton}}$ lässt sich

die benötigte Menge in ng errechnen, (Bp = Basenpaare). Die entsprechende Menge wird mit 10 µl *Gibson Assembly Master Mix* (2x) gemischt. Der Rest wird mit deionisiertem Wasser aufgefüllt, bis das Gemisch 20 µl misst. Anschließend erfolgt die Inkubation im Thermocycler bei 50 °C für eine Stunde ohne Schütteln. Die in dem *Assembly Master Mix* enthaltenen Komponenten (5'-3'-Exonuklease, DNA-Polymerase, Ligase) sorgen für eine Anlagerung und Verschmelzung der überlappenden DNA-Fragmente (s. Abb. 11 D).

Folgende Primer wurden für das *Gibson Assembly* eingesetzt:

Tabelle 10: Darstellung der für das Gibson-Assembly verwendeten Primer mit Bezeichnung und Basenabfolge

Primer	Basenabfolge
M1_Nanobody_for	GCACTCCCTCCCGCCAATGCGTGCAGCTGGTGAATCTGG
pcDNA_M1_NB_rev	CCAGATTCCACCAGCTGCACGCATTGGCGGGAGGGAG
pcDNA_M1_NB_for	CACAAGTGACCGTGTCCAGCTGACTCGAGTCTAGAGGG
M1_Nanobody_rev	GGCCCTCTAGACTCGAGTCAGCTGGACACGGTCACTTGT
M1_GFP_for	GCACTCCCTCCCGCCAATGCATGGTGAGCAAGGGCGAG
pcDNA_M1_GFP_rev	TCCTCGCCCTTGCTCACCATGCATTGGCGGGAGGGAG
pcDNA_M1_GFP_for	GGCCCTCTAGACTCGAGTCATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
M1_GFP_rev	TGGACGAGCTGTACAAGTAATGACTCGAGTCTAGAGGGCC
M3_Nanobody_for	GCGCACCCGAGCAGGCCTTGGTGCAGCTGGTGAATCT
pcDNA_M3_NB_rev	CCAGATTCCACCAGCTGCACCAAGGCCTGCTCGGGTG
pcDNA_M3_NB_for	CACAAGTGACCGTGTCCAGCTAGTCTAGAGGGCCCGTTAAACCC
M3_Nanobody_rev	TAAACGGGCCCTCTAGACTAGCTGGACACGGTCACTTG
M3_GFP_for	GCGCACCCGAGCAGGCCTTGATGGTGAGCAAGGGCGAG
pcDNA_M3_GFP_rev	TCCTCGCCCTTGCTCACCATCAAGGCCTGCTCGGGTG
pcDNA_M3_GFP_for	TAAACGGGCCCTCTAGACTATTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
M3_GFP_rev	TGGACGAGCTGTACAAGTAATAGTCTAGAGGGCCCGTTAAAC- CCGCT
M5_Nanobody_for	AGGGGAACAGCAAGCTACCCGTGCAGCTGGTGAATCTGGC

pcDNA_M5_NB_rev	CCAGATTCCACCAGCTGCACGGGTAGCTTGCTGTTCCCCT
pcDNA_M5_NB_for	CACAAGTGACCGTGTCCAGCTGACTCGAGTCTAGAGGGCC
M5_Nanobody_rev	GGCCCTCTAGACTCGAGTCAGCTGGACACGGTCACTTGT
Primer	Basenabfolge
M5_GFP_for	AGGGGAACAGCAAGCTACCCATGGTGAGCAAGGGCGAG
pcDNA_M5_GFP_rev	TCCTCGCCCTTGCTCACCATGGGTAGCTTGCTGTTCCCC
pcDNA_M5_GFP_for	GGCCCTCTAGACTCGAGTCATTACTGTACAGCTCGTCCATGCC
M5_GFP_rev	TGGACGAGCTGTACAAGTAATGACTCGAGTCTAGAGGGCC

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung, sowie die gesonderte Extrahierung der mittels PCR synthetisierten Konstrukt-DNA von weiteren Bestandteilen der PCR (Puffer, Polymerase, Nukleotide etc.). Weiterhin kann sie zur groben Bestimmung der Basengröße der klonierten Konstrukte und somit zur Überprüfung des PCR-Erfolgs herangezogen werden.

Herstellung des Gels:

- 25 g Agarose
- + 250 ml TAE-Puffer 1x
 - 20 ml TAE (Tris Acetate-EDTA Puffer) 50x + 980 ml H₂O → TAE-Puffer 1x

Erhitzen bis zur vollständigen Auflösung.

Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid.

Gemisch in Elektrophorese-Becken gießen und aushärten lassen.

Die amplifizierte DNA aus der PCR wurde mit einem Farbstoff markiert („DNA Gel Loading Dye (6X)“), in die vorgesehenen Elektrophoresetaschen pipettiert und die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht. Für die Bestimmung der Konstruktgröße wurde ein DNA-Größenstandard (*quick load ladder*) mitgeführt. Die entsprechenden Banden wurden anschließend mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel geschnitten und mithilfe des Gel-Aufreinigungs-Kits „Wizard SV Gel and PCR Clean-up System“ aufgereinigt. Das Aufreinigungs-Kit enthält Komponenten, welche die Auflösung des Agarose-Gels unter Schonung der DNA und eine Trennung der DNA vom Gel ermöglichen. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden entsprechend des angegebenen Manuals durchgeführt.

Die Transformation der klonierten Vektor-DNA in kompetente Bakterienstämme ermöglicht die effiziente Amplifikation der eingeschleusten Konstrukt-DNA. Diese Methode bietet dank

bakterieneigener Korrekturenzyme, besonders bei großen DNA-Mengen, einen Vorteil gegenüber der Amplifikation mittels PCR. Für die Transformation wurden 5-alpha kompetente *E. coli* (NEB #C2987) der Firma NEB verwendet und alle Schritte nach dem NEB-Protokoll durchgeführt. Im letzten Schritt wurden die kompetenten Bakterien auf *lysogeny broth* (LB)-Agar-Platten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

pcDNA3.1(-) besitzt ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Die Agarplatten, auf denen die kompetenten *E. coli*-Bakterien wachsen, enthalten Ampicillin und gewährleisten das Absterben aller Bakterien ohne Vektor. Das Antibiotikum-Resistenz-Gen kann nur als zirkulärer Vektor abgelesen werden. Somit konnte gewährleistet werden, dass überlebende Bakterienkolonien den Vektor in sich aufgenommen hatten und in der Lage waren, diesen abzulesen. Die inkubierten Platten wurden am Folgetag auf Koloniewachstum überprüft.

Die Kolonie-PCR ermöglicht die Überprüfung der mittels *Gibson Assembly* erstellten Konstrukt-DNA. Zu diesem Zweck wird im Anschluss an das *Gibson Assembly* die gewünschte Konstrukt-DNA mittels Primer amplifiziert und die Größe anhand der Basenpaare (Bp) in einer folgenden Gelelektrophorese grob bestimmt. Bei erfolgreicher Fusion sollte das Konstrukt in der Gelelektrophorese in etwa der Bp-Größe der beiden einzelnen DNA-Komponenten entsprechen. Nach erfolgter Transformation wird eine der Bakterien-Kolonien auf der Agarplatte mit einer Pipettenspitze gepickt und mit 10 µl DNase freiem H₂O versetzt. 5 µl dieser Bakterienlösung werden für die Kolonie-PCR genutzt und die Konstrukt-DNA in einer 2kb-PCR amplifiziert.

5 µl Bakterienkolonie +	
1 µl Primer 1	
1 µl Primer 2	
1 µl dNTPs	
0,2 µl One-Taq Polymerase	
2 µl Polymerase Puffer	
9,8 µl DNase freies H ₂ O	
= 20 µl	

Die übrigen 5 µl der o. g. Bakterienlösung können für die Amplifikation der Bakterienkolonie in einer Schüttel-Kultur verwendet werden. Die darin enthaltenen Bakterien wurden in Zentrifugenröhrchen mit 5 ml LB-Medium (+Ampicillin 1000:1) versetzt und im Inkubationsschüttler bei 140 UpM, 37 °C über Nacht inkubiert. Die weitere Isolierung der erwünschten DNA erfolgte nach dem Protokoll der Maxi Prep Plasmid DNA Purification (Thermo Fisher Scientific Inc.).

Im Anschluss erfolgten die Verdünnung der aufgereinigten DNA mit H₂O im Verhältnis 1000:1 und die Konzentrationsbestimmung im Photometer bei 260 nm Extinktionswellenlänge. Als Referenzwert diente deionisiertes H₂O. Die aufgereinigten DNA-Konstrukte wurden im Anschluss von der Firma Microsynth SeqLab (Göttingen, D) sequenziert.

Um sicherzugehen, dass die Rezeptor-DNA nach der Klonierung weiterhin für funktionierende Rezeptorproteine codiert, wurden die mit Rezeptor-GFP- oder Rezeptor-NB-DNA transfizierten N1E-Zellen unter dem Konfokal-Mikroskop mit ACh stimuliert und das Ca²⁺-Signal mit der Rezeptorantwort nativer mAChRs im Calcium-imaging verglichen. Abbildung 20 auf S. 45 zeigt am Beispiel vom M5-mAChR, dass das Ca²⁺-Signal klonierter Rezeptoren nahezu identisch zum Ca²⁺-Signal nativer mAChRs ist.

2.2.9. FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*)

FRAP ist eine Methode aus der Zellbiologie und Biophysik, um das Diffusionsverhalten bestimmter Proteine in einem Medium zu beobachten. Häufig, so wie auch in diesem Fall, handelt es sich dabei um die Bewegung von Proteinen in einer fluiden Membran. Das Prinzip des FRAP basiert auf der Markierung des zu untersuchenden Proteins (z. B. mAChRs) mit einem fluoreszierenden Marker (z. B. GFP, CFP, YFP etc.). Dabei kann es sich um einen Antikörper gebundenen oder direkt mit dem Rezeptor gekoppelten Fluoreszenzmarker handeln. Die Erstellung der GFP-mAChR-Konstrukte mittels Klonierung ermöglichte die Erfassung der Fluoreszenz des GFP-gekoppelten Rezeptors an der Zelloberfläche mit dem *laser-scanning-microscope*. Im Anschluss wird während der Messung ein ausgewählter Bereich der fokussierten Zellmembran durch einen hochenergetischen Laserimpuls gebleicht (*bleaching*). Durch das Bleichen, bzw. durch den Laserimpuls, wird die Struktur der GFP-Proteine irreversibel geschädigt, wodurch sie ihre fluoreszierende Eigenschaft verlieren (Deschout et al. 2014). Unabhängig vom Prozess des Bleichens stellen die Rezeptoren gemäß der Brown'schen Molekularbewegung keine statischen Objekte dar, sondern bewegen sich lateral in der fluiden Membran. Um das gebleichte Areal liegende Rezeptoren mit intakten GFPs diffundieren mit der Zeit in das gebleichte Feld und führen zu Erholung der abgefallenen Fluoreszenz (*recovery time*).

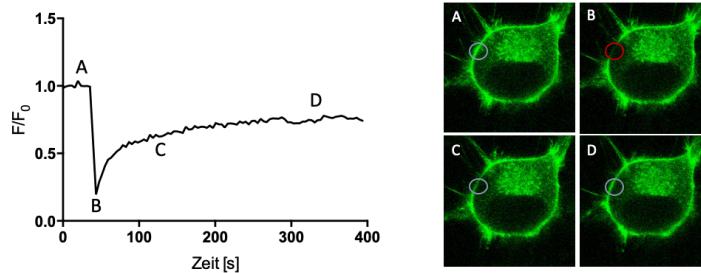


Abbildung 12: Schematische Darstellung einer FRAP-Messung. Abgebildet ist die Dauer der Messung in Sekunden [s] gegen die Fluoreszenz. Diese ergibt sich als Quotient aus der gemessenen Fluoreszenz F gegen die Grundfluoreszenz F_0 (A). Die Buchstaben zeigen Abschnitte der Messung im Verlauf: Auswahl der ROIs auf der Zellmembran, Ablichtung einer Grundfluoreszenz (A). Setzen des Laserimpulses (rot) und Messung des initialen Fluoreszenzabfalls (B). Erholung der Fluoreszenz durch laterale Diffusion der Membran-Proteine (C), Plateauphase der Fluoreszenzerholung bei etwa 70-80% des Ausgangswertes (D).

Die benötigte Zeit ist abhängig von der Größe der Teilchen und maßgeblich für die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten (D). Der D berechnet sich anhand der Erholungskinetik der jeweiligen Teilchen, welche in $t_{1/2}$ angegeben wird, also der Zeit, nach welcher die Fluoreszenz die Hälfte des Ausgangswertes erreicht hat. Je größer die diffundierenden Teilchen, desto langsamer kehrt die Fluoreszenz zum Ausgangswert zurück und umso kleiner ist der Diffusionskoeffizient. Der D weist demnach eine negative Korrelation zur Molekülgröße auf, wodurch sich anhand der Messung auf die Größe des untersuchten Rezeptors schließen lässt. Liegen Rezeptoren als Dimere vor, haben sie demnach einen niedrigeren D als Monomere.

Zur Versuchsdurchführung wurden N1E-Zellen ausschließlich mit GFP-mAChR DNA transfiziert. Pro Messung wurden bis zu 4 ROIs mit einem Radius von $2 \mu\text{m}$ auf der Zellmembran festgelegt, in denen die Fluoreszenz gemessen und nach 10 Bildern der Laserimpuls gesetzt wurde. Die Messungen erfolgten unter dem LSM-Mikroskop mit einem C-Apochromat 63x/1.2 W corr Objektiv (Zoom 4,1x, Pixelverweildauer $1,6 \mu\text{s}$, Bildgröße $34,78 \times 34,78 \mu\text{m}$, Anregungswellenlänge 488 nm , 0,4% Laserpower, LP 505 Filter, Pinhole $106 \mu\text{m}$, Scan time $3,93 \text{ s}$, keine Intervalle zwischen Messungen). Nach 10 Aufnahmen erfolgte das Bleichen mit 100 % Laserstärke. Darauf folgten etwa 100 weitere Aufnahmen, um die Erholung der Fluoreszenz zu messen.

Für die Auswertung der Messung wurde das Ende des Bleichimpulses mit $X = 0$ festgelegt. Die resultierenden Kurven zeigen einen exponentiellen Anstieg der Fluoreszenzerholung. Mithilfe des Graphikprogramms wurde für jeden Rezeptor die Intensität bei der Hälfte der Endfluoreszenz ermittelt, welche dann als Halbwertszeit $t_{1/2}$ angegeben wird. Anhand der vereinfachten

Formel nach Soumpasis kann bei konstanten Rahmenbedingungen (T (Temperatur), η (dynamische Viskosität des Lösungsmittels) und r (Radius der ROI)) somit der Diffusionskoeffizient der getesteten Rezeptoren errechnet werden (Soumpasis 1983):

$$D = 0,224 \times \frac{r^2}{t_{1/2}}$$

Formel 1: Berechnung des Diffusionskoeffizienten nach Soumpasis. 0,224 = empirisch ermittelte Konstante. r = Radius der ROI; $t_{1/2}$ = Zeit nach Bleichimpuls ab $X=0$, bis zum Erreichen der halben Grundfluoreszenz; Bei konstantem r hängt D von $t_{1/2}$ ab.

Um zu zeigen, dass das Bleichen zu einer irreversiblen und nicht temporären Schädigung der Fluorophore führt, wurde der Bleichimpuls ebenfalls an mit DPBS und PFA fixierten Zellen durchgeführt. Hier zeigte sich an mit Rezeptor-GFP transfizierten und anschließend fixierten N1E-Zellen kein reversibler Fluoreszenzanstieg (Daten nicht gezeigt).

Die drei mAChRs M1, M3 und M5 weisen eine starke Sequenzhomologie in ihrer DNA-Sequenz untereinander auf (Kruse et al. 2012). Unterschiede in der Molekülstruktur und folglich auch im hämodynamischen Durchmesser der Rezeptoren sind vernachlässigbar gering und ermöglichen somit den Vergleich der Rezeptoren und ihrer Diffusionskoeffizienten untereinander. Unter stabilen Rahmenbedingungen können die FRAP-Ergebnisse hinsichtlich unterschiedlicher Diffusionskoeffizienten zwischen den Rezeptoren bzw. Rezeptorpaaren auf das Vorliegen der Rezeptoren als Monomer, Dimer oder Oligomer interpretiert werden.

3. Ergebnisse

Der folgende Ergebnisteil geht der Frage nach, ob mAChRs untereinander Dimere bilden und wenn ja, welchen Effekt die Dimerisierung auf die den Rezeptoren nachgeschaltete zelluläre Signalkaskade haben kann. Zunächst soll anhand der Ergebnisse der FACS-Messungen dargestellt werden, ob und wie die mAChRs an der Zelloberfläche von Neuroblastomzellen nach Einzel- und Co-Expression der Rezeptoren verteilt sind. Anschließend soll anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen von verschiedenen fluoreszierenden Proteinen die Bindung des NB an das GFP nachgewiesen werden. Nach Darstellung dieser grundlegenden Experimente fokussiert sich der Ergebnisteil auf die eigentliche Fragestellung der Arbeit, mit Darstellung der Ergebnisse des Calcium-*imaging*s von einzeln- sowie co-transfizierten Zellen. Dabei werden Ergebnisse von forcierten und unforcierten Rezeptorkonstrukten nebeneinander dargestellt und miteinander verglichen. Abschließend werden die Ergebnisse der Agonisten/Antagonisten-Messungen co-transfizierter Zellen präsentiert. Der M1-mAChR wird in den folgenden Graphiken vereinfacht als ‚M1‘, der M3-mAChR als ‚M3‘ und der M5-mAChR als ‚M5‘ bezeichnet.

Für eine gute Lesbarkeit der Ergebnisse, wird sowohl im Ergebnisteil als auch in der Diskussion folgendes Farbschema angewandt: Messwerte des M1-Rezeptors werden in rot, des M3-Rezeptors in blau und des M5-Rezeptors in grün dargestellt. Werden zwei Rezeptoren co-exprimiert, so sind die Messwerte als Streifenmuster der jeweiligen Farben dargestellt. Eine Unterscheidung zwischen co-exprimierten und forciert co-exprimierten Rezeptoren ist an der Beschriftung verdeutlicht und wird zusätzlich an dem spiegelverkehrten Streifenmuster erkennbar gemacht. Forcierte Dimere werden als ‚Rezeptor + Rezeptor forc.‘ abgekürzt. Wurden andere Pharmaka als das standardmäßig verwendete Acetylcholin verwendet, oder zusätzlich eine zuvor applizierte Antagonisten-Lösung verwendet, so wird in der Abbildung darauf hingewiesen.

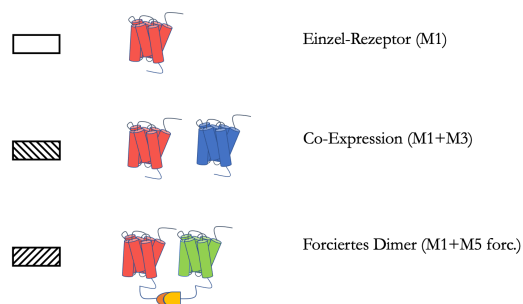


Abbildung 13: Angewandtes Farbschema: M1-mAChR in rot, M3-mAChR in blau und M5-mAChR in grün. Die Balken der einzeln transfizierten Rezeptoren werden ohne Musterung dargestellt. Die Balken der co-transfizierten und forciert co-transfizierten Rezeptoren werden anhand gegenläufiger Streifenmuster unterschieden.

3.1. Linearität zwischen Transfektion und Rezeptorexpression in N1E-Zellen

Ein wesentlicher Bestandteil der Arbeit stellt die Co-Expression zweier Rezeptoren innerhalb einer Zelle dar. Um eine korrekte Interpretation der Ergebnisse co-transfizierter Rezeptoren zu gewährleisten, sollte sichergestellt sein, dass beide Rezeptoren in annähernd äquimolarer Menge an der Zelloberfläche exprimiert sind. Dies wurde mittels FACS überprüft (s. Kapitel 2.2.2. S. 19). Nach Transfektion aufsteigend hoher DNA-Mengen in N1E-Zellen wurden diese anschließend in einem Durchflusszytometer hinsichtlich ihrer Rezeptordichte an der Zelloberfläche analysiert, wobei übliche Anregungs- und Emissions-Filter genutzt wurden.

Die folgende Abbildung zeigt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie und stellt somit das Verhältnis zwischen transfizierter DNA-Menge und der gemessenen Fluoreszenzintensität dar.

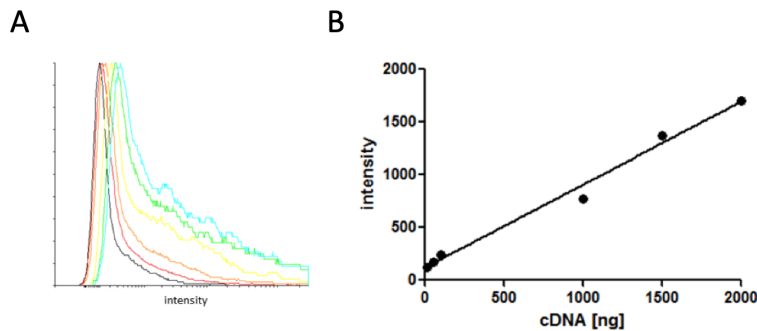


Abbildung 14: (A) zeigt ein FACS-Histogramm an mit M1-mAChR transfizierten N1E-Zellen. Die x-Achse stellt die Fluoreszenzintensität eines Kanals bei einer Emissionswellenlänge von 655 nm dar, während die y-Achse die normierte Anzahl erfasster Ereignisse für die jeweilige Intensität aufzeigt. Die Intensität ist als Äquivalent für die Menge an rezeptorgebundenen *quantum dots* zu verstehen. Für die FACS-Messungen wurden ansteigende cDNA-Mengen transfiziert, was sich im Histogramm anhand verschiedener Farben der Kurvenverläufe darstellt. Es zeigte sich eine mit steigender cDNA höhere Intensität in der FACS, was in der Graphik (B) als Dotplot-Diagramm verdeutlicht wird. Die steigenden cDNA-Mengen [ng] sind gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen und weisen einen proportionalen Anstieg auf.

Die Ergebnisse der FACS-Messung konnten zeigen, dass mit zunehmender Menge an transfizierter mAChR-DNA die Anzahl der oberflächlich exprimierten Rezeptoren linear steigt (Abb. 14 B). Diese Linearität erlaubt es, eine definierte Menge an zu transfizierender DNA zu bestimmen, welche nicht im Bereich einer Sättigung liegt. Für die folgenden Versuche wurde eine Konzentration von 1 μg cDNA verwendet.

In einer zweiten Versuchsreihe der FACS-Messungen wurde die oberflächlich exprimierte Menge eines jeweiligen Rezeptors bei Co-Expression gemessen, um das Verhältnis beider Re-

zeptoren auf der Zelloberfläche darzustellen. Dabei wurden eine Gesamtkonzentration an Rezeptor-DNA von 1 μg beibehalten und somit 0,5 μg eines mAChR mit 0,5 μg eines anderen mAChR transfiziert. Warum diese Methode der Co-Transfizierung mit Beibehaltung der Gesamtkonzentration sich in dieser Arbeit durchgesetzt hat, wird in der Diskussion im Kapitel 4.5 diskutiert.

Die verwendeten Ak-gebundenen Fluorophore (*quantum dots*) besitzen unterschiedliche physikalische Eigenschaften, wie beispielsweise in ihrer Intensität oder dem *quantum yield*. Daher ist ein direkter Vergleich zwischen zwei verschiedenen Fluorophoren nicht aussagekräftig und eine Co-Transfektion zweier Rezeptoren in einer Zelle mit Bindung von Sekundär-Ak unterschiedlicher Fluorophore demnach nicht möglich. Stattdessen erfolgte die Aufteilung in zwei Messabschnitte mit äquimolarer DNA-Menge der beiden co-transfizierten Rezeptoren. Zunächst wurden co-transfizierte Zellen mit spezifischen Primär-Ak gegen einen der beiden Rezeptoren und anschließend mit einem fluorophorgebundenen zweiten Ak behandelt. In einer zweiten Messung wurden für die gleiche Rezeptorkonstellation ein Primär-Ak für den jeweils anderen Rezeptor und der gleiche zuvor genutzte fluorophorgebundene Ak zu den Zellen gegeben. Die beiden FACS-Histogramme wurden anschließend übereinandergelegt und miteinander verglichen.

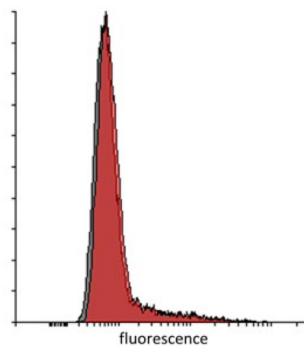


Abbildung 15: Die Abb. zeigt ein FACS-Histogramm an mit M1- und M3-transfizierten N1E-Zellen. Die x-Achse stellt die Fluoreszenzintensität eines Kanals bei einer Emissionswellenlänge von 655 nm dar, während die y-Achse die normierte Anzahl erfasster Ereignisse für die jeweilige Intensität aufzeigt. Die Intensität ist als Äquivalent für die Menge an rezeptorgebundenen *quantum dots* zu verstehen. Die Kurven zu den Rezeptoren wurden jeweils einzeln ermittelt und anschließend in dieser Abbildung übereinander gelegt. Die Kurven sind fast symmetrisch überlappend, womit von einer annähernd gleichen Konzentration oberflächlich exprimierter Rezeptoren ausgegangen werden kann.

Mithilfe der FACS-Messungen lässt sich zeigen, dass die Transfizierung bestimmter DNA-Mengen in einer stabilen Rezeptor-Expressionsrate resultiert (s. Abb. 14). Weiterhin konnte mittels dieser Messmethode gezeigt werden, dass bei Co-Expression zweier mAChRs annähernd gleich viele Rezeptoren beider Subtypen oberflächlich exprimiert sind (s. Abb. 15).

3.2. Nachweis forcierter Dimere

Die Ausbildung forcierter Dimere zwischen den erstellten Konstrukten ist ein zentraler Bestandteil dieser Arbeit. Im Folgenden wurde daher getestet, ob es nach Transfektion der Konstrukte wie erwartet zu einer forcierter Anlagerung des GFP- an das NB kommt. Für den Nachweis einer Antikörper-Antigen-Bindung zwischen GFP und NB wurde zunächst die DNA einiger freier fluoreszierender Proteine (CFP/GFP/YFP/RFP) in Zellen transfiziert und dessen Fluoreszenz erfasst. Somit soll gezeigt werden, dass die Ag-Bindung des NB auch gegen Ag-Strukturen verwandter Fluoreszenzproteine gerichtet ist. *Cyan fluorescent protein* (CFP), *yellow fluorescent protein* (YFP) und *red fluorescent protein* (RFP) sind wie das GFP fluoreszierende Proteine, mit einem vom GFP abweichendem Fluoreszenzspektrum. YFP und CFP sind modifizierte Varianten des bereits erwähnten GFP (Heim und Tsien 1996). Bei RFP handelt es sich um ein weiteres aus Korallen isoliertes Fluorophor (Bevis und Glick 2002).

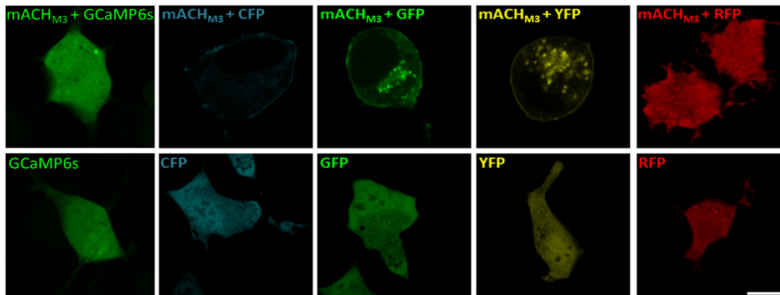


Abbildung 16: Die Bilder wurden auf einem konfokalen Zeiss LSM 501 im Meta-modus bei 63facher Vergrößerung aufgenommen. Nach Transfektion von CFP/GFP/YFP/RFP-DNA (untere Reihe) und mACH-M3-NB-DNA + GCaMP6s/CFP/GFP/YFP/RFP-DNA (obere Reihe) erfolgte die Durchführung der Messung mit folgenden fluorophorspezifischen Einstellungen: *Excitation with 458 nm laser line for CFP, 488 nm for GFP and GCaMP6s, 514 nm for YFP and 543 nm for RFP. Emission recorded from 470 to 490 nm for CFP, 500 to 520 nm for GFP and GCaMP6s, 520 to 540 nm for YFP and 600 to 660 nm for RFP.* Der Maßbalken misst 10 μm .

Die fluoreszierenden Proteine verteilen sich in allen getesteten Fällen homogen in der Zelle (s. Abb. 16 untere Reihe). In einem anschließenden Versuch wurden Zellen mit der DNA der Fluorophore sowie der klonierten M3-mAChR-NB-Konstrukte transfiziert (Abb. 16, obere Bildreihe). CFP, GFP und YFP zeigen durch Ag-Ak-Bindung eine Akkumulation von fluoreszierenden Partikeln an der Zellmembran und an Zellorganellen (GFP, YFP). Die Aufnahmen mit Rezeptor-NB und RFP zeigten hingegen keine eindeutige Akkumulation. Beim RFP handelt es sich um ein eigenständiges, aus der Korallenart *Discosoma* isoliertes und somit strukturell unterschiedliches Protein, wodurch sich die Bindungsunfähigkeit an den NB bzw. Ak erklären lässt (Matz et al. 1999). Die Versuchsergebnisse zeigen, dass der rezeptorgebundene NB das GFP bindet und an die Oberfläche bzw. zum Ort der höchsten Rezeptor-NB-Konzentration zieht.

3.3. Einzeltransfektion von M1-, M3- oder M5-mAChRs; Homodimere im Vergleich

3.3.1. Wirkungsbereich der mAChRs M1, M3 und M5 für ACh

Die folgende Versuchsreihe diente dem Zweck, den Wirkungsbereich des applizierten ACh auf die mAChRs in N1E-Zellen darzustellen und eine mittlere Stimulationskonzentration zu ermitteln, mit welcher die Folgeversuche durchgeführt werden.

Die drei für uns relevanten mAChRs wurden mit unterschiedlichen ACh-Konzentrationen von 0,01 μM – 20 μM ACh stimuliert und die Antwort der intrazellulären Signalkaskade mittels des Calcium-*imaging* gemessen.

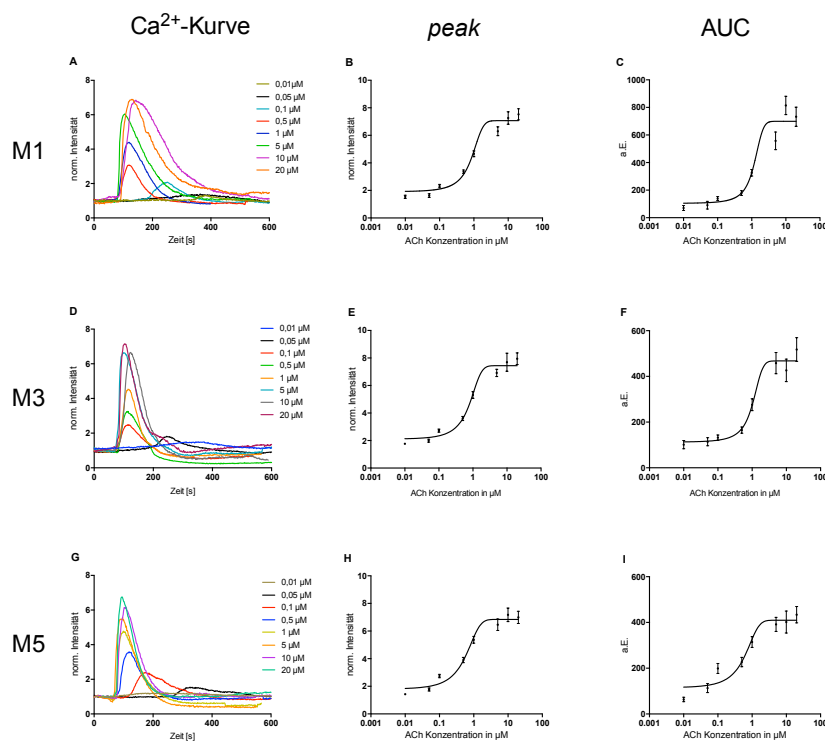


Abbildung 17: M1-, M3-, M5-mAChR einzeln transfizierte Zellen. In der linken Spalte wird das Ca²⁺-Signal der einzeln transfizierten Rezeptoren in Form von normierten Fluoreszenzwerten gegen die Dauer der Messung dargestellt (A, D, G). Die mittlere Spalte mit den Abb. B, E und H zeigt die *peaks* (Amplitude) des jeweiligen Rezeptors in norm. Intensität für aufsteigende ACh-Konzentrationen. Die AUC wird in der rechten Spalte in arbiträren Einheiten (a. E.) gegen aufsteigende ACh-Konzentrationen in den Abb. C, F und I dargestellt. Gezeigt wird der Mittelpunkt jeder Konzentration mit Standardfehler in logarithmischer Auftragung.

Die Stärke des Ca^{2+} -Signals wird mit der *area under the curve* (AUC) und dem *peak* dargestellt. Die AUC entspricht der innerhalb einer Messung freigesetzten Gesamtmenge an Ca^{2+} , während der *peak* die maximale Ca^{2+} -Konzentration während einer Messung widerspiegelt. Im Folgenden wird aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit die AUC als alleiniges Äquivalent für die Stärke des Ca^{2+} -Signals dargestellt.

Die AUC sowie die Amplituden (*peak*) der drei mAChRs zeigen bei logarithmischer Auftragung einen sigmoidalen Kurvenverlauf. Eine Konzentration von $1 \mu\text{M}$ ACh löst für alle drei Rezeptoren eine etwa halbmaximale Reaktion im Bereich des Umschlagpunktes aus und wird somit in Folgeversuchen als Standardkonzentration verwendet. Die Stimulationskurven aller drei mAChRs (Abb. 17 **A, D, G**) zeigen, dass bei Anstieg der verabreichten ACh-Konzentration die Zeit bis zum Erreichen des *peak* geringer wird. Mit steigender Konzentration des Liganden werden eine entsprechend höhere Anzahl an Rezeptoren in kurzer Zeit aktiviert.

Die Kurven des Ca^{2+} -Signals für M3- und M5-transfizierte Zellen fallen weisen eine geringere AUC auf (Abb. 17 **D, F, G, I**) als M1-transfizierte Zellen (Abb. 17, **A, C**). Generell lässt sich beobachten, dass die drei verglichenen mAChRs eine durchaus ähnliche Aktivierungskinetik mit vergleichbarem Ca^{2+} -Signal aufweisen. Die Tatsache, dass eine Konzentration von $1 \mu\text{M}$ ACh für die drei mAChRs eine ähnlich starke Ca^{2+} -Antwort auslöst, lässt bei co-exprimierten Rezeptoren eine gute Vergleichbarkeit der Rezeptoren untereinander zu. Da die drei Rezeptoren fast identische Bindestellen besitzen (s. Kapitel 1.1., S. 2ff), entsprechen diese Ergebnisse den Erwartungen.

3.3.2. Dimerisierungsrate in M1-, M3-, M5-transfizierten N1E-Zellen

Im Folgenden werden die Diffusionskoeffizienten (D) der drei Rezeptoren miteinander verglichen und im direkten Vergleich zu GFP/NB-Konstrukten gezeigt. Rezeptor-GFP-/Rezeptor-NB-Konstrukte wurden in Zellen co-transfiziert und führten bei gemeinsamer Expression zu einer forcierten Dimerisierung der beiden Rezeptor-Konstrukte.

Je größer die diffundierenden Teilchen (z. B. forcierte Dimere im Vergleich zu Monomeren), desto langsamer kehrt die in der FRAP gemessene Fluoreszenz zum Ausgangswert zurück und umso kleiner ist der Diffusionskoeffizient (s. Kapitel 2.2.9., S. 34ff). Oligomere Strukturen weisen demnach einen kleineren D auf als Monomere, wodurch Rückschlüsse auf die Rate an Dimeren gezogen und das Konzept der forcierten Dimerisierung überprüft werden konnte.

hat formatiert: Schriftart: Kursiv

Im Vorfeld der FRAP-Messungen mit den mAChRs, wurden FRAP-Messungen an CD28 und CD86 durchgeführt, von denen bekannt ist, dass sie als obligatorische Dimere bzw. Monomere vorkommen. CD86 ist ein auf B-Zellen und Makrophagen exprimiertes, als obligatorisches Monomer vorliegendes, Transmembranprotein, welches bei der Regulation der Immunantwort als Signaltransduktor eine wesentliche Rolle spielt (Zhang et al. 2003). CD28 wird von einem Großteil der CD4 und CD8 positiven T-Zellen exprimiert und weist eine durch Disulfidbrücken ausgebaut streng dimere Struktur auf (Ledbetter und Linsley 1998). Fluoreszenzmarkierte CD86- und CD28-Rezeptoren wurden in N1E-Zellen transfiziert und ihr FRAP-Signal ermittelt.

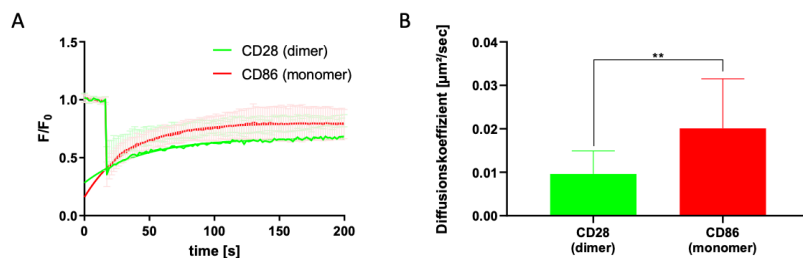


Abbildung 18: (A) zeigt die Ergebnisse der FRAP-Messung mit CD28 und CD86 transfizierten Zellen als Liniendiagramm. Abgebildet ist die Dauer der Messung in Sekunden [s] gegen die Fluoreszenz. Diese ergibt sich als Quotient aus der gemessenen Fluoreszenz F gegen die Grundfluoreszenz F_0 . (B) zeigt die aus der FRAP-Messung (A) berechneten Diffusionskoeffizienten in $\mu\text{m}^2/\text{sec}$ im Vergleich. CD28: $0,009276 \pm 0,005317$; CD86: $0,01839 \pm 0,01140$; $p^{**} = 0,0089$. Die Graphen für CD28 sind grün und für CD86 rot markiert.

Anhand der Ergebnisse der FRAP-Messung aus Abb. 18 zeigt sich eindeutiger Unterschied zwischen dem D der dimeren CD28- und monomeren CD86-Rezeptoren. Bei CD 28 und CD 86 handelt es sich um Zytokinrezeptoren mit einer Transmembrandomäne. Da es sich bei den mAChRs um 7TM-Rezeptoren handelt, kann ein numerischer Vergleich der Diffusionskoeffizienten untereinander nicht vorgenommen werden. Die Ergebnisse der FRAP-Messung mit CD28 und CD86 zeigen jedoch, dass diese Methode eine Unterscheidung zwischen Zellen mit hohem Anteil oberflächlich exprimierter Mono- bzw. Dimeren erlaubt.

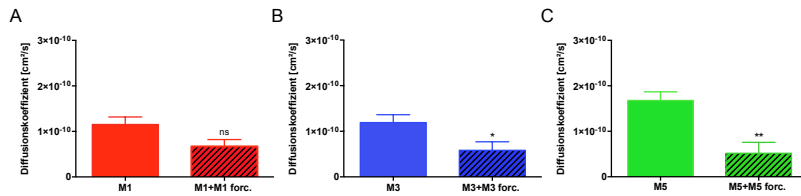


Abbildung 19: Ergebnisse der FRAP-Messungen mit Einzel-Rezeptor transfizierten Zellen. M1 wird in rot (A), M3 in blau (B) und M5 in grün (C) dargestellt. Forcierte Konstrukte sind schräg schraffiert dargestellt. Gezeigt ist der Diffusionskoeffizient in cm^2/s . Die Fehlerbalken geben den Mittelwert mit Standardfehler an. Mann-Whitney-U-Test mit $p^* \leq 0.05$, $p^{**} \leq 0.01$.

In Abbildung 19 sind die Ergebnisse der FRAP-Messungen unforciert und forciert exprimierter mit M1-, M3- und M5-mAChRs dargestellt. Forcierte Dimere des M1-mAChR zeigten einen D von $0.6695 \times 10^{-10} \pm 0.1518 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, $n = 15$, während unforcierte M1-mAChR einen nahezu doppelt so hohen D von $1.153 \times 10^{-10} \pm 0.1640 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, $n = 28$ aufwiesen ($p = 0.0605$, Abb. 19 A). Ähnlich verhielt es sich für forcierte Dimere des M3-mAChR, welche mit einem D von $0.5822 \times 10^{-10} \pm 0.1887 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, $n = 16$ etwa die Hälfte des D unforcierter M3-mAChR von $1.190 \times 10^{-10} \pm 0.1729 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, $n = 18$ ausmachten ($p^* = 0.0122$, Abb. 19 B). Unforcierte M5-mAChR wiesen im Vergleich zu M1 und M3 mit einem D von $1.679 \times 10^{-10} \pm 0.1886 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, $n = 10$ höhere Werte auf, während sich die forcierten M5-mAChR ähnlich wie M1 und M3 mit einem D von $0.5176 \times 10^{-10} \pm 0.2385 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, $n = 6$ ähnlich stark von den Werten unforcierter Rezeptoren abgrenzten ($p^{**} = 0.0044$, Abb. 19 C).

Die forcierten mAChR zeigten im Vergleich zu den unforcierten für alle drei Rezeptoren eine deutliche Reduzierung des Diffusionskoeffizienten. Damit lässt sich zeigen, dass die Co-Transfektion von GFP- und NB-gebundenen Rezeptoren zu einer höheren Rate an Dimeren führt. Der M5-mAChR scheint einen höheren Anteil an monomeren Rezeptoren zu besitzen als M1 und M3.

3.3.3. Ca^{2+} -Signal in M1-, M3-, M5-transfizierten N1E-Zellen

Zuvor konnte mit der Kopplung von Rezeptor-GFP und Rezeptor-NB ein Verfahren aufgezeigt werden, mit welchem Dimerisierung kontrolliert werden kann. Daher soll im folgenden Schritt der Einfluss der Dimerisierung auf das zelluläre Ca^{2+} -Signal untersucht werden.

Die folgende Versuchsreihe beschäftigt sich mit der Frage, ob forcierte Homodimerisierung eines mAChR Auswirkungen auf die Signalkaskade (*signalling*) des getesteten Rezeptors hat. Im Mittelpunkt standen dabei die Ca^{2+} -Signalstärke (AUC) und die Aktivierungskinetik (TTP) der untersuchten mAChRs.

Für diese Fragestellung wurden bereits durchgeführte Versuche mit nativen M1-, M3- und M5-Rezeptoren (s. Kapitel 3.3.1., S. 41f) mit Messungen verglichen, in denen die Zellen Rezeptor-GFP und Rezeptor-NB an der Zelloberfläche exprimieren. Die Stimulation erfolgte mit $1 \mu\text{M}$ ACh-Konzentration. Die GFP- und NB-Rezeptorkonstrukte wurden hinsichtlich ihres Ca^{2+} -Signals untersucht und mit nativen mAChRs verglichen, um einen Einfluss der Klonierung auf das Ca^{2+} -Signal auszuschließen. Im Folgenden soll dies anhand eines Beispiels mit dem M5-mAChR gezeigt werden.

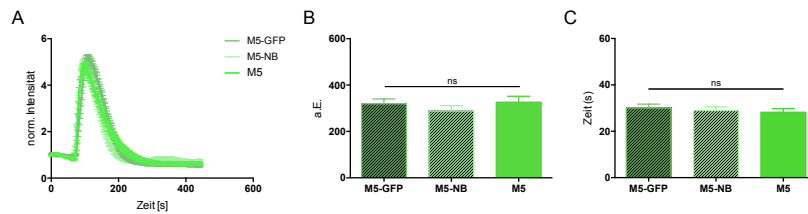


Abbildung 20: Ergebnisse des Calcium-imagings für M5 in grün, für M5-GFP in Dunkelgrün-schraffiert und für M5-NB in hellgrün schraffiert dargestellt. **A** zeigt die Kurven der Ca^{2+} -Antwort auf eine $1 \mu\text{M}$ ACh-Stimulation, während **B** die AUC (*area under the curve*) und **C** die TTP (*time to peak*) dieser Kurven abbilden. Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an. Kruskal-Wallis-Test mit $p^{ns} > 0.05$.

Es zeigte sich am Beispiel von M5 kein Einfluss der Rezeptor-Klonierung auf die Ca^{2+} -Signalstärke (Abb. 20 **B**; $p = 0.3991$, $\text{AUC}_{\text{M5-GFP}} = 319,6 \pm 20.57$ a. E., $n = 35$; $\text{AUC}_{\text{M5-NB}} = 288.0 \pm 23.47$ a. E., $n = 33$; $\text{AUC}_{\text{M5}} = 326.2 \pm 25.61$ a. E., $n = 33$), sowie auf die Aktivierungskinetik (Abb. 20 **C**; $p = 0.5910$, $\text{TTP}_{\text{M5-GFP}} = 30,09 \pm 1.616$ s, $n = 37$; $\text{TTP}_{\text{M5-NB}} = 28.97 \pm 1.541$ s, $n = 33$; $\text{TTP}_{\text{M5}} = 28.22 \pm 1.565$ s) der mAChRs.

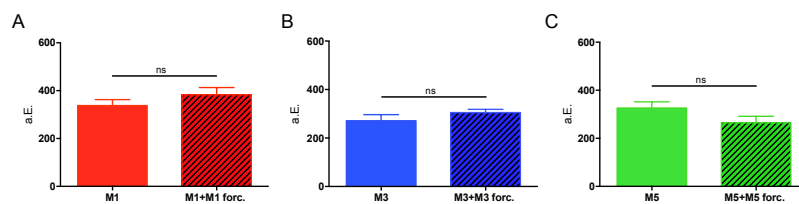


Abbildung 21: Ergebnisse des Calcium-imagings mit Einzel-Rezeptor transfizierten Zellen. M1 in rot (**A**), M3 in blau (**B**) und M5 in grün (**C**) dargestellt. Gezeigt ist die Ca^{2+} -Signalstärke als AUC der jeweiligen Rezeptoren bei einer $1 \mu\text{M}$ ACh-Stimulation. Forcierte GFP+NB-Konstrukte sind schräg schraffiert dargestellt. Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an. Mann-Whitney-U-Test mit $p^{ns} > 0.05$.

Abbildung 21 stellt die Ca^{2+} -Signalstärke zwischen unforcierter und forcierter Expression eines mAChRs für M1, M3 und M5 dar. Forcierte Homodimere des M1-mAChR zeigen keinen signifikanten Unterschied zu unforcierter M1-mAChR (Abb. 21 **A**; $p = 0.1768$, $\text{AUC}_{\text{M1+M1 forc.}} =$

382.6 ± 30.40 a. E., $n = 25$; $AUC_{M1} = 337.9 \pm 24.67$ a. E., $n = 42$). Ebenso verhält es sich für den M3-mAChR (Abb. 21 **B**; $p = 0.05$, $AUC_{M3+M3 \text{ forc.}} = 304.8 \pm 13.50$ a. E., $n = 53$; $AUC_{M3} = 271.1 \pm 25.31$ a. E., $n = 39$) sowie für den M5-mAChR (Abb. 21 **C**; $p = 0.0874$, $AUC_{M5+M5 \text{ forc.}} = 264.3 \pm 27.40$ a. E., $n = 22$; $AUC_{M5} = 326.2 \pm 25.61$ a. E., $n = 33$).

Die AUC der drei Rezeptoren war für unforcierte Messungen etwa gleich hoch, was eine Vergleichbarkeit der Rezeptoren untereinander ermöglicht. Die forcierten Dimere von M1, M3 und M5 zeigen für die AUC keine statistisch signifikanten Abweichungen von den einzeln transfizierten Rezeptoren bei Stimulation mit $1 \mu\text{M}$ ACh.

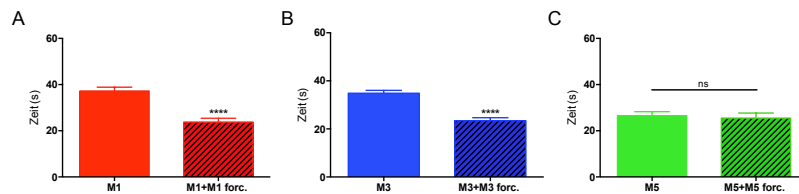


Abbildung 22: Ergebnisse des Calcium-imagings mit Einzel-Rezeptor transfizierten Zellen. M1 in rot (A), M3 in blau (B) und M5 in grün (C) dargestellt. Gezeigt ist die Aktivierungskinetik (TTP) der jeweiligen Rezeptoren bei einer $1 \mu\text{M}$ ACh-Stimulation. Forcierte GFP+NB-Konstrukte sind schräg schraffiert dargestellt. Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an. Mann-Whitney-U-Test mit $p^{ns} > 0.05$, $p^{****} \leq 0.0001$

In der Abbildung 22 wird die Aktivierungskinetik unforzierter mAChRs mit der von forcierten Homodimeren verglichen. Forcierte Homodimere des M1-mAChR führen deutlich schneller zum Ca^{2+} -Peak als unforcierte M1-mAChR (Abb. 22 **A**; $p < 0.0001$, $TTP_{M1+M1 \text{ forc.}} = 23.77 \pm 1.649$ s, $n = 25$; $TTP_{M1} = 37.22 \pm 1.640$ s, $n = 43$). Ebenso verhält es sich für forcierte Homodimere des M3-mAChR (Abb. 22 **B**; $p < 0.0001$, $TTP_{M3+M3 \text{ forc.}} = 23.41 \pm 1.249$ s, $n = 50$; $TTP_{M3} = 34.83 \pm 1.211$ s, $n = 37$). Unforcierte M5-mAChR führen schneller zum Ca^{2+} -Peak als M1 und M3 (Abb. 22 **A, B, C**; $TTP_{M5} = 26.48 \pm 1.799$ s, $n = 34$). Die Aktivierungskinetik forcierte M5-Homodimere unterscheiden sich statistisch nicht signifikant von der unforcierte M5-mAChR (Abb. 22 **C**, $p = 0.8315$, $TTP_{M5 \text{ forc.}} = 25.47 \pm 2.228$ s, $n = 22$). Zusammengefasst führt die forcierte Homodimerisierung der M1- und M3-mAChRs zu einer verkürzten TTP, während unforcierte M5-mAChRs bereits eine Aktivierungskinetik aufweisen, welcher der von forcierten M1 und M3 Homodimeren entspricht.

3.4. Co-Transfektion von M1-, M3- und M5-mAChRs; Heterodimere im Vergleich

Im zuvor dargestellten Abschnitt ergab sich unter der forcierten Homodimerisierung kein Unterschied hinsichtlich der intrazellulären Ca^{2+} -Signalantwort. Im Folgenden sollte daher weiterführend die Co-Transfektion von zwei der drei mAChRs M1, M3, M5 hinsichtlich der Ca^{2+} -Signalantwort und der Dimerisierungsrate untersucht werden.

Zum einen wird überprüft, ob die Co-Transfektion von zwei der drei mAChRs M1, M3, M5 zu einer Veränderung der Ca^{2+} -Signalantwort und/oder der Dimerisierungsrate führt. Zum anderen ist vom Interesse, welchen Einfluss die forcierte Dimerisierung der beiden co-transfizierten Rezeptoren auf das Ca^{2+} -signalling hat.

In den folgenden Abbildungen werden die Ergebnisse der Co-Transfizierung im Vergleich zu den forcierten und den Einzel-Transfizierungen dargestellt.

3.4.1. Dimerisierungsrate in M1+M3-, M1+M5-, M3+M5-co-transfizierten N1E-Zellen

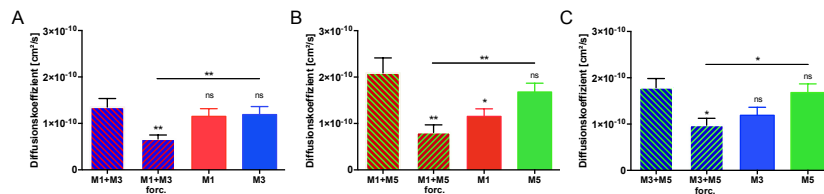


Abbildung 23: Ergebnisse der FRAP-Messungen co-transfizierter Rezeptoren. M1 wird in rot, M3 in blau, M5 in grün und Co-Transfektionen als Schraffur dargestellt. Forcierte Rezeptorpaare sind schraffiert angezeigt. Die Abbildungen zeigen die jeweiligen Diffusionskoeffizienten D (in cm^2/s) der Rezeptorkombinationen M1 und M3 (A), M1 und M5 (B) und M3 und M5 (C). Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an. Kruskal-Wallis-Test mit $p^* \leq 0.05$, $p^{**} \leq 0.01$.

In Abbildung 23 werden die Diffusionskoeffizienten von forcierten im Vergleich zu unforcierten mAChRs von M1+M3- (A), M1+M5- (B) und M3+M5- (C) co-transfizierten Zellen dargestellt. Die Mittelwerte der einzeln exprimierten Rezeptoren sind der Abb. 20 zu entnehmen. Für die Co-Transfektion von M1- und M3-mAChR zeigt sich mit $p^{**} = 0.0075$ eine statistisch signifikante Abweichung des D in forcierten Heterodimeren (Abb. 23 A; $\text{Dif}_{\text{M1+M3}} = 1.351 \times 10^{-10} \pm 0.1845 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, $n = 19$; $\text{Dif}_{\text{M1+M3 forciert}} = 0.6630 \times 10^{-10} \pm 0.08847 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, $n = 31$). Eine ähnlich starke Abweichung zeigen die forcierten Heterodimere co-transfizierter M1- und M5-mAChR mit $p^{**} = 0.0023$ (Abb. 23 B; $\text{Dif}_{\text{M1+M5}} = 1.711 \times 10^{-10} \pm 0.1680 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, $n = 35$; $\text{Dif}_{\text{M1+M5 forciert}} = 0.8080 \times 10^{-10} \pm 0.1639 \times 10^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, $n = 13$). Auch die forcierten Heterodimere co-transfizierter

hat gelöscht: en

M3+M5-mAChR zeigen eine statistisch signifikante Abweichung von unforcierten Co-Transfektionen (Abb. 23 C, $p^* = 0.0104$; $\text{Dif}_{\text{M3+M5}} = 1.787e^{-10} \pm 0.1951e^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, $n = 20$; $\text{Dif}_{\text{M3+M5 forc.}} = 0.9751e^{-10} \pm 0.1505e^{-10} \text{ cm}^2/\text{s}$, $n = 13$).

Die dargestellten Ergebnisse wiesen einen signifikant niedrigeren Diffusionskoeffizienten bei forcierten Heterodimeren im Vergleich zu unforciert co-exprimierten Rezeptoren auf. Es kann demnach von einer höheren Rate an Dimeren ausgegangen werden.

Co-transfizierte M1- und M3-mAChR wiesen einen ähnlich hohen D auf wie die einzeln transfizierten Rezeptoren und wichen statistisch nicht signifikant voneinander ab (Abb. 23 A, $p^{ns} > 0.05$, s. Abb. 19 zum Vergleich). Die Rate an Dimeren war dementsprechend in der Co-Transfektion ähnlich hoch wie für beide einzeln transfizierten Rezeptoren. Für die weiteren Rezeptorkombinationen M1+M5 und M3+M5 zeigte sich der D der co-exprimierten Rezeptoren äquivalent zum D des M5-Rezeptors, während Ergebnisse des anderen Rezeptorpartners einen deutlich niedrigeren Wert aufwiesen (Abb. 23 A, B, $p^* \leq 0.05$, s. Abb. 19 zum Vergleich).

hat gelöscht: r

3.4.2. Ca^{2+} -Signal in M1+M3-, M1+M5-, M3+M5-co-transfizierten N1E-Zellen

Im Folgenden wurde die Auswirkung forciert und unforciert Co-Expression der mAChRs auf die zelluläre Ca^{2+} -Signalstärke (AUC) sowie die Aktivierungskinetik (TTP) untersucht.

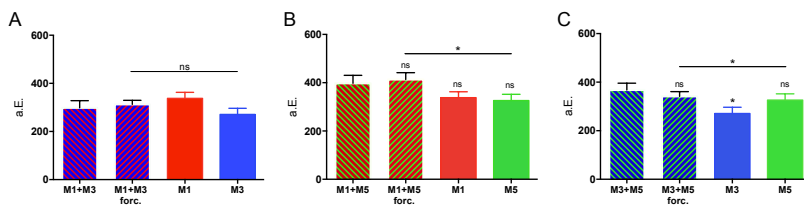


Abbildung 24: Ergebnisse des Calcium-imagings co-transfizierter Rezeptoren. M1 wird in rot, M3 in blau, M5 in grün und Co-Transfektionen als Schraffur dargestellt. Forcierte Rezeptorpaare sind schräg schraffiert dargestellt. Gezeigt ist die Ca^{2+} -Signalstärke als AUC in arbiträrer Einheit (a.E.) bei einer $1 \mu\text{M}$ ACh-Stimulation für die Rezeptorkombinationen M1 und M3 (A), M1 und M5 (B) und M3 und M5 (C). Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an. Kruskal-Wallis-Test mit $p^{ns} > 0.05$, $p^* \leq 0.05$.

In Abbildung 24 wird der Vergleich der Ca^{2+} -Signalstärke (AUC) zwischen forciert und unforciert co-exprimierten sowie unforciert co- und einzeln exprimierten mAChRs dargestellt. Die Mittelwerte der einzeln exprimierten Rezeptoren sind der Abb. 22 zu entnehmen.

Sowohl forciert als auch unforciert co-exprimierte M1+M3-Rezeptorpaare wiesen eine AUC zwischen den beiden Mittelwerten der einzeln exprimierten mAChR M1 und M3 auf. Es zeigte sich keine statistisch signifikante Abweichung der Balken von einander (Abb. 24 A; $p^{ns} = 0.1170$; $\text{AUC}_{\text{M1+M3}} = 298.3 \pm 30.02$ a. E., $n = 28$; $\text{AUC}_{\text{M1+M3 forc.}} = 312.9 \pm 16.74$ a. E., $n = 55$).

Die Mittelwerte forcierter und unforcierter Rezeptorpaare co-exprimierter M1+M5 mAChR wiesen eine nahezu identisch hohe AUC auf und lagen beide über den Mittelwerten der einzeln exprimierten Rezeptoren. Somit wiesen sie ein statistisch gering signifikantes, leicht stärkeres Ca^{2+} -Signal als singular exprimierte M1- und M5-mAChR auf (Abb. 24 B; $p^* = 0.0473$; $\text{AUC}_{\text{M1+M5}} = 397.5 \pm 32.87$ a. E., $n = 30$; $\text{AUC}_{\text{M1+M5 forc.}} = 413,3 \pm 28,20$ a. E., $n = 27$).

Forciert und unforciert exprimierte M3+M5 Rezeptorpaare wiesen ebenfalls ähnlich hohe Mittelwerte für die AUC auf und gleichen damit der Signalantwort des M5-mAChR. Der M3-mAChR zeigte eine statistisch gering signifikant verminderte AUC im Vergleich zu M3+M5 (Abb. 24 C; $p^* = 0.0172$; $\text{AUC}_{\text{M3+M5}} = 367.8 \pm 27.77$ a. E., $n = 32$; $\text{AUC}_{\text{M3+M5 forc.}} = 341.7 \pm 19.29$ a. E., $n = 29$).

Zusammengefasst ließ sich für die Ca^{2+} -Signalstärke kein relevanter Unterschied zwischen forciert und unforciert co-exprimierten im Vergleich zu einzeln exprimierten mAChRs nachweisen.

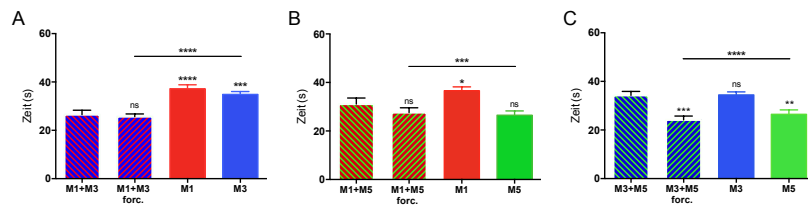


Abbildung 25: Ergebnisse des Calcium-imagings co-transfizierter Rezeptoren. M1 wird in rot, M3 in blau, M5 in grün und Co-Transfektionen als Schraffur dargestellt. Forcierte Rezeptorpaare sind schräg schraffiert dargestellt. Gezeigt ist die Aktivierungskinetik (TTP) in Sekunden bei einer $1 \mu\text{M}$ ACh-Stimulation für die Rezeptorkombinationen M1 und M3 (A), M1 und M5 (B) und M3 und M5 (C). Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an. Kruskal-Wallis-Test mit $p^{\text{ns}} > 0.05$, $p^{**} \leq 0.01$, $p^{***} \leq 0.001$, $p^{****} \leq 0.0001$.

In Abbildung 25 ist die Aktivierungskinetik der einzeln transfizierten mAChR im Vergleich zu den jeweiligen forcierter und unforcierter co-exprimierten mAChR dargestellt. Die Mittelwerte der einzeln exprimierten Rezeptoren sind der Abb. 22 zu entnehmen.

Die forcierter und unforcierter co-exprimierten Rezeptorpaare M1+M3 weisen ähnliche Mittelwerte auf und zeigen eine deutlich schnellere Aktivierungskinetik, als die mAChRs M1 und M3 alleine exprimiert (Abb. 25 A; $p^{****} \leq 0.0001$; $\text{TTP}_{\text{M1+M3}} = 26.48 \pm 1.845$ s, $n = 29$; $\text{TTP}_{\text{M1+M3 forc.}} = 25.67 \pm 1.097$ s, $n = 56$).

M1+M5 unforcierter co-exprimierte Rezeptoren zeigten eine Aktivierungskinetik, welche zwischen den Mittelwerten der einzeln exprimierten M1 und M5 mAChRs liegt. Die forcierter co-

exprimierten Rezeptorpaare M1+M5 wiesen eine dem M5-mAChR entsprechende Aktivierungskinetik auf (Abb. 25 B, $p^{***} = 0.0003$; $TTP_{M1+M5} = 31.09 \pm 2.519$ s, $n = 30$; $TTP_{M1+M5 \text{ forc.}} = 27.62 \pm 1.943$ s, $n = 28$).

Unforcierte co-transfizierte M3+M5-mAChR wiesen eine ähnliche Aktivierungskinetik auf wie M3 alleine. Die forciert co-exprimierten Rezeptorpaare M3+M5 zeigten eine statistisch stark signifikante Abweichung der Aktivierungskinetik von unforciert co-exprimierten Rezeptoren und ähneln der Kinetik des M5-mAChR (Abb. 25 C, $p^{****} \leq 0.0001$; $TTP_{M3+M5} = 34.25 \pm 1.632$ s, $n = 30$; $TTP_{M3+M5 \text{ forc.}} = 24.17 \pm 1.573$ s, $n = 30$).

Sowohl unforciert als auch forciert co-exprimierte M1+M3-mAChRs wiesen eine deutlich schnellere Aktivierungskinetik auf, als einzeln exprimierte M1- und M3-mAChR. Die co-transfizierten Rezeptorkombinationen M1+M5 sowie M3+M5 wiesen unforciert Werte zwischen den beiden einzeln transfizierten Rezeptorpartnern auf, während sie im forcierten Zustand eine Aktivierungskinetik aufwiesen, welche der von M5 entspricht.

3.5. Isolierte mAChR-Stimulation und Inhibition in co-transfizierten N1E-Zellen

Zuvor konnte nachgewiesen werden, dass die Co-Expression zweier mAChRs sowohl im forcierten als auch im unforcierten Zustand Auswirkungen auf das Ca^{2+} -Signal hat. Im folgenden Kapitel sollen die Ergebnisse der isolierten Stimulation bzw. Inhibition eines mAChR in unforciert co-transfizierten Zellen mittels Agonisten/Antagonisten dargestellt und somit mögliche Effekte der unforcierten Heterodimerisierung auf die zelluläre Signalkaskade untersucht werden.

Folgende Agonisten wurden verwendet:

- M3-Antagonist DAU 5884 hydrochlorid (DAU)
- M1-Antagonist Telenzepin dihydrochlorid (Tel)
- M1-Agonist McN-A-343 (McN)

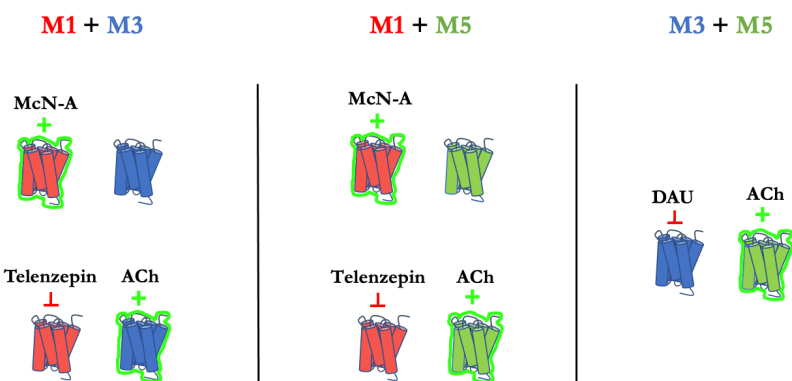


Abbildung 26: Schematische Darstellung der von uns getesteten Rezeptorkombinationen zwischen M1, M3 und M5 mit gezielter Stimulation bzw. Blockade eines Rezeptors. Jede Spalte steht für eine Rezeptorkombination. Die Rezeptoren sind farblich markiert (rot für M1, blau für M3 und grün für M5). Der jeweilige, für eine Rezeptorkombination verwendete Agonist/Antagonist steht über dem interagierenden Rezeptor und zeigt entweder einen stimulierenden (+) oder antagonisierenden (−) Effekt.

Entscheidend bei der Auswahl der Agonisten und Antagonisten ist ihre Spezifität für den jeweiligen Rezeptor. Die Auswahl an spezifischen Agonisten/Antagonisten konnte in den letzten Jahren dank zunehmender Erkenntnisse über die molekulare Struktur der Rezeptoren gesteigert werden. Da dennoch unklar ist, ob die jeweilige Rezeptorspezifität auch bei der von uns gemessenen Konzentration an Agonisten/Antagonisten präzise genug ist, wurden Kreuzversuche mit den jeweils anderen beiden Rezeptortypen durchgeführt.

hat gelöscht: ben

3.5.1. M1-Stimulation mittels McN-A-343

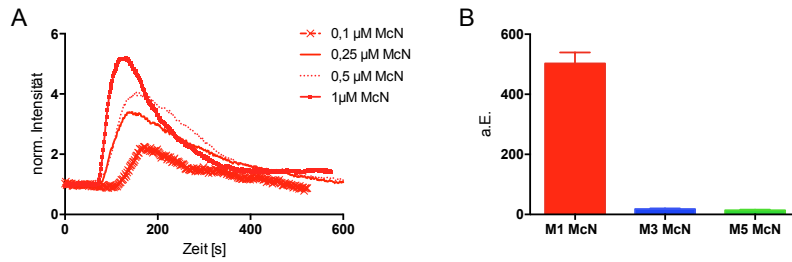


Abbildung 27: (A) Vergleich des Ca^{2+} -Signals M1-transfizierter Zellen mit unterschiedlichen McN-Konzentrationen, abgebildet als norm. Fluoreszenzintensität gegen die Zeit (s). (B) Kreuztest M1-, M3-, M5-transfizierter Zellen mit $0,25 \mu\text{M}$ McN-Konzentration. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardfehler der AUC in Balkenform

Ähnlich wie für ACh, wurde auch für den selektiven Agonisten McN das Wirkspektrum mittels aufsteigender Konzentrationen ermittelt, um eine Konzentration im mittleren Wirkungsspektrum für weitere Versuche zu bestimmen (Abb. 27 A). Diese wurde im Falle von McN für eine Konzentration von $0,25 \mu\text{M}$ festgelegt (Abb. 27 A, durchgezogene Linie) und für die folgenden Versuche verwendet.

Abbildung 27 B zeigt die AUC nach Stimulation von M1, M3 und M5 exprimierenden Zellen mit $0,25 \mu\text{M}$ McN-Konzentration. Es zeigte sich eine eindeutige Spezifität des M1-Agonisten für den M1-mAChR (Abb. 27 B; $\text{AUC}_{\text{M1-McN}} = 502.6 \pm 36.89$ a. E., $n = 32$; $\text{AUC}_{\text{M3-McN}} = 18.06 \pm 1.784$ a. E., $n = 36$; $\text{AUC}_{\text{M5-McN}} = 13.81 \pm 2.018$ a. E., $n = 27$).

In der folgenden Abbildung ist die selektive Aktivierung von M1-Rezeptoren in M1+M5 unforciert co-transfizierten Zellen mittels 0,25 μ M McN-A-343 dargestellt.

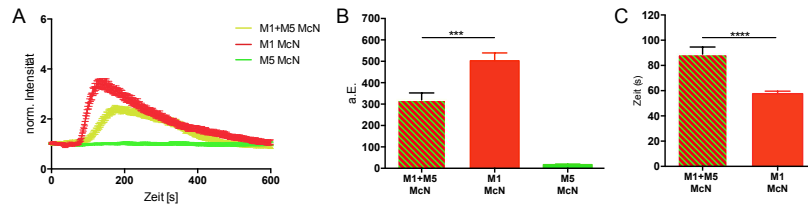


Abbildung 28: Gezeigt wird das Ca^{2+} -Signal von M1 (rot), M5 (grün) und M1+M5 (rot/grün schraffiert) transfizierten Zellen mit 0,25 μ M McN-Stimulation. (A) stellt das Ca^{2+} -Signal im Kurvenverlauf als norm. Fluoreszenzintensität gegen die gemessene Zeit dar. Die Ca^{2+} -Signalstärke (AUC) wird in arbiträren Einheiten (a. E.) in (B) abgebildet. (C) zeigt die Aktivierungskinetik (TTP) in Sekunden. Die Balken sowie die Graphen geben den Mittelwert mit Standardfehler an. Mann-Whitney-U-Test mit $p^* \leq 0.05$, $p^{***} \leq 0.001$, $p^{****} \leq 0.0001$.

Die alleinige Stimulation des M1-Rezeptors in M1+M5 unforciert co-exprimierenden Zellen mittels des Agonisten McN zeigte ein verringertes Ca^{2+} -Signal, sowie eine verzögerte Aktivierungskinetik im Vergleich zur Aktivierung M1- exprimierender Zellen (Abb. 28 **A**, **B**, **C**). Die Mittelwerte der Ca^{2+} -Signalstärke M1+M5- und M1- exprimierender Zellen wichen stark signifikant voneinander ab und zeigten einen Wirkungsverlust der Co-Transfektion bei Wegfall des M5-mAChR (Abb. 28 **B**; $p^{***} = 0.0002$; $\text{AUC}_{\text{M1+M5-McN}} = 319.5 \pm 32.63$ a. E., $n = 32$; $\text{AUC}_{\text{M1-McN}} = 502.6 \pm 36.89$ a. E., $n = 32$). Die Aktivierungskinetik in M1+M5 co- exprimierenden Zellen verlängerte sich im Vergleich zu M1- exprimierenden Zellen signifikant (Abb. 28 **C**; $p^{****} \leq 0.0001$; $\text{TTP}_{\text{M1+M5-McN}} = 89.00 \pm 5.588$ a. E., $n = 32$; $\text{TTP}_{\text{M1-McN}} = 57.65 \pm 1.999$ a. E., $n = 34$).

Zusammengefasst führt die isolierte Stimulation des M1 Rezeptors in M1+M5 co-exprimierenden Zellen zu einer deutlich reduzierten Ca^{2+} -Signalstärke, sowie zu einer verzögerten Signalantwort.

In Abbildung 29 sind die Ergebnisse der Stimulation M1+M3 unforciert co-transfizierter Zellen mit 0,25 μ M McN-A-343 dargestellt.

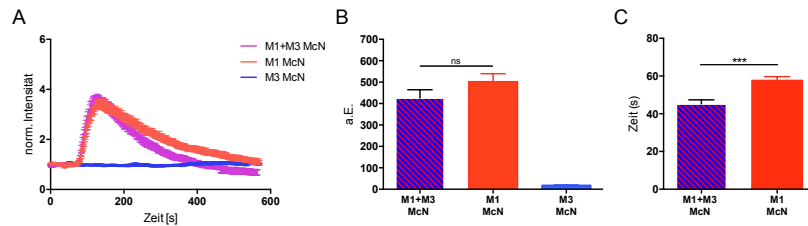


Abbildung 29: Gezeigt wird das Ca²⁺-Signal von M1 (rot), M3 (blau) und M1+M3 (rot/blau schraffiert) transfizierten Zellen mit 0,25 μ M McN-Stimulation. (A) stellt das Ca²⁺-Signal im Kurvenverlauf als norm. Fluoreszenzintensität gegen die gemessene Zeit dar. Die Ca²⁺-Signalstärke (AUC) wird in arbiträren Einheiten (a.E.) in (B) abgebildet. (C) zeigt die Aktivierungskinetik (TTP) in Sekunden. Die Balken sowie die Graphen geben den Mittelwert mit Standardfehler an. Mann-Whitney-U-Test mit $p^{ns} > 0.05$, $p^{***} \leq 0.001$

Die Ergebnisse der McN-Stimulation von M1+M3 co-exprimierenden Zellen unterschieden sich deutlich zu M1+M5 co-exprimierender Zellen. Wie in Abbildung 29 dargestellt, hatte die fehlende Aktivierung des M3-Rezeptors keinen wesentlichen Einfluss auf das nachgeschaltete Ca²⁺-Signal der Zellen (Abb. 29 A). Die Ca²⁺-Signalstärke M1+M3 co-exprimierender Rezeptoren mit McN-Stimulation war annähernd so hoch wie die Ca²⁺-Signalstärke M1-exprimierender Rezeptoren mit McN-Stimulation und wich statistisch nicht signifikant von dieser ab (Abb. 29 B; $p^{ns} > 0.05$; $AUC_{M1+M3-McN} = 426.8 \pm 37.52$ a. E., $n = 36$; $AUC_{M1-McN} = 502.6 \pm 36.89$ a. E., $n = 32$). Für die Aktivierungskinetik M1+M3 co-exprimierender Rezeptoren zeigte sich im Vergleich zu M1 nach Stimulation mit McN eine signifikant geringere TTP (Abb. 29 C; $p^{***} = 0.0003$; $TTP_{M1+M3-McN} = 45.25 \pm 2.143$ s, $n = 36$; $TTP_{M1-McN} = 57.65 \pm 1.999$ a. E., $n = 34$). Dabei ist erwähnenswert, dass die Ergebnisse der AUC sowie der Aktivierungskinetik von M1+M3-McN/M1-McN im gleichen Verhältnis zueinander stehen wie M1+M3-ACh/M1-ACh bei 1 μ M ACh-Stimulation (zum Vergleich s. Abb. 24 A u. 25 A).

Zusammenfassend deuten diese Erkenntnisse darauf hin, dass es trotz der isolierten Stimulation von M1 in M1+M3 co-exprimierenden Zellen zu keiner Abschwächung des Ca²⁺-Signals im Vergleich zur Aktivierung beider Rezeptoren kommt.

3.5.2. M1-Antagonisierung mit Telenzepin hydrochlorid

In den zuvor dargestellten Ergebnissen erfolgte die isolierte Stimulation des M1-mAChR in M1+M3 und M1+M5 co-exprimierenden Zellen. Im folgenden Abschnitt soll nun die isolierte M1-Inhibition in M1+M3 und M1+M5 co-transfizierten Zellen durch den M1-Antagonisten Telenzepin (Tel) evaluiert werden. Die anschließende Behandlung mit ACh führte zur isolierten Aktivierung des M3- bzw. M5-mAChR in den co-exprimierenden Zellen. Ebenfalls wurde Tel auf seine M1-Rezeptor-Spezifität getestet. Ermittelt wurde zunächst die minimale, nach 1 μ M ACh-Stimulation, zu keinem Anstieg des Ca^{2+} -Signals führende Konzentration des Antagonisten.

Die ermittelte Konzentration wurde im Kreuzversuch mit M3 und M5-exprimierenden Zellen verwendet und diese ebenfalls mit ACh stimuliert.

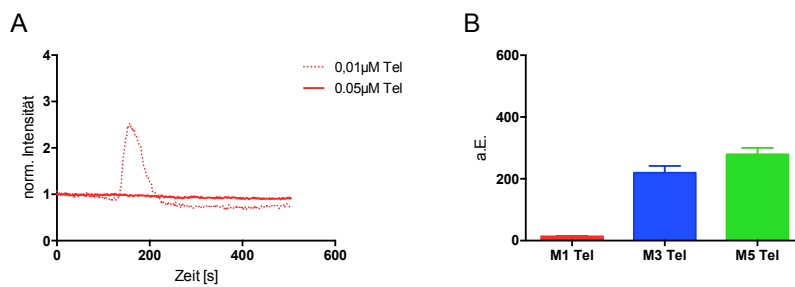


Abbildung 30: (A) zeigt das Ca^{2+} -Signal für M1 transfizierte Zellen mit verschiedenen Tel-Konzentrationen als norm. Fluoreszenzintensität gegen die Zeit. Nach Ermittlung der minimalsten Effektdosis von 0,05 μ M Telenzepin wurden mit dieser Konzentration Kreuzversuche durchgeführt. (B) stellt die Ca^{2+} -Signalstärken (AUC) in a. E. von M1, M3 und M5-transfizierten Zellen bei 0,05 μ M Tel-Antagonisierung und anschließender 1 μ M ACh-Stimulation dar.

Wie in Abbildung 30 gezeigt, führte eine Konzentration von 0,05 μ M Telenzepin zu einer Blockade des M1-Rezeptors (A). Diese Konzentration wurde für die folgenden Kreuzversuche ausgewählt und die AUC der Ca^{2+} -Signalantwort abgebildet (Abb. 30 B; $\text{AUC}_{\text{M3-Tel}} = 220.0 \pm 21.72$ a. E., $n = 35$; $\text{AUC}_{\text{M5-Tel}} = 279.1 \pm 21.17$ a. E., $n = 24$). Die mit Telenzepin behandelten Rezeptoren zeigen im Vergleich zu den Versuchen ohne Telenzepin nach ACh Stimulation beide eine leicht reduzierte Ca^{2+} -Signalstärke (zum Vergleich s. Abb. 21 B, C).

In Abbildung 31 sind die Ergebnisse der M1-Antagonisierung mit Telenzepin und anschließender 1 μM ACh-Stimulation in M1+M3 unforciert co-exprimierenden Zellen dargestellt.

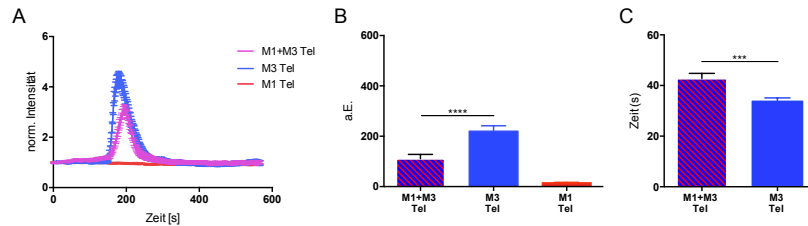


Abbildung 31: Gezeigt wird das Ca^{2+} -Signal von M1 (rot), M3 (blau) und M1+M3 (rot/blau schraffiert) transfizierten Zellen mit 0,05 μM Telenzepin-Antagonisierung und 1 μM ACh-Stimulation. (A) stellt das Ca^{2+} -Signal im Kurvenverlauf als norm. Fluoreszenzintensität gegen die gemessene Zeit dar. Die Ca^{2+} -Signalstärke (AUC) wird in arbiträren Einheiten (a. E.) in (B) abgebildet. (C) zeigt die Aktivierungskinetik (TTP) in Sekunden. Die Balken sowie die Graphen geben den Mittelwert mit Standardfehler an. Mann-Whitney-U-Test mit $p^{\text{ns}} > 0,05$, $p^{***} \leq 0,001$

M1+M3 co-exprimierende Zellen zeigten bei Blockade des M1-mAChR nach ACh-Stimulation ein deutlich reduziertes Ca^{2+} -Signal im Vergleich zur Signalantwort M3-exprimierender und mit Telenzepin behandelter Zellen (Abb. 31 A). Die Ca^{2+} -Signalstärke (AUC) von M1+M3-Tel entsprach etwa der Hälfte der Ca^{2+} -Signalstärke von M3-Tel (Abb. 31 B; $p^{****} \leq 0,0001$; $\text{AUC}_{\text{M1+M3-Tel}} = 111,0 \pm 16,78$ a. E., $n = 32$; $\text{AUC}_{\text{M3-Tel}} = 220,0 \pm 21,72$ a. E., $n = 35$; $\text{AUC}_{\text{M1-Tel}} = 14,74 \pm 1,718$ a. E., $n = 47$). M1+M3-Tel zeigte weiterhin eine statistisch signifikant verlangsamte Aktivierungskinetik im Vergleich zu M3-Tel (Abb. 31 C; $p^{***} = 0,0006$; $\text{TTP}_{\text{M1+M3-Tel}} = 42,79 \pm 2,012$ s, $n = 32$; $\text{TTP}_{\text{M3-Tel}} = 33,75 \pm 1,345$ s, $n = 35$). Im Hinblick auf die verlangsamte Aktivierungskinetik wird an dieser Stelle explizit auf das Verhältnis zwischen M1+M3-ACh und M3-ACh hingewiesen (s. Abb. 25 A, S. 49). Die Aktivierungskinetik M1+M3 co-transfizierter Rezeptoren nach 1 μM ACh-Stimulation war statistisch signifikant schneller als die Aktivierungskinetik M3 transfizierter Zellen, während sie sich für M1+M3 co-transfizierte Zellen nach Telenzepinbehandlung signifikant verlangsamt zeigte.

Zusammenfassend resultiert die Antagonisierung des M1-mAChR in M1+M3 co-transfizierten Zellen in einer Halbierung der Ca^{2+} -Signalstärke mit deutlich verzögerter Aktivierungskinetik.

In der Abbildung 32 sind die Ergebnisse der M1-Antagonisierung mit Telenzepin und anschließender 1 μM ACh-Stimulation in M1+M5 unforciert co-exprimierenden Zellen dargestellt.

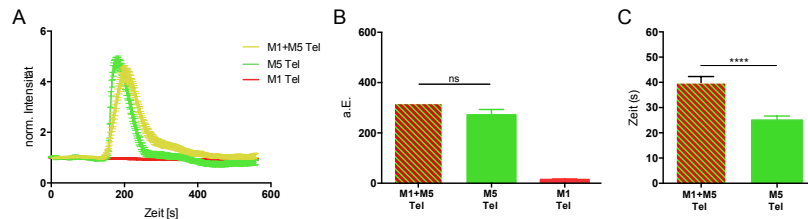


Abbildung 32: Gezeigt wird das Ca^{2+} -Signal von M1 (rot), M5 (grün) und M1+M5 (rot/grün schraffiert) transfizierten Zellen mit 0,05 μM Telenzepin-Antagonisierung und 1 μM ACh-Stimulation. (A) stellt das Ca^{2+} -Signal im Kurvenverlauf als norm. Fluoreszenzintensität gegen die gemessene Zeit dar. Die Ca^{2+} -Signalstärke (AUC) wird in arbiträren Einheiten (a. E.) in (B) abgebildet. (C) zeigt die Aktivierungskinetik (TTP) in Sekunden. Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an. Mann-Whitney-U-Test $p^{\text{ns}} > 0.05$, $p^{\text{****}} \leq 0.0001$

M1+M5 co-exprimierende Rezeptoren mit Telenzepinbehandlung zeigten ein ähnlich starkes Ca^{2+} -Signal wie M5 exprimierende Zellen mit Telenzepinbehandlung (Abb. 32 A). Die AUC-Werte von M1+M5-Tel lagen statistisch nicht signifikant höher als die Messwerte der Versuche mit M5-Tel (Abb. 32 B; $p^{\text{ns}} > 0.05$; $\text{AUC}_{\text{M1+M5-Tel}} = 318.6 \pm 30.01$ a. E., $n = 35$; $\text{AUC}_{\text{M5-Tel}} = 271.9 \pm 21.54$ a. E., $n = 25$; $\text{AUC}_{\text{M1-Tel}} = 14.74 \pm 1.718$ a. E., $n = 47$). Die TTP M1+M5 co-exprimierender Zellen wich statistisch signifikant von der TTP M5 exprimierender Zellen ab (Abb. 32 C; $p^{\text{****}} \leq 0.0001$; $\text{TTP}_{\text{M1+M5-Tel}} = 39.96 \pm 2.369$ s, $n = 34$; $\text{TTP}_{\text{M5-Tel}} = 25.06 \pm 1.624$ s, $n = 25$). Aus den Messungen ohne Antagonisten resultierte jedoch ebenfalls eine verlängerte TTP der Co-Transfektion M1+M5 im Vergleich zu einzeln exprimierten M5 Rezeptoren.

Es konnte festgestellt werden, dass die Antagonisierung des M1-mAChR in M1+M5 co-exprimierenden Zellen in einer annähernd unveränderten Ca^{2+} -Signalstärke mit verzögerter Aktivierungskinetik im Vergleich zur Aktivierung beider Rezeptoren resultierte.

3.5.3. M3-Antagonisierung mit DAU 5884 hydrochlorid

Kongruent zu den Experimenten mit Telenzepin wurde für den M3-Antagonisten DAU 5884 hydrochlorid (DAU) ebenfalls getestet, ab welcher minimalen Konzentration nach einer 1 μM ACh-Stimulation von M3-transfizierten Zellen kein Anstieg des Ca^{2+} -Signals zu beobachten ist. Anschließend sollte die Spezifität der Rezeptorblockade in Kreuzversuchen mit M1- und M5-transfizierten Zellen getestet werden.

hat gelöscht: k

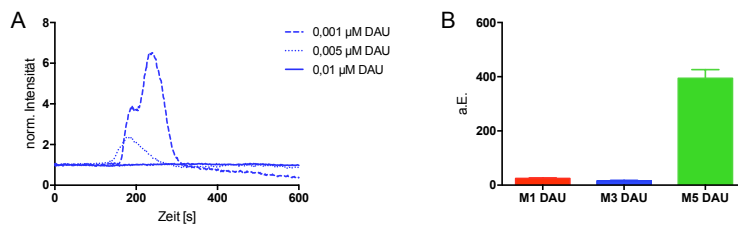


Abbildung 33: (A) zeigt das Ca^{2+} -Signal M3-transfizierter Zellen mit aufsteigenden DAU-Konzentrationen, abgebildet als norm. Fluoreszenzintensität gegen die gemessene Zeit. (B) zeigt die Ca^{2+} -Signalstärke (AUC) in arbiträren Einheiten von M1, M3 und M5-transfizierten Zellen mit 0,01 μM DAU-Antagonisierung und anschließender 1 μM ACh-Stimulation.

Der Abbildung 33 A ist zu entnehmen, dass die Stimulation des M3-mAChR durch eine Behandlung mit 0,01 μM DAU verhindert wurde. Graphik B der Abbildung 33 zeigt, dass eine 0,01 μM DAU-Konzentration ebenfalls den M1-Rezeptor inhibierte. Eine 0,01 μM DAU-Antagonisierung von M1+M3 co-exprimierenden Rezeptoren führte nach ACh-Stimulation ebenfalls zu keinem Ca^{2+} -Signal (Daten nicht gezeigt). Die Inhibition von M3-mAChR in M1+M3 co-transfizierten Zellen kann demnach in dieser Arbeit nicht demonstriert werden. M5 exprimierende Zellen zeigten nach DAU-Behandlung und 1 μM ACh-Stimulation ein vergleichbares Signal, wie ohne DAU-Behandlung (Abb. 33 B; $\text{AUC}_{\text{M1-DAU}} = 24.62 \pm 2.353$ a. E.; $n = 42$; $\text{AUC}_{\text{M3-DAU}} = 15.00 \pm 2.229$, $n = 32$; $\text{AUC}_{\text{M5-DAU}} = 394.4 \pm 31.78$ a. E., $n = 29$).

In Abbildung 34 wird der Vergleich zwischen unforciert co-exprimierten M3+M5- und einzeln exprimierten M5-mAChR jeweils nach Behandlung mit dem M3-Antagonisten DAU und anschließender 1 μM ACh-Stimulation veranschaulicht.

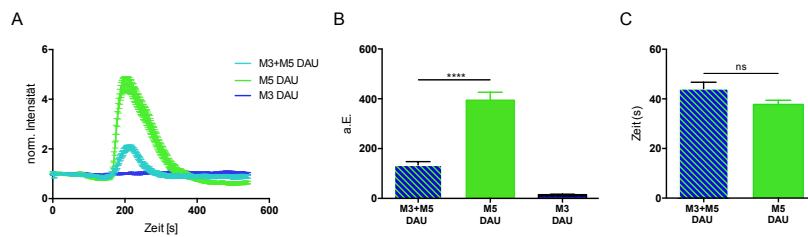


Abbildung 34: Ca^{2+} -Signal von M3 (blau), M5 (grün) und M3+M5 (grün/blau schraffiert) transfizierten Zellen mit 0,01 μM DAU-Antagonisierung und 1 μM ACh-Stimulation. (A) stellt das Ca^{2+} -Signal im Kurvenverlauf als norm. Fluoreszenzintensität gegen die gemessene Zeit dar. Die Ca^{2+} -Signalstärke (AUC) wird in arbiträren Einheiten (a. E.) in (B) abgebildet. (C) zeigt die Aktivierungskinetik (TTP) in Sekunden. Die Balken geben den Mittelwert mit Standardfehler an. Mann-Whitney-U-Test $p^{\text{ns}} > 0,05$, $p^{\text{****}} \leq 0,0001$

Die Antagonisierung des M3 Rezeptors in M3+M5 co-transfizierten Zellen führte zu einer deutlichen Reduzierung des Ca^{2+} -Signals (Abb. 34 A). Dies führte zu einer signifikanten Abnahme der Ca^{2+} -Signalstärke (Abb. 34 B; $p^{\text{****}} \leq 0,0001$; $\text{AUC}_{\text{M3+M5-DAU}} = 134,5 \pm 13,30$ a. E., $n = 34$; $\text{AUC}_{\text{M5-DAU}} = 394,4 \pm 31,78$ a. E., $n = 29$; $\text{AUC}_{\text{M3-DAU}} = 15,00 \pm 2,229$ a. E., $n = 32$).

Ein Vergleich der Aktivierungskinetiken ist aufgrund der im Vergleich zu M5-ACh deutlich verlängerten TTP nur eingeschränkt möglich (zum Vergleich Abb. 22 C, S. 46). Es ist demnach nicht auszuschließen, dass die Behandlung des M5-mAChR mit DAU zu einer Beeinflussung der Aktivierungskinetik führt (Abb. 34 C; $p^{\text{ns}} = 0,1190$; $\text{TTP}_{\text{M3+M5-DAU}} = 44,15 \pm 2,548$, $n = 33$; $\text{TTP}_{\text{M5-DAU}} = 37,76 \pm 1,690$, $n = 32$). Ähnlich zur Versuchsreihe mit alleiniger ACh-Stimulation, zeigte sich für die Co-Transfektion M3+M5 mit DAU-Behandlung eine leicht verlängerte Aktivierungskinetik im Gegensatz zu einzeln exprimierten M5-mAChR (zum Vergleich Abb. 25 C).

Unabhängig von einer möglichen Einflussnahme des M3-Antagonisten auf die Aktivierungskinetik des M5 Rezeptors, lässt sich zusammenfassend sagen, dass die fehlende Aktivierung des M3-Rezeptors in M3+M5 co-transfizierten Zellen zu einer deutlichen Abschwächung der Ca^{2+} -Signalstärke im Vergleich zur Aktivierung beider Rezeptoren führte.

4. Diskussion

Humane Zellen exprimieren in unterschiedlicher Dichte ubiquitär vorkommende und strukturell hochgradig ähnliche muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren. Diese ubiquitäre und parallele Expression, besonders der drei Gq-gekoppelten mAChRs M1, M3 und M5 mit identischer Signalkaskade, wirft die Frage nach dem Nutzen auf und ob mögliche Interaktionen zwischen diesen zu bisher unentdeckten Mechanismen führen. Um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen, wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Dimerbildung unter M1, M3 und M5 auf das zelluläre Ca^{2+} -Signal untersucht. Dabei spielten modifizierte Rezeptorkonstrukte (mAChRs gekoppelt mit einem Ak und einem entsprechendem Ag), welche eine Dimerisierung zweier Rezeptorkonstrukte forcierten, eine entscheidende Rolle. Diese wurden in N1E-Zellen co-exprimiert und hinsichtlich ihrer auslösenden Ca^{2+} -Signalantwort untersucht.

Als Maß der Beeinflussung wurden Änderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nach Rezeptoraktivierung bestimmt. Mittels des Ca^{2+} -Sensors GCaMP-6s konnte anhand der detektierten Fluoreszenz der relative Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration nach Stimulation bestimmt werden. Da sich die mAChRs gleichermaßen durch den Liganden Acetylcholin stimulieren lassen, erlaubt dies eine gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Eine logarithmische Auftragung unserer Ergebnisse in einer Dosis-Wirkungskurve zeigte, dass eine $1 \mu\text{M}$ ACh-Stimulation für alle drei Rezeptoren in etwa im Umschlagspunkt der Kurve liegt, womit diese Konzentration ideal für die Durchführung späterer Versuchsreihen ist, um die drei Rezeptoren untereinander vergleichen zu können (s. Abb. 17, S. 41).

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche bestätigen, dass die Kopplung von NB (Ak) und GFP (Ag) an die mAChRs erfolgreich war und dass modifizierte Rezeptorkonstrukte aus NB-mAChRs und GFP-mAChRs bei Co-Expression forcierte Dimere bilden. Mithilfe dieser neuen Methode konnte festgestellt werden, dass eine Dimerisierung unter mAChRs sowohl in Homo- als auch in Heterodimeren zu einer Beeinflussung der Aktivierungskinetik führt. Die Ergebnisse der selektiven Rezeptoraktivierung mittels Agonisten bzw. Antagonisten deuten zusätzlich darauf hin, dass zwischen heterologen Rezeptorpaaren der mAChRs mögliche Kopplungsmechanismen existieren, welche einen Einfluss auf die zelluläre Signalkaskade haben und eine essentielle Funktion der Dimerbildung darstellen könnten.

4.1. Erfolg der forcierten Dimerisierung

Um der Fragestellung auf den Grund zu gehen, ob Dimerisierung einen Einfluss auf das zelluläre Signalling hat, war ein System zur Kontrolle der Dimerisierung erforderlich. Ein theoretisch denkbarer Ansatz wäre die Inhibition der Dimerisierung oberflächlich lokalisierter Rezeptoren. Eine entsprechende validierte Methodik existiert jedoch aktuell nicht. Es besteht zwar die Möglichkeit Rezeptor-Mutanten zu erschaffen, bei denen gezielt für die Dimerisierung essentielle Rezeptor-Domänen ausgeschaltet werden. Da jedoch nicht sicher geklärt ist, welche Rezeptorabschnitte eines GPCR entscheidend für die Dimerisierung sind und ob diese eventuell auch bei der G-Protein Kopplung eine Rolle spielen, erschwert die Verwendung von Rezeptor-Mutanten die Interpretation der Ergebnisse. Eine weitere und von uns verwendete Möglichkeit der Kontrolle über Dimerisierung besteht in dem Erzwingen der Dimerbildung. Anhand der Bindung zwischen Rezeptor-gekoppelten NBs und GFPs wird bei Co-Transfektion zweier mAChR-Konstrukte eine unmittelbare räumliche und zeitliche Nähe der beiden Rezeptoren zueinander erzwungen. Ein Vergleich der Signalantworten zwischen forciert und unforciert co-exprimierten mAChR ermöglicht Schlussfolgerungen auf potentielle Einflüsse der Dimerisierung zu ziehen. Der Erfolg dieser GFP-NB-Bindung wurde in Abb. 16 (s. S. 40) dargestellt. Konfokale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen GFP-transfizierter Zellen zeigen bei Co-Transfizierung mit M3-NB-DNA eine deutliche Akkumulation der Fluoreszenz in bestimmten Kompartimenten der Zelle. Die Rezeptor-Konstrukte wurden ebenfalls im Hinblick auf das zelluläre Signalling mit unmodifizierten Rezeptoren verglichen. Es ließ sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen, womit ein Einfluss des GFP- oder NB-Anhangs auf das zelluläre Signalling ausgeschlossen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die erfolgreiche Anlagerung zwischen den NB- und GFP-Konstrukten ermöglichte die Verwendung der Konstrukte für die FRAP-Messungen, zum Vergleich der Molekülgrößen zwischen forcierten und unforcierten mAChR. Die forciert exprimierten mAChRs zeigten in den FRAP-Versuchen für alle Konstellationen (sowohl für einzeln- als auch co-exprimierte Rezeptoren) einen deutlich reduzierten Diffusionskoeffizienten im Vergleich zu den unforciert exprimierten Rezeptoren (s. Abb. 19, S. 44 und 23, S. 47). Diese Ergebnisse bestätigten, dass die Anlagerung von NB und GFP zu einer Anlagerung der Rezeptoren und somit zu einer höheren Dimerisierungsrate führt. Weiterhin konnte mittels der FRAP-Messungen festgestellt werden, dass der Diffusionskoeffizient des einzeln transfizierten mAChR-M5 höher ist als der von M1 und M3 (s. Abb. 19). Der M5-Rezeptor bildet demnach mehr Monomere als M1 und M3. Diese Ergebnisse passen zu weiteren Forschungsarbeiten anderer Gruppen, welche für den M1-Rezeptor eine Rate an Dimeren von etwa 30% angeben (Hern et al. 2010; Pediani et al. 2016). Die

Diffusionskoeffizienten der unforciert einzeln transfizierten mAChRs M1 und M3 sind in etwa gleich hoch und beide höher als die Diffusionskoeffizienten ihrer jeweiligen forcierten Dimere.

Für einen Vergleich herangezogene BRET-Studien zeigten eine überwiegende Rate an Dimeren für M1, M2, M3 mit einem geringeren Anteil an Monomeren (Goin und Nathanson 2006). BRET- und besonders FRET-Messungen wurden allerdings im Hinblick auf ihre begrenzte Aussagekraft kritisiert. Eine Exzitation der fluoreszierenden Komponenten kann bereits ab einer relativen Nähe zweier GPCRs von etwa 5-10 Nanometer zueinander bewirkt werden. Dies entspricht in etwa dem ein- bis zweifachen Durchmesser eines Rhodopsin-Rezeptors (Wu und Brand 1994; Angers et al. 2000; Rios et al. 2001). Eine direkte physikalische Interaktion zweier Rezeptoren, die eine Rezeptorlänge voneinander entfernt liegen, muss nicht angenommen werden.

Die Co-Transfektion von NB-GFP-Konstrukten der Rezeptoren M1+M3, M1+M5 und M3+M5 (forciert) weisen alle einen deutlich reduzierten D im Vergleich zu Co-Transfektionen der gleichen Rezeptor-Kombinationen mit regulären mAChR (unforciert) auf. Eine NB-GFP-Kopplung war demnach ebenfalls für Co-Transfektionen geeignet die Bildung von Heterodimeren zu forcieren. Für die unforcierte Co-Transfektion M1+M3 zeigte sich ein Diffusionskoeffizient, der in etwa gleich hoch wie der von M1 und M3 einzeln ist. Dies könnte bedeuten, dass entweder zu gleichen Anteilen Homodimere vorhanden sind oder sich zu gleichen Anteilen M1+M3 Heterodimere ausbilden. Für M1+M5 und M3+M5 ließ sich interessanterweise feststellen, dass die Diffusionskoeffizienten der unforcierten Co-Transfektionen in beiden Fällen stets dem Diffusionskoeffizienten von M5 ähneln. Anhand dieser Beobachtung lag die Überlegung nahe, dass der M5-Rezeptor in Zellen mit co-transfizierten M1+M5 und M3+M5 die Bildung von Dimeren verhindern bzw. blockieren könnte.

FRAP-Messungen lassen keine eindeutige Aussage über die Quantität der Dimere auf der Zelloberfläche zu, sondern zeigen ein relatives Verhältnis von Dimeren zu Monomeren im Vergleich mit bestehenden Messungen. Bei der Interpretation der Daten sollte ebenfalls bedacht werden, dass es unter Rezeptoren zu einer spontanen Dimerbildung und erneuter Dissoziation kommen kann, welche von der FRAP-Messung nicht erfasst werden. Somit könnte im Vergleich zu konstitutiven Dimeren der Eindruck entstehen, dass spontan bildende Dimere hauptsächlich als Monomere erscheinen. Feinere und aufwändigere Verfahren, wie das *single particle tracking* (SPT), oder die *total internal reflection fluorescence microscopy* (TIRFM) ermöglichen eine präzisere Aussage über die Bildung und Dissoziation von Dimeren zu treffen. Für den M1-mAChR konnte bereits gezeigt werden, dass die Rezeptoren dazu tendieren innerhalb von Sekunden spontane Dimere zu bilden und erneut zu dissoziieren (Hern et al. 2010). Die Erfassung dieser

spontan bildenden Dimere hängt von der Geschwindigkeit ihrer Bildung und Dissoziation ab. FRAP-Messungen geben einen Querschnitt der oberflächlich vorhandenen Dimere wieder. Dabei handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach nicht um einen feststehenden Anteil an Dimer-Komplexen, sondern um eine variable Anzahl an Rezeptoren, welche zu einem gewissen Zeitpunkt Dimere formen, während andere erneut dissoziieren.

4.2. M1- und M3- Homodimere beeinflussen die Aktivierungskinetik

Die Ergebnisse des Calcium-*imaging*s zeigen, dass forcierte Homodimere der M1-, M3- und M5-mAChRs im Vergleich zu unforciert exprimierten mAChRs keine Unterschiede in der Ca^{2+} -Signalstärke aufweisen. Allerdings zeigten sich Auffälligkeiten in der Aktivierungskinetik der drei mAChRs sowohl im forcierten als auch im unforcierten Zustand.

Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass unforcierte M1- und M3-mAChRs ähnlich schnelle Aktivierungskinetiken besitzen, die im Vergleich zu M5 verzögert sind (s. Abb. 22, S. 46). Forcierte Homodimere der mAChRs M1 und M3 führen zu einer signifikanten Verkürzung der TTP. Der M5-mAChR weist sowohl unforciert als auch forciert nach ACh-Stimulation eine unverändert schnelle Aktivierungskinetik auf. In Anbetracht der Tatsache, dass M5 im unforcierten Zustand einen kleineren D aufweist und somit tendenziell mehr Monomere ausbildet als M1 und M3 (s.o. 30% Dimere), könnten verschiedene Erklärungsansätze für diese Beobachtung infrage kommen.

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, existieren u. a. zwei geläufige Erklärungsansätze für die Kopplung zwischen GPCR und G-Protein; *pre-coupling* und *collision-coupling*. Für die mAChRs konnte bereits gezeigt werden, dass Gq-Proteine vorzugsweise und unabhängig von Agonistenbindung an M1 und M3 mittels *pre-coupling* binden (Jakubík et al. 2011; Qin et al. 2011). Qin et al. konnten weiterhin nachweisen, dass die Bindung des G-Proteins im inaktiven Status (kein Ligand gebunden) am C-Terminus des M3-mAChR stattfindet (Qin et al. 2011). Mathematische Modelle bestätigten, dass *pre-coupling* von Rezeptor und G-Protein zu einer akzelerierten Kinetik führen kann, da die Aktivierung eines bereits mit G-Protein ‚vorgekoppelten‘ Rezeptors zu einer sofortigen Aktivierung des G-Proteins führt (Shea et al. 2000; Jakubík et al. 2011). Die akzelerierte Aktivierungskinetik des M1 und M3 mAChR im forcierten Dimer zeigte sich bereits für andere GPCR-Klassen. Jastrzebska et al. konnten feststellen, dass Dimerbildung des Rhodopsin-Rezeptors für die G-Protein Aktivierung eine essentielle Rolle spielt. Sie ermittelten die Gt-Bindungskapazität in Rhodopsin-Rezeptor transfizierten Zellen mit Zusatz von dimerisierungsfördernden Detergenzien und stellten fest, dass Dimere des Rhodopsin-Rezeptors eine deutlich

effizientere und schnellere Aktivierungskinetik besitzen als Monomere. (Jastrzebska et al. 2006). Der Mechanismus, welcher hinter der akzelerierten Aktivierungskinetik forcierter M1- und M3-mAChRs steckt, lässt sich demnach durch zwei mögliche Szenarien erklären: Zum einen kann die Dimerbildung das *pre-coupling* vom G-Protein an den GPCR begünstigen, was wiederum zu einer beschleunigten G-Protein Aktivierung führt. Zum anderen könnten allosterische Effekte durch intermolekulare Kommunikation (im engl. oft als ‚*cross-talk*‘ bezeichnet) zwischen den beiden Rezeptoren zu einer beschleunigten Aktivierung der G-Proteine von dimerisierten Rezeptoren führen. Passende Erklärungsansätze lieferten Damian et al., als sie in Versuchen mit BLT1-Rezeptoren feststellten, dass Monomere des BLT1 zwar effektiv G-Proteine binden, allerdings im Vergleich zu BLT1-Dimeren eine verzögerte GTP γ S-Bindungskinetik aufweisen. Sie stellten weiterhin fest, dass ein Dimer ein G-Protein gebunden hat und somit eine 2:1 Stochiometrie zwischen den beiden Rezeptoren und dem G-Protein existiert. Im Bezug auf ihre Ergebnissen postulierten sie, dass ein Rezeptor in einem Dimer nach Ligandenbindung zur Aktivierung des G-Proteins beiträgt, während der andere über spezifische Kontakte mit dem G-Protein verbunden ist und durch Beeinflussung der Konformation zu einer verstärkten GTP γ S-Bindung führt (Damian et al. 2006).

Über die Aktivierungskinetik und Kopplungsmechanismen des M5-Rezeptors gibt es kaum Erkenntnisse, sodass diesbezüglich lediglich spekuliert werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen für den M5-Rezeptor einen höheren D auf als für M1 und M3, wodurch sich tendentiell auf einen höheren Anteil an Monomeren in M5-transfizierten Zellen schließen lässt (s. Abb. 19, S. 44). Gleichzeitig weist der native M5-Rezeptor eine schnellere Aktivierungskinetik als native M1- und M3-mAChRs auf (s. Abb. 22, S. 46). Dies erscheint zunächst widersprüchlich zu der zuvor aufgestellten Hypothese, dass Dimere zu einer gesteigerten Effizienz des *pre-coupling* und somit zu einer schnelleren Signaltransduktion führen. Geht man jedoch davon aus, dass die M5-Rezeptoren tendentiell eher als Monomere vorkommen und hauptsächlich über *collision-coupling* ihre Signaltransduktion vermitteln, erscheint es durchaus plausibel, dass M5-Rezeptoren durch ihre freie Beweglichkeit als Monomere deutlich effizienter durch die Membran diffundieren und mehr G-Proteine aktivieren können als die größeren Dimere (bspw. in M1- und M3-transfizierten Zellen).

Im Kontext bisheriger Forschung kann vermutet werden, dass Dimere ab einem bestimmten Anteil (z. B. nahezu 100% bei forcierten GFP-NB-Konstrukten) durch erschwerte laterale Diffusion das *collision-coupling* behindern, diesen negativen Effekt allerdings durch optimierte Bedingungen für das *pre-coupling* wieder ausgleichen. Dieser Erklärungsansatz ist kongruent mit der bisherigen Erkenntnis, dass keine festgelegte Kinetik dominiert, sondern Mischformen im Sinne

eines fließenden Modells existieren. Ein etwas simplerer Erklärungsansatz besteht in der Überlegung, dass M1, M3 und M5 ihr G-Protein mittels *pre-coupling* binden und eine Dimerbildung das *pre-coupling* optimiert, der native M5-Rezeptor jedoch deutlich effizienter zum *pre-coupling* befähigt ist, sodass eine forcierte Dimer-Bildung keinen weiteren Effekt auf die Aktivierungskinetik ausübt. Ein durchaus interessanter Versuchsansatz wäre die Beobachtung der Bindungskinetik von G-Proteinen und mAChRs mittels des NB-GFP-Modells im Sinne einer forcierten Dimerisierung.

Eine eindeutige Zuteilung zu einem bestimmten Kopplungsmechanismus ist nur bedingt möglich und hängt von Faktoren wie der Rezeptorklasse, den jeweiligem Zelltyp und der Membranbeschaffenheit ab (Hein und Bünemann 2009; Michal et al. 2015). Es bleibt abzuwarten, ob und mit welchen Methoden die mAChRs, besonders der M5-Rezeptor, in nächster Zeit auf die Mechanismen der G-Protein-Aktivierung und Signaltransduktion untersucht werden.

4.3. M1+M3-, M3+M5-Heterodimere beeinflussen die Aktivierungskinetik

Für co-exprimierte mAChRs konnte festgestellt werden, dass sich die Ca^{2+} -Signalstärken von unforcierten und forcierten Heterodimeren der drei mAChRs M1, M3 und M5 sowohl untereinander als auch von den Einzelmessungen nicht signifikant unterscheiden (Abb. 21). Im Hinblick auf die Aktivierungskinetik zeigte sich, dass alle forcierten Heterodimere eine kürzere TTP aufweisen als die unforcierten, ähnlich den Ergebnissen zu Homodimeren (s. Abb. 25, S. 49). Sowohl für Zellen mit unforciert als auch forciert co-exprimierten M1+M3 ergab sich eine signifikant kürzere TTP als die der beiden einzeln transfizierten Rezeptoren. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Beobachtung ist die Bildung von Heterodimeren zwischen unforciert co-exprimierten M1- und M3-mAChR, welche durch bereits diskutierte *cross-talk* Mechanismen zu einer schnelleren G-Protein-Aktivierung oder zu optimiertem *pre-coupling* befähigt sein könnten. In den hier durchgeführten FRAP-Messungen mit unforciert co-transfizierten M1+M3 mAChR stellte sich jedoch lediglich ein Dimeranteil von etwa 30% an der Zelloberfläche dar. Folglich müsste bei o. g. Hypothese davon ausgegangen werden, dass eine Dimerisierungsrate von nahezu 100% (forciert M1+M3) keinen Unterschied im Vergleich zu einer Dimerisierungsrate von etwa 30% (unforcierte M1+M3) bewirkt. Berücksichtigt man jedoch die Möglichkeit, dass unforcierte M1+M3-Dimere lediglich als temporäre und kurzlebige Dimere vorkommen, welche von FRAP-Messungen nicht als solche erfasst werden können, lässt sich die Hypothese

weiterhin verfolgen. Diese temporären Dimere wären durchaus in der Lage durch intermolekulare *cross-talks* zu einer beschleunigten Signaltransduktion beizutragen. Ob dieser intermolekulare *cross-talk* für temporäre M1+M3-Dimere existiert und warum dieser für diese Rezeptorkombination reserviert sein sollte, bleibt zu klären.

Forcierte Co-Transfektionen mit M1 und M5 zeigen eine statistisch nicht signifikante, dennoch kürzere TTP im Vergleich zu der unforcierten Co-Transfektion (s. Abb. 25 B, S. 49). Die TTP der unforcierten Co-Transfektion von M1 und M5 zeigt sich als Mischform der Aktivierungskinetik beider Einzelrezeptoren. Ein Einfluss der Dimerbildung unter M1 und M5 auf das zelluläre Ca^{2+} -Signal kann sich angesichts der niedrigen Signifikanz nicht bestätigen.

Für die Rezeptorkombination M3+M5 zeigte sich eine signifikant schnellere TTP bei forcierter im Vergleich zu unforcierter Co-Transfektion (Abb. 25 C). Die forcierte Dimerisierung co-exprimierter M3+M5-mAChR könnte demnach gemäß den o. g. Hypothesen (intermolekularer *cross-talk*, optimiertes *pre-coupling*) zu einer beschleunigten Signaltransduktion führen. Die TTP der unforcierten Co-Expression hingegen ist deutlich verlangsamt und ähnlich hoch wie die des M3-Rezeptors. Wie bereits in Kapitel 4.1. erwähnt, weisen die FRAP-Messungen darauf hin, dass M1 und M3-mAChR in unforcierten Co-Transfektionen mit M5 in ihrer Dimerbildung gehemmt werden (s. Abb. 23, S. 47). Der geringe Anteil an Dimeren in M3+M5 co-exprimierenden Zellen könnte die Ursache der verlängerten TTP sein. In M1+M5 co-exprimierenden Zellen scheint dieser Effekt keine wesentliche Auswirkung auf das Ca^{2+} -Signal zu haben.

Zusammenfassend zeigte sich für alle heterologen Rezeptorpaare der forciert co-exprimierten mAChRs M1, M3 und M5 eine verkürzte TTP im Vergleich zu unforciert co-exprimierten mAChRs. Dies wird im Sinne einer beschleunigten Rezeptoraktivierung, bzw. Signaltransduktion durch Effekte der Dimerisierung gewertet. Im Falle von unforciert co-exprimierten M1+M3 zeigte sich ebenfalls eine verkürzte TTP im Vergleich zu einzeln exprimierten M1 und M3.

4.4. Co-Expression von mAChRs bewirkt potentielle Kopplungsmechanismen

In Kapitel 4.3. wurde diskutiert, ob die simultane Stimulation beider Rezeptoren in mAChR-Heterodimeren einen Einfluss auf das Ca^{2+} -Signal haben könnte. Dabei wurden unforciert co-transfizierte mit forciert co-transfizierten Zellen verglichen. Präsentiert sich das Ca^{2+} -Signal der forciert co-transfizierten Zellen signifikant höher oder niedriger als die der unforcierten, so deutet dies auf synergistische oder kompetitive Mechanismen hin, welche der Dimerisierung zugeschrieben werden können. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass es zwischen den Rezeptoren eines Dimers zu Wechselwirkungen kommen kann, welche sich nicht bei simultaner Stimulation zeigen. Beispielsweise stellten Urizar et al. fest, dass Dopamin D2-Rezeptoren in D1-D2 Heterodimeren nach Stimulation mit einem spezifischen D2-Agonisten eine 10fach höhere G-Protein-Aktivierung aufwiesen, als es in D2-D2 Homodimeren der Fall war (Urizar et al. 2011). Damit konnte die funktionelle und pharmakologische Relevanz der Heterodimerisierung unter GPCRs bestätigt und gleichzeitig gezeigt werden, dass auch die alleinige Stimulation eines Rezeptors zu Interaktionen zwischen beiden Rezeptoren eines Dimers führt.

Kapitel 4.4. diskutiert diese Möglichkeit der Interaktion zwischen Rezeptoren eines Dimers in co-transfizierten Zellen bei gezielter Stimulation nur eines der beiden Rezeptoren. Erreicht wurde die gezielte Stimulation durch Verwendung spezifischer allosterischer Agonisten, bzw. spezifischer Antagonisten.

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde überprüft, wie spezifisch die Agonisten/Antagonisten für M1, M3 und M5 sind. Den Abbildungen 27 (S. 52) und 30 (S. 55) ist zu entnehmen, dass McN-A 343 spezifisch für eine M1-Aktivierung und Telenzepin spezifisch für eine M1-Antagonisierung ist. Die Applikation des M3-Antagonisten DAU führt in der von uns verwendeten Konzentration zu einer unspezifischen Blockade des M1- und des M3-Rezeptors (s. Abb. 33, S. 58).

4.4.1. Isolierte M1-Stimulation in M1+M5 führt zur Abschwächung des Ca^{2+} -Signals

Es zeigte sich, dass eine isolierte M1-Aktivierung mithilfe des M1-Agonisten McN-A 343 in M1+M5 co-transfizierten Zellen zu einem signifikanten Rückgang der Ca^{2+} -Signalstärke und zu einer signifikanten Verzögerung der Aktivierungskinetik führt (s. Abb. 28, S. 53). Der Stimulationsausfall der M5-Rezeptoren in co-exprimierten M1+M5 mAChR führt demnach zu einer Reduktion der Signaltransduktion und intrazellulären Ca^{2+} -Ausschüttung, wie sie bei fehlender Aktivierung der halben Rezeptormenge erwartet werden kann.

4.4.2. Isolierte M1-Stimulation in M1+M3 führt zur Aufrechterhaltung des Ca²⁺-Signals

Eine isolierte M1-Aktivierung in M1+M3 co-transfizierten Zellen mithilfe des M1-Agonisten McN-A 343, führte zu keiner signifikanten Abweichung der Ca²⁺-Signalstärke (s. Abb. 29 A u. B, S. 54). Trotz des Stimulationsausfalls des M3-Rezeptors zeigte sich die Signalstärke unverändert. Die Aktivierungskinetik M1+M3 co-transfizierter und mit McN-A 343 stimulierter Zellen präsentierte sich signifikant schneller im Gegensatz zu alleiniger M1-Transfektion mit McN-A 343 Stimulation (Abb. 29 C). Die Ergebnisse zur Aktivierungskinetik entsprechen dem gleichen Verhältnis wie M1+M3- und M1-transfizierte Zellen mit ACh-Stimulation (s. Abb. 24, S. 48). Betrachtet man zusätzlich die bereits vorgestellte Diskussion und Interpretation der Daten zu der Co-Transfektion M1+M3 mit ACh-Stimulation, ist die dort aufgegriffene Hypothese einer Kommunikation unter den Rezeptoren naheliegend. Diese Interaktion zwischen den Rezeptoren erlaubt das Aufrechterhalten des Ca²⁺-Signals, trotz fehlender Stimulation der halben Rezeptorpopulation (M3). Für Heterodimere unter mAChRs ist dies eine neue Erkenntnis, es existieren jedoch ähnliche Resultate für diverse heterologe Rezeptorpaare.

Maggio et al. äußerten erstmals die Vermutung einer direkten Protein-Protein-Interaktion zwischen co-transfizierten Rezeptoren. Untersucht wurde das Signal- und Bindeverhalten chimärer signaldefizienter α_2 /M3 und M3/ α_2 Rezeptoren mit der Feststellung, dass die Funktionslosigkeit der einzelnen chimären Rezeptoren durch Co-Expression beider Chimären aufgehoben wird. Aus der Arbeit ging hervor, dass direkte physikalische Interaktionen zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Rezeptoren führen. Dieses beobachtete Phänomen wurde wiederholt als sog. ‚*rescue*-Phänomen‘ bezeichnet (Maggio et al. 1993).

Maggios Forschung wurde zum Paradebeispiel zahlreicher ähnlicher Versuchsreihen, in denen die verschiedensten GPCRs im Hinblick auf die Wiederherstellung der Rezeptorfunktionalität durch Kommunikation zwischen Rezeptorpaaren untersucht wurden. So konnten auch Hebert et al. einige Jahre später zeigen, dass die Co-Expression eines defekten β_2 -Adrenorezeptors mit einem wild-typ β_2 -Adrenorezeptor zu einer Wiederherstellung der Rezeptorfunktion führt und intermolekulare Kommunikationsmechanismen eine Rolle spielen könnten (Hebert et al. 1998). Die Hypothese einer Kommunikation unter den Rezeptorpaaren bestätigte sich durch zahlreiche und vielfältige Untersuchungsmethoden weiterer Arbeiten, in denen Interaktionen zwischen den Rezeptoren eines Heterodimers nachgewiesen werden konnten (Rocheville et al. 2000; Lavoie et al. 2002; Werry et al. 2003). Die ersten Hinweise auf intermolekulare Kommunikation zwischen zwei mAChRs lieferten Chiaccio et al., indem sie mutierte M2 Rezeptor (Asparagin-

404 der TMD VI wurde durch Serin ersetzt) erzeugten, dessen Antagonist-Bindekapazität durch diese Mutation drastisch reduziert wurde (Blüml et al. 1994). Die Co-Expression dieser mutierten M2(Asn404 → Ser)-Rezeptoren mit Wild-Typ M3-Rezeptoren führte zur Wiederherstellung der Antagonisten-Bindfähigkeit. In der gleichen Versuchsreihe führten sie ähnliche Experimente mit mutierten M3-Rezeptoren durch, welche durch Co-Expression mit einem Wild-Typ M3-Rezeptor ebenfalls ihre Bindfähigkeit wiederherstellen konnten. Dieses *rescue*-Phänomen ließ sich durch Deletion von 196 Aminosäuren der IL3 (*intracellular loop 3*) verhindern, womit die Bedeutung der IL-3 für die intermolekulare Kommunikation bzw. die Ausbildung von Dimeren ersichtlich wurde (Chiacchio et al. 2000).

Han et al. zeigten für D2-Dopaminrezeptoren, dass die kleinste funktionelle Einheit aus zwei Rezeptoren und einem G-Protein besteht und die Aktivierung eines Rezeptors innerhalb des dimeren Komplexes zu einer maximalen Signalantwort führt (Han et al. 2009). Die Aktivierung eines Rezeptors innerhalb eines Dimers wird auch als ‚asymmetrische Aktivierung‘ beschrieben. Sie wurde für zahlreiche GPCRs beobachtet und resultierte in Überlegungen zu theoretischen Modellen der Kreuzaktivierung zwischen zwei Rezeptoren. Moreira et al. beschreiben in ihrem Review zwei Möglichkeiten der gegenseitigen Beeinflussung: Einerseits beschreiben sie das Modell der ‚cis-Aktivierung‘, indem der Agonist-gekoppelte Rezeptor mit dem G-Protein (oder beiden G-Proteinen) interagiert, oder der ‚trans-Aktivierung‘, in der ein Agonist-gekoppelter Rezeptor den anderen ungebundenen Rezeptor aktiviert und dieser anschließend sein G-Protein (Moreira 2014).

Die bisherigen Erkenntnisse sind kongruent mit unseren Ergebnissen zur M1+M3-Co-Transfektion, mit alleiniger allosterischer Aktivierung des M1-mAChR. Die bereits geäußerte Vermutung, dass zwischen Rezeptoren heterologer mAChR-Dimere Kopplungsmechanismen existieren, lässt sich mit zahlreicher Literatur in Einklang bringen. Welche genauen Mechanismen hinter dem *rescue*-Phänomen stehen, bleibt zu klären.

4.4.3. Isolierte M3-Stimulation in M1+M3 führt zur Abschwächung des Ca²⁺-Signals

Ergänzend zum vorgehenden Versuch, wurden M1+M3 co-exprimierende Zellen mit dem M1-Antagonisten Telenzepin behandelt und der M3-Rezeptor anschließend mit 1 µM ACh stimuliert. Anders als bei isolierter M1-Stimulation mit McN bewirkt eine isolierte M3-Stimulation in M1+M3 co-exprimierenden Zellen eine deutliche Reduktion des Ca²⁺-Signals (s. Abb. 31, S. 56). Eine Aufrechterhaltung des Signals bei isolierter Aktivierung des M3-Rezeptors konnte nicht beobachtet werden.

An dieser Stelle sollte der Einfluss des Telenzepin auf die Eigenschaften der Rezeptoren diskutiert werden. Pediani et al. konnten zeigen, dass die selektiven M1-Antagonisten Pirenzepin und das nahe verwandte Telenzepin bei Applikation auf M1-transfizierten HEK293-Zellen eine Erhöhung der membranständigen Dimerfraktionen bewirken (Pediani et al. 2016). Es kann dementsprechend davon ausgegangen werden, dass die Applikation von Telenzepin zu M1+M3 co-transfizierten Zellen eine höhere Rate an M1-Dimeren bewirkt. Unklar ist, ob durch die hohe Rate an M1-Dimeren mögliche Interaktionen zwischen M1- und M3-Rezeptoren gleichermaßen beeinflusst werden. Da für diese Versuchsreihe kein *rescue*-Phänomen des inaktiven Rezeptors beobachtet werden konnte, existieren zwei mögliche Erklärungsansätze: Entweder existiert bei isolierter Stimulation des M3 in M1+M3 co-transfizierten Zellen kein *rescue*-Phänomen für M1, oder die Anwendung von Telenzepin hemmt die Ausbildung von M1+M3-Dimeren, wodurch Interaktionen zwischen den Rezeptoren (z. B. im Sinne des *rescue*-Phänomens) unterbunden werden.

Pediani und seine Arbeitsgruppe konnten weiterhin zeigen, dass Pirenzepin den M3-Rezeptor in gleichem Ausmaß besetzt, allerdings zu keiner Änderung der Dimerkonfiguration führt (Pediani et al. 2016). Es bleibt zu klären, ob die Gabe eines Antagonisten Einfluss auf die Bindung zwischen co-transfizierten Rezeptoren hat und welche Ausmaße dieser Einfluss annehmen könnte. Die Arbeiten von Pediani et al. deuten an, dass bei Anwendung der M1-Antagonisten Pirenzepin/Telenzepin die Interpretation der Ergebnisse im Hinblick auf Dimerisierung zumindest nur bedingt möglich ist.

4.4.4. Isolierte M5-Stimulation in M1+M5 führt zur Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Signalstärke bei reduzierter Aktivierungskinetik

Telenzepin wurde ebenfalls für die M1-Antagonisierung in M1+M5 co-transfizierten Zellen genutzt. In unseren Versuchen stellte sich heraus, dass die alleinige Aktivierung von M5 in M1+M5 co-transfizierten Zellen zu einer Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Signalstärke, allerdings auch zu deutlichen Einschränkungen der Aktivierungskinetik führt (s. Abb. 32, S. 57). Es zeigt sich dementsprechend im Hinblick auf Ca^{2+} -Signalstärke das bereits beobachtete *rescue*-Phänomen, wohingegen die Aktivierungskinetik deutlich verlängert ist. Eine mögliche Erklärung für die verlängerte Aktivierungskinetik könnte erneut die Nebenwirkung des Telenzepin sein, die Rate an M1-Dimeren zu erhöhen, wodurch sich auch die Kinetik des M5 Rezeptors beeinflusst. Für die Kinetik des M5-mAChR wurde bereits diskutiert, ob dessen G-Proteine womöglich bevorzugt über das *collision-coupling* aktiviert werden (Kapitel 4.2., s.S.63ff). Eine durch Telenzepin erhöhte Rate an membranständigen M1-Dimeren würde die freie Beweglichkeit der M5-

Rezeptoren in der Membran, somit auch die Effektivität des *collision-coupling*, einschränken. Einflüsse des Antagonisten Telenzepin auf den M5.mAChR, wie bereits für M3 beschrieben, sind in der Literatur nicht erwähnt. Die Aufrechterhaltung des Ca^{2+} -Signals und somit auch der Aktivierungskinetik durch die isolierte M5-Stimulation scheint in Anbetracht bisheriger Ergebnisse möglich. Um potentiellen Nebeneffekten des Telenzepins zu entgehen, wären Versuche mit hochselektiven M5-Agonisten hilfreich.

4.4.5. Isolierte M5-Stimulation in M3+M5 führt zur Abschwächung der Ca^{2+} -Signalstärke

Der M3-Antagonist DAU erwies sich als unspezifisch. Eine von uns benötigte Konzentration von $0,01 \mu\text{M}$ DAU blockierte nach ACh-Stimulation die Signalantwort des M3 Rezeptors sowie gleichermaßen des M1-mAChR (s. Abb. 33, S. 58). Da die Kombination M1+M3 mit M1-Aktivierung bereits mittels McN-A 343 erprobt wurde, blieb diese Beobachtung jedoch ohne relevante Konsequenz für unsere Versuchsreihe.

Für die Kombination aus M3+M5 wurden co-transfizierten Zellen mit $0,01 \mu\text{M}$ DAU behandelt und anschließend mit $1 \mu\text{M}$ ACh stimuliert. Die M3-Antagonisierung und isolierte M5-Stimulation führte zu einer deutlichen Reduktion der Ca^{2+} -Signalstärke und einer nahezu unveränderten Aktivierungskinetik (s. Abb. 34, S. 59). An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass eine Beurteilung der Aktivierungskinetik nur bedingt möglich ist, da der M3-Antagonist DAU einen deutlichen Einfluss auf die Aktivierungskinetik aufweist. In den Kreuzversuchen mit M5-transfizierten Zellen, denen zunächst DAU und anschließend $1 \mu\text{M}$ ACh zupipettiert wurden, zeigte sich eine deutliche Verzögerung der Aktivierungskinetik bei unveränderter Ca^{2+} -Signalstärke und Ca^{2+} -Peak (Vergleich Abb. 22 mit Abb. 34). Der ungewöhnlich starke Abfall der Ca^{2+} -Signalstärke bei fehlender Stimulation des M3-Rezeptors in M3+M5 co-transfizierten Zellen könnte ein Hinweis auf negative Kooperationsmechanismen unter den Rezeptoren sein. Diese wurden bereits für andere GPCRs beobachtet und stellen das Gegenstück zu dem bereits beschriebenen *rescue*-Phänomen dar.

FRET-Analysen co-exprimierter μ -opioid Rezeptoren (MOR) und α_{2A} -adrenergen Rezeptoren (α_{2A} -AR) in HEK-293-Zellen zeigten, dass es zwischen den heterologen Rezeptoren zu Heterodimerisierung kommt. Nach Zugabe von Morphin bzw. Norepinephrin als Agonist des jeweiligen Rezeptors konnte festgestellt werden, dass die Gabe von Morphin zu den co-transfizierten Zellen eine Signaltransduktion des α_{2A} -AR durch Noradrenalin verhindert. Der ausbleibende Effekt nach Applikation von Morphin zu lediglich α_{2A} -AR-transfizierten Zellen bestätigte, dass es sich tatsächlich um Kommunikationsmechanismen zwischen zwei co-transfizierten GPCRs

handelt, bei denen molekulare ‚*cross-talk*‘-Mechanismen (transmolekulare Konformationsänderungen) eine entscheidende Rolle spielen (Vilardaga et al. 2008). Diese Beobachtung wurde zwar bereits vielfach bestätigt, jedoch stets mit dem Fokus die Signalkaskade verstärkend zu aktivieren. Das Beispiel der μ -opioid- und α_{2A} -adrenergen Rezeptoren weist darauf hin, dass *cross-talk*-Mechanismen zwischen dimerisierten Rezeptoren nicht nur zu positiv verstärkenden Effekten, sondern auch zu inhibitorischen Effekten führen können. Vilardaga et al. vermuten, dass solche Mechanismen existieren könnten, um eine Überstimulation der Signalwege zu verhindern.

Diese Angaben bestätigen die Bedeutung der intermolekularen Kommunikation zwischen Dimeren, zeigen jedoch auch, dass es durch Bindung spezifischer allosterischer Antagonisten zu Konformationsänderungen kommen kann, welche negative *cross-talk*-Mechanismen bewirken.

4.5. Limitationen der Interpretation

Ein Kritikpunkt an Arbeiten zum Thema Dimerisierung/Oligomerisierung ist die Transfektion exogener Rezeptor-DNA in die Zellen, wodurch die physiologische Rezeptor-Expression um ein Vielfaches übersteigt wird. Für die erfolgreiche Durchführung der FRAP-Versuche wurde eine gewisse Expressionsstärke der Rezeptoren benötigt. Zwei Argumente sprechen dafür, dass in dieser Arbeit keine verfälschte Anzahl an Dimeren provoziert wurde. Wie in Abb. 14 (S. 38) zu sehen, wurde die Menge an transfizierter Rezeptor-DNA so gewählt, dass keine Sättigung eintrat. Herrick-Davis und seine Arbeitsgruppe konnten weiterhin zeigen, wie die Rate an M1-(GFP)Dimeren in HEK293 Zellen über eine steigende Rezeptor-Expressionsrate hinweg stabil blieb (Herrick-Davis et al. 2013).

Im Hinblick auf die Co-Transfektion zweier Rezeptoren kann nach verschiedenen Prinzipien vorgegangen werden. Einerseits kann die verwendete Menge an Rezeptor-DNA pro Rezeptor halbiert werden, womit die Gesamtmenge an Rezeptor-DNA im Vergleich zu den einzeln transfizierten Rezeptoren gleichbleibt. Andererseits kann die verwendete DNA-Menge der Einzeltransfektion pro Rezeptor beibehalten und demnach eine doppelte Gesamtkonzentration an Rezeptor-DNA transfiziert werden. Letzteres hat den Vorteil, dass die verwendeten Rezeptormengen nicht verändert werden und die jeweiligen Ergebnisse besser verglichen werden können. Allerdings geht diese Methodik auch mit einer doppelten Oberflächenexpression der Rezeptoren einher. Die höhere Dichte an Rezeptoren könnte die Tendenz zur Dimerbildung maßgeblich beeinflussen.

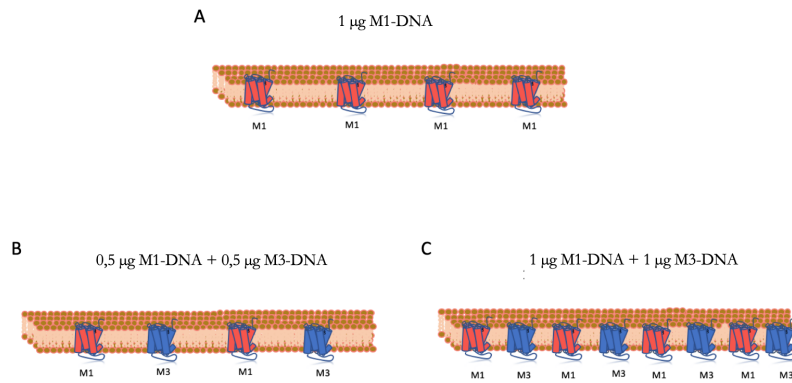


Abbildung 35: Graphische Darstellung von oberflächlich exprimierten mAChRs eingebettet in die Zellmembran. (A) zeigt die Rezeptorexpression bei Einzeltransfektion mit 1 µg Rezeptor-DNA. (B) zeigt eine Co-Transfektion mit pro Rezeptor verwendeter halb-molarer DNA-Mengen (0,5 µg + 0,5 µg) bei insgesamt äquimolarer Gesamtmenge an DNA im Vergleich zur Einzeltransfektion (A). (C) zeigt eine Co-Transfektion mit Verwendung von 1 µg Rezeptor-DNA pro Rezeptor und somit einer zweifach molaren DNA-Menge im Vergleich zu Einzeltransfektionen (A).

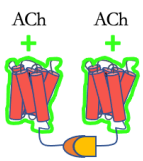
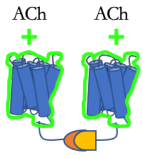
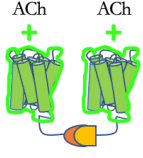
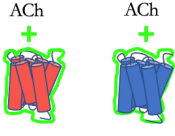
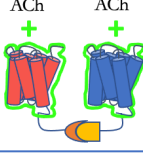

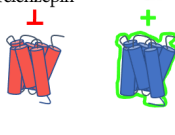
Die Halbierung der jeweiligen DNA-Mengen hingegen führt nach Co-Transfizierung zu einer stabilen Expressionsrate im Vergleich zu den Einzel-Transfektionen, weshalb dieses Prinzip in der Arbeit verwendet wurde. Weiterführende, in dieser Arbeit nicht dargestellte, Versuche konnten zeigen, dass eine halbierte Rezeptorexpressionsrate zu einem hälftigen Ca^{2+} -Signal führte (Daten nicht gezeigt). Dies stellte eine entscheidende Voraussetzung für die Interpretation der Versuche mit Agonisten/Antagonisten-Behandlung dar.

Ein limitierender Faktor der Arbeit stellte die begrenzte Verfügbarkeit an spezifischen Agonisten bzw. Antagonisten für M1, M3 und M5 dar. Besonders der zuletzt entdeckte M5-Rezeptor wies zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung eine begrenzte Anzahl an spezifischen Agonisten bzw. Antagonisten auf, welche zu dem Zeitpunkt nicht ausreichend erprobt waren. Die Auswirkungen der allosterischen oder orthosterischen Agonisten bzw. Antagonisten auf die Konformation der Rezeptoren sollten für die Interpretation der Versuche stets berücksichtigt werden. Es existieren zahlreiche, teils widersprüchliche Studien, welche die Auswirkungen besonders von Antagonisten auf die Oligomer-Struktur der jeweils betroffenen Rezeptoren beschreiben. Ob sich diese Effekte auch für unsere Versuche ergeben, ließe sich anhand einer weiteren FRAP-Versuchsreihe mit zusätzlicher Applikation von Agonisten-/Antagonistenlösung nachweisen. So wurde bereits auf S. 69f diskutiert, dass der orthosterische Antagonist Telenzepin Effekte auf den Grad der Rezeptor-Dimerisierung ausübt.

Markovic et al. erzeugten M1-Chimären, in denen die i3 loop, als Zentrum der Konformationsänderung, mit Fluoreszenzproteinen markiert wurde und beobachteten anhand von FRET-Studien die Konformation der Rezeptoren nach Ligandenapplikation (Markovic et al. 2012). Sie konnten nachweisen, dass trotz der unterschiedlichen Bindestellen allosterischer und orthosterischer Agonisten ähnliche Konformationsänderung zu beobachten sind. Weiterhin stellten sie fest, dass die Aktivierung durch erprobte Partialagonisten (wie z. B. McN-A 343) im Vergleich zu den sog. Vollagonisten (in der Studie Metacholin, in dieser Arbeit ACh) jedoch eine deutlich reduzierte Rate an Konformationsänderung mit sich bringt. Für diese Arbeit stellt sich nun die Frage, ob das Ausmaß der Konformationsänderung auch eine Bedeutung für die Dimerisierung hat. Borroto et al. konnten zeigen, dass für den M5-mAChR die i3 loop für die Homo-Dimerisierung einen entscheidenden Faktor darstellt (Borroto-Escuela et al. 2010). Die Tatsache, dass Partialagonisten, sowie orthosterische/allosterische Antagonisten im Vergleich zu den Vollagonisten einen Einfluss auf die i3 loop-vermittelte Konformationsänderung haben und dadurch auch die Dimerisierung beeinflussen könnten, muss bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden.

Ein ebenfalls nenneswerter Punkt ist die Stimulation der Zellen mittels Pipettierung von ACh, welche zwar unter hoch standardisierten Bedingungen ablief, eine physiologische ACh-Ausschüttung allerdings nicht nachahmen kann. Die Überlegungen ein mechanisches Pipettiermodell zu verwenden, das über ein Schlauchsystem kontinuierlich vorgefertigte ACh-Konzentrationen in die Messchalen hinzufügt, wurde wegen der schlechten Steuerbarkeit und dem hohen Aufwand verworfen.

4.5.1. Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

M1+M1 forc.		Verkürzte TTP bei gleichbleibender Ca ²⁺ -Signalstärke im Vergleich zu unforcierter Expression
M3+M3 forc.		Verkürzte TTP bei gleichbleibender Ca ²⁺ -Signalstärke im Vergleich zu unforcierter Expression
M5+M5 forc.		TTP und Ca ²⁺ -Signalstärke unverändert im Vergleich zu unforcierter Expression
M1+M3		Verkürzte TTP bei unveränderter Ca ²⁺ -Signalstärke im Vergleich zur Einzelexpression
M1+M3 forc.		Verkürzte TTP bei unveränderter Ca ²⁺ -Signalstärke im Vergleich zu unforcierter Expression
M1+M3		Isolierte M1-Stimulation in M1+M3 (McN) führt zur Aufrechterhaltung des Ca ²⁺ -Signals mit unveränderter TTP und Ca ²⁺ -Signalstärke im Vergleich zu M1+M3 (ACh), mgl. <i>rescue</i> -Phänomen.
M1+M3		Isolierte M4-Stimulation in M1+M3 (Telenzepin/ACh) führt zur Abschwächung des Ca ²⁺ -Signals mit halbmax. Ca ²⁺ -Signalstärke und verlängerter TTP im Vergleich zu M1+M3 (ACh) Einfluss des Telenzepin auf Dimerbildung bleibt unklar

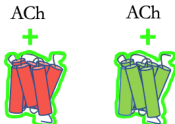
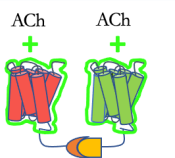
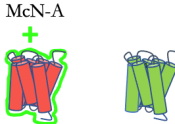
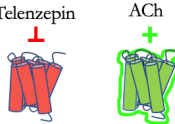
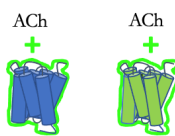
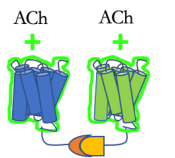
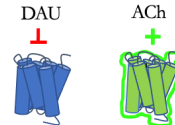
M1+M5		Unveränderte TTP und Ca ²⁺ -Signalstärke im Vergleich zur Einzelexpression
M1+M5 forc.		Statistisch nicht signifikant verkürzte TTP bei unveränderter Ca ²⁺ -Signalstärke im Vergleich zu unforcierter Expression
M1+M5		Isolierte M1-Stimulation in M1+M5 (McN) führt zur Abschwächung des Ca ²⁺ -Signals mit halbmax. Ca ²⁺ -Signalstärke und verlängerter TTP im Vergleich zu M1+M5 (ACh)
M1+M5		Isolierte M5-Stimulation in M1+M5 (Telenzepin/ACh) führt zur Aufrechterhaltung der Ca ²⁺ -Signalstärke bei reduzierter TTP im Vergleich zu M1+M5 (ACh)
M3+M5		Verlängerte TTP bei unveränderter Ca ²⁺ -Signalstärke im Vergleich zur Einzelexpression
M3+M5 forc.		Verkürzte TTP bei unveränderter Ca ²⁺ -Signalstärke im Vergleich zu unforcierter Expression
M3+M5		Isolierte M5-Stimulation in M3+M5 (DAU/ACh) führt zu erheblicher Abschwächung der Ca ²⁺ -Signalstärke (neg. Kooperationsmechanismen mgl.) Aktivierungskinetik nur bedingt beurteilbar, da potentieller Einfluss von DAU auf die TTP in den Kreuzversuchen.

Abbildung 36: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse. Eingliederung in Rezeptorkombination, graphische Darstellung und schriftliche Erläuterung.

4.6. Möglichkeiten und Ausblick

MACHRs nehmen durch ihr Vorhandensein im zentralen und vegetativen Nervensystem einen bedeutenden Stellenwert ein. Diverse neurologische Erkrankungen werden mit dem Untergang cholinergischer Neurone bzw. dem Ausfall einzelner Rezeptorsubtypen in Zusammenhang gebracht. Jährlich nimmt die Anzahl der Entdeckungen eminenter Zusammenhänge zwischen Erkrankungen des Nervensystems und den mACHRs zu. Aus diesen Erkenntnissen wachsen auch Möglichkeiten der medikamentösen Beeinflussung dieser Defizite.

In der Einleitung Kapitel 1.2.1. wurden bereits rezeptorassoziierte Erkrankungsmuster erwähnt, welche die klinische Bedeutung der mACHRs hervorheben. Eines der zahlreichen Beispiele mit großer gesellschaftlicher Bedeutung ist der Untergang cholinergischer Neurone in der Alzheimer'schen Erkrankung. Auch wenn bis heute kein direkter Zusammenhang zwischen fehlerhaften M1-Rezeptoren und der Alzheimer'schen Erkrankung gefunden werden konnte, stellen allosterische M1-Agonisten die bisher effektivste Therapie in der Behandlung der kognitiven Leistungseinschränkung dar (Scarr 2012). Ihre nachgewiesene Eigenschaft, das Fortschreiten der für die Pathophysiologie maßgeblichen, hippocampalen β -amyloid Akkumulation zu verhindern, haben sie zum vorherrschenden Pharmazeutikum werden lassen (Caccamo et al. 2006).

Ein weiteres, im Hinblick auf mACHRs intensiv erforschtes Krankheitsbild ist die Schizophrenie. Die Rolle des mACHR-M1 in der Pathophysiologie der Schizophrenie konnte durch zahlreiche Studien nachgewiesen werden (Dean et al. 2002; Katerina et al. 2004). In einer Arbeit von 2009 konnten Scarr et al Anhand von Antagonisten-Bindungskurven (Pirenzepin) zeigen, dass bestimmte Subgruppen von Schizophrenie-Patienten existieren, bei denen die Anzahl der M1-Bindestellen im dorsolateralen präfrontalen Kortex auf knapp 25% reduziert ist (Scarr et al. 2009). Diese Subtypenspezifität der Erkrankung ist ein wichtiger Hinweis für die spätere Therapie dieser Patienten und dient einem besseren Verständnis über die Pathophysiologie der Schizophrenie.

Anhand dieser Beispiele zeigt sich die enorme Bedeutsamkeit der speziellen pharmakologischen Beeinflussung GPCR-assoziierter Erkrankungen. Unsere Erkenntnisse zu potentiellen Kopplungsmechanismen unter mACHRs könnten für die Therapie dieser Patientengruppen von großer Bedeutung sein. Besonders die Steuerung des in der Diskussion häufig erwähnten *rescue*-Phänomens dürfte für rezeptorassoziierte Erkrankungen eine Rolle spielen. Anhand dieses Phänomens lassen sich evtl. neue Therapiemodelle entwickeln, welche nicht lediglich auf der gezielten Aktivierung eines spezifischen Rezeptors basieren, sondern die Interaktion der ortsansässi-

gen defekten Rezeptoren mit benachbarten funktionalen Rezeptoren miteinbezieht. Dieses theoretische Therapiemodell könnte ebenfalls eine Reduktion rezeptorassoziierter Nebenwirkungen in der aktuellen klassischen Pharmatherapie bewirken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen insbesondere für heterologe Rezeptorpaare einen Effekt der Dimerisierung auf die Rezeptorfunktion und -kinetik. In Zukunft wäre es durchaus sinnvoll, Erkenntnisse zu diesem unzureichend erforschten Gebiet zu erweitern und potentielle Kopplungsmechanismen unter mAChRs zu untersuchen. Die Etablierung spezifischer Agonisten, welche seit der Aufdeckung der kristallinen Strukturen der mAChRs immer rasanter voranschreitet, sollte dabei von großer Hilfe sein. Ein besonderer Fokus könnte dabei auf die Anwendung spezifischer Agonisten/Antagonisten in forcierten Heterodimeren gelegt werden.

5. Zusammenfassung

Die Tatsache, dass ein Großteil der GPCRs Dimere bilden, scheint mittlerweile unumstritten. Die Auswirkungen dieser Dimerisierung stellt jedoch ein weiterhin nicht vollständig geklärtes Kapitel in der Rezeptorforschung dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fragestellung nachgegangen, welchen Einfluss Dimerisierung unter den G_q -Protein-gekoppelten mAChRs M1, M3 und M5 auf die zelluläre Signalkaskade hat. Im Hinblick auf die mAChRs hat es diesbezüglich bisher kaum Aufschlüsse zu diesem Thema gegeben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich feststellen, dass Dimere der mAChRs M1, M3 und M5 einen Einfluss auf die zelluläre Signalkaskade der Rezeptoren haben. Die Existenz von potentiellen Wechselwirkungen bzw. Kopplungsmechanismen zwischen den beiden Rezeptorpartnern eines Dimers lässt sich mit unseren Ergebnissen in Einklang bringen. Besonders deutlich wurde diese Beobachtung in den Messungen co-exprimierter mAChRs mit selektiver Stimulation eines Rezeptors. Es zeigte sich sowohl für M1+M3- als auch für M1+M5-co-transfizierte Zellen, dass die isolierte Stimulation eines mAChRs ausreicht, um ein ähnlich starkes Ca^{2+} -Signal zu erhalten, wie bei Aktivierung beider mAChRs. Des Weiteren konnten für forcierte Homo- und Heterodimere zwischen M1, M3 und M5 Einflüsse auf die Aktivierungskinetik im Sinne einer verkürzten TTP festgestellt werden.

Die beobachteten Phänomene sind kongruent mit Ergebnissen zahlreicher Studien, welche sich mit der Dimerisierung von GPCRs beschäftigen. Dass das genaue Verständnis und die gezielte Beeinflussung dieser Kopplungsmechanismen für die pharmakologische Forschung noch von großem Interesse sein werden, steht außer Frage. Gerade im Hinblick auf Dimerbildung dürfte der Fokus der pharmakologischen Forschung in Zukunft auf der Entwicklung gezielter dimerisierungsfördernder oder -hemmender Substanzen liegen, um Einflüsse auf die genannten Kopplungsmechanismen nehmen zu können. Die Zukunft wird zeigen, mit welchen Methoden mögliche Kopplungsmechanismen unter mAChRs weiter untersucht werden und ob, bzw. wann sich aus diesen die Entwicklung neuer pharmakologischer Konzepte mit klinischer Relevanz ableiten lassen.

6. Literaturverzeichnis

- Akerboom J, Rivera JDV, Guilbe MMR, Malavé ECA, Hernandez HH, Tian L, Hires SA, Marvin JS, Looger LL, Schreier ER (2009): Crystal Structures of the GCaMP Calcium Sensor Reveal the Mechanism of Fluorescence Signal Change and Aid Rational Design. *J Biol Chem* 284, 6455–6464
- Anagnostaras SG, Murphy GG, Hamilton SE, Mitchell SL, Rahnama NP, Nathanson NM, Silva AJ (2003): Selective cognitive dysfunction in acetylcholine M1 muscarinic receptor mutant mice. *Nat Neurosci* 6, 51–58
- Angers S, Salahpour A, Joly E, Hilairat S, Chelsky D, Dennis M, Bouvier M (2000): Detection of β 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3684–3689
- Angers S, Salahpour A, Bouvier M (2002): Dimerization: An Emerging Concept for G Protein–Coupled Receptor Ontogeny and Function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 409–435
- Aslanoglou D, Alvarez-Curto E, Marsango S, Milligan G (2015): Distinct Agonist Regulation of Muscarinic Acetylcholine M2-M3 Heteromers and Their Corresponding Homomers. *J Biol Chem* 290, 14785–14796
- Avisar S, Amitai G, Sokolovsky M (1983): Oligomeric structure of muscarinic receptors is shown by photoaffinity labeling: subunit assembly may explain high- and low-affinity agonist states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 156–159
- Basile AS, Fedorova I, Zapata A, Liu X, Shippenberg T, Duttaroy A, Yamada M, Wess J (2002): Deletion of the M5 muscarinic acetylcholine receptor attenuates morphine reinforcement and withdrawal but not morphine analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11452–11457
- Berridge MJ, Irvine RF (1984): Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315–321
- Bevis BJ, Glick BS (2002): Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol* 20, 83–87
- Bjarnadóttir TK, Gloriam DE, Hellstrand SH, Kristiansson H, Fredriksson R, Schiöth HB (2006): Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics* 88, 263–273
- Blüml K, Mutschler E, Wess J (1994): Functional role in ligand binding and receptor activation of an asparagine residue present in the sixth transmembrane domain of all muscarinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 269, 18870–18876
- Böni-Schnetzler M, Pilch PF (1987): Mechanism of epidermal growth factor receptor autophosphorylation and high-affinity binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7832–7836

- Bonner TI, Young AC, Bran MR, Buckley NJ (1988): Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* **1**, 403–410
- Borroto-Escuela DO, García-Negredo G, Garriga P, Fuxe K, Ciruela F (2010): The M5 muscarinic acetylcholine receptor third intracellular loop regulates receptor function and oligomerization. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1803**, 813–825
- Bouvier M (2001): Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* **2**, 274–286
- Caccamo A, Oddo S, Billings LM, Green KN, Martinez-Coria H, Fisher A, LaFerla FM (2006): M1 Receptors Play a Central Role in Modulating AD-like Pathology in Transgenic Mice. *Neuron* **49**, 671–682
- Caulfield MP (1993): Muscarinic Receptors—Characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* **58**, 319–379
- Caulfield MP, Birdsall NJM (1998): International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Pharmacol Rev* **50**, 279–290
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802–805
- Chen T W, Wardill TJ, Sun Y, Pulver SR, Renninger SL, Baohan A, Schreiter ER, Kerr RA, Orger MB, Jayaraman V, et al. (2013): Ultra-sensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* **499**, 295–300
- Chiacchio S, Scarselli M, Armogida M, Maggio R (2000): Pharmacological evidence of muscarinic receptor heterodimerization. *Pharm Acta Helv* **74**, 315–326
- Damian M, Martin A, Mesnier D, Pin J P, Banères J L (2006): Asymmetric conformational changes in a GPCR dimer controlled by G-proteins. *EMBO J* **25**, 5693–5702
- Dean B, McLeod M, Keriakous D, McKenzie J, Scarr E (2002): Decreased muscarinic1 receptors in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Mol Psychiatry* **7**, 1083–1091
- Deschout H, Raemdonck K, Demeester J, De Smedt SC, Braeckmans K (2014): FRAP in Pharmaceutical Research: Practical Guidelines and Applications in Drug Delivery. *Pharm Res* **31**, 255–270
- Dohlman HG, Thorner J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1991): Model Systems for the Study of Seven-Transmembrane-Segment Receptors. *Annu Rev Biochem* **60**, 653–688
- Dupré DJ, Robitaille M, Éthier N, Villeneuve LR, Mamarbachi AM, Hébert TE (2006): Seven Transmembrane Receptor Core Signaling Complexes Are Assembled Prior to Plasma Membrane Trafficking. *J Biol Chem* **281**, 34561–34573
- Eglen RM: Overview of Muscarinic Receptor Subtypes. In: *Muscarinic Receptors (Handbook of Experimental Pharmacology)*. Springer, Berlin, Heidelberg 2012, 3–28

- Eglen RM, Nahorski SR (2000): The muscarinic M5 receptor: a silent or emerging subtype? *Br J Pharmacol* 130, 13–21
- Ferguson KM (2008): Structure-based view of epidermal growth factor receptor regulation. *Annu Rev Biophys* 37, 353–373
- Fisher A (2008): M1 muscarinic agonists target major hallmarks of Alzheimer's disease--the pivotal role of brain M1 receptors. *Neurodegener Dis* 5, 237–240
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin L G, Schiöth HB (2003): The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol* 63, 1256–1272
- Fujii T, Mashimo M, Moriwaki Y, Misawa H, Ono S, Horiguchi K, Kawashima K (2017): Physiological functions of the cholinergic system in immune cells. *J Pharmacol Sci* 134, 1–21
- Fukamauchi F, Saunders PA, Hough C, Chuang DM (1993): Agonist-induced down-regulation and antagonist-induced up-regulation of m2- and m3-muscarinic acetylcholine receptor mRNA and protein in cultured cerebellar granule cells. *Mol Pharmacol* 44, 940–949
- Galés C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hébert TE, Bouvier M (2005): Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods* 2, 177–184
- Gautam D, Heard TS, Cui Y, Miller G, Bloodworth L, Wess J (2004): Cholinergic Stimulation of Salivary Secretion Studied with M1 and M3 Muscarinic Receptor Single- and Double-Knockout Mice. *Mol Pharmacol* 66, 260–267
- Gautam D, Jeon J, Li JH, Han S J, Hamdan FF, Cui Y, Lu H, Deng C, Gavrilova O, Wess J (2008): Metabolic roles of the M3 muscarinic acetylcholine receptor studied with M3 receptor mutant mice: a review. *J Recept Signal Transduct Res* 28, 93–108
- Gautam D, Jeon J, Starost MF, Han S J, Hamdan FF, Cui Y, Parlow AF, Gavrilova O, Szalayova I, Mezey E, Wess J (2009): Neuronal M3 muscarinic acetylcholine receptors are essential for somatotroph proliferation and normal somatic growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6398–6403
- Geaney DP, Soper N, Shepstone BJ, Cowen PJ (1990): Effect of central cholinergic stimulation on regional cerebral blood flow in Alzheimer disease. *The Lancet* 335, 1484–1487
- Gibson DG, Young L, Chuang R Y, Venter JC, Iii CAH, Smith HO (2009): Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods* 6, 343–345
- Gilman AG (1987): G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56, 615–649
- Goin JC, Nathanson NM (2006): Quantitative analysis of muscarinic acetylcholine receptor homo- and heterodimerization in live cells: regulation of receptor down-regulation by heterodimerization. *J Biol Chem* 281, 5416–5425

- Gosens R, Bromhaar MMG, Tonkes A, Schaafsma D, Zaagsma J, Nelemans SA, Meurs H (2004): Muscarinic M3 receptor-dependent regulation of airway smooth muscle contractile phenotype. *Br J Pharmacol* 141, 943–950
- Grando SA, Kawashima K, Kirkpatrick CJ, Kummer W, Wessler I (2015): Recent progress in revealing the biological and medical significance of the non-neuronal cholinergic system. *Int Immunopharmacol* 29, 1–7
- Hagan JJ, Jansen JH, Broekkamp CL (1987): Blockade of spatial learning by the M1 muscarinic antagonist pirenzepine. *Psychopharmacology (Berl)* 93, 470–476
- Hammer R, Berrie CP, Birdsall NJ, Burgen AS, Hulme EC (1980): Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* 283, 90–92
- Han Y, Moreira IS, Urizar E, Weinstein H, Javitch JA (2009): Allosteric communication between protomers of dopamine class A GPCR dimers modulates activation. *Nat Chem Biol* 5, 688–695
- Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schiöth HB, Gloriam DE (2017): Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* 16, 829–842
- Hazum E, Chang K-J, Leighton HJ, Lever OW, Cuatrecasas P (1982): Increased biological activity of dimers of oxymorphone and enkephalin: Possible role of receptor crosslinking. *Biochem Biophys Res Commun* 104, 347–353
- Hebert TE, Moffett S, Morello J-P, Loisel TP, Bichet DG, Barret C, Bouvier M (1996): A Peptide Derived from a β 2-Adrenergic Receptor Transmembrane Domain Inhibits Both Receptor Dimerization and Activation. *J Biol Chem* 271, 16384–16392
- Hebert TE, Loisel TP, Adam L, Ethier N, Onge SS, Bouvier M (1998): Functional rescue of a constitutively desensitized beta2AR through receptor dimerization. *Biochem J* 330, 287–293
- Hedin KE, Duerson K, Clapham DE (1993): Specificity of receptor-G protein interactions: Searching for the structure behind the signal. *Cell Signal* 5, 505–518
- Heim R, Tsien RY (1996): Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr Biol* 6, 178–182
- Hein P, Bünemann M (2009): Coupling mode of receptors and G proteins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379, 435–443
- Hein P, Frank M, Hoffmann C, Lohse MJ, Bünemann M (2005): Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. *EMBO J* 24, 4106–4114
- Hern JA, Baig AH, Mashanov GI, Birdsall B, Corrie JET, Lazareno S, Molloy JE, Birdsall NJM (2010): Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*

107, 2693–2698

Herrick-Davis K, A Weaver B, Grinde E, E Mazurkiewicz J (2006): Serotonin 5-HT_{2C} receptor homodimer biogenesis in the endoplasmic reticulum - Real-time visualization with confocal fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 281, 27109–16

Herrick-Davis K, Grinde E, Cowan A, Mazurkiewicz JE (2013): Fluorescence Correlation Spectroscopy Analysis of Serotonin, Adrenergic, Muscarinic, and Dopamine Receptor Dimerization: The Oligomer Number Puzzle. *Mol Pharmacol* 84, 630–642

Hillion J, Canals M, Torvinen M, Casadó V, Scott R, Terasmaa A, Hansson A, Watson S, Olah ME, Mallol J, et al. (2002): Coaggregation, Cointernalization, and Codesensitization of Adenosine A_{2A} Receptors and Dopamine D₂Receptors. *J Biol Chem* 277, 18091–18097

Hirschberg BT, Schimerlik MI (1994): A kinetic model for oxotremorine M binding to recombinant porcine m₂ muscarinic receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 269, 26127–26135

Holzgrabe U, De Amici M, Mohr K (2006): Allosteric modulators and selective agonists of muscarinic receptors. *J Mol Neurosci* 30, 165–167

Hu G-M, Mai T-L, Chen C-M (2017): Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution. *Sci Rep* 7, e15495

Hulme EC, Birdsall NJM, Buckley NJ (1990): Muscarinic Receptor Subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30, 633–673

Ikura M, Clore GM, Gronenborn AM, Zhu G, Klee CB, Bax A (1992): Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science* 256, 632–638

Jacobs S, Cuatrecasas P (1976): The mobile receptor hypothesis and „cooperativity“ of hormone binding. Application to insulin. *Biochim Biophys Acta* 433, 482–495

Jakubík J, Janíčková H, Randáková A, El-Fakahany EE, Doležal V (2011): Subtype Differences in Pre-Coupling of Muscarinic Acetylcholine Receptors. *PLoS ONE* 6, e27732

Jastrzebska B, Fotiadis D, Jang G F, Stenkamp RE, Engel A, Palczewski K (2006): Functional and Structural Characterization of Rhodopsin Oligomers. *J Biol Chem* 281, 11917–11922

Jones KA, Borowsky B, Tamm JA, Craig DA, Durkin MM, Dai M, Yao W J, Johnson M, Gunwaldsen C, Huang L Y, et al. (1998): GABA_B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA_BR1 and GABA_BR2. *Nature* 396, 674–679

Jordan BA, Devi LA (1999): G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399, 697–700

Katerina Z, Andrew K, Filomena M, Xu-Feng H (2004): Investigation of M1/M4 Muscarinic Receptors in the Anterior Cingulate Cortex in Schizophrenia, Bipolar Disorder, and

Major Depression Disorder. *Neuropsychopharmacology* **29**, 619–625

Kaupmann K, Malitschek B, Schuler V, Heid J, Froestl W, Beck P, Mosbacher J, Bischoff S, Kulik A, Shigemoto R, et al. (1998): GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes. *Nature* **396**, 683–687

Kniazeff J, Prézeau L, Rondard P, Pin J P, Goudet C (2011): Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs. *Pharmacol Ther* **130**, 9–25

Kruse AC, Hu J, Pan AC, Arlow DH, Rosenbaum DM, Rosemond E, Green HF, Liu T, Chae PS, Dror RO, et al. (2012): Structure and Dynamics of the M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Nature* **482**, 552–556

Kuszak AJ, Pitchiaya S, Anand JP, Mosberg HI, Walter NG, Sunahara RK (2009): Purification and Functional Reconstitution of Monomeric μ -Opioid Receptors. *J Biol Chem* **284**, 26732–26741

Lachance M, Ethier N, Wolbring G, Schnetkamp PPM, Hébert TE (1999): Stable Association of G Proteins with β 2AR Is Independent of the State of Receptor Activation. *Cell Signal* **11**, 523–533

Langmead CJ, Watson J, Reavill C (2008): Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther* **117**, 232–243

Lavoie C, Mercier JF, Salahpour A, Umopathy D, Breit A, Villeneuve LR, Zhu WZ, Xiao RP, Lakatta E, Bouvier M, Hébert TE (2002): β 1/ β 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates β 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J Biol Chem* **277**, 35402–35410

Lebois EP, Thorn C, Edgerton JR, Popiolek M, Xi S (2018): Muscarinic receptor subtype distribution in the central nervous system and relevance to aging and Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **136**, 362–373

Ledbetter JA, Linsley PS: CD28. In: Delves PJ (Hrsg.): *Encyclopedia of Immunology* (Second Edition). Elsevier, Oxford 1998, 482–483

Levey AI (1993): Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci* **52**, 441–448

Limbird LE, Lefkowitz RJ (1976): Negative cooperativity among beta-adrenergic receptors in frog erythrocyte membranes. *J Biol Chem* **251**, 5007–5014

Londong W, Londong V, Meierl A, Voderholzer U (1987): Telenzepine is at least 25 times more potent than pirenzepine--a dose response and comparative secretory study in man. *Gut* **28**, 888–895

Maggio R, Vogel Z, Wess J (1993): Coexpression studies with mutant muscarinic/adrenergic receptors provide evidence for intermolecular „cross-talk“ between G-protein-linked receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3103–3107

- Markovic D, Holdich J, Al-Sabah S, Mistry R, Krasel C, Mahaut-Smith MP, Challiss RAJ (2012): FRET-based detection of M1 muscarinic acetylcholine receptor activation by orthosteric and allosteric agonists. *PLoS One* **7**, e29946
- Marsango S, Ward RJ, Alvarez-Curto E, Milligan G (2018): Muscarinic receptor oligomerization. *Neuropharmacology* **136**, 401–410
- Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA (1999): Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* **17**, 969–973
- Michal P, El-Fakahany EE, Doležal V (2015): Changes in Membrane Cholesterol Differentially Influence Preferential and Non-preferential Signaling of the M1 and M3 Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Neurochem Res* **40**, 2068–2077
- Milligan G, Bouvier M (2005): Methods to monitor the quaternary structure of G protein-coupled receptors. *FEBS J* **272**, 2914–2925
- Mitchelson FJ (2012): The pharmacology of McN-A-343. *Pharmacol Ther* **135**, 216–245
- Moreira IS (2014): Structural features of the G-protein/GPCR interactions. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1840**, 16–33
- Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J (1974): Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry* **13**, 2656–2662
- Muyldermans S (2001): Single domain camel antibodies: current status. *Rev Mol Biotechnol* **74**, 277–302
- Nakai J, Ohkura M, Imoto K (2001): A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **19**, 137–141
- Okuma Y, Reisine T (1992): Immunoprecipitation of alpha 2a-adrenergic receptor-GTP-binding protein complexes using GTP-binding protein selective antisera. Changes in receptor/GTP-binding protein interaction following agonist binding. *J Biol Chem* **267**, 14826–14831
- Oldham WM, Hamm HE (2008): Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 60–71
- Pedersen JE, Bergqvist CA, Larhammar D (2018): Evolution of the Muscarinic Acetylcholine Receptors in Vertebrates. *eNeuro* **5**, e0340
- Pediani JD, Ward RJ, Godin AG, Marsango S, Milligan G (2016): Dynamic Regulation of Quaternary Organization of the M1 Muscarinic Receptor by Subtype-selective Antagonist Drugs. *J Biol Chem* **291**, 13132–13146
- Perry JL, Ramachandran NK, Utama B, Hyser JM (2015): Use of genetically-encoded calcium indicators for live cell calcium imaging and localization in virus-infected cells. *Methods* **90**, 28–38

- Pfeuffer T, Helmreich EJ (1975): Activation of pigeon erythrocyte membrane adenylate cyclase by guanylnucleotide analogues and separation of a nucleotide binding protein. *J Biol Chem* 250, 867–876
- Potter LT, Ballesteros LA, Bichajian LH, Ferrendelli CA, Fisher A, Hanchett HE, Zhang R (1991): Evidence of paired M2 muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* 39, 211–221
- Qin K, Dong C, Wu G, A Lambert N (2011): Inactive-state preassembly of Gq-coupled receptors and Gq heterotrimers. *Nat Chem Biol* 7, 740–7
- Raffa RB (2009): The M5 muscarinic receptor as possible target for treatment of drug abuse. *J Clin Pharm Ther* 34, 623–629
- Rinaldo L, Hansel C (2013): Muscarinic acetylcholine receptor activation blocks long-term potentiation at cerebellar parallel fiber–Purkinje cell synapses via cannabinoid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 11181–11186
- Rios CD, Jordan BA, Gomes I, Devi LA (2001): G-protein-coupled receptor dimerization: modulation of receptor function. *Pharmacol Ther* 92, 71–87
- Rocheville M, Lange DC, Kumar U, Patel SC, Patel RC, Patel YC (2000): Receptors for Dopamine and Somatostatin: Formation of Hetero-Oligomers with Enhanced Functional Activity. *Science* 288, 154–157
- Roffel AF, Elzinga CRS, Zaagsma J (1990): Muscarinic M3 receptors mediate contraction of human central and peripheral airway smooth muscle. *Pulm Pharmacol* 3, 47–51
- Rothbauer U, Zolghadr K, Tillib S, Nowak D, Schermelleh L, Gahl A, Backmann N, Conrath K, Muyltermans S, Cardoso MC, Leonhardt H (2006): Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Methods* 3, 887–889
- Rothbauer U, Zolghadr K, Muyltermans S, Schepers A, Cristina Cardoso M, Leonhardt H (2008): A Versatile Nanotrap for Biochemical and Functional Studies with Fluorescent Fusion Proteins. *Mol Cell Proteomics* 7, 282–9
- Salahpour A, Angers S, Mercier J-F, Lagacé M, Marullo S, Bouvier M (2004): Homodimerization of the β 2-Adrenergic Receptor as a Prerequisite for Cell Surface Targeting. *J Biol Chem* 279, 33390–33397
- Scarr E (2012): Muscarinic receptors: their roles in disorders of the central nervous system and potential as therapeutic targets. *CNS Neurosci Ther* 18, 369–379
- Scarr E, Cowie TF, Kanellakis S, Sundram S, Pantelis C, Dean B (2009): Decreased cortical muscarinic receptors define a subgroup of subjects with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 14, 1017–1023
- Scholz N, Langenhan T, Schöneberg T (2019): Revisiting the classification of adhesion GPCRs. *Ann N Y Acad Sci* 1456, 80–95

- Schwartz TW (1994): Locating ligand-binding sites in 7TM receptors by protein engineering. *Curr Opin Biotechnol* 5, 434–444
- Shea LD, Neubig RR, Linderman JJ (2000): Timing is everything: The role of kinetics in G protein activation. *Life Sci* 68, 647–658
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962): Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59, 223–239
- Soumpasis DM (1983): Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery experiments. *Biophys J* 41, 95–97
- Stevens FC (1983): Calmodulin: an introduction. *Can J Biochem Cell Biol* 61, 906–910
- Struckmann N, Schwering S, Wiegand S, Gschnell A, Yamada M, Kummer W, Wess J, Haberberger RV (2003): Role of Muscarinic Receptor Subtypes in the Constriction of Peripheral Airways: Studies on Receptor-Deficient Mice. *Mol Pharmacol* 64, 1444–1451
- Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang X-Y (2016): Regulation, Signaling and Physiological Functions of G-proteins. *J Mol Biol* 428, 3850–3868
- Thal DM, Sun B, Feng D, Nawaratne V, Leach K, Felder CC, Bures MG, Evans DA, Weis WI, Bachhawat P, et al. (2016): Crystal Structures of the M1 and M4 Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Nature* 531, 335–340
- Tong XK, Hamel E (1999): Regional cholinergic denervation of cortical microvessels and nitric oxide synthase-containing neurons in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 92, 163–175
- Ullrich A, Schlessinger J (1990): Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203–212
- Urizar E, Yano H, Kolster R, Galés C, Lambert N, Javitch JA (2011): CODA-RET reveals functional selectivity as a result of GPCR heteromerization. *Nat Chem Biol* 7, 624–630
- Vilardaga J-P, Nikolaev VO, Lorenz K, Ferrandon S, Zhuang Z, Lohse MJ (2008): Conformational cross-talk between α_{2A} -adrenergic and μ -opioid receptors controls cell signaling. *Nat Chem Biol* 4, 126–131
- Vilaró MT, Palacios JM, Mengod G (1990): Localization of m5 muscarinic receptor mRNA in rat brain examined by in situ hybridization histochemistry. *Neurosci Lett* 114, 154–159
- Ward RJ, Pediani JD, Milligan G (2011): Heteromultimerization of Cannabinoid CB1 Receptor and Orexin OX1 Receptor Generates a Unique Complex in Which Both Protomers Are Regulated by Orexin A. *J Biol Chem* 286, 37414–37428
- Weiner DM, Levey AI, Brann MR (1990): Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7050–7054

Werry TD, Wilkinson GF, Willars GB (2003): Mechanisms of cross-talk between G-protein-coupled receptors resulting in enhanced release of intracellular Ca²⁺. *Biochem J* 374, 281–296

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

Whorton MR, Bokoch MP, Rasmussen SGF, Huang B, Zare RN, Kobilka B, Sunahara RK (2007): A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 7682–7687

Wreggett KA, Wells JW (1995): Cooperativity Manifest in the Binding Properties of Purified Cardiac Muscarinic Receptors. *J Biol Chem* 270, 22488–22499

Wu PG, Brand L (1994): Resonance Energy Transfer: Methods and Applications. *Anal Biochem* 218, 1–13

Yamada M, Basile AS, Fedorova I, Zhang W, Duttaroy A, Cui Y, Lamping KG, Faraci FM, Deng C-X, Wess J (2003): Novel insights into M5 muscarinic acetylcholine receptor function by the use of gene targeting technology. *Life Sci* 74, 345–353

Yarden Y, Schlessinger J (1987): Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* 26, 1443–1451

Yasuda RP, Ciesla W, Flores LR, Wall SJ, Li M, Satkus SA, Weisstein JS, Spagnola BV, Wolfe BB (1993): Development of antisera selective for m4 and m5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of m4 and m5 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol* 43, 149–157

Zeng F-Y, Wess J (2000): Molecular Aspects of Muscarinic Receptor Dimerization. *Neuropsychopharmacology* 23, 19–31

Zhang X, Schwartz J-CD, Almo SC, Nathenson SG (2003): Crystal structure of the receptor-binding domain of human B7-2: Insights into organization and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2586–2591

Zuccolo E, Lim D, Kheder DA, Perna A, Catarsi P, Botta L, Rosti V, Riboni L, Sancini G, Tanzi F, et al. (2017): Acetylcholine induces intracellular Ca²⁺ oscillations and nitric oxide release in mouse brain endothelial cells. *Cell Calcium* 66, 33–47

Lebenslauf

Ich wurde am 10.08.1992 in Hamburg geboren. Von 2005 bis 2011 besuchte ich das Gymnasium Hochrad, welches ich mit der Allgemeinen Hochschulreife abschloss. Nachdem ich das folgende Jahr dafür nutzte Teile Europas zu entdecken, ein dreimonatiges Praktikum in der Global-Marshall-Plan-Foundation, sowie ein Pflegepraktikum im Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg zu absolvieren, begann ich im Oktober 2012 mit dem Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen. Den ersten Teil der Staatsexamensprüfung absolvierte ich im Sommer 2014 sowohl schriftlich als auch mündlich mit der Note 2,0. Zu Beginn des Wintersemesters im Oktober 2015 fing ich unter der Aufsicht meines Doktorvaters PD Dr. Marcus Niebert mit meiner Promotionsarbeit im Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie Göttingen an. Nebenbei nahm ich eine Tätigkeit als studentische Hilfskraft in der Abteilung ‚Klinische Chemie‘ auf und übte diese mit großer Freude bis zum Ende des Studiums aus. Im April 2018 schloss ich den schriftlichen Teil des zweiten Staatsexamens ab (Note 2,0). Nach einem halben Jahr, welches ich der Dissertation widmete, begann ich im November 2018 das erste Tertial des Praktischen Jahres im Fach Chirurgie in Lachen, Schweiz. Im Anschluss daran begann ich im Fach Innere Medizin das zweite Tertial in München für zwei Monate, woran sich weitere zwei Monate Innere Medizin in Heide, Schleswig-Holstein anschlossen. Das letzte Tertial absolvierte ich an der Universitätsmedizin Göttingen in der Klinischen Neurophysiologie. Nach beenden des dritten Tertials schloss ich im November 2019 den mündlichen und damit letzten Teil der ärztlichen Approbationsprüfung mit der Gesamtnote 2,0 ab. Im August 2020 begann ich bis dato in Elmshorn in Schleswig-Holstein als Assistenzarzt für Innere Medizin tätig zu werden.

Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere meinem Doktorvater und Betreuer PD Dr. phil. nat. Marcus Niebert für die weitreichende Unterstützung zur Fertigstellung dieser Arbeit. Seine unermüdliche Bereitschaft, in entscheidenden Phasen mit kompetenten Ratschlägen zur Seite zu stehen, hat maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen. Vorallem bin ich ihm dankbar für die stete Erreichbarkeit, als Mensch, wie auch als Betreuer.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. med. M. Oppermann als Ko-Referent bedanken, dessen konstruktive und hilfreiche Ratschläge eine Bereicherung für diese Arbeit gewesen sind.