



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Pharmakologische Charakterisierung von natürlich
vorkommenden und synthetisch optimierten
Vasopressin Liganden“

Verfasserin

Dalia Gharib

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Dr. Christian W. Gruber für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes an der Medizinischen Universität Wien, Zentrum für Physiologie und Pharmakologie, sowie für seine Unterstützung sowohl während der Praktikumszeit als auch beim Verfassen der Diplomarbeit bedanken.

Ich danke Herrn Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek für die Betreuung meiner Diplomarbeit.

Ein besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Mag. Johannes Köhbach, Mag. Christian Bergmayr und Justyna Kusek für die nette Arbeitsatmosphäre, die laufende Unterstützung bei der Durchführung sämtlicher Experimente sowie für die hilfreichen fachlichen Informationen.

Besonders möchte ich mich weiters bei meiner Familie, insbesondere meiner Schwester Mag. phil. Sherin Gharib, und bei meinen FreundInnen und StudienkollegInnen bedanken, die mir im Laufe meines gesamten Studiums stets zur Seite standen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs-, und Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung.....	12
1.1 Naturstoffchemie	13
1.1.1 Naturstoffe und Naturstoffentwicklung	13
1.1.2 Peptide und Proteine im Pflanzen- und Tierreich.....	17
1.1.3 Kegelschnecken	18
1.2 Vasopressin und Oxytocin	21
1.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren	24
1.3.1 Signalwege über G-Proteine	29
1.3.2 Internalisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren	31
1.4 Diabetes insipidus	33
1.4.1 Diabetes insipidus centralis	33
1.4.2 Diabetes insipidus renalis	33
1.5 Ziele und Motivation	35
2 Material.....	37
3 Methoden	39
3.1 Zellen und Zellmembranen	39
3.1.1 Zellkultivierung	39
3.1.2 Passagieren von Zellen	39
3.1.3 Einfrieren von Zellen.....	39
3.1.4 Auftauen von Zellen.....	40
3.1.5 Transfektion.....	40
3.1.6 Erhalt stabiler Zelllinien	41
3.1.7 Ernten von Zellmembranen	41
3.1.8 Bicinchoninssäure Assay.....	42
3.2 Pharmakologische Experimente.....	43
3.2.1 Rezeptorsättigungsexperiment	43
3.2.2 Kompetitionsversuch	44
3.2.3 Luciferase - Assay.....	45
3.2.4 cAMP Nachweis	46
3.3 Durchflusszytometrie	47
3.3.1 Efflux-Test zur Prüfung der Zellpermeabilität der Peptide	47
3.3.2 Rezeptorinternalisierung	48
3.3.3 Pharmakochaperone - Test.....	48
3.4 Klonierung	49
3.4.1 Polymerase Kettenreaktion	49
3.4.2 Verdau des Plasmids und des PCR-Produktes	49
3.4.3 Enzymatische Verknüpfung des Plasmids mit dem Rezeptor.....	50
3.4.4 Transformation	50
3.4.5 Plasmidisolierung und Kontrollverdau	51
3.4.6 Plasmidgewinnung.....	51

4	Ergebnisse	53
4.1	Klonierung	53
4.2	Plasmidgewinnung.....	55
4.3	Zellmembranisolierung	56
4.4	Rezeptor-Bindungs-Versuche	57
4.4.1	Rezeptorbindungsexperimente zum Testen von transient und stabil transfizierten Zelllinien	57
4.4.2	Sättigungsexperimente	59
4.4.3	Kompetitionsexperiment	60
4.4.4	Dosis-Bindungskurve an V _{1b} R	60
4.5	G-Protein Aktivierung	62
4.5.1	Zyklase Assay	62
4.5.2	Luciferase Assay	63
4.6	Ergebnisse zu FACS-Untersuchungen	66
4.6.1	Pharmako-Chaperone	66
4.6.2	Ergebnisse zu Efflux.....	69
4.6.3	Rezeptorinternalisierung	70
5	Diskussion	73
6	Abstract (Deutsch).....	83
7	Abstract (Englisch).....	85
	Literaturverzeichnis	86
	Anhang.....	90
	Curriculum Vitae.....	135

Abbildungs-, und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Aus natürlichen Quellen isolierte Peptide	18
Abb. 2: Gehäuse und Giftapparat der Kegelschnecken.....	19
Abb. 3: Vasopressin und Oxytocin im Vergleich.....	21
Abb. 4: Vasopressin / Oxytocin ähnliche Strukturen.....	23
Abb. 5: Grundzüge der Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren.....	30
Abb. 6: Desensitisierung, Sequestrierung und Resensitisierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren	32
Abb. 7: Physiologischer Ablauf der Wasserrückresorption in der Niere.....	34
Abb. 8: Zerfall des Luciferins bei Anwesenheit von Luciferase	45
Abb. 9: Agarose-Gelelektrophorese zur Identifizierung und Auftrennung des PCR- Produktes	53
Abb. 10: Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung des Plasmids mit SF-TAP von A ₂ A-Rezeptor	54
Abb. 11: Agarose-Gelelektrophorese zu SF-TAP V ₂ R und SF-TAP V ₂ L219R.....	55
Abb. 12: Rezeptorbindungsversuch an V _{1b} R	57
Abb. 13: Rezeptorbindungsversuch an transient transfizierten Zelllinien mit SF-TAP V ₂ R und SF-TAP V ₂ L219R	58
Abb. 14: Rezeptorsättigungsexperiment an V _{1b} R.....	59
Abb. 15: Verdrängungsfähigkeit von ³ H-AVP aus V _{1b} R durch w24, w55, w56.....	60
Abb. 16: Dosis-Bindungskurve an V _{1b} R.....	61
Abb. 17: Dosis-Wirkungskurven an V _{1a} R, V _{1b} R, V ₂ R und OTR.....	64
Abb. 18: Fluoreszenzmikroskopie zu V ₂ R mit Grün Fluoreszierendem Protein (GFP)	67
Abb. 19: Pharmakologische Wirkung als Rezeptorfaltungshelfer von OPC, w24, w55 und w56.....	68
Abb. 20: Unterschied der Fluoreszenzstärke zwischen V ₂ R und V ₂ L219R	68
Abb. 21: Orginaldaten aus FACS	71
Abb. 22: Rezeptorinternalisierung des V ₂ - Rezeptors durch AVP, w24, w55 und w56.....	71
Abb. 23: Rezeptorinternalisierung des V ₂ - Rezeptors bei 2 und 5 min im Vergleich	72

Abb. 24: Selektivität hinsichtlich Affinität am V ₂ R im Vergleich zu V _{1a} R, V _{1b} R und OTR	75
Abb. 25: Selektivität hinsichtlich Aktivierung von V ₂ R im Vergleich zu V _{1a} R, V _{1b} R und OTR.....	76
Abb. 26: Zusammenhang zwischen Rezeptorbindung und –aktivierung des V ₂ R	77
Abb. 27: Rezeptoraktivierung des V ₂ R durch AVP im Vergleich zu den Liganden w24, w55 und w56.....	78
Abb. 28: Schematische Darstellung der Anordnung der 7-TM Helixes.....	79
Tab. 1: Biogene Wirkstoffe als Leitstruktur für die Entwicklung von Arzneimitteln.....	14
Tab. 2: Sekundärstoffe in Pflanzen.....	16
Tab. 3: Peptide aus Kegelschnecken der Gattung Conus und ihre Angriffspunkte	20
Tab. 4: Rezeptoraffinität von Vasopressin und Oxytocin auf AVP / OT Rezeptoren	22
Tab. 5: Rezeptoraktivierung von AVP / OT Rezeptoren durch Vasopressin und Oxytocin	22
Tab. 6: Conopressine im Vergleich zu Vasopressin und Oxytocin.....	24
Tab. 7: G-Protein gekoppelte Rezeptoren und ihre Liganden bzw. Arzneistoffe	27
Tab. 8: Getestete Peptide auf AVP / OT Rezeptoren	37
Tab. 9: DNA – Konzentrationen zu Plasmidgewinnung.....	55
Tab. 10: Proteinkonzentrationen isolierter Zellmembranen	56
Tab. 11: Experimentdaten der Sättigungsexperimente.....	60
Tab. 12: Rezeptorbindungseigenschaften von w24, w55, w56 an AVP / OT Rezeptoren ..	62
Tab. 13: Rezeptoraktivierung durch AVP / OT und w24, w55, w56.....	65
Tab. 14: Fähigkeit der Plasmamembranpermeation eines Fluorescein-markierten Nonapeptids.....	69
Tab. 15: Rezeptorinternalisierung durch AVP, w24, w55 und w56	72
Tab. 16: Strukturunterschiede zwischen AVP, w24, w55 und w56	73
Tab. 17: τ und K _p Werte zu w24, w55 und w56	79

Abkürzungsverzeichnis

$^3\text{H-AVP}$	Tritium markierter Vasopressin
AC	Adenylatcyclase
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
AVP	Arginin-Vasopressin
BCA	Bicinchoninicsäure Assay
B_{max}	maximale spezifische Bindung
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK	cyclic cystine knot
CRE	cAMP response element
CRH	Corticotropin-releasing Hormon
DAC	Diacylglycerin
ddH ₂ O	doppel destilliertes Wasser
DI	Diabetes insipidus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E_{max}	maximaler Effekt
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FM	Freezing Medium
G-418	Geneticin
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GIRK	G-Protein gekoppelter einwärts gerichteter K ⁺ -Kanal
G-Protein	GTP-bindenes Protein
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptor Kinase

GTP	Guanosintriphosphat
HEK-293	menschliche embryonale Nierenzellen (human embryonic kidney)
HME	Hepes-MgCl ₂ -EDTA-Puffer
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
K _d	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
K _i	Dissoziationskonstante eines Inhibitors
K _p	funktionelle Affinität eines partiellen Agonisten
LB-Medium	Lysogeny broth Medium
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
MS	Massenspektrometrie
NCEs	New Chemical Entities
NDI	nephrogener Diabetes insipidus
NFAT	Nuclear Factor of Activated T-cells
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Austauscher
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
OT	Oxytocin
OTR	Oxytocin-Rezeptor
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCA	Perchlorsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDL	Poly-D-Lysin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PP2A	Protein Phosphatase 2A
QCS	Proteinqualitätskontrolle

	(quality control system)
SAR	Strukturwirkungsbeziehung
	(structure activity relationship)
SF-TAP	Strep/FLAG Tandem Affinity Purification
7 TM	heptahelikale Transmembranproteine
TM	Tris-MgCl ₂ -Puffer
TME	Tris-MgCl ₂ -EDTA
V _{1a} R	Vasopressin-1a-Rezeptor
V _{1b} R	Vasopressin-1b-Rezeptor
V ₂ R	Vasopressin-2-Rezeptor
VDCC	spannungsabhängiger Ca ²⁺ -Kanal (voltage dependent Ca ²⁺ -channel)
wt	Wildtyp

1 Einleitung

Neuropeptide dienen der Steuerung wichtiger Körperfunktionen und sind somit von großer Bedeutung. Sie werden von Nervenzellen als Botenstoffe produziert und erreichen über die Blutbahn als Hormone die Zielzellen. Neuropeptide bestehen aus 3-30 Aminosäuren. Bisher sind bis zu 100 verschiedene Neuropeptide bekannt. Dazu gehören beispielsweise Thyreotropin, Bradykinin, Angiotensin II, Adrenocorticotropin, Somatostatin, Galanin, Prolactin, Cholecystokinin, Vasopressin, Oxytocin und viele andere.

In der vorliegenden Diplomarbeit fokussiere ich mich auf die beiden Neuropeptidhormone Arginin-Vasopressin (AVP) und Oxytocin (OT). AVP und OT haben beide sowohl periphere als auch zentrale Wirkungen. AVP ist für die Regulation des Wasserhaushaltes des Körpers und damit für die Regulation der Osmolalität des Blutes und des Blutdruckes verantwortlich. OT spielt eine wichtige Rolle bei der Gebärmutterkontraktion während der Geburt, Laktation und Sexualität. Zentrale Wirkungen, die von AVP und OT reguliert werden, sind zum Beispiel Aggressionen, Lernvermögen, Gedächtnis, soziale Kommunikation, Stress und mütterliche Fürsorge.

AVP und OT wirken über G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Es sind im menschlichen Körper drei AVP Rezeptoren ($V_{1a}R$, $V_{1b}R$ und $V_{2}R$) und ein OT Rezeptor (OTR) bekannt. Mängel oder Fehlbildungen dieser Neuropeptide oder deren Rezeptoren können zu der Entstehung von Krankheiten wie Diabetes insipidus, Bettnässen, Bluthochdruck, kongestive Herzinsuffizienz und Hyponatriämie führen. Da sowohl die beiden Neuropeptide als auch deren Rezeptoren strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen, kommt es oft bei der Therapie solcher Erkrankungen zu Nebenwirkungen. Daher steigt das Interesse ähnliche Peptide mit besseren pharmakologischen Eigenschaften und höherer Selektivität zu erforschen. Strukturähnliche Peptide sind im Tierreich weit verbreitet, welche sich nur durch einige Aminosäuren von AVP und OT unterscheiden. Beispielsweise sind in Säugetieren neben AVP und OT auch Lysipressin und Phenypressin zu finden, während Vögel, Fische Amphibien und Reptilien Vasotocin, Mesotocin und Isotocin bilden. Auch Insekten, Schnecken und Würmer besitzen AVP und OT strukturähnliche Peptide wie Annepressin, Conopressin und Inotocin.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit soll die Wirkung und Selektivität natürlich vorkommender und synthetisch optimierter Vasopressinanaloga mit dem Fokus auf die in marinen Kegelschnecken vorkommenden Conopressine untersucht und charakterisiert werden.

1.1 Naturstoffchemie

1.1.1 Naturstoffe und Naturstoffentwicklung

Im Laufe der Zeit entwickelte die Natur eine verblüffende Vielfalt an sekundären Metaboliten. Basierend auf traditionellem, volkstümlichem und erfahrungsgemäßigem Wissen waren Pflanzen, Pflanzenteile, dessen Extrakte und Tiere lange Zeit die einzig mögliche medizinische Versorgung des Menschen¹. Daher sind Naturstoffe und chemische Substanzen, welche in Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen zu finden sind, von großem Interesse und spielen eine entscheidende Rolle bei der Entdeckung und Synthese neuer Wirkstoffe. Die Erforschung von Naturstoffen als Quelle neuer Therapeutika erreichte ihren Höhepunkt in der westlich pharmazeutischen Industrie zwischen den Jahren 1970-2006^{1, 2}. Aus den 877 neuen Wirksubstanzen, welche zwischen 1981 und 2002 der Food and Drug Administration (FDA) vorgeschlagen wurden, waren geschätzt 49% Reinsubstanzen, halbsynthetische Naturstoffe oder basierend auf dem Naturstoff synthetisierte Produkte (Pharmakophore)^{2, 3}. Diese werden als New Chemical Entities (NCEs) bezeichnet und umfassen alle Arzneimittelanwendungen mit einem wirksamen Inhaltsstoff, der zuvor auf keine Art und Weise auf dem Markt gekommen ist². In Tab. 1 sind einige Arzneistoffe angegeben, welche ihre Existenz der Entdeckung eines Naturstoffes zu verdanken haben. Der Entwicklungsweg beginnend von der Entdeckung eines möglich wirksamen Naturstoffes bis zu dessen Einführung auf dem Markt ist langwierig und nimmt für gewöhnlich mehrere Jahre in Anspruch. Dementsprechend leiten sich jetzige neu zugelassene biogene Arzneimittel von Naturstoffen ab, die vor mindestens einem Jahrzehnt entdeckt worden sind². Naturstoffe werden aus ihrer Quelle extrahiert, fraktioniert und aufgereinigt, um einzelne möglich aktive Substanzen zu isolieren und deren Struktur zu erforschen. *De novo* Strukturaufklärung von neuen Substanzen sind mit spektroskopischen Methoden, besonders mit der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR – „nuclear magnetic resonance“) sowie mittels direkter Kopplung von Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC – „high performance liquid chromatography“) und Massenspektrometrie (MS), leicht zu ermitteln. Die Nutzung und Aktualisierung von Naturstoff – Datenbanken verhindert eine erneute Ermittlung von bereits vorhandenen und bekannten Substanzen. Ist einmal die Struktur des wirksamen Inhaltsstoffs bekannt, können Struktur-Wirkungs-Beziehungsstudien (SAR – „structure-activity relationship“) durchgeführt und die Struktur je nach Zieleigenschaften opti-

miert werden. Das Resultat ist meist eine neue Substanz mit besserer Wirkung und oder höherer Selektivität im Vergleich zum ursprünglichen Naturstoff².

Tab. 1: Biogene Wirkstoffe als Leitstruktur für die Entwicklung von Arzneimitteln

Naturstoff, Entdeckungsjahr	Entwickler (Land)	Wirkstoff, Zulassungsjahr	Applikationsart
Biogene Wirkstoffe aus Actinomyceten			
Validamycin, 1970	Takeda (JAP)	Acarbose, 1990	p.o.
Oligosaccharid		Voglibose, 1994	p.o.
Midecamycin, 1971	Meiji (JAP)	Miocomycin, 1995	p.o.
Macrolid			
Cephameycin C, 1971	Lilly (USA)	Moxalactam, 1982	i.v.
β -Lactam		Cefotetan, 1984	i.v.
		Cefbuperazone, 1985	i.v.
Coformycin, 1974	Inst Microbial Chem	Pentostatin, 1992	i.v.
Nukleosid	(JAP)		
Rapamycin, 1974	Ayerst (CAN)	Sirolimus, 1999	p.o.
Polyketid		Everolimus, 2004	p.o.
		Zotarolimus, 2005	p.o.
Lipstatin, 1975	Roche (SWI)	Orlistat, 1987	p.o.
Polyketid			
Bestatin, 1976	Inst Microbial Chem	Ubenimex, 1987	p.o.
Peptid	(JAP)		
Thienamycin, 1976	Merck (USA)	Imipenem, 1985	i.v.
β -Lactam		Meropenem, 1994	i.v.
		Panipenem, 1994	i.v.
		Faropenem, 1997	p.o.
		Biapenem, 2002	i.v.
		Doripenem, 2005	i.v.
Avermectin B _{1a} , 1979	Kitastato Inst (JAP) /	Ivermectin, 1987	p.o.
Polyketid	Merck (USA)		
SQ26,180, 1981	Squibb (USA)	Aztreonam, 1984	i.v.
β -Lactam		Carumonam, 1988	i.v.
FK506, 1984	Fujisawa (JAP)	Tacrolimus, 1993	p.o.
Polyketid			
Daptomycin, 1986	Lilly (USA)	Daptomycin (2003)	i.v.
Cyclodepsipeptid			
Calicheamicin γ_1 , 1988	Lederle (USA)	Gemtuzumab, 2000	i.v.
Polyketid			
Biogene Wirkstoffe aus Bakterien			
Pseudomoninsäure, 1971	Beecham (UK)	Mupirocin, 1995	top
Polyketid			

Naturstoff, Entdeckungsjahr	Entwickler (Land)	Wirkstoff, Zulassungs-jahr	Applikationart	
Spergualin, 1981 Peptid	Inst Microbial Chem (JAP)	Gusperimus, 1994	i.v.	
Biogene Wirkstoffe aus Tieren				
Exendin-4, 1992 Polypeptid	Dr. John Eng (NY)	Exenatide, 2005	s.c.	
ω-Conotoxin MVIIA Peptid		Ziconotid, 2005	i.t	
Hirudin, 1884 Polypeptid		Bivalirudin, 2007 Argatroban, 2005 Melagatran, 2006	p.c. i.v. s.c.	
Biogene Wirkstoffe aus Pflanzen				
Taxol, 1971 Diterpen	Res Triangle Inst / NIH (USA)	Paclitaxel, 1993 Docetaxel, 1995	i.v.	
Artemisinin, 1977 Sesquiterpen	Qinghaosu Res Grp (PRC)	Artemisinin, 1987 Artemether, 1987 Artenusate, 1987 Arteether, 2000	p.o. p.o. p.o. p.o.	
Forskolin, 1977 Diterpen	Hoechst (IND)	Colforsin, 1999	i.v.	
Plaunotol, 1977 Diterpen	Sankyo (JAP)	Plaunotol, 1987	p.o.	
Arglabin, 1982 Sesquiterpen	Inst Phytochem (USSR)	Arglabin, 1999	p.o.	
Biogene Wirkstoffe aus Pilze				
Echinocandin B, 1974 Cyclopeptid	Ciba-Geigy (SWI)	Caspofungin, 2001 Micafungin, 2002 Anidulafungin, 2006	i.v. i.v. i.v.	
Mizoribine, 1974 Nucleosid	Toyo (JAP)	Mizoribine, 1984	p.o.	
Compactin, 1975 Polyketid	Sankyo (JAP)	Lovastatin, 1984 Simvastatin, 1988 Pravastatin, 1989 Fluvastatin, 1994 Atorvastatin, 1997 Cerivastatin, 1997 Pitavastatin, 2003 Rosuvastatin, 2003	p.o. p.o. p.o. p.o. p.o. p.o. p.o. p.o.	
Cyclosporin A, 1975 Cyclopeptid		Sandoz (SWI)	Ciclosporin, 1983	p.o.

p.o.: per oral, i.v.: intra venös, top: topisch; i.t.: intrathekal; s.c.: subkutan; p.c.: perkutan; Information übernommen aus Ganesan¹

Als Quelle zur Gewinnung von Naturstoffen dienen alle Organismen beginnend von Mikroben bis hin zu Insekten, höheren Pflanzen und Tieren. Bedingt durch evolutionären Überlebenskampf und Selektionsauslese haben sie die Fähigkeit entwickelt Substanzen mit unterschiedlichsten Strukturen zu synthetisieren, welche meist als Abwehrstoffe dienen. Solche natürlich vorkommenden Substanzen waren schon bereits im Mittelalter von großer Bedeutung. In traditionellen Medizinsystemen spielten Pflanzen, Pflanzenteile und Pflanzenextrakte eine entscheidende Rolle. Pflanzen produzieren eine große Vielfalt an sekundären Naturstoffen, welche hinsichtlich Biogenese, Funktion und Struktur sehr gut erforscht sind. Eine Übersicht einiger Sekundärstoffe in Pflanzen ist in Tab. 2 zu finden. Sekundäre Naturstoffe kommen nur in bestimmten Organismengruppen vor und verschaffen Überlebensvorteile oder sind an der Steuerung der Aktivität von Zellen und Organen beteiligt. Beispielsweise erzeugen einige Pflanzenfamilien Alkaloide, um sich möglicherweise von Tieren zu verteidigen und Mikroorganismen besitzen die Fähigkeit antibiotische Substanzen zu erzeugen⁴.

Tab. 2: Sekundärstoffe in Pflanzen

Inhaltsstoffe	Vorkommen	Wirkung	Chemische Struktur
ätherische Öle ⁵ , Terpene ⁵	Asteraceae, Lamiaceae	antibakteriell, antifungal, antiviral, expectorant, antioxidativ, sedativ, diuretisch, antiinflammatorisch	Terpene, aromatische Verbindungen
Herzwirksame Glykoside ⁵	Digitalis, Convallaria, Adonis	positiv inotrop, negativ chronotrop	Steroidglykoside
Saponine ⁵		sekretolytisch, diuretisch, antitussiv	Steroidglykoside, Triterpenglykoside
Bitterstoffe ⁵	Gentianaceae, Asteraceae	appetitanregend, verdauungsfördernd	Pregnanderivate, Acrylphloroglucinol
Gerbstoffe ⁵	Fabaceae, Anacardiaceae, Rosaceae	adstringierend	Gallotannine, Catechin-, Epicatechin
Oligo- und Polysaccharide ⁵	weit verbreitet	laxierend, antitussiv, immunmodulatorisch	Zucker
Phenylpropanderivate ⁵	Poaceae, Fabaceae	sedativ, spasmolytisch, antiphlogistisch	Cumarine, Lignane, Anthocyane, Phenolglykoside
Alkaloide ⁵	Solanaceae, Papaveraceae, Fabaceae, Apocynaceae	Wirkung an prä- und postsynaptischen Rezeptoren und Ionenkanälen	N-haltige Verbindungen
Polyketide ⁵	Höhere Pflanzen	laxierend	Anthra-, Naphthalenderivate

Weitere von großem Interesse in Lebewesen vorkommende Substanzen sind Proteine, Kohlenhydrate und Fettsäuren. Da sie am Energie- und Baustoffwechsel beteiligt sind, sind sie lebensnotwendig und werden demnach als primäre Naturstoffe bezeichnet⁵. Im Gegensatz zu den sekundären Naturstoffen sind primäre Naturstoffe in alle Lebewesen vorhanden. Im Folgenden möchte ich genauer auf natürlich vorkommende Peptide und Proteine eingehen.

1.1.2 Peptide und Proteine im Pflanzen- und Tierreich

Peptide spielen eine bedeutende Rolle bei vielen Funktionen des menschlichen Körpers. Mängel, Überproduktion oder Fehlbildung sind oft mit der Ausbildung von Krankheiten verbunden. Heutzutage sind Peptide interessante Forschungsthemen und können in natürlicher Form therapeutisch eingesetzt werden oder als Leitbild zum Gestalten von modifizierten Peptiden und Peptidomimetika mit pharmakologischer Wirkung dienen⁶. Wie in Abb. 1 zu sehen ist erstreckt sich das Vorkommen biologisch aktiver Peptide unterschiedlicher Struktur und Aktivität über alle Lebewesen, ausgehend von Mikroorganismen bis hin zu Pflanzen und Tieren^{6, 7}. Einige nennenswerte Beispiele hierfür sind die in Pflanzen vorkommenden zyklischen Polypeptide. Diese werden als Zyklotide bezeichnet und sind in einigen Pflanzenfamilien wie Violaceae, Rubiaceae und Apocynaceae zu finden. Es handelt sich hierbei um disulfidreiche Peptide mit einer Größe von ungefähr 30 Aminosäuren. Alle Vertreter der Zyklotide enthalten sechs Cysteine und bilden daher drei Disulfidbrücken. Diese Eigenschaft wird als „cyclic cystine knot – CCK“ bezeichnet und verleiht den Zyklotiden eine weitaus gute Stabilität gegen termischen, chemischen und enzymatischen Einfluss. Diese Peptide zeigen hämolytische, zytotoxische, antibakterielle, insektizide und uterotonische Wirkungen⁸.

Weitere interessante biologisch aktive Peptide sind in Giften verschiedener Tiere wie Schlangen⁹, Spinnen¹⁰, Insekten wie Bienen, Wespen und Zecken⁶, Krebse⁶, Skorpione¹¹ und Amphibien⁶ zu finden. Ihre Angriffspunkte sind meist spannungs- oder ligandengesteuerte Ionenkanäle und dienen vermutlich der Abwehr oder dem Beutefang. Ihre Wirkung auf Tier und Mensch ist mit den in Pflanzen vorkommenden Alkaloiden zu vergleichen. Auch Mikroorganismen, wie Bakterien und Schimmelpilze enthalten oft viele biologisch aktive Peptide mit ungewöhnlichen Strukturaufbau⁶. Eine bemerkenswerte Vielfalt gut erforschter und interessanter Peptide ist im Gift von marinen Kegelschnecken der Gat-

tung *Conus* zu finden. Diese werden Conopeptide oder Conotoxine genannt und im nächsten Kapitel näher erläutert.

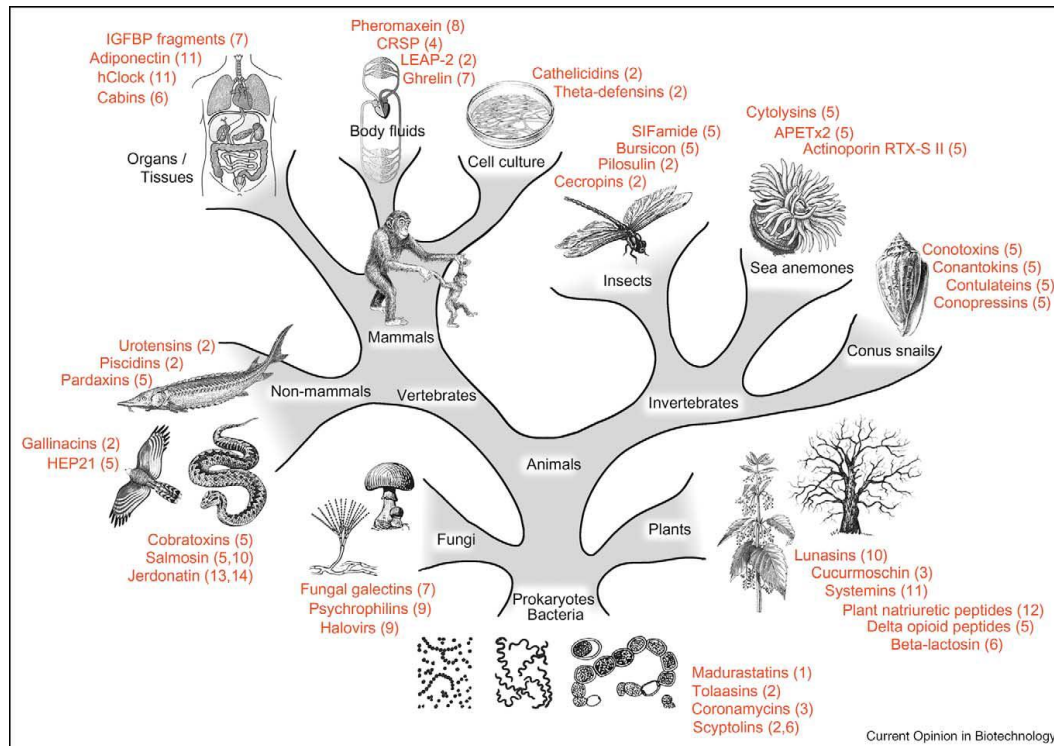


Abb. 1: Aus natürlichen Quellen isolierte Peptide (1) Eisenmetabolismus, (2) antimikrobiell, (3) antifungal, (4) Ca^{2+} - Metabolismus, (5) neuroaktiv (6) Protease Inhibitor, (7) Wachstumsregulator, (8) Steroidmetabolismus, (9) antiviral, (10) antitumoral, (11) Hormone/Transmitter, (12) Elektrolytregulator, (13) fertil, (14) Koagulation. Übernommen aus Adermann et al.⁶

1.1.3 Kegelschnecken

Kegelschnecken sind jedem bekannt durch die prachtvolle Schönheit ihrer Schalen (siehe Abb. 2), welche in vielen Souvenirshops in Meeresnähe überall auf der Welt zu finden sind. Kegelschnecken leben in warmen, tropischen Meeren vorallem in der Nähe von Korallenriffen. Die meisten Arten gehören zu der Gattung *Conus*. Diese umfasst geschätzt 500 - 700^{4, 12} Arten und bildet somit eine der größten Gattungen der marinen Lebewesen¹³. Kegelschnecken sind langsam bewegende Lebewesen, die sich in einer schnell bewegenden Umgebung befinden¹². Jedoch entwickelten sie eine faszinierende Strategie zum Fangen ihrer Nahrung, die ihnen ermöglicht in dieser Umgebung zu überleben. Alle Kegelschnecken sind Raubtiere, die Gift in ihre Beute einspritzen, um diese zu Fangen⁴. Die Zusammensetzung des Giftes ist je nach Art des Beutetieres unterschiedlich. Die häufigsten Beutetiere sind Weichtiere, Würmer oder Fische. Es gibt aber jedoch Kegelschnecken,

die sich von mehr als eine Art Beutetier ernähren. Wie in Abb. 2 zu sehen ist, ist der Giftapparat der Kegelschnecken besonders gut entwickelt. Über eine lang gestreckte Röhre, genannt Siphon, können sie sich in ihrer Umgebung orientieren und ihre Beute identifizieren. Das Gift wird in einem röhrenförmigen Kanal produziert und bei Kontraktion einer muskulären Knolle am Ende des Kanals in den Rüssel gepumpt, indem sich ein Zahn befindet. Dieser Zahn erinnert stark an eine Harpune und dient nicht nur dem Beutefang, sondern auch zum Injizieren des Giftes. Dieses verursacht eine Lähmung des Beutetieres, welches anschließend von der Kegelschnecke verschlungen werden kann^{12, 14}.

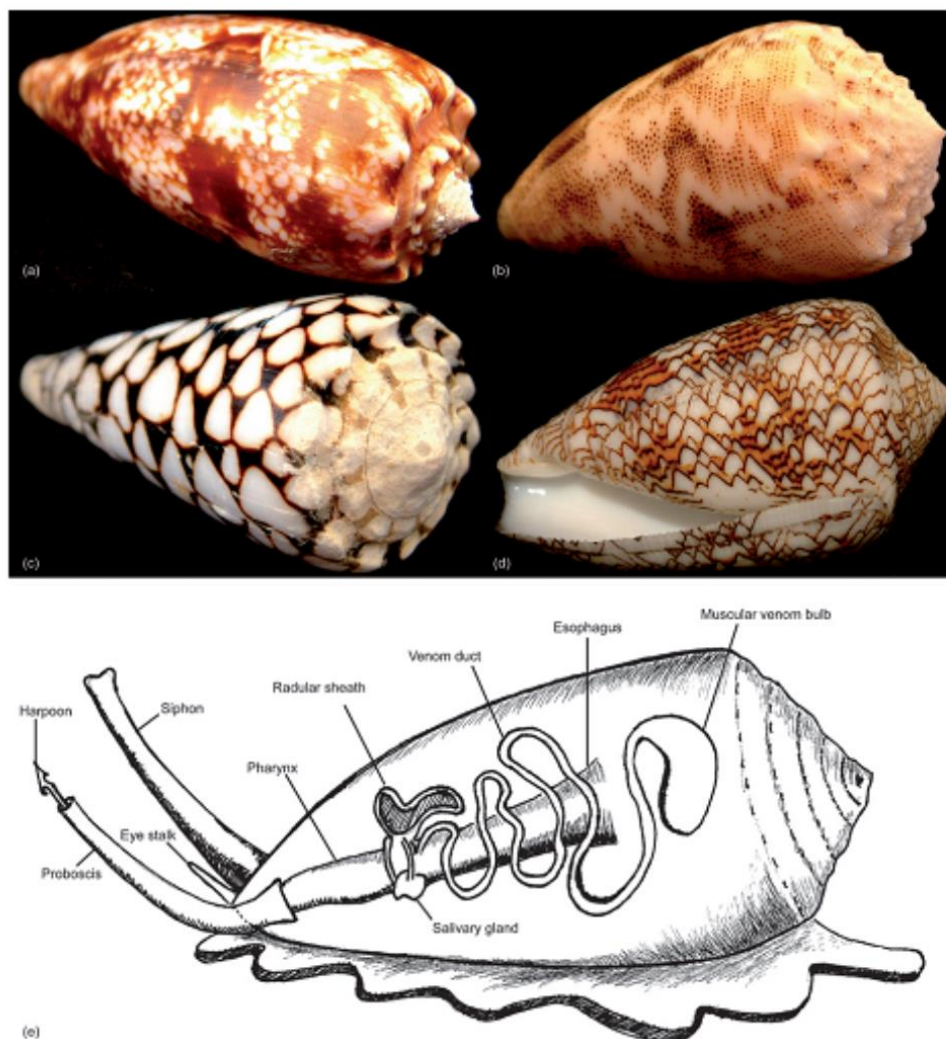


Abb. 2: Gehäuse und Giftapparat der Kegelschnecken (a) *C. geographus*, eine Fisch fressende Schnecke (b) *C. arenatus*, eine Wurm fressende Schnecke (c) *C. marmoreus*, eine Weichtier fressende Schnecke (d) *C. textile*, eine eine Weichtier und Wurm fressende Schnecke (e) Darstellung des Giftapparats der Kegelschnecke; Abbildung übernommen aus Halai & Craik¹²

Das Gift einer einzigen Kegelschnecke enthält 100 - 200^{13, 14} pharmakologisch aktive Komponenten, die anhand ihrer Strukturunterschiede und der verschiedenen Angriffspunk-

te in die Gruppen α , ω , δ , κ , μ , σ und Ψ eingeteilt sind. Die biologisch aktiven Komponenten des Giftes sind kleine disulfidreiche Peptide bestehend aus 7 - 35 Aminosäuren¹³, die Conopeptide beziehungsweise Conotoxine genannt werden. Die Angriffspunkte der Conotoxine sind verschiedene spannungs- und ligandengesteuerte Ionenkanäle und Rezeptoren im neuromuskulären System⁴. Einige Beispiele der Conotoxine sind in Tab. 3 angegeben. Conotoxine sind heutzutage interessante Forschungswerkzeuge in der Neurowissenschaft. μ -Conotoxin beispielsweise wird aufgrund dessen Fähigkeit muskuläre aber nicht neuronale Na^+ -Kanäle zu blockieren bei der Immobilisierung von Muskeln verwendet ohne dabei einen Effekt auf die Weiterleitung von Nervenimpulsen oder Synapsen auszulösen. ω -Conotoxin ist Standardreagenz bei der Erforschung von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen und wird zur Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung genutzt. Ebenfalls finden Conotoxine bei der Diagnostik von Krankheiten Verwendung⁴.

Tab. 3: Peptide aus Kegelschnecken der Gattung *Conus* und ihre Angriffspunkte

Conus Peptid	Rezeptor	Wirkung	Sulfidbrücken
Peptide, welche an Ligand-abhängige Ionenkanäle binden			
α - Conotoxin	Nikotinrezeptor	kompetitiver Antagonist	CC – C – C
αA - Conotoxin	Nikotinrezeptor	kompetitiver Antagonist	CC – C – C – C – C
Ψ - Conotoxin	Nikotinrezeptor	nicht kompetitiver Antagonist	CC – C – C – CC
σ - Conotoxin	5 – HT ₃ Rezeptor	kompetitiver Antagonist	CC – C – C – CC
Conantokins	NMDA - Rezeptor	-	Keine Disulfidbrücke
Peptide, welche an spannungsabhängigen Ionenkanäle binden			
μ - Conotoxin	Na^+ - Ionenkanal	Kanalblocker	CC – C – C – CC
μO -	Na^+ - Ionenkanal	Inhibitor	CC – C – C – CC
δ - Conotoxin	Na^+ - Ionenkanal	Inhibitor	CC – C – C – C
κA - Conotoxin	K^+ - Ionenkanal	Inhibitor	CC – C – C – C – C
κ - Conotoxin	K^+ - Ionenkanal	Inhibitor	CC – C – CC – C – C
ω - Conotoxin	Ca^{2+} - Ionenkanal	Kanalblocker	C – C – CC – C – C
Peptide, welche an G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden			
Conopressin	Vasopressinrezeptor	Agonist	C – C
Contulakín	Neurotensinrezeptor	Agonist	Keine Disulfidbrücke

Weitere bedeutende Komponenten des Giftes der Kegelschnecken sind die Conopressine¹⁵. Conopressine sind zyklische Nonapeptide mit einer Disulfidbrücke zwischen Cys-I und Cys-VI. Sie weisen nicht nur bezüglich ihrer Struktur sondern auch aufgrund ihrer Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren große Ähnlichkeiten mit den beiden Neu-

ropeptiden AVP und OT auf. Angesichts dieser großen Strukturähnlichkeit möchte ich die Conopressine gemeinsam mit AVP und OT im nächsten Kapitel näher beschreiben.

1.2 Vasopressin und Oxytocin

Arginin-Vasopressin (AVP) und Oxytocin (OT) sind multifunktionelle Peptidhormone des Hypophysenhinterlappens. Die Biogenese erfolgt aus den Prohormonen Prooxyphysin und Propressophysin, die während des Transports zum Wirkort in je ein Protein und je ein Glykoprotein zerlegt werden⁵. AVP und OT sind zyklische Nonapeptide mit einer Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteingruppen in Position 1 und 6. Dabei bildet sich ein Ring aus 6 Aminosäuren und eine aus 3 Aminosäuren bestehende C-terminale Kette⁷. Wie in Abb. 3 zu sehen ist, unterscheiden sich AVP und OT in Position 3 und 8. AVP trägt in Position 3 ein Phenylalanin und in Position 8 ein Arginin, während bei OT das Phenylalanin gegen ein Isoleucin und das Arginin gegen ein Leucin ausgetauscht sind¹⁶.

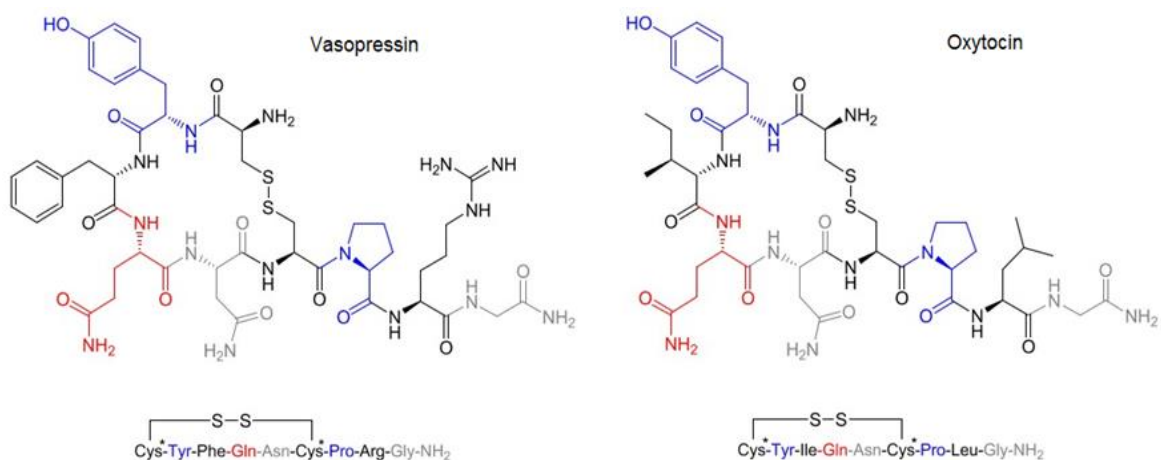


Abb. 3: Strukturen von Vasopressin und Oxytocin im Vergleich

(<http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/botenstoffe/hormone.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/botenstoffe/hormone/hypophysenhormone.vscml.html>)

AVP bindet und wirkt an drei verschiedene Rezeptoren: V_{1a} -Rezeptor ($V_{1a}R$), V_{1b} -Rezeptor ($V_{1b}R$) und V_2 -Rezeptor (V_2R). $V_{1a}R$ kommt in der Leber, in glatten Muskelzellen der Blutgefäße und im Gehirn vor. Der Rezeptor ist für die Regulierung des Blutdruckes verantwortlich. Im Gehirn reguliert $V_{1a}R$ durch Interaktion mit AVP das Angst- und Aggressionsverhalten¹⁷. $V_{1b}R$ ist in der Adenohypophyse lokalisiert. Es steuert bei Stresssituationen neben dem Corticotropin-releasing Hormon (CRH) die Ausschüttung

von Adrenocorticotropes Hormon (ACTH)^{17, 18}. In der vorliegenden Arbeit ist ganz besonders der in der Niere lokalisierte V₂R vom Interesse. Über V₂R reguliert AVP die Osmolalität des Blutes durch Wasserrückresorption in der Niere¹⁷. Weiters hat AVP zentral einen Einfluss auf das Gedächtnis und die Lernfähigkeit⁷.

OT bindet an einem OT-Rezeptor (OTR), der in der Gebärmutter und in Milchdrüsen lokalisiert ist¹⁹. Er reguliert während der Geburt die Gebärmuttermuskelkontraktion, die Milchproduktion in den Milchdrüsen und steuert das Sexualverhalten. OTR ist auch im Gehirn zu finden, wo es als Neurotransmitter für soziales Verhalten, mütterliches Gefühl, Stress und Angstgefühle verantwortlich ist²⁰. Alle vier Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. V_{1a}R, V_{1b}R und OTR sind G_q-gekoppelte Rezeptoren, während V₂R zu den G_s-gekoppelten Rezeptoren zählt^{7, 19}.

Die strukturelle Ähnlichkeit der Liganden führt zu einer niedrigen Selektivität zwischen den Rezeptoren. Demnach ist die Verwendung von Arzneimitteln, welche für einen dieser Rezeptoren bestimmt ist, aufgrund der antretenden Kreuzreaktion, mit vielen Nebenwirkungen verbunden. Dies führt zu einem immer wachsenden Interesse nach der Suche nach selektiven Rezeptorliganden. Zur Darstellung des Selektivitätsdilemmas sind in Tab. 4 die Bindungsaffinitäten sowie in Tab. 5 die Aktivierungsfähigkeit der beiden Neuropeptide zu ihren Rezeptoren dargestellt.

Tab. 4: Rezeptoraffinität von Vasopressin und Oxytocin auf AVP / OT Rezeptoren

V _{1a} R			V _{1b} R		V ₂ R		OTR	
Peptid	Ki (nM)	Referenz	Ki (nM)	Referenz	Ki (nM)	Referenz	Ki (nM)	Referenz
Vasopressin	0.6 – 4.2	²¹⁻²⁶	0.085 – 1.4	^{21, 23, 24, 27}	1.06 – 5.3	^{21, 23-25, 27}	1.67 - 110	^{21, 23-25, 27}
Oxytocin	37 – 845	^{21, 23-26}	222 – 1782	^{21, 23, 24}	823 – 1544	^{21, 23, 25, 26}	0.79 – 1.5	^{21, 23-25}

Tab. 5: Rezeptoraktivierung von AVP / OT Rezeptoren durch Vasopressin und Oxytocin

V _{1a} R			V _{1b} R		V ₂ R		OTR	
Peptid	EC ₅₀ (nM)	Referenz	EC ₅₀ (nM)	Referenz	EC ₅₀ (nM)	Referenz	EC ₅₀ (nM)	Referenz
Vasopressin	0.24	²⁸	2.0 – 4.3	^{27, 28}	0.05	^{22, 28}	8.3 - 41	²⁷⁻²⁹
Oxytocin	59.7	³⁰	24.5	²⁷	--	--	9 - 15	^{27, 29, 30}

AVP und OT ähnliche Peptide sind auch im Tierreich zu finden (siehe Abb. 4). Knochenfische (Osteichthyes), aus dessen Vorfahrenvertreter die Landwirbeltiere hervorgehen, besitzen Isotocin und Vasotocin. Demnach entwickelten sich zwei evolutionäre Verzweigungen: einerseits Isotocin-Mesotocin-Oxytocin Vertreter, welche mit dem Fortpflanzungsgeschehen in Verbindung gesetzt werden und andererseits Vasotocin-Vasopressin Vertreter, welche für den Wasserhaushalt verantwortlich sind¹⁶.

In Säugetieren findet man neben AVP und OT auch Lysipressin und Phenypressin. Vasotocin, Mesotocin und Isotocin sind OT ähnliche Hormone in Amphibien, Reptilien und Vögel. Auch Würmer, Insekten, Schnecken und Schlangen erzeugen strukturähnliche Peptide wie Annepressin, Conopressin und Inotocin³¹.

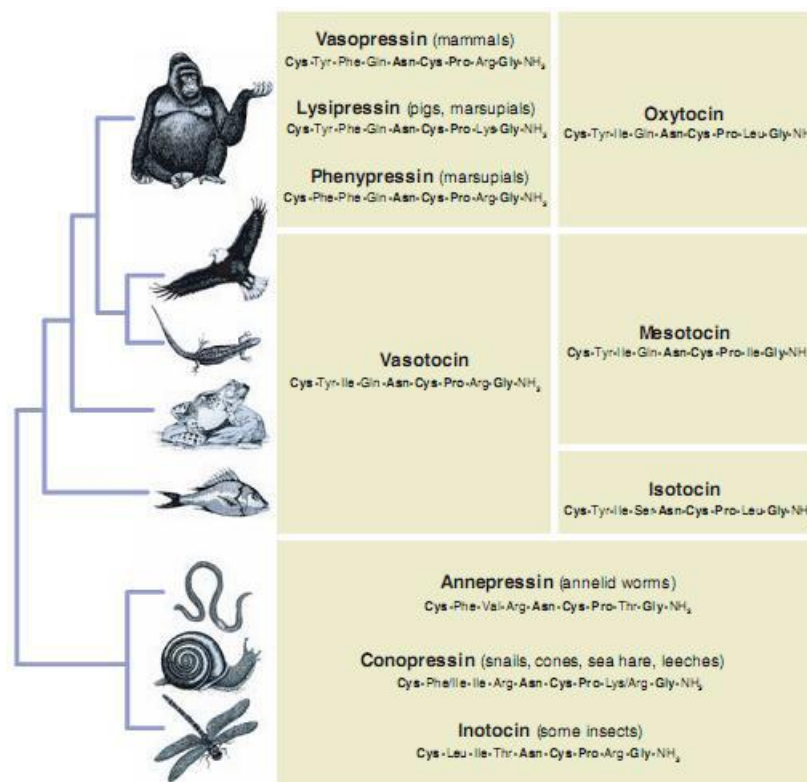
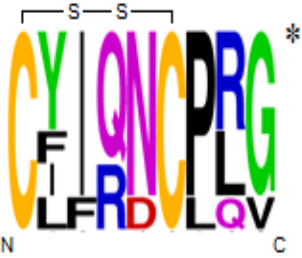


Abb. 4: Vasopressin / Oxytocin ähnliche Strukturen
(übernommen aus Donaldson & Young³¹)

Mit Betracht auf die Kreuzreaktionen, welche zwischen allen AVP und OT Rezeptoren entstehen können, ist es von großem Interesse selektive Liganden aufzusuchen. Die im Tierreich vorkommenden AVP und OT ähnlichen Peptide bieten eine solche mögliche Anwendung an. Ein interessantes Beispiel hierfür sind, wie in Kapitel 1.1.3 erwähnt, die Conopressine, welche im Gift der marinen Kegelschnecken zu finden sind. Eine physiolo-

gische Wirkung der Conopressine ist bisher nicht bekannt. Conopressine sind wie AVP und OT Nonapeptide, die aufgrund der Disulfidbrücke zwischen Cys-I und Cys-VI aus einem Ring mit sechs Aminosäuren und aus einer C-Terminalen linearen Kette aus drei Aminosäuren bestehen¹⁵. Wie in Tab. 6 zu sehen ist, unterscheiden sich Conopressine nur in einigen Aminosäuren von AVP und OT. Arg-Conopressin-S und Lys-Conopressin-G sind die ersten AVP / OT verwandten Peptide, welche aus wirbellosen Lebewesen isoliert worden sind³².

Tab. 6: Conopressine im Vergleich zu Vasopressin und Oxytocin

Name	Sequenz in Einbuchstabencode	Vorkommen	Sequenz Logo	Ref.
Vasopressin	CYFQNCPRG*	Säugetiere		24
Oxytocin	CYIQNCPLG*	Säugetiere		24
Conopressin-T	CYIQNCLR*	<i>Conus tulipa</i>		24
Conopressin-Vil	CLIQDCPYG*	<i>Conus villepinii</i>		24
Arg-Conopressin-S	CIIRNCPRG*	<i>Conus striatus</i>		24
Lys-Conopressin-G	CFIRNCPLG*	<i>Conus geographus</i> <i>Conus imperialis</i> , <i>Lymnaea stagnalis</i>		16, 24

γ steht für γ-Carboxyglutamat; *: Amid

Wie bereits erwähnt, wirken AVP und OT aber auch die strukturähnlichen Conopressine auf G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Struktur und Funktion dieser Rezeptoren werden im folgenden Kapitel näher beschrieben.

1.3 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Als G-Protein gekoppelte Rezeptoren werden jene Rezeptoren bezeichnet, welche mit GTP-bindenden Proteinen (G-Proteine) interagieren³³ und zur Gruppe der heptahelikalen Transmembranproteine (7 TM) gehören. Diese bestehen aus sieben die Plasmamembran durchspannende Helixstrukturen, wodurch sich jeweils auf jeder Seite der Plasmamembran drei Schleifen bilden. Der N-Terminus befindet sich auf der extrazellulären und der C-Terminus auf der intrazellulären Seite⁷. G-Protein gekoppelte Rezeptoren übertragen Signale durch Licht, Ca^{2+} , Geruchsstoffe, Aminosäuren, Hormone, Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Peptide und Proteine über verschiedene Signaltransduktionswege ins Zellin-

nere^{7, 34}. Die Bindungsdomäne für Liganden kann je nach Molekülgröße und -eigenschaft sehr unterschiedlich sein. Einige Liganden wie Photonen, biogene Aminosäuren, Nukleoside, Eicosanoide und andere kleine Moleküle interagieren ausschließlich mit den hydrophoben Hohlräumen der Transmembranregion. Peptide mit weniger als 40 Aminosäuren binden an die Hohlräume der Transmembranregion gemeinsam mit den extrazellulären Schleifen. Andere Liganden können zwischen dem N-Terminus und den extrazellulären Schleifen binden, wie Polypeptide mit mehr als 90 Aminosäuren. Große Proteine (> 30 kDa) interagieren ausschließlich mit dem N-Terminus³⁵. Die Bindungsdomäne für das G-Protein befindet sich zwischen der zweiten und dritten intrazellulären Schleife und dem C-Terminus³⁶.

G-Protein gekoppelte Rezeptoren stellen eine der umfangreichsten Gruppen der Membranrezeptoren dar. Im menschlichen Genom existieren 791- 865 Gene für G-Protein gekoppelte Rezeptoren, was etwa 2% des gesamten menschlichen Genoms ausmacht^{7, 37}. Sie unterscheiden sich in Länge und Funktion des extrazellulären N-Terminus, dem intrazellulären C-Terminus und der intrazellulären Schleifen³⁴, wodurch sie sich in verschiedene Gruppen einteilen lassen. Nach IUPHAR¹ und GPCRDB² werden G-Protein gekoppelte Rezeptoren in drei wichtige Hauptgruppen unterteilt^{7, 38}. Die erste Gruppe stellt die Rhodopsin-ähnliche Familie A dar, welche bei Weitem die umfangreichste und meist untersuchte Familie hinsichtlich Strukturaufklärung und Funktionalität ist. Die Liganden dieser Gruppe binden mit Ausnahme der Glykoprotein-bindenden Rezeptoren innerhalb der 7 TM Regionen. Glykoproteine (LH, FSH, TSH und LG) binden ausschließlich am N-Terminus ihres Rezeptors^{38, 39}. Die anderen zwei wichtigen Unterfamilien sind die Secretin-ähnliche Rezeptorfamilie B, an welche viele Neuropeptide und Peptidhormone binden, und die metabotrope Glutamatrezeptor (mGluR)-ähnliche Familie C. Vertreter der Secretin-ähnliche Familie sind charakterisiert durch einen ziemlich langen N-Terminus, der gemeinsam mit den juxtamembranären 7 TM für die Ligandenbindung verantwortlich ist. Vertreter der mGluR-ähnlichen Familie werden ziemlich lange N- und C-Terminus beschrieben. Die Ligandenbindungsdomäne befindet sich am N-Terminus, welche die Form einer so genannten „Venus fly trap“ formt³⁹. Eine eigene kleinere Gruppe stellt die „frizzled/smoothed“-Gruppe dar, für welche eine direkte Interaktion mit den G-Proteinen noch beschränkt ist³⁸. G-Protein gekoppelte Rezeptoren des menschlichen Ge-

¹ Ausführliche Liste G-Protein gekoppelter Rezeptoren der International Union of Basic and Clinical Pharmacology: <http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ReceptorFamiliesForward?type=GPCR>. 19.05.2012

² G-Protein-Coupled Receptor Database: <http://www.gpcr.org/7tm/proteinfamily/>. 19.05.2012

noms wurden nach phylogenetischen Analysen in fünf verschiedene Gruppen namens GRAFS unterteilt. GRAFS steht für Glutamat, Rhodopsin, Adhesin, Frizzled/taste2 und Secretin³⁹. Die GRAFS-Gliederung wird in der vorliegenden Arbeit nicht im Detail beschrieben. Neben dieser großen Anzahl an bekannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die eine entscheidende Rolle bei der Sinneswahrnehmung und anderen wichtigen Funktionen des Körpers spielen, gibt es weitere 300 G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die nicht ausreichend untersucht sind. Bei etwa 140 dieser Rezeptoren, die als „orphan-GPCRs“ bezeichnet werden, kennt man noch keinen endogenen Liganden⁴⁰.

In der pharmazeutischen Industrie gewannen G-Protein gekoppelte Rezeptoren große Aufmerksamkeit, etwa 40 - 50% der auf dem Markt vorhandenen Arzneimittel wirken auf diese Rezeptorfamilie⁷. Eine Übersicht der wichtigsten G-Protein gekoppelten Rezeptoren und deren natürlich vorkommenden Liganden und Arzneistoffe gibt Tab. 7.

Tab. 7: G-Protein gekoppelte Rezeptoren und ihre Liganden bzw. Arzneistoffe

G-Protein gekoppelter Rezeptor	Vertreter	natürlicher Ligand	Arzneistoff
Rhodopsin-Gruppe			
Adenosinrezeptor	A ₁ , A _{2A-B} , A ₃	Adenosin	Caffein, Theophyllin
Adrenorezeptoren	α _{1A-D} , α _{2A-C} , β ₁₋₃	Adrenalin, Noradrenalin	Prazosin, Doxazosin, Terazosin, Tamsulosin, Clonidin, Moxonidin, Bisoprolol, Metoprolol, Atenolol, Esmolol, Salbutamol, Salmeterol, Fenoterol, Formoterol
Angiotensinrezeptoren	AT ₁₋₂	Angiotensin I-III	Losartan, Candesartan, Telmisartan
Bradykininrezeptoren	B ₁₋₂	Bradykinin, Kallidin, T-Kinin	Icatibant
Cannabinoidrezeptoren	CB ₁₋₂	Anandamid, 2-Arachidonylglycerol	Rimonabant
Chemokinrezeptoren	CCR ₁₋₁₀ , CXCR ₁₋₇ , CX ₃ CR ₁ , XCR ₁	Chemokine	
Cholecystokininrezeptoren	CCK ₁₋₂	Cholesystokinin, Gastrin	
Dopaminrezeptoren	D ₁₋₅	Dopamin	L-DOPA, Pramipexol, Ropinirol, Haloperidol, Fluphenazin, Sulpirid, Clozapine
Endothelinrezeptoren	ET ₁₋₂	Endothelin	Bosentan, Sitaxentan
Galaninrezeptor	GAL ₁₋₃	Galanin, Galanin-ähnliches Peptid	
Glykoproteine	FSH-, LH-, TSH-Rezeptor	Follikel stimulierendes Hormon, humanes Choriongonadotropin, Luteinisierendes Hormon, thyreotropes Hormon	FSH / Follitropin, Menotropin, LH / Lutropin, HCG / Choriongonadotropin α
Gonatotropin releasing Hormonrezeptoren	GnRH, GnRH2	Gonatoliberin	Goserelin, Buserelin, Degarelix
Histaminrezeptoren	H ₁₋₄	Histamin	Diphenhydramin, Dimetinden, Desloratadin, Cimetidin, Ranitidin
Hydroxycarboxylsäurerezeptoren =GPR109a = PUMA-G = HM74	HCA ₁₋₃	L-Milchsäure, β-D-Hydroxybuttersäure, 3-Hydroxyoctansäure	Nicotin, Acipimox
Lysophospholipidrezeptoren	S1P ₁₋₅	Sphingosin, Sphingosyl	Fingolimod
Melanocortinrezeptoren	MC ₁₋₅	Adrenocorticotropin, α, β, γ - Melanozyten-stimulierendes Hormon	ACTH

G-Protein gekoppelter Rezeptor	Vertreter	natürlicher Ligand	Arzneistoff
Melatoninrezeptoren	MT ₁₋₂	Melatonin	Agomelatin
Muskarinische Acetylcholinrezeptoren	M ₁₋₅	Acetylcholin	Pirenzepin, Atropin, Ipratropium, Tiotropium,
Neuromedinrezeptoren	NMU1-2	Neuromedin S, Neuromedin U	
Neurotensinrezeptoren	NTS ₁₋₂	Neurotensin, Neuromedin N	
Opioidrezeptoren	δ, κ, μ, NOP	Endorphin, Dynorphin, Enkephalin, Nociceptin	Morphin, Fentanyl, Buprenorphin, Nalbuphin
Oxytocinrezeptor	OT	Oxytocin	Atosiban, Oxytocin
Prostanoidrezeptoren	DP ₁₋₂ , EP ₁₋₄ , FP, IP, TP	Prostaglandine, Thromboxan	Misoprostol, Alprostadil, Latanoprost, Treprostinil, Epoprostenol, Laropripant
P2Y Rezeptoren	P2Y _{1,2,4,6,11-14}	ATP, ADP, UTP, UDP, UDP-Glucose	Clopidogrel
Rhodopsinrezeptor		Rhodopsin	Retinal, Vitamin A
Serotoninrezeptoren	5-HT _{1a-f} , 5-HT _{2a-c} , 5-HT ₄ , 5-HT _{5a-b} , 5-HT ₆ , 5-HT ₇	5-Hydroxytryptamin (5-HT)	Buspiron, Zolmitriptan, Sumatriptan, Risperidon, Quetiapin, Olanzapin, Cisapride, Metoclopramid
Somatostatinrezeptoren	Sst ₁₋₅	Cortistatin, Somatostatin	Somatostatin, Octreotid, Lanreotid
Tachykininrezeptoren	NK ₁₋₃	Neurokinin A, B, Substanz P	Aprepitant
Thyrotropin releas. Hormonrez.	TRH ₁₋₂	Thyrotropin releasing Hormon	
Vasopressinrezeptor	V _{1a-b} , V ₂	Arginin Vasopressin	Vasopressin, Terlipressin, Desmopressin, Tolvaptan
Secretin - Gruppe			
Calcitoninrezeptoren	CT, AMY ₁₋₃ , CGRP, AM ₁₋₂	Calcitonin, Amylin, α-, β-CGRH, Adrenomedullin, Intermedin,	Calcitonin
Corticotropin-releasing Faktorrezeptoren	CRF ₁₋₂	Corticoliberin, Urocortin 1-3	
Glucagonrezeptoren	GIP, GIP-1/2, GHRH, GLP ₁₋₂ , Glucagon-, Secretinrezeptor	Glukoseabhängiges insulinotropes Peptid, Somatoliberin, Glucagon, Secretin	Genotropin, Glucagon, Norditropin, Exenatide
Parathyroid Hormone Rezeptor	PTH1-2	Parathormon	PTH / Parathyroid Hormon, Teriparatid
VIPR	VPAC ₁₋₂	Vasoaktives intestinales Peptid	
Glutamat - Gruppe			
Ca ²⁺ sensorische Rezeptoren	CAS, GPRC ₆	Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Cinacalcet
GABA-Rezeptoren	GABA _B	γ - Aminobuttersäure	Baclofen
Glutamatrezeptoren	mGlu ₁₋₈	L-Glutaminsäure	

Information zusammengestellt aus IUPHAR Datenbank^{41, 7}

1.3.1 Signalwege über G-Proteine

Eine wichtige Rolle bei der Übertragung von extrazellulären Signalen ins Zellinnere spielen G-Proteine, welche mit dem heptahelikalem Rezeptor gekoppelt sind. Heterotrimäre G-Proteine bestehen, wie der Name sagt, aus drei Untereinheiten: α , β und γ . Die Untereinheiten bilden einen stabilen Komplex, der mittels $G\alpha$ und $G\gamma$ an die Plasmamembran fixiert ist. Im inaktivierten Zustand hat die $G\alpha$ Untereinheit in ihrer Nukleotidbindungstasche ein Guanosindiphosphat (GDP) gebunden. Die extrazelluläre Bindung eines Liganden am heptahelikalen Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und zur Folge zur Strukturänderung der $G\alpha$ Untereinheit. Dies führt zu einem Austausch von GDP durch Guanosintriphosphat (GTP) in der Nukleotidbindungstasche der $G\alpha$ Untereinheit. Die Bindung von GTP destabilisiert den Komplex des heterotrimären G-Proteins, was zu einer Dissoziation von $G\alpha$ und $G\beta/\gamma$ vom Rezeptor führt und somit deren Interaktion mit membranständigen Effektorproteinen ermöglicht^{7, 42}. $G\beta$ und $G\gamma$ befinden sich durchgehend in einer Komplexbildung, welche nur durch Denaturierung aufgelöst werden kann. Durch eine intrinsische GTPase-Aktivität, welche GTP zu GDP hydrolysiert, wird die Aktivierung des G-Proteins beendet. Der GTP-GDP Austausch führt zu einer Restrukturierung des inaktiven $G\alpha\beta\gamma$ Komplexes, welches für eine erneute Aktivierung zur Verfügung stehen kann.

Es existieren viele verschiedene Arten von G-Protein Untereinheiten. In Säugetieren, beispielsweise, gibt es mehr als 20 $G\alpha$, 5 $G\beta$ und 12 $G\gamma$ Arten, welche verschiedenartig miteinander kombiniert sind und somit eine große Vielfalt an vorhandenen G-Proteinen bilden. Trotz dieser großen Vielfalt, werden G-Proteine nach der $G\alpha$ Untereinheit, aufgrund dessen Bedeutung bei der Signalübertragung, eingeteilt⁷. Die drei wichtigsten Arten der $G\alpha$ Untereinheit sind $G\alpha_s$, $G\alpha_i$ und $G\alpha_q$. Wie in Abb. 5 zu sehen ist wirkt die $G\alpha_s$ Untereinheit bei Aktivierung durch Austausch von GDP durch GTP auf die membranständige Adenylatcyclase (AC). Diese wandelt Adenosintriphosphat (ATP) zu zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) um. Die erhöhte cAMP Konzentration führt zur Aktivierung der cAMP abhängigen Proteinkinase A (PKA), welche folgend zellspezifische Wirkungen auslöst wie Energiestoffwechsel der Zelle, Einfluss auf Zellteilung / -differenzierung, Einfluss auf Ionentransport innerhalb der Zelle, Einfluss auf Funktion der Ionenkanäle und Regulation der Proteinkinase³⁸. Im Gegensatz zur $G\alpha_s$ Untereinheit wird die AC durch Aktivierung von $G\alpha_i$ inhibiert. Die GTP gebundene $G\alpha_q$ Untereinheit aktiviert die Phospholipase C

(PLC), welche Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) spaltet. DAG bleibt in der Membran und aktiviert die Phospholipase C. IP₃ dissoziiert aus der Plasmamembran und reagiert mit dem IP₃ – Rezeptor am Endoplasmatischen Retikulum (ER), wodurch Ca²⁺ intrazellulär freigesetzt wird³⁸. Der Gβ/γ Komplex spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Signalübertragung ins Zellinnere. Gβ/γ aktivieren viele Effektorproteine wie Ionenkanäle, Phosphoinositidkinasen, G-Protein gekoppelte einwärtsgerichtete K⁺-Kanälen (GIRK₁₋₄), spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle (VDCC), Phospholipase A₂ (PLA₂), Phospholipase C_{β2/β3} und dem Na⁺/H⁺-Austauscher (NHE1)³⁸.

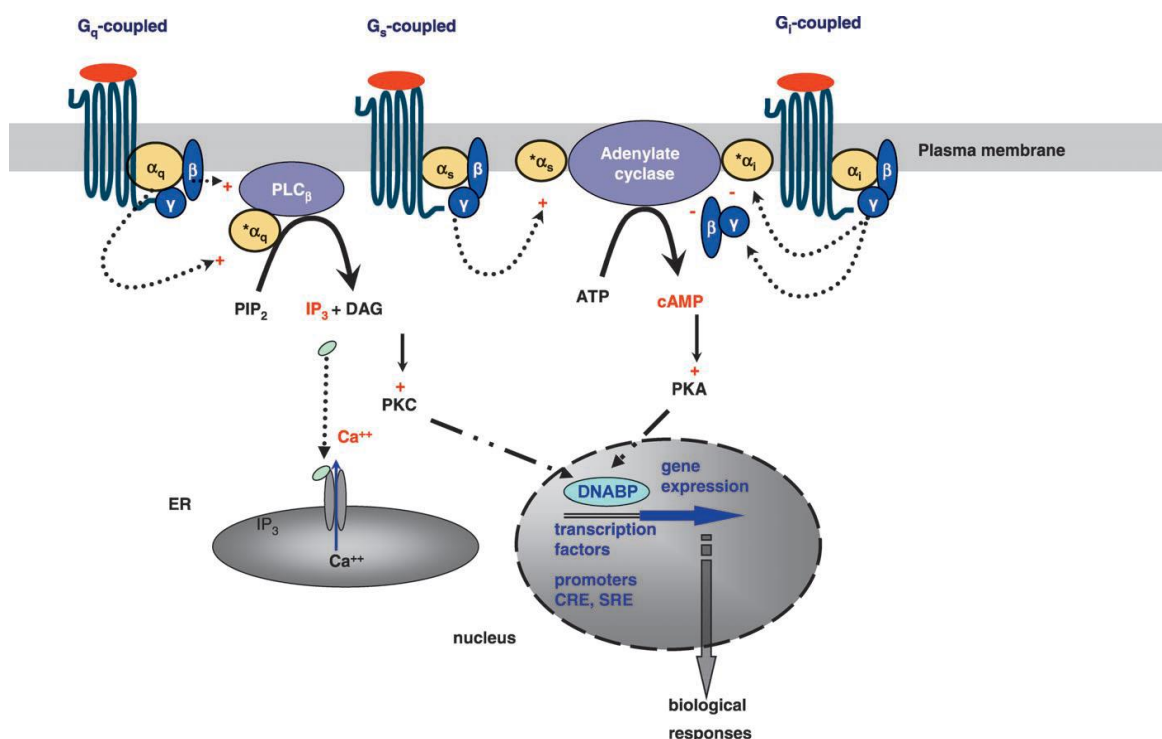


Abb. 5: Grundzüge der Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren Ligandenbindung am Rezeptor führt intrazellulär zu einem Austausch von GDP zu GTP an der Gα-Untereinheit, wodurch diese vom Gβ/γ-Dimer dissoziiert. Je nach Typ der Gα-Untereinheit, werden drei verschiedene Zellantworten ausgelöst: Gα_q – gekoppelte Rezeptoren aktivieren die Phospholipase C_β (PLC_β), welche die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-1, 4, 5-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) verursacht. DAG erhöht die Aktivität der Proteinkinase C (PKC) und IP₃ reagiert mit dem IP₃-Rezeptor am ER und setzt Ca²⁺ ins Cytosol frei. Bei Gα_s – gekoppelte Rezeptoren wirkt Gα-GTP auf die Adenylatcyclase, welche ATP zu cAMP umwandelt. cAMP wirkt auf die Proteinkinase A (PKA), welche zellspezifische Wirkungen auslöst, beispielsweise Einfluss auf Zellteilung / -differenzierung, Energiestoffwechsel, Einfluss auf Funktion der Ionenkanäle. Der Gα_i – gekoppelter Rezeptor inaktiviert die Adenylatcyclase. Gβ/γ-Dimer löst ebenfalls eine Reihe von Signalkaskaden aus. Beispiele hierfür sind Aktivierung von K⁺-Kanäle (GIRK₁₋₄), spannungsabhängige Ca²⁺-Kanäle (VDCC), Phospholipase A₂ (PLA₂), Na⁺/H⁺-Austauscher (NHE1), Abbildung übernommen aus Jacoby et al.³⁸

1.3.2 Internalisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Die Konformationsänderung des G-Protein gekoppelten Rezeptors durch Ligandenbindung führt nicht nur zur Aktivierung des G-Proteins, sondern auch gleichzeitig zur Internalisierung des Rezeptors⁴³. Dieser Prozess geht mit der Desensibilisierung einher, bei der der Rezeptor durch zugehörige Effektorkinasen oder spezifische Kinasen, wie G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK), phosphoryliert und somit unempfindlich gemacht wird^{37, 43, 44}. Effektorkinasen, wie cAMP abhängige Proteinkinase (PKA) und Proteinkinase C (PKC), phosphorylieren Serin- und Threoninreste innerhalb der dritten cytoplasmatischen Schleife und des C-Terminus der G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Die Phosphorylierung durch die Effektorkinasen ist ausreichend, um in Abwesenheit von β -Arrestin die Signalkaskade des G-Proteins zu unterbrechen⁴⁴. Aktivierte Effektorkinasen phosphorylieren alle Rezeptoren, also nicht nur den ligandenbesetzten Rezeptor sondern auch freie Rezeptoren sowie Rezeptoren, welche andere Liganden binden und ermöglichen somit eine homologe als auch eine heterologe Desensibilisierung^{44, 45}. Demgegenüber steht die durch GRKs vermittelte Phosphorylierung. Es sind insgesamt sieben GRKs bekannt. Diese phosphorylieren bevorzugt ligandenbesetzte Rezeptoren, was also ausschließlich eine homologe Desensibilisierung ermöglicht⁴⁵. Die GRK induzierte Phosphorylierung erhöht die Affinität des Rezeptors zu β -Arrestin⁴⁴, auch bezeichnet als 48 kDa-Protein oder S-Antigen⁴⁶, was die Interaktion mit den G-Proteinen verhindert und somit zur Unterbrechung der Signalkaskade führt⁴⁷. Mit der Bindung des β -Arrestins mit dem Rezeptor beginnt der zweite Schritt der Internalisierung, die Sequestrierung. β -Arrestin fungiert als Adapterprotein, welches eine Verbindung des Rezeptors mit Komponenten der Clathrin-abhängigen Endocytose herstellt. Zusätzlich bindet β -Arrestin direkt an β_2 -Adaptin Untereinheiten. Dieser Komplex erhöht die Bindungsaffinität des Rezeptors mit Dynamin, was anschließend zur Endocytose des Rezeptors führt⁴⁴. In Anlehnung an der Interaktion mit β -Arrestin und deren Internalisierungswege, kann der Internalisierungsprozess von G-Protein gekoppelten Rezeptoren in zwei Gruppen geteilt werden. Rezeptoren der Gruppe A binden an β -Arrestin 2 mit höherer Affinität als β -Arrestin 1, während Rezeptoren der Gruppe B an beiden β -Arrestinen mit gleicher Affinität binden. Nach Internalisierung der Gruppe A Rezeptoren dissoziiert β -Arrestin sofort und der Rezeptor wird durch einer GPCR - spezifischen Protein Phosphatase 2A (PP2A) dephosphoryliert. Folgend kann der Rezeptor wieder in die Plasmamembran eingebaut werden und somit für eine neue Aktivierung zur Ver-

fügung stehen^{43, 44}. Im Gegensatz dazu bildet β -Arrestin mit Rezeptoren der Gruppe B einen stabilen Komplex, was zu einer Ansammlung der Rezeptoren in Endosomen führt. Gruppe B Rezeptoren werden also intrazellulär zurückgehalten und nur sehr langsam oder gar nicht in die Plasmamembran eingebaut^{43, 44}. In Abb. 6 ist die Internalisierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren durch β -Arrestin veranschaulicht.

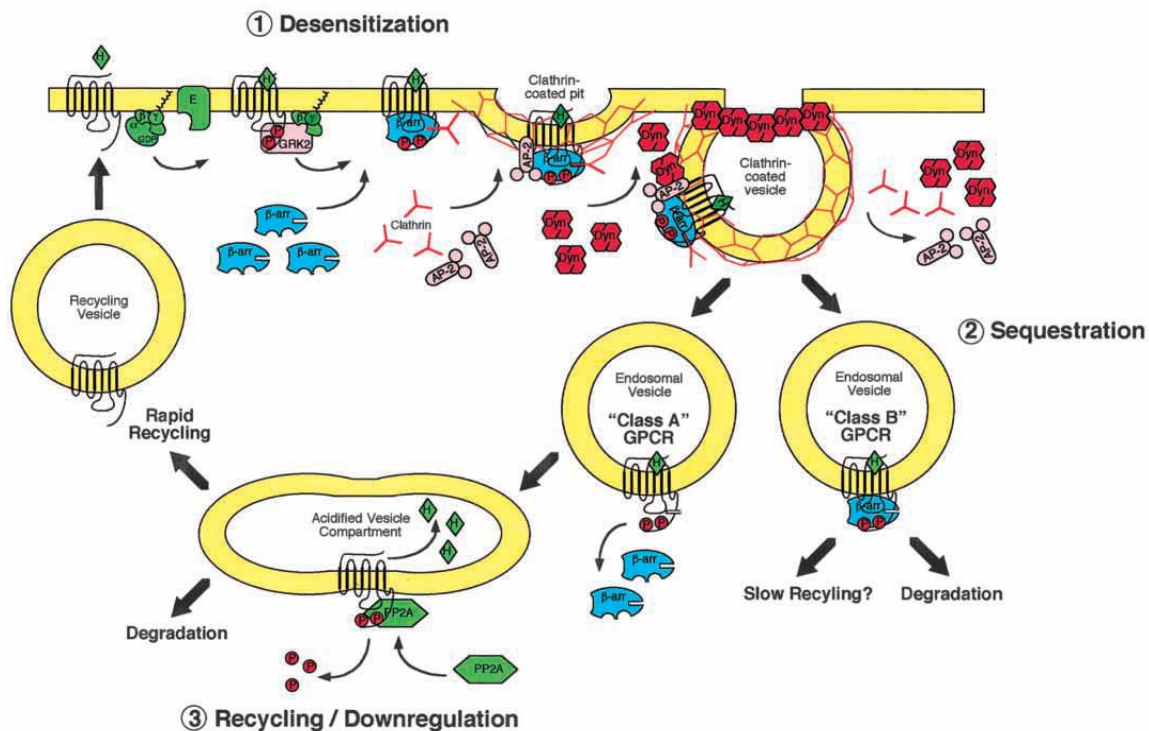


Abb. 6: Desensibilisierung, Sequestrierung und Resensibilisierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (1) Desensibilisierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors: der aktivierte Rezeptor wird durch spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) phosphoryliert. Die Phosphorylierung erhöht die Affinität zu β -Arrestin, wodurch die Interaktion des heterotrimären G-Proteins mit dem Rezeptor verhindert wird. β -Arrestin wirkt als Adapterprotein zu Clathrin und β_2 -Adaptin (AP-2) und führt dadurch zur Endocytose des Rezeptorkomplexes. (2) Rezeptorsequestrierung stellt die Dynamin (Dyn) – abhängige Endocytose dar. Ist der Rezeptor einmal internalisiert, folgen zwei unterschiedliche Interaktionen mit β -Arrestin. G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Gruppe A dissoziieren sofort nach der Internalisierung von β -Arrestin. Bei niedrigem pH im Vesikel dissoziiert der Ligand und der Rezeptor wird von einer GPCR-spezifischen Protein Phosphatase PP2A dephosphoryliert und anschließend in die Plasmamembran eingebaut (3). Vertreter der Gruppe B bilden mit β -Arrestin einen stabilen Komplex. Diese Rezeptoren häufen sich in Vesikeln an und werden entweder abgebaut oder langsam in die Plasmamembran wieder eingebaut. Abbildung entnommen aus Luttrell & Lefkowitz⁴⁴

Eine Mutation der AVP Rezeptoren oder die fehlende beziehungsweise eine unzureichende Produktion eines endogenen Peptidliganden führt zur Ausbildung von bestimmter Krankheitsbilder⁴⁸. Im folgenden Kapitel möchte ich auf das Krankheitsbild „Diabetes insipidus“ genauer eingehen, welches sich bei einer Störung im Vasopressin-System bemerkbar macht.

1.4 Diabetes insipidus

Beim Diabetes insipidus (DI), auch als Wasserharnruhr bekannt, handelt es sich um eine angeborene oder erworbene Erkrankung bei der die betroffenen Personen über vermehrte Harnausscheidung (Polyurie) von bis zu 15 - 20 Liter pro Tag und über ein damit entstehendes Durstgefühl (Polydipsie) klagen. Bei dieser Erkrankung ist die Niere zu keiner ausreichenden Wasserrückresorption befähigt⁴⁹. Dabei spielt AVP eine wichtige Rolle indem es den Einbau von Aquaporinen in die Plasmamembran ermöglicht. Die fehlende Wirkung des Hormons beim DI wird entweder durch die ausbleibende Synthese des Hormons verursacht, oder durch eine Mutation des Rezeptors in der Niere⁴⁸. In beiden Fällen kommt es zu der vermehrten Wasserausscheidung. Im Gegensatz zum Diabetes mellitus, das durch eine Störung des Zuckerstoffwechsels charakterisiert ist, ist beim DI der Harn schwach konzentriert ($< 100 \text{ mOsmol/kg}$)⁴⁹.

In Kapitel 1.4.1 und Kapitel 1.4.2 werden die beiden Formen des DI genauer beschrieben.

1.4.1 Diabetes insipidus centralis

Beim zentralen Diabetes insipidus ist der Körper nicht befähigt AVP in ausreichendem Maße zu produzieren. Ursachen hierfür können Hirntumore, Entzündungen, autoimmune oder vaskuläre Erkrankungen, ein aus Operationen oder Unfällen verursachtes Trauma, Metastasen oder Sarkoidose sein. In wenigen Fällen ist das Ausfallen der AVP Synthese auch erblich bedingt⁴⁹.

1.4.2 Diabetes insipidus renalis

Beim Diabetes insipidus renalis, auch nephrogener Diabetes insipidus (NDI) genannt, handelt es sich um eine Mutationen im V_2 -Rezeptor, welche meist X-Chromosomal vererbt wird. V_2R ist im Sammelrohr der Niere lokalisiert und ist für die Wasserrückresorption durch den Einbau von Aquaporin-2 (AQP-2) in die Plasmamembran verantwortlich (siehe Abb. 7). Dies erfolgt mittels Aktivierung der G_{as} - Untereinheit des G-Proteins. Genmutationen des V_2 -Rezeptors sind mit der Entstehung von NDI verbunden. In den meisten Fällen handelt es sich um Punktmutationen, die zu einer falschen Proteinfaltung des Rezeptors

führen. Der falsch gefaltete Rezeptor wird von der Proteinqualitätskontrolle (QCS – „quality control system“) erkannt und im ER zurückgehalten. Der Rezeptor gelangt somit nicht oder nur sehr vereinzelt an die Zelloberfläche, wodurch die Interaktion zwischen Rezeptor und AVP verhindert wird. Dabei fällt die nachgeschaltete Signalkaskade der G-Protein Aktivierung aus und Aquaporine können nicht in die Membran eingebaut werden⁵⁰ (siehe Abb. 7). Folglich kommt es zu einem enormen Wasserverlust da die Rückresorption nicht ausreichend funktioniert. Die derzeitige Behandlung von NDI Patienten ist eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr in Kombination mit einer salzarmen Diät, um eine niedrige Osmolarität zu erreichen und somit die erzwingende Wasserausscheidung zu reduzieren. Die Anwendung von Hydrochlorothiazid in Kombination mit Amilorid oder Indomethacin führt ebenfalls zu einer veringerten Wasserausscheidung von bis zu 50%. Eine ausgezeichnete Therapie wäre, da die falsche Faltung des Rezeptors zwar dessen Einbau in die Plasmamembran verhindert jedoch dessen Funktionalität nicht beeinflusst, mit Agonisten bzw. Antagonisten möglich, welche den Rezeptor vom ER befreien und an die Oberfläche geleiten⁵¹. Diese werden pharmakologische Chaperone oder Pharmako-Chaperone genannt^{51, 52}.

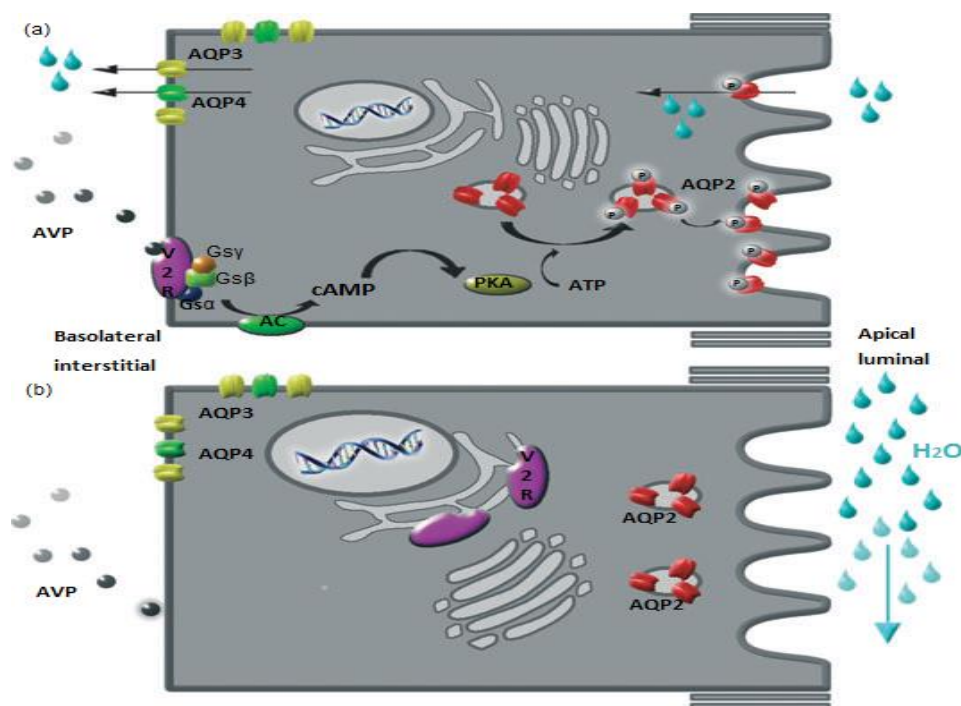


Abb. 7: Physiologischer Ablauf der Wasserrückresorption in der Niere (a) AVP bindet an V2-Rezeptor wodurch der Einbau von AQP-2 in der Membran auf der apicalen Seite verursacht wird und Wasser rückresorpiert werden kann (b) Falsche Proteinfaltung des mutierten V2-Rezeptors verursacht dessen Zurückhalten im ER. AVP kann nicht binden und somit seine Wirkung nicht ausüben. Abbildung übernommen aus Los et al.⁵¹

1.5 Ziele und Motivation

AVP und OT spielen im menschlichen Körper eine wichtige Rolle. Sie haben sowohl physiologische als auch zentrale Wirkungen, die dem Organismus von großer Bedeutung sind. Demnach sind Störungen bei der Synthese oder Wirkungsausfall dieser Peptide mit Krankheiten verbunden. Da sowohl AVP und OT als auch ihre Rezeptoren große Strukturähnlichkeiten aufweisen, führen eingesetzte Therapeutika oft zu Kreuzreaktionen und somit zu Nebenwirkungen. Daher ist das Erforschen selektiver Liganden weitaus von Interesse. In der Natur findet sich eine große Vielfalt an AVP und OT ähnlich wirkenden Verbindungen. So produzieren einige Pflanzenfamilien disulfidreiche Peptide, welche als Zyklotide bezeichnet werden und eine Wirkung auf den Oxytocin Rezeptor aufweisen. AVP ähnliche Verbindungen sind ebenfalls in der Natur weit verbreitet. Man findet sowohl in Säugetieren als auch in Reptilien, Vögel, Schnecken und Insekten strukturähnliche Wirkstoffkomponenten. Wichtige Vertreter sind marine Kegelschnecken. Das von ihnen produzierte Gift beinhaltet viele Komponenten, welche an Ionenkanäle und Rezeptoren des neuromuskulären Systems binden. Ein Beispiel hierfür sind Conopressine, die sich von AVP und OT nur durch einige Aminosäuren unterscheiden. In der vorliegenden Arbeit beschäftige ich mich mit der Suche nach selektiven Conopressinanaloga mit dem Fokus auf V_2R . Neben der Testung von natürlich vorkommenden Conopressinen wurden aus denen abgeleitete Analoga ebenfalls herangezogen. Im Rahmen der vorherigen Diplomarbeit wurden die Peptide auf ihre Bindungs- und Aktivierungsfähigkeit zu AVP und OT Rezeptoren getestet. In Tab. 8 werden die getesteten Substanzen dargestellt. Mithilfe von Rezeptorbindungsexperimenten konnte die Selektivität der Peptide dV4r8-VP DP iso1 (w55), dV4r8-VP DP iso2 (w56), d[Val4,His8]-VP (w24) zu V_2R bewiesen werden. Jedoch wurde $V_{1b}R$ nicht getestet. Ziel dieser Arbeit war es die Bindungseigenschaften an $V_{1b}R$ sowohl die Aktivierung von $V_{1a}R$, $V_{1b}R$, V_2R und OTR durch diese Liganden zu untersuchen. Des Weiteren wird ein möglicher therapeutischer Einsatz zur Behandlung des Diabetes insipidus untersucht. Einerseits wird getestet, ob die Liganden die Faltung des Rezeptors im ER beim nephrogenen Diabetes insipidus fördern und somit als pharmakologische Faltungshelfer (Pharmako-Chaperone) eingesetzt werden können. Andererseits wird untersucht, ob die vorliegenden Peptide dazu befähigt sind die Agonisten-induzierte Rezeptorinternalisierung zu blockieren. Dieser Effekt kann beim zentralen Diabetes insipidus von Nutzen sein. Da der Körper nicht fähig ist AVP zu produzieren, kann dessen ausgebliebene Wirkung durch

diese Peptide ersetzt und über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden. Der erste Schritt ist daher V_{1b}R exprimierende Zellen vorzubereiten, dessen Membranen zu ernten und zur Durchführung von Bindungsstudien heranzuziehen. Gefolgt von der Durchführung funktioneller Experimente zur Messung der Aktivierung aller Rezeptoren. V₂R wird mittels direktem cAMP Nachweis, während V_{1a}R, V_{1b}R und OTR mittels Luciferase-Assay geprüft werden. Zur Durchführung der Pharmako-Chaperone- sowie Rezeptorinternalisierungsexperimente, ist es nötig eine dafür geeignete Markierung des V₂R bzw. des mutierten Rezeptors (V₂L219R) zu finden. Der Rezeptor wurde unter Verwendung von Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und mittels Durchflusszytometrie (FACS) detektiert.

Tab. 8: Getestete Peptide auf AVP / OT Rezeptoren

No.	analogue	No.	analogue	No.	analogue
w37	Dap5-Conopressin T	w20	[Thr8]-VP	w36	[His3]-AVP
w07	R4-Conopressin T	w21	[Gln8]-VP	w35	d[Leu4]-AVP
w08	D5-Conopressin T	w25	d[Val4,Trp8]-VP	w45	d[Lys4]-AVP
w02	Conopressin-G	w32	d[Thz2,Val4,D-Arg8]-VP	w34	d[Cha4]-AVP
w55	dV4r8-VP DP iso1	w64	[R7,Cit8]-VP	w11	[Thr4]-AVP
w56	dV4r8-VP DP iso2	w65	[R7,HArg8]-VP	w46	d(Ch2)5-AVP
w24	d[Val4,His8]-VP	w53	d[Ile2,Ile3,Leu4]-AVP	w17	[His2]-AVP
w60	Gly7-AVP	w54	d[Ile2,Leu4]-AVP	w43	[Nph2]-AVP
w33	Hyp7-AVP	w18	[Ile2]-AVP	w10	desamino-AVP
w22	[Val8]-VP	w19	[Trp2]-AVP	w58	desamino-desGly-AVP
w69	[C1,6U]-AVP	w15	[Trp3]-AVP	w59	desamino-desGly-AVP-OH
w72	d[C1,6U]-AVP	w16	[Cha3]-AVP	w06	L2T4-AVP

Generation 0 (selenium) beinhaltet w5, w16, w3, w4, w12, w13. Generation 1a (G1a) beinhaltet w10 und w09. G1a-Disulfidbrücke Analoga beinhaltet w69, w70, w72, w74. G1a-C-N Terminus Analoga beinhalten w28, w29, w58, w59. G1a 2Y Analoga beinhalten w17, w43, w18, w19. G1a-Position 3F/I Analoga beinhalten w15, w16, w36. G1a-Position 4Q Analoga beinhalten w35, w45, w34, w11. G1a-Position 7P Analoga beinhalten w62, w63, w73, w61, w60, w33. G1a-Position 8 Analoga beinhalten w22, w20, w21, w64, w65. G1a-OTR Analoga beinhalten w30, w39. G1a-V1bR Analoga beinhalten w53, w54, w40, w46. G1a-V2R Analoga beinhalten w55, w56, w24, w25, w32. Generation 1b-Conopressins Analoga beinhalten w37, w07, w08, w02, w06.

2 Material

In diesem Kapitel werden Puffer und Materialien vorgestellt, die für die Durchführung der Experimente sowie für die Zellkultivierung in Verwendung waren.

- DMEM, high glucose (4.5 g/l) mit L-Glutamin und Phenolrot (PAA, Austria)
- DMEM, high glucose (4.5g/L) mit L-Glutamin ohne Phenolrot (PAA, Austria)
- FCS (Gibco, USA)
- Trypsin 1x (PAA, Austria)
- Geneticin (G418-BC (30000 U/ml in WFI); Biochrom AG, Germany)
- PBS 1x: 1000 ml enthalten 200 mg KCl, 200 mg KH_2PO_4 , 8 g NaCl, 766 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; pH=7.3
- BSA (Sigma Aldrich, USA)
- FM: FCS + 10% DMSO (Sigma Aldrich, USA)
- Forskolin
- PDL (Sigma Aldrich, USA)
- Protease Inhibitor: CompleteTM Tablette (Roche, Switzerland)
- HME 1x: 25 mM Hepes, 2 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA; pH=7.4
- TM 1x: 100 mM Tris, 10 mM MgCl_2 ; pH=7.4 – 7.8
- TME 1x: 100 mM Tris, 10 mM MgCl_2 , 1mM EDTA; pH=7.8
- 2 M CaCl_2
- 2.5 M CaCl_2
- 2x HEBS: 50 mM Hepes, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na_2HPO_4 ; pH=7.07 – 7.1
- Glyzerinlösung: 100 ml enthalten 13.8 ml 100% sauberes Glyzerin und 86.2 ml PBS
- AVP (Perkin Elmer, USA)
- [^3H] – AVP (Perkin Elmer, USA)
- [^3H] – Adenin (Perkin Elmer, USA)
- Rotiszint eco plus (Roth, Germany)
- TM + BSA: 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 0.1% BSA; pH=7.8
- Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, USA)
 - Bovine Serum Albumin (BSA)

- Reagenz A: 0.1 g Na-bicinchoninsäure, 2.0 g $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.16 g Na-tartrat Dihydrat, 0.4 g NaOH, 0.95 g NaHCO_3 , in 100 ml destilliertes Wasser, pH=11.25
- Reagenz B: 0.4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 10 ml destilliertes Wasser
- Luciferase Assay System (Promega Corporation, USA)
 - Luciferase Substrat
 - Luciferase Puffer
- Lysis Puffer
- Rat Anti-Mouse IgG1 PerCP (BD Biosciences, USA)
- Anti-FLAG M2 (Stratagene Agilent)

3 Methoden

In diesem Kapitel werden die verschiedenen Methoden zur Durchführung der Experimente vorgestellt.

3.1 Zellen und Zellmembranen

3.1.1 Zellkultivierung

Zur Durchführung der Experimente wurden Human Embryonic Kidney Zellen (HEK-293) verwendet. Die Kultivierung erfolgt in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit. Die Zellen werden in 10 cm Platten in Kultur gehalten und bei einer Konfluenz von ~90% passagiert. Sobald die Zellen für ein Experiment benötigt werden, werden sie in 15 cm Platten angewachsen. Die verwendeten HEK-293 Zellen exprimieren humanes V₂R, V_{1a}R, V_{1b}R oder OTR. Die Transfektion der HEK-293 Zellen mit dem entsprechenden Plasmid wird in Kapitel 3.1.5 beschrieben.

3.1.2 Passagieren von Zellen

Das alte Medium wird abgesaugt und mit 5 ml PBS vorsichtig gewaschen, um abgestorbene Zellen und Reste des alten Mediums zu entfernen. Anschließend wird mit 1 ml Trypsin zwei Minuten lang bei Zimmertemperatur inkubiert, um Zellen von der Platte und Zellverbände untereinander zu lösen. Mit 4 ml frisches, auf 37°C temperiertes DMEM wird die Trypsinisierung gestoppt, die Zellen gut suspendiert und etwa 1/10 der Zellsuspension in eine frische Platte überführt. 10 ml frisches DMEM + 10% FCS und 100 µl Genetecin (G-418) werden hinzugefügt. Nicht transfizierte HEK-293 Zellen (wt) werden nicht mit G-418 behandelt, da sie das Resistenzgen nicht besitzen und absterben würden.

3.1.3 Einfrieren von Zellen

Die Zellen werden in 15 cm Platten kultiviert. Aus jeder einzelnen Platte werden drei Aliquots mit je 700 µl eingefroren. Das alte Medium wird abgesaugt und die Zellen mit 10 ml

PBS gewaschen. Danach wird 2 ml Trypsin zugesetzt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Mit 8 ml DMEM wird die Trypsinisierung gestoppt, die Zellen gut suspendiert und in ein konisches Zentrifugenröhrchen übertragen. Bei 1000 U/min wird bei Zimmertemperatur 5 Minuten zentrifugiert. Das überstehende Medium wird abgesaugt, die Zellen mit 700 µl Freezing Medium (FM) pro Aliquot resuspendiert und in Kryoröhrchen übertragen. Um ein stufenweises Einfrieren zu gewährleisten, werden die Röhrchen in Zellstoff eingewickelt und bei -80°C gelagert.

3.1.4 Auftauen von Zellen

In einer 10 cm Zellkulturplatte werden 10 ml DMEM + 10% FCS vorbereitet. Die Zellen werden aus dem -80°C Eiskasten herausgeholt und schnell aufgetaut. Die Zellsuspension wird ins Medium übertragen und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wird das Medium, um DMSO zu entfernen, gewechselt und 100 µl G-418, solange es sich nicht um HEK-293 (wt) handelt, hinzugefügt.

3.1.5 Transfektion

Die Transfektion mit humanem V₂R, V_{1a}R und OTR wurde bereits von Mag. Christian Bergmayr durchgeführt und stabile Zelllinien vorbereitet. Die Transfektion mit humanem V_{1b}R-gfp, SF-TAP V₂R (wt) und SF-TAP V₂-L219R (Mutante) wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels zwei Transfektionswege durchgeführt. Unter Verwendung der Calcium Phosphat Präzipitation wurden HEK-293 Zellen mit V_{1b}R transfiziert. Für die Expression der beiden Rezeptoren SF-TAP V₂R und SF-TAP V₂-L219R wurde die Transfektion mit Turbofect durchgeführt.

Zuerst möchte ich die Durchführung der Transfektion mittels Calcium Phosphat Präzipitation vorstellen: In eine 10 cm Platte werden 1.8×10^6 HEK-293 Zellen ausgesät und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird eine Mischung aus 50 µl CaCl₂ (2.5 M) und 480 µl ddH₂O vorbereitet. 20 µg DNA werden der CaCl₂-H₂O Mischung zugesetzt. Diese wird zu 500 µl HEPES Buffer zugefügt und gut durchmischt. Nach 6 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird die Mischung vorsichtig auf die Zellen getropft. Die Zellen werden 4 h bei 37°C inkubiert worauf der Glycerinsschock folgt. Das Medium wird dabei abgesaugt und 1 ml Glycerinschocklösung den Zellen vorsichtig hinzugefügt. Danach

wird mit 5 ml PBS zwei Mal gewaschen und 10 ml frisches DMEM + 10% FCS zugesetzt. Die Zellen werden für 24 h – 48 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird unter UV-Licht die Anwesenheit des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), als Marker für eine erfolgreiche Transfektion, kontrolliert.

Bei der Transfektion mit TurboFect - Reagenz werden HEK-293 Zellen angewachsen bis sie 70-90% Konfluenz erreicht haben. Das Medium wird abgesaugt und durch 9 ml DMEM + 10% FCS und 90 µl G-418 ersetzt. 10 µg DNA werden in 1 ml DMEM gelöst. TurboFect Reagenz wird gut durchmischt und 10 µl der DNA – DMEM Mischung zugesetzt. Noch einmal wird gut durchmischt und 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischung wird tropfenweise vorsichtig auf die Zellen aufgetragen und 24-48 h bei 37°C inkubiert.

Nach erfolgreicher Transfektion können die Membranen der transienten Zellen geerntet werden (siehe Kapitel 3.1.7) oder die Zellen weiter in Kultur gehalten, um stabile Zelllinien zu erhalten (siehe Kapitel 3.1.6).

3.1.6 Erhalt stabiler Zelllinien

24 h nach erfolgreicher Transfektion werden transfizierte und wt HEK-293 Zellen mit G-418 behandelt. G-418 verhindert die Elongation der Translation und hemmt somit die Proteinbiosynthese. Da die cDNA neben den Rezeptorgen auch ein Neomycin-Geneticin-Resistenzgen enthält, können transfizierte Zellen in Anwesenheit des Antibiotikums überleben, während nicht transfizierte Zellen absterben. Sobald alle wt HEK-293 Zellen abgestorben sind, werden die nun überlebenden transfizierten Zellen trypsinisiert und in Medium so verdünnt, dass in einer 96-well Mikrotiterplatte sich in jeder Vertiefung 100 µl Medium und eine einzige Zelle befinden. Sobald sich das Medium verfärbt, werden die Zellen Schritt für Schritt in 24-Well, 6-Well, 6 cm und 10 cm Platten übertragen. Zellmembranen werden geerntet und die Anwesenheit des Rezeptors mithilfe von Rezeptorbindungsversuche überprüft.

3.1.7 Ernten von Zellmembranen

Zellmembranen werden für diverse Rezeptor-Bindungsexperimente benötigt. Ziel ist es reine Zellmembranen inklusive Rezeptor zu erhalten. Dabei werden die Zellen zerstört und

die Plasmamembranen von allen anderen Zellkompartimenten abgetrennt. Die Zellen werden hierfür in 15 cm Platten kultiviert, sodass man eine hohe Zellzahl und somit hohe Konzentrationen an Plasmamembranen erhält. Gearbeitet wird auf Eis, um alle Zellvorgänge zu stoppen. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen zwei Mal mit 10 ml eiskaltem PBS vorsichtig gewaschen. Weitere 10 ml PBS werden hinzugefügt und die Zellen von der Platte mit einem Schaber abgeschabt, gut suspendiert und in 50 ml Zentrifugenröhrchen übertragen. Mit 5 ml PBS wird nachgewaschen, um möglichst viele Zellen zu erhalten. Die Zellsuspension wird 10 min bei 1000 U/min und + 4°C zentrifugiert. Überstehendes PBS wird vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml HME + Complete™ Tablette resuspendiert und in ein 1.5 ml Eppendorf Gefäß überführt. HME bewirkt durch den großen Osmolaritätsunterschied ein Aufbrechen der Zelle. Die nun frei vorliegenden Proteasen werden durch die Inhibitoren der Complete™ Tablette gestoppt. Anschließend wird die Zellsuspension in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Dabei muss darauf geachtet werden, dass ein gefrorener Kern erhalten bleibt, um keine völlige Erwärmung der Suspension zu verursachen und somit den Rezeptor zu zerstören. Es wird gut durchmischt und wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese Schritte werden drei Mal wiederholt. Nach dem letzten Zyklus wird die Suspension etwa 20 Sekunden drei Mal im Ultraschalleisbad behandelt. Die Suspension wird in 10 ml Zentrifugenröhrchen übergeführt, 5 ml HME + Complete™ Tablette hinzugefügt und bei 18000 U/min und + 4°C 20 min zentrifugiert. Die überstehende Lösung wird vorsichtig entfernt und das Pellet je nach Pelletgröße in 400 - 1000 µl TME - Puffer resuspendiert. 20 µl werden entnommen und die Proteinkonzentration mittels Bicinchoninicsäure Assay (BCA) bestimmt. Die Lagerung der Membranen erfolgt bei -80°C.

3.1.8 Bicinchoninicsäure Assay

1 ml einer Standard Bovine Serum Albumin Lösung (2 mg/ml) wird mit ddH₂O wie folgt verdünnt:

A: 2000 µg/µl

B: 1500 µg/µl

C: 1000 µg/µl

D: 750 µg/µl

E: 500 µg/µl

F: 250 µg/µl

G: 125 µg/µl

H: 25 µg/µl

Die Bestimmung erfolgt in einer 96 - Well Mikrotiterplatte. Es werden 12.5 µl jeder Konzentration in die Platte pipettiert und mit 12.5 µl ddH₂O versetzt. 2 µl der Membransuspension werden zu 23 µl ddH₂O hinzugefügt. Eine Blindwertbestimmung wird mit 25 µl ddH₂O durchgeführt. Um mögliche Pipettierfehler zu verhindern, werden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt. Reagenz A und Reagenz B werden so miteinander gemischt, dass Reagenz A in einem 50 fachen Überschuss vorliegt. 200 µl aus der Reagenz Mischung werden hinzugefügt und die Platte bei 37°C 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wird die Absorption bei 550 nm (Reader ht2, Anthos, Germany) gemessen. Mithilfe der aus den Standardlösungen resultierenden Eichgerade wird die Konzentration der Probe bestimmt.

3.2 Pharmakologische Experimente

3.2.1 Rezeptorsättigungsexperiment

Rezeptorsättigungsexperimente dienen zur Bestimmung der maximalen spezifischen Bindung ($B_{\max}$) und der Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_d).

Bindung-Puffer (TM + 0,1% BSA) wird hergestellt. Sieben Konzentrationen (0.01 nM, 0.03 nM, 0.1 nM, 0.3 nM, 1 nM, 3 nM und 10 nM) von [³H]-AVP werden in dem Puffer vorbereitet. Die spezifische Aktivität des radioaktiv markierten AVP beträgt 55.9 Ci / mmoles (Ci - Curie). Es gilt: 1 Ci = 3.7×10^{10} Zerfälle pro Sekunde bzw. 2.22×10^{12} Zerfälle pro Minute (dpm-disintegrations per minute). Bei 50% er Umwandlung der Werte von dpm in cpm (counts per minute) ergibt sich 1 Ci / mmoles = 1.11×10^{12} cpm / mmoles. Dementsprechend wird die Konzentration des eingesetzten radioaktiv markierten Liganden wie folgt ausgerechnet:

$$^3\text{H-AVP: } 50 \mu\text{Ci} / 50 \mu\text{l}, 55.9 \text{ Ci / mmoles} \rightarrow 14.9 \mu\text{M}$$

$$1 \text{ Ci / mmoles} = 1.11 \times 10^{12} \text{ cpm / mmoles}$$

$$55.9 \text{ Ci / mmoles} = 62.05 \times 10^{12} \text{ cpm / mmoles}$$

$$1 \text{ fmol} = 62.05 \text{ cpm}$$

$$c \text{ (nM)} = \text{cpm} / 62.05 / 200 \mu\text{l}$$

Eine 1 μM AVP Lösung wird ebenfalls vorbereitet. 30-50 μg Zellmembranen werden im Puffer suspendiert. Für die Bestimmung des Total-Wertes werden 50 μl [^3H]-AVP, 100 μl Bindung-Puffer und 50 μl Membransuspension in Röhrchen pipettiert. Für die Ermittlung der nichtspezifischen Bindung werden 50 μl des Puffers durch 50 μl 1 μM AVP ersetzt. Die Bestimmung erfolgt jeweils in Duplikaten. Die Röhrchen werden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation werden die Proben mit eiskaltem TM durch eine Filtermembran (GF/A Glass Microfibre Filters 102•256 nM) mithilfe von Semi-automatic Cell Harvester filtriert. Die Filtermembranen werden in Scintillation Fläschchen übertragen und 2 ml Scintillation Lösung (ULTIMA Gold Perkin Scintillation Liquid) hinzugefügt. Die Fläschchen werden 30 min geschüttelt und anschließend wird die Radioaktivität mithilfe eines β -Counters (TRI-CARB 2300 TR Liquid Scintillation Analyzer, Packard Instruments) gemessen. Unter Verwendung des aus dem Experiment erhaltenen B_{max} lässt sich die Rezeptordichte wie folgt berechnen:

$$1 \text{ Ci} / \text{mmoles} = 1.11 \times 10^{12} \text{ cpm} / \text{mmoles}$$

$$61.2 \text{ Ci} / \text{mmoles} = 67.9 \times 10^{12} \text{ cpm} / \text{mmoles}$$

$$67.9 \text{ cpm} = 1 \text{ fmoles}$$

$$B_{\text{max}} (\text{cpm}) : 67.9 = \text{xx fmoles} / \text{xx } \mu\text{g Protein}$$

$$= \text{xx fmoles} / \text{mg Protein}$$

$$= \text{xx pmoles} / \text{mg Protein}$$

3.2.2 Kompetitionsversuch

Die Fähigkeit der Peptide einen radioaktiv markierten Liganden von seinem Rezeptor zu verdrängen wird anhand eines Kompetitionsversuch getestet. Zur Überprüfung der Anwesenheit des Rezeptors in stabilen Zelllinien wurde die Verdrängung von [^3H]-AVP aus dem Rezeptor durch ein oder zwei Konzentrationen AVP überprüft. Für die Bestimmung des IC_{50} Wertes einer Testsubstanz wurden mindestens sieben Konzentration der Testsubstanz eingesetzt.

Um Zellmembranen auf die Anwesenheit des Rezeptors zu testen, wird eine Endkonzentration von 1 nM [^3H]-AVP und 1 μM (und 10 μM) nicht markiertem AVP in Bindung-Puffer hergestellt. 30-50 μg Zellmembranen werden in Puffer vorbereitet. Folglich werden zur Bestimmung des Total-Wertes 100 μl Bindung-Puffer, 50 μl radioaktiver Ligand und 50 μl

Membransuspension in Röhrchen pipettiert. Zur Ermittlung der nichtspezifischen Bindung werden 50 µl Binding Puffer, 50 µl radioaktiver Ligand, 50 µl Peptidlösung und 50 µl Membransuspension in Röhrchen pipettiert. Die Bestimmung erfolgt jeweils in Duplikaten. Die Reaktionslösungen werden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben durch eine Filtermembran filtriert und die Radioaktivität gemessen. Um den IC_{50} Wert einer Substanz zu bestimmen, wird das Experiment auf die gleiche Art durchgeführt mit dem Unterschied, dass sieben Konzentrationen der Testsubstanz getestet werden. Für die Ermittlung der nichtspezifischen Bindung werden 50 µl einer Lösung aus 1 µM AVP anstelle des Bindung-Puffers eingesetzt. Die Bestimmung erfolgt auch hier in Duplikaten.

3.2.3 Luciferase - Assay

Mithilfe des Luciferase Assays wird die Zellantwort nach Aktivierung eines Rezeptors durch einen Liganden untersucht. Dabei werden die Zellen mit einem Reporter-Gen kointransfiziert. G_q -gekoppelte Rezeptoren ($V_{1a}R$, $V_{1b}R$ und OTR) werden mit pGL-luc2P NFAT (Nuclear factor of activated T-cells), während G_s -gekoppelte Rezeptoren ($V_{2}R$) mit pGL-luc2P CRE (cAMP response element) transfiziert werden. Bei Aktivierung des Rezeptors wird am Ende der Signalkaskade das Enzym Luciferase synthetisiert. Wie in Abb. 8 zu sehen ist, katalysiert Luciferase bei Zugabe von Luciferin die Entstehung von Licht, dessen Intensität bei 560 nm mithilfe eines Detektors gemessen wird.

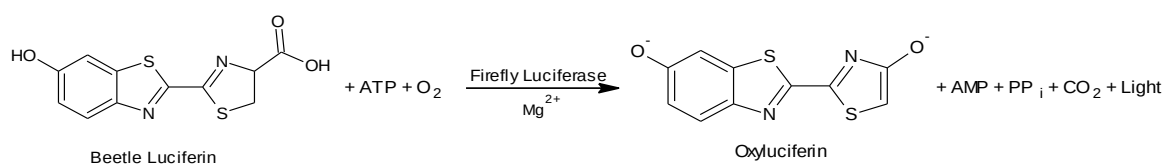


Abb. 8: Zerfall des Luciferins bei Anwesenheit von Luciferase

Am ersten Tag werden 6×10^6 Rezeptor exprimierende HEK-293 Zellen ausgesät und in eine 15 cm Platte bei 37°C 18 h inkubiert. 2×10^6 HEK-293 Wildtyp Zellen werden in eine 10 cm Platte als Negativkontrolle ausgesät und ebenfalls inkubiert. Am zweiten Tag werden die Zellen mit 15 µg pGL-luc2P NFAT bzw. CRE Plasmid transfiziert. 637.8 µl H₂O, 18.2 µl NFAT (0.822 µg/µl), 750 µl 2x HeBS und 94 µl 2M CaCl₂ werden in dieser Reihenfolge nach einander in ein 1.5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und gut durchmischt.

Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wird die Lösung vorsichtig auf die Zellen getropft und die Zellen für weitere 6 h bei 37°C inkubiert. Die Peptide und der natürliche Ligand (als Kontrolle) werden in Kulturmedium (DMEM ohne Phenolrot + 10% FCS) verdünnt. 8 verschiedene Konzentrationen (10 µM, 1 µM, 100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 0.1 nM) werden in eine 96-Well-Platte pipettiert. Jede Konzentration wird in Triplikaten gemessen. Nach der 6-stündigen Inkubation wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 20 ml PBS gewaschen. 2 ml Trypsin werden hinzugefügt und eine Minute bei Raumtemperatur stehen gelassen. Um die Trypsinisierung zu stoppen werden 8 ml DMEM hinzugefügt, die Zellen gut suspendiert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen übertragen. Bei 1500 U/min und Zimmertemperatur wird 3 min zentrifugiert. Das überstehende Medium wird abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml DMEM resuspendiert. Die Zellen werden gezählt und 5×10^4 Zellen pro 150 µl Medium in die 96-Well-Platte hinzugefügt. Es wird bei 37°C 18 h inkubiert. Am dritten Tag wird das Medium abgesaugt und die Platte bei -80°C über Nacht gelagert. Danach werden 30 µl Lysis-Buffer in jedes Well pipettiert und die Platte 30 min lang bei Zimmertemperatur geschüttelt. 20 µl jeder Verdünnung des Zelllysats werden in eine weiße Platte für die Vermessung übertragen.

3.2.4 cAMP Nachweis

6-Well Platten werden mit 1 ml PDL 2 h bei Raumtemperatur gelagert. PDL wird danach abgesaugt und die Platten mit ddH₂O gewaschen. HEK-293 Zellen, welche den V₂R exprimieren, werden in 15 cm Platten angewachsen. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Mit 2 ml Trypsin werden die Zellen von der Platte abgelöst. 8 ml Medium werden hinzugefügt und die Zellen gut suspendiert. Es wird bei 1000 U/min bei Raumtemperatur 5 min zentrifugiert und die Zellen in DMEM + FCS und 1 µl [³H]-Adenin pro 1 ml Medium resuspendiert. $5-8 \times 10^5$ Zellen werden pro 1 ml Medium in die 6-Well Platte pro Well überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wird das Medium abgesaugt und durch ein serumfreies Medium + RO201724 (1:1000, stock 100mM) ersetzt und 1 – 2 h bei 37°C inkubiert. RO201724 ist ein Phosphodiesterasehemmer und verhindert somit den Abbau des cAMPs. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen (0.3 nM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM und 300 nM) von AVP, w24, w55 und w56 behandelt. 30 µM Forscolin wird als Positivkontrolle gemessen und reines Medium als Negativkontrolle. Alle Bestimmungen wer-

den in Triplikate durchgeführt. Die Zellen werden mit den Peptiden 20 min bei 37°C behandelt. Nach der Inkubation wird auf Eis gearbeitet. Das Medium wird abgesaugt. Um die Zellen zu lysieren werden sie mit 1 ml eiskaltem 2.5% PCA + 100 µM cAMP versetzt. Bei + 4°C werden die Zellen 30 - 60 min gelagert. 100 µl KOH zur Neutralisierung werden in 1.5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und 900 µl der Zellsuspension werden zugesetzt. Dabei bildet sich ein weißer Niederschlag mit einem rosa - färbenden Überstand. Der Überstand wird auf Dowex-Säulen überführt. cAMP wird aus den Säulen eluiert und in Szintillation Fläschchen übertragen. 10 ml Szintillation Lösung werden hinzugefügt und gut durchmischt. Die Radioaktivität wird mit dem β -Counter (TRI-CARB 2300 TR Liquid Szintillation Analyzer, Packard Instruments) gemessen.

3.3 Durchflusszytometrie

3.3.1 Efflux-Test zur Prüfung der Zellpermeabilität der Peptide

Ziel war es eine Information darüber zu gewinnen, ob die Peptide dazu fähig sind die Zellmembran zu durchdringen. Dafür wurde ein Fluoreszein markiertes Peptid verwendet. Nach Durchdringen des Peptides in die Zelle, soll anhand des Experimentes der Ausstrom des Moleküls durch die Zellmembran hindurch gemessen werden. Dabei soll am Anfang eine hohe Fluoreszenz gemessen werden, die im Verlauf einiger Minuten abnimmt.

In zwei Bechergläser werden jeweils 10 ml DMEM + 10% FCS und 60 mg 25 mM HEPES vorbereitet. Es wird einmal bei pH=6 und einmal bei pH=7.4 geladen. Das Efflux – Medium, bestehend aus DMEM + 2% FCS und 60 mg 25 mM HEPES, wird bei pH=7.4 eingestellt. HEK-Zellen werden von der Platte gelöst und bei 600 U/min bei + 4°C 6 min zentrifugiert. Das überstehende Medium wird entfernt und die Zellen resuspendiert. 1×10^6 Zellen werden in Zentrifugenröhrchen im Medium bei verschiedenen pH - Werten und einer Behandlung von 1 µM Fluoreszein markiertem Peptid 30 min bei 37°C inkubiert. Die Samples werden in Glasröhrchen übergeführt und bei 500 U/min 6 min bei + 4°C zentrifugiert. Es wird bei jeder Ladung einmal nicht gewaschen, einmal mit 100% FCS bei 37°C gewaschen und einmal mit 100% FCS bei 0°C gewaschen. Das erhaltene Zellpellet wird mit 1 ml Efflux Medium resuspendiert und die Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie (FACS) gemessen.

3.3.2 Rezeptorinternalisierung

HEK-293 werden in 15 cm Platten kultiviert und beim Erreichen von 70 - 80% Konfluenz mit einem FLAG-markierten V₂R transfiziert. Es werden 10 - 20 µg DNA in 1000 µl jet-PRIME™ Puffer gelöst und gut durchmischt. 20 - 40 µl jetPRIME™ Reagenz werden hinzugefügt und 10 s durchmischt. Bei Raumtemperatur wird 10 min inkubiert. Die Lösung wird tropfenweise den Zellen hinzugefügt. Nach 4 h wird das Medium gewechselt und die Zellen im Inkubator inkubiert. 24 h nach der Transfektion werden die Zellen in 6 cm Platten ausgesät und 18 h inkubiert. Ebenfalls werden HEK-293 Zellen (wt) in 6 cm Platten vorbereiten. Diese dienen als Negativkontrolle. Die Zellen werden mit 100 nM AVP, w24, w55 und w56 für verschiedene Zeitpunkte (2 min, 5 min, 20 min, 1 h, 2 h, 4 h) bei 37°C inkubiert. Es werden jeweils Duplikate durchgeführt. Nach der Behandlung wird auf Eis gearbeitet, um weitere Zellvorgänge zu stoppen. Das Medium wird abgesaugt und die Platte mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen werden mit 1 ml 0,02% EDTA abgelöst, suspendiert und in Zentrifugenröhrchen übergeführt. 9 ml PBS werden hinzugefügt und die Gefäße bei 1000 U/min bei + 4°C 5 min zentrifugiert. Überstehendes Medium wird abgesaugt und das Zellpellet je nach Größe in 200-300 µl PBS + 1% BSA resuspendiert. 100 µl der Zellsuspension werden mit Anti-FLAG M2 (1:1000) versetzt und 15 - 20 min auf Eis stehen gelassen. 20 µl des zweiten Antikörpers, Rat Anti-Mouse IgG1 PerCP, werden hinzugefügt und für weitere 15 - 20 min inkubiert. Bei der Behandlung mit dem zweiten Antikörper muss im Dunklen gearbeitet werden, da der Antikörper lichtempfindlich ist. Danach wird 1 ml PBS hinzugefügt und bei 1000 U/min bei + 4°C 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet in 200-300 µl PBS + 1% BSA resuspendiert und mit FACS wird die Fluoreszenz gemessen.

3.3.3 Pharmakochaperone - Test

HEK-293 werden am ersten Tag ausgesät und 24 h bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt die Transfektion mit GFP - markiertem V₂R (wt) und V₂-L219R (mutant). Die Zellen werden 24 h im Inkubator aufbewahrt. Am dritten Tag werden Tolvaptan, w24, w55 und w56 mit den Konzentrationen 10 nM, 50 nM, 300 nM und 1000 nM hinzugefügt und es werden für weitere 24h inkubiert. Als Negativkontrollen werden nicht transfizierte HEK-293 und unbehandelte V₂R und V₂-L219R exprimierende HEK-293 Zellen genom-

men. Als Positivkontrolle werden die Zellen bei 28°C statt 37°C inkubiert. Die Zellen werden am nächsten Tag resuspendiert und in Röhrchen übergeführt. Bei + 4°C und 500 U/min wird die Zellsuspension 6 min zentrifugiert. Das überstehende Medium wird vorsichtig abgesaugt und 1.5 ml PBS hinzugefügt und nochmals zentrifugiert. Das überstehende PBS wird abgesaugt und je nach Zellpellet werden 60 - 150 µl PBS hinzugefügt. Die Fluoreszenz wird mittels FACS gemessen.

3.4 Klonierung

Die folgenden Schritte beschreiben die identische Vervielfältigung der cDNA des humanen V₂R und des V₂L219R, die Integrierung des DNA-Fragments in ein Plasmid mit der SFTAP-Sequenz, das Einschleusen des Plasmids für weitere Vermehrung in Bakterien und später dessen Gewinnung, welches für die Transfektion von HEK-293 Anwendung finden kann.

3.4.1 Polymerase Kettenreaktion

20 µl Buffer 10 x (Finnzyme HF), 2 µl dNTP (10 mM), 55 µl ddH₂O und 1 µl Taq (Finnzyme Fusion) werden für die Zubereitung des PCR - Mastermixes vorbereitet.

In zwei 200 µl Reagenzgefäße werden jeweils 50 µl V₂R A108T-mut_1 bzw. 50 µl V₂R L219R A108T-mut_1, 5 µl MgCl₂, 5 µl Primer (10µM) V₂R-SFTAP-NheI_F (#32) und 5 µl Primer (10 µM) V₂SFTAP-Apa_R2 (#37) pipettiert. Zu jedem vorbereitetem DNA-Template werden 40 µl PCR - Mastermix hinzugefügt und die Proben im Thermocycler gestellt. Das daraus gewonnene Produkt wird in Agarose - Gel (30 ml TAE, 1% Agarose, 3 µl Ethidiumbromid) aufgetrennt und das benötigte DNA-Fragment ausgeschnitten und aus dem Gel isoliert.

3.4.2 Verdau des Plasmids und des PCR-Produktes

Dabei werden das gewünschte Gen (V₂R und V₂L219R) und das Plasmid an den richtigen Schnittstellen geschnitten. Es werden hierfür 5 µl Puffer B 10 x, 34 µl ddH₂O, 0.5 µl NheI (10 U/µl), 0.5 µl ApaI (10 U/µl) und 10 µl Plasmid zusammenpipettiert. Für den Verdau

des PCR-Produktes werden statt 34 µl ddH₂O nur 4 µl genommen aber dafür 40 µl PCR-Lösung. Insgesamt soll der MIX 50 µl betragen. Anschließend wird bei 37°C für 2.5 h inkubiert. Um die Enzyme zu stoppen, kommt der Mix für 10 min bei 65°C. Das geschnittene Plasmid wird mittels Gelelektrophorese (30 ml TAE, 1% Agarose, 3 µl Ethidiumbromid) aufgetrennt, das benötigte Fragment herausgeschnitten und die DNA aus dem Gel mithilfe des DNA purification kit eluiert. Dafür wird je 100 mg Gel 400 µl Binding Buffer II zugefügt und im Hitzeblock erwärmt. Das Gel muss vollständig gelöst sein. Die Lösung wird am Xact column übertragen und 2 min inkubiert. Bei 10.000 U/min wird 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. 500 µl Wash Solution wird hinzugefügt und nochmals bei 10.000 U/min 2 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und dieser Schritt wiederholt. Das Column wird in 1.5 ml Eppendorf-Gefäß übertragen, 30-50 µl Elution Buffer hinzugefügt und bei Raumtemperatur 2 min inkubiert. Um die DNA aus dem Filter zu lösen, wird bei 10.000 U/min zentrifugiert. Das gewonnene Produkt wird wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, weiterverarbeitet.

3.4.3 Enzymatische Verknüpfung des Plasmids mit dem Rezeptor

Die enzymatische Verknüpfung zweier DNA-Segmente, in diesem Fall V₂R bzw. V₂L219R und Vektorplasmid, wird Ligation genannt.

1 µl Ligase Puffer (10 x), 1 µl T4 DNA Ligase, 3 µl Plasmid und 5 µl des jeweiligen Rezeptors werden miteinander gemischt und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Enzym wurde durch zehn minütiges Erhitzen auf 65°C gestoppt.

3.4.4 Transformation

Nach der Ligation wird das Plasmid in Bakterienzellen eingeschleust. Dabei werden XL2 blue Zellen verwendet.

5 µl der Plasmidlösung werden zu 100 µl Bakteriensuspension hinzugefügt und 20 min auf Eis gelagert. Für 45 Sekunden wird auf 42 °C erhitzt und dann wieder auf Eis für 4 min. 800 µl LB Medium ohne Antibiotikum werden hinzugefügt. Es wird unter häufigem Schütteln bei 37°C 30-60 min inkubiert. 50 µl der Suspension werden auf Agarosegel-Platten (mit Kanamycin) ausgestrichen. Der Rest wird zentrifugiert, in 50 µl resuspendiert und auf eine zweite Platte ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht bei 37° inkubiert. Einzelne

Kolonien werden mit einer Pipettenspitze von der Platte entnommen und in ~ 7 ml LB Medium + Kanamycin übergeführt. Es werden je fünf verschiedene Klone entnommen. Die Röhrchen werden bei 37°C unter Schütteln über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird eine Plasmidgewinnung in kleinen Volumen ein Kontrollverdau durchgeführt.

3.4.5 Plasmidisolierung und Kontrollverdau

Die Plasmidisolierung wird wie in Kapitel 3.4.6 durchgeführt mit dem Unterschied, dass hier in kleinen Volumen gearbeitet wird. Es werden 1-1.5 ml Bakterienkultur entnommen und behandelt. 5 µl des isolierten Plasmids werden mit 12.8 µl ddH₂O, 0.1 µl ApaI (10 U/µl), 0.1 µl NheI (10 U/µl) und 2 µl Puffer 10 x (buffer B) bei 37°C 2 h inkubiert. Nach der Inkubation werden die Proben auf Agarose Gel aufgetragen und aufgetrennt. Positive Proben wurden zur Überprüfung der Sequenz zur Sequenzierung geschickt. Für die weitere Verwendung wird ein Glycerol-Stock vorbereitet. Dafür werden 950 µl Bakterienkultur der positiven Proben mit 450 µl Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

3.4.6 Plasmidgewinnung

Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden Plasmide für die Rezeptoren V_{1b}R, SF-TAP-V₂R und SF-TAP-V₂L219R aus E.Coli gewonnen, welche für die Transfektion von HEK-293 Zellen verwendet wurden.

Aus dem Glycerol-Stock werden die Bakterien auf Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. LB-Medium (10 g/l ddH₂O Pepton, 5 g/l ddH₂O Hefeextrakt, 5 g/l ddH₂O NaCl) wird hergestellt und autoklaviert. Eine Bakterienkolonie wird vorsichtig mit einer Pipettenspitze von der Platte entnommen und dem LB-Medium zugesetzt, Ampicillin bzw. Kanamycin, je nach Resistenz, hinzugefügt und bei 37°C 12-16 h geschüttelt. Die Bakteriensuspension wird in Zentrifugenröhrchen übergeführt und bei + 4°C 15 min lang bei 4500-6000 U/min zentrifugiert. Die abstehende Lösung wird entfernt und das Bakterien-Pellet mit 8 ml RES-Puffer resuspendiert. Mit 8 ml LYS-Puffer wird lysiert und 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. NucleoBond® Xtra Column Filter wird mit 12 ml EQU-Puffer vorbefeuchtet. Dem Bakterienlysats wird 8 ml NEU-Puffer hinzugefügt, das Gefäß drei Mal umgeschwenkt und auf den NucleoBond® Xtra Column Filter übertragen. Mit 5 ml EQU-Buffer wird ein erstes Mal gewaschen, das Filter verworfen und mit 8 ml

WASH-Puffer ein zweites Mal gewaschen. In einem Röhrchen wird das Plasmid mit 5 ml ELU-Puffer eluiert. 3.5 ml Isopropanol werden hinzugefügt und bei Raumtemperatur 2 min lang stehen gelassen. Die Lösung wird auf NucleoBond® Finalizer übergeführt und mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen. Schließlich wird die DNA mit 200 - 800 µl TRIS-Puffer eluiert und die Konzentration bestimmt.

4 Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der durchgeführten Experimente dargestellt. Zuerst zeige ich die Daten der Klonierung von SF-TAP V₂R sowie SF-TAP V₂L219R. Gefolgt von Ergebnisse der Plasmidisolierung sowie Zellmembrangewinnung. Anschließend werden Daten zu Rezeptorbindungs- sowie Rezeptoraktivierungsstudien präsentiert. Zu allerletzt kommen die Ergebnisse zu Pharmako-Chaperone und Rezeptorinternalisierung.

4.1 Klonierung

Zur Untersuchung des Pharmako-Chaperone-Effektes sowie Rezeptorinternalisierung war es erforderlich, die dafür benötigten Rezeptoren mit der entsprechenden Rezeptormarkierung herzustellen. Zu diesem Zweck wurde die DNA-Sequenz, welche für V₂R und V₂L219R codiert, mithilfe der Polymerase Kettenreaktion vervielfältigt und auf Agarose Gel aufgetragen. Die resultierende Auftrennung der Gelelektrophorese ist in Abb. 9 dargestellt. Es wurde bei jedem Rezeptortyp jeweils die Reaktion mit und ohne MgCl₂ durchgeführt. Die richtigen Banden wurden ausgeschnitten und die Rezeptorsequenz wie in Material und Methoden beschrieben aus dem Gel isoliert und weiterverarbeitet.

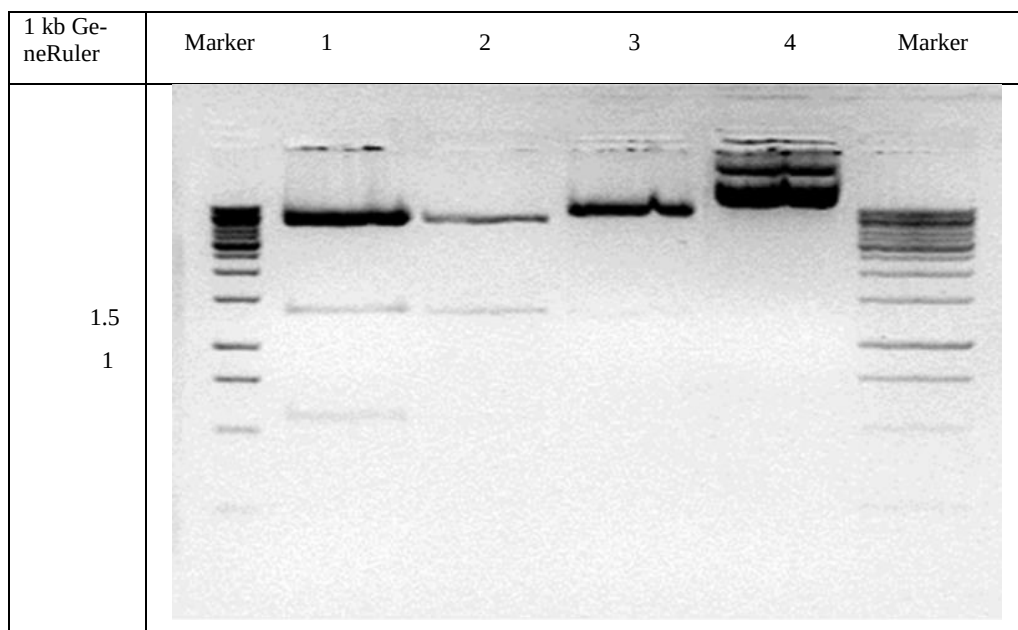


Abb. 9: Agarose-Gelelektrophorese zur Identifizierung und Auftrennung des PCR-Produktes
 1: SF-TAP V₂L219 ; 2: SF-TAP V₂R ; 3: SF-TAP V₂L219R + 5 µl MgCl₂ ; 4: SF-TAP V₂R + 5 µl MgCl₂

Um nun die vervielfältigten Rezeptoren in ein Plasmid mit SF-TAP Sequenz zu ligieren, wurde ein bereits vorhandenes Plasmid an richtigen Schnittstellen geschnitten. Abb. 10 zeigt das Ergebnis einer Gelelektrophorese. Das Plasmid wurde von A₂A Rezeptor getrennt, um die nötigen Rezeptoren mit der SF-TAP Sequenz verknüpfen zu können.

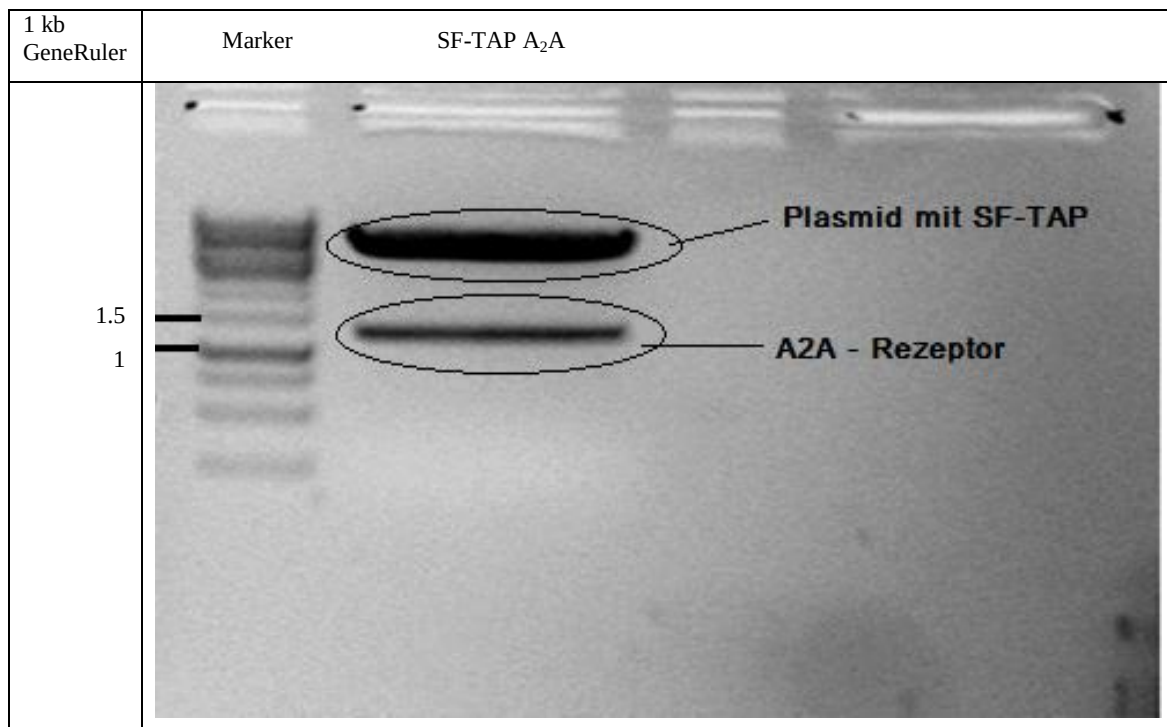


Abb. 10: Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung des Plasmids mit SF-TAP von A₂A-Rezeptor

Das nun isolierte Plasmidfragment wird mit V₂R und V₂L219R enzymatisch verknüpft und in Bakterien auf Agarplatten vermehrt. Es wurden jeweils fünf verschiedene Bakterienkolonien entnommen und in größere Volumen vermehrt und anschließend lysiert. Das Plasmid wurde isoliert. Als Kontrolle für die positive Ligation wurde ein Kontrollverdau durchgeführt. Dabei wurden Plasmid und Rezeptor voneinander getrennt und die Probenlösungen auf Agarose Gel aufgetragen. Bei erfolgreicher Ligation sollen nach der Gelauf-trennung zu jeder Probe zwei Banden zu erkennen sein. Die erste, größere Bande stellt das Plasmidfragment dar, die zweite den Rezeptor. In Abb. 11 ist zu erkennen, dass alle zehn Proben positiv waren. Es wurden 950 µl der Proben 4 und 5 (SF-TAP V₂R) und die Proben 8 und 9 (SF-TAP V₂L219R) mit 450 µl Glyzerin versetzt und bei -80°C für die weitere Verwendung gelagert. Die isolierten Plasmide dieser Proben wurden zur Sequenzierung geschickt.

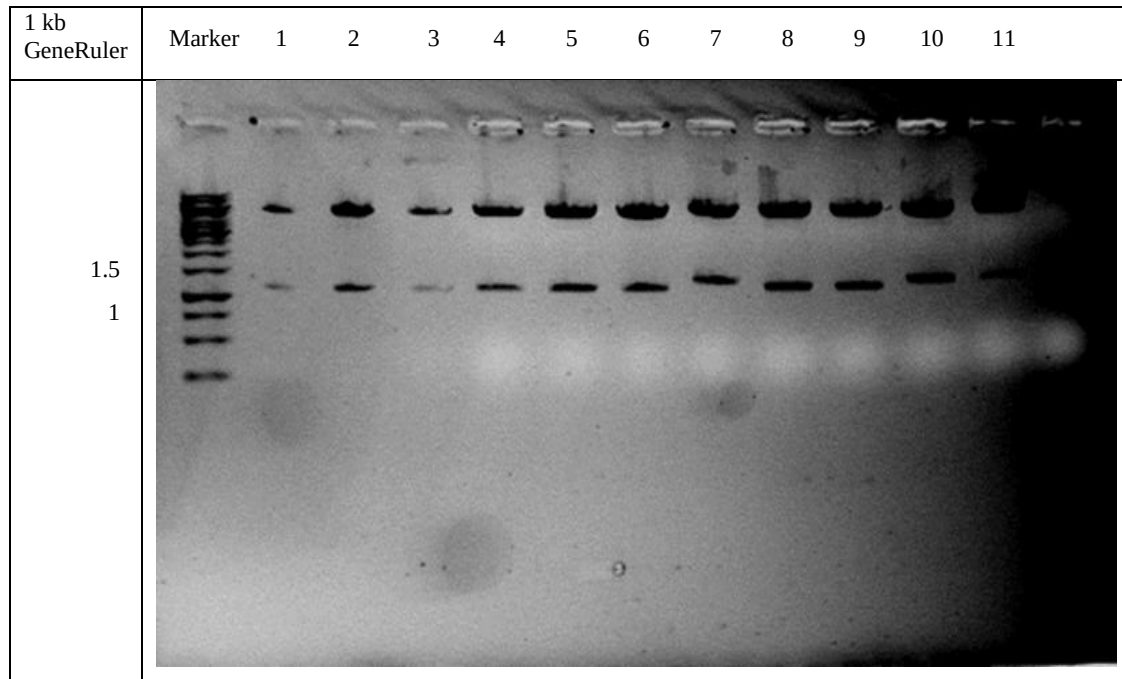


Abb. 11: Agarose-Gelelektrophorese zu SF-TAP V₂R und SF-TAP V₂L219R 1 – 5: SF-TAP V₂R ; 6 – 10: SF-TAP V₂L219R ; 11: SF-TAP A₂A als Postivkontrolle

4.2 Plasmidgewinnung

Um HEK-293 Zellen mit einem bestimmten Plasmid zu transifizieren, war es nötig das entsprechende Plasmid zu vermehren. Dazu wurden E.coli verwendet. Die Bakterien wurden wie in Kapitel 3.4.6 angewachsen, lysiert und das Plasmid isoliert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe von Implen Nanophotometer. Diese Werte sind in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: DNA – Konzentrationen zu Plasmidgewinnung

Plasmid	Konzentration (µg/µl)	Standardabweichung	Datum
V _{1b} R - gfp	0.465	0.06	11.11.11
NFAT	0.822	0.04	08.12.11
V _{1b} R - gfp	0.319	0.004	08.12.11
SF-TAP - V ₂ R (1)	1.120	0.01	13.01.12
SF-TAP - V ₂ R (2)	1.025	0.06	13.01.12
SF-TAP - V ₂ L219R	0.840	0.003	13.01.12
V ₂ R - FLAG	1.436	0.325	17.05.12

„XL2 blue chemical competent“ – E.coli wurden mit den Plasmiden transformiert, lysiert und das Plasmid wie beschrieben isoliert. Die resultierende Plasmidkonzentration wurde mit Implen NanoPhotometer LP 0.2 mm, factor 50 bestimmt.

4.3 Zellmembranisolierung

Um Rezeptorbindungsexperimente durchzuführen war es nötig Zellmembranen mit dem entsprechenden Rezeptor zu gewinnen. Die Zellen wurden in 15 cm Platten kultiviert und bei einer Konfluenz von 80 – 90%. Die Zellmembranen wurden isoliert und mittels Bicinchoninicsäure Assay wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Die daraus resultierenden Daten sind in Tab. 10 angeführt.

Tab. 10: Proteinkonzentrationen isolierter Zellmembranen

Rezeptor_Klon_Datum	Konz. (µg/µl)	Absorption (Mittelwert)	SD	Gleichung der Eichgerade	R ²
V _{lb} -gfp_111003 (transient)	2.73	0.282	0.117	y=0.0007x-0.023	0.9875
V _{lb} -gfp_111031 (transient)	1.61	0.159	0.018	y=0.0006x+0.005	0.997
V _{lb} -gfp_111118 (transient)	3.57	0.514	0.05	y=0.0006x+0.0001	0.991
V _{lb} -gfp_111206 (transient)	1.97	0.473	0.12	y=0.0006x+0.0003	0.9981
V _{lb} -gfp_1a_120111	1.33	0.295	0.07	y=0.0006x-0.0231	0.9967
V _{lb} -gfp_2a_120111	1.40	0.313	0.07	y=0.0006x-0.0231	0.9967
V _{lb} -gfp_3a_120111	1.00	0.216	0.01	y=0.0006x-0.0231	0.9967
V _{lb} -gfp_3a_120124 (1)	1.81	0.181	0.03	y=0.0006x+0.0071	0.9976
V _{lb} -gfp_3a_120124 (2)	2.56	0.253	0.22	y=0.0006x+0.0071	0.9976
V _{lb} -gfp_3a_120207 (1)	8.55	0.709	0.07	y=0.0005x+0.0247	0.9968
V _{lb} -gfp_3a_120207 (2)	8.90	0.736	0.13	y=0.0005x+0.0247	0.9968
V _{lb} -gfp_3a_120207 (3)	5.90	0.499	0.06	y=0.0005x+0.0247	0.9968
SF-TAP V ₂ R (transient)	2.80	0.250	0.04	y=0.0005x+0.0247	0.9968
SF-TAP V ₂ L219R (transient)	4.30	0.365	0.10	y=0.0005x+0.0247	0.9968
SF-TAP V ₂ L219R_4	4.67	0.692	0.12	y=0.0006x+0.0186	0.9977
SF-TAP V ₂ L219R_6	3.45	0.516	0.03	y=0.0006x+0.0186	0.9977
SF-TAP V ₂ R_B	2.67	0.403	0.05	y=0.0006x+0.0186	0.9977
SF-TAP V ₂ R_C	0.72	0.122	0.02	y=0.0006x+0.0186	0.9977
SF-TAP V ₂ R_D	2.79	0.421	0.07	y=0.0006x+0.0186	0.9977
SF-TAP V ₂ R_E	2.21	0.337	0.02	y=0.0006x+0.0186	0.9977
SF-TAP V ₂ R_H	4.51	0.669	0.07	y=0.0006x+0.0186	0.9977

Zellmembranen wurden wie in Kapitel Material und Methoden beschrieben geerntet und die Proteinkonzentration mittels Bicinchoninic Acid Assay (BCA) bestimmt.

4.4 Rezeptor-Bindungs-Versuche

4.4.1 Rezeptorbindungsexperimente zum Testen von transient und stabil transfizierten Zelllinien

HEK-293 Zellen wurden mit V_{1b}R transfiziert und wie in Kapitel 3.1.6 beschrieben mehrere stabile Zellkolonien kultiviert. Die Zellmembranen wurden geerntet und die Anwesenheit des Rezeptors anhand eines Rezeptorbindungsversuches überprüft. Dabei wurden die Zellmembranen einmal ausschließlich mit 0.5 nM bzw. 5 nM [³H]-AVP und einmal mit radioaktiven Ligand inklusive 1 µM AVP inkubiert. Wie in Abb. 12 zu erkennen ist, sind alle drei getesteten Zelllinien positiv. Abb. 12a zeigt den Rezeptorbindungsversuch mit 0.5 nM und Abb. 12b den Versuch mit 5 nM [³H]-AVP. Die Inkubation der Zellmembransuspension mit [³H]-AVP alleine zeigt die totale Bindung, an Rezeptor sowohl an unspezifischen Bindungsstellen. Da AVP im Überschuss vorliegt und die Affinität von AVP zum Rezeptor größer ist als zu unspezifischen Stellen, wird der radioaktiv markierte Ligand ausschließlich von dem Rezeptor verdrängt und somit bei Anwesenheit des Rezeptors weniger Radioaktivität gemessen. Die noch erhaltene radioaktive Messung stellt daher die unspezifische Bindung dar. Den spezifischen Wert erhält man aus der Differenz zwischen totaler Bindung und unspezifischer Bindung. Die Ergebnisse wurden mit GraphPad-Prism (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA) ausgewertet. Alle Messungen wurden in Duplikaten durchgeführt und die Werte als Mittelwert ± SEM dargestellt.

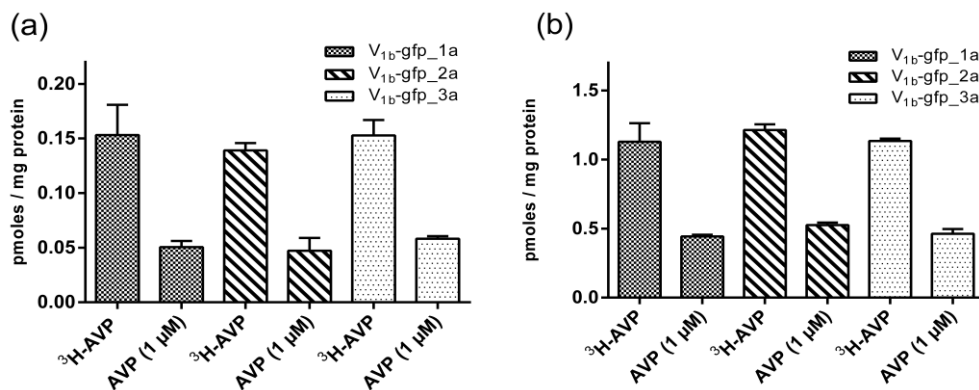


Abb. 12: Rezeptorbindungsversuch an V_{1b}R Zellmembranen aus drei verschiedenen Zelllinien, welche den V_{1b}R exprimieren wurden getestet. Verschiedene Balken repräsentieren verschiedene Zelllinien. ³H-AVP stellt die totale Bindung des nativen Liganden dar, AVP (1µM) die nichtspezifische Bindung. (a) Versuch mit 0.5 nM radioaktiv markierter Ligand (b) Versuch mit 5 nM radioaktiv markierter Ligand. Werte sind dargestellt als Mittelwert ± SEM

Abb. 13 zeigt einen Rezeptorbindungsversuch mit transient transfizierten und Abb. 13b den Versuch mit stabil transfizierten Zellen mit SF-TAP V₂R und SF-TAP V₂L219R. Aus den Grafiken ist zu erkennen, dass nur Zellmembranen mit SF-TAP V₂R positiv waren, da AVP den radioaktiv markierten Liganden aus dem Rezeptor verdrängen konnte und somit die Radioaktivität verringert wurde. Bei SF-TAP V₂L219R sind spezifische und nichtspezifische Bindung gleich, da kein Rezeptor exprimiert wurde und nur unspezifische Bindungsstellen besetzt waren. Wie in Abb. 13b zu sehen ist, weisen die Klone B, D und H (alle SF-TAP V₂R) die Anwesenheit des Rezeptors auf, während die Klone C und E (SF-TAP V₂R) und die Klone 4 und 6 (SF-TAP V₂L219R) ein negatives Ergebnis lieferten. Weiteres ist zu sehen, dass drei Balken hohe Messwerte (7500 – 13000 cpm) aufweisen. Dieses Phänomen war zu beobachten, da einerseits eine hohe Konzentration radioaktiv markierter Ligand und andererseits hohe Konzentration an Zellmembransuspension verwendet wurden. Dies beeinflusst das Ergebnis des Experimentes nicht, jedoch ist die Verwendung einer so hohen Konzentration an radioaktiv markierten Substanzen einerseits umweltschädlich und andererseits kostspielig.

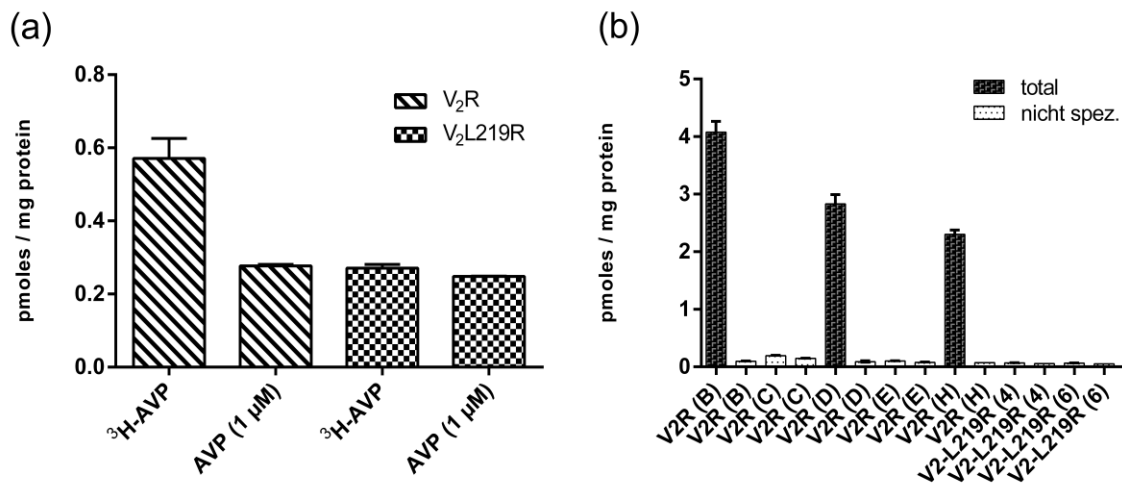


Abb. 13: Rezeptorbindungsversuch an Zelllinien mit SF-TAP V₂R und SF-TAP V₂L219R (a) Membransuspensionen von transient transfizierten Zellen wurden mit 2.5 nM ³H-AVP und 1 μM AVP inkubiert. Gestreifte Balken stellen den Versuch mit SF-TAP-V₂R dar, karierte Balken den Versuch mit SF-TAP-V₂L219R. ³H-AVP repräsentiert die totale Bindung, AVP die unspezifische Bindung (b) Fünf verschiedene Zelllinien mit exprimierten SF-TAP V₂R und zwei Zelllinien mit SF-TAP V₂L219R wurden auf die Anwesenheit des Rezeptors getestet. Die Zellmembransuspensionen wurden mit 2 nM ³H-AVP und 1 μM AVP eine Stunde inkubiert. Dunkle Balken repräsentieren die totale Bindung, helle Balken die unspezifische Bindung. Die Differenz beider stellt die spezifische Bindung von AVP am Rezeptor dar. Werte sind dargestellt als Mittelwert ± SEM

4.4.2 Sättigungsexperimente

Rezeptorsättigungsexperimente werden durchgeführt, um die maximale spezifische Bindung ($B_{\max}$) und die Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_d) zu ermitteln.

Da $V_{1b}R$ exprimierende Zellen nicht zur Verfügung standen, mussten diese im Laufe dieser Arbeit vorbereitet werden. Das Plasmid wurde in *E.coli* vermehrt, isoliert und für die Transfektion von HEK-293 Zellen herangezogen. Zur Durchführung von Rezeptorbindungsversuche wurden die Zellmembranen inklusive Rezeptor geerntet und dessen Konzentration mittels BCA bestimmt. In Abb. 15a ist das Experiment mit transient transfizierten und in Abb. 15b das Experiment mit einer stabilen Zelllinie dargestellt. Die Zellmembransuspensionen wurden mit mehreren Konzentrationen 3H -AVP (0.01 nM, 0.03 nM, 0.1 nM, 0.3 nM, 1 nM, 3 nM und 10 nM) inkubiert. Zur Ermittlung der nichtspezifischen Bindung wurde 1 μ M AVP verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism.

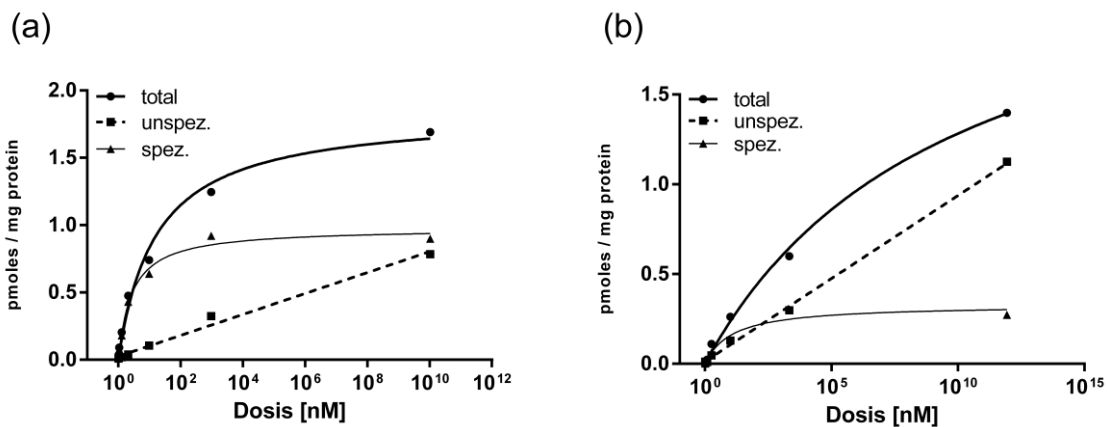


Abb. 14: Rezeptorsättigungsexperiment an $V_{1b}R$ Membransuspensionen wurden mit sieben Konzentrationen 3H -AVP und 1 μ M AVP inkubiert. Die Differenz aus totaler Bindung und nichtspezifischer Bindung stellt die spezifische Bindung dar. (a) Sättigungsexperiment an einer transient transfizierten Zelllinie (b) Sättigungsexperiment an einer stabil transfizierten Zelllinie

In Abb. 14b ist anhand der ziemlich hohen Werte der nicht spezifischen Bindung zu erkennen, dass die Expressionsrate dieser Zelllinie gering ist. Mithilfe der durch das Experiment abzulesenden maximalen spezifischen Bindung lässt sich die Rezeptordichte anhand der angeführten Formel berechnen. Daraus ergibt sich eine Rezeptordichte von 0.98 pmoles / mg Protein bei den transienten Zellen (Abb. 15a) und 0.33 pmoles / mg Protein bei der stabilen Zelllinie (Abb. 15b). Es ist sowohl graphisch als auch rechnerisch zu erkennen, dass die Expressionsrate bei den transienten Zellen im Vergleich zu der stabilen Zelllinie um das Zwei- bis Dreifache erhöht ist.

Tab. 11: Experimentdaten der Sättigungsexperimente

	Transiente Zellen	Stabile Zelllinie
Eingesetzte Membrankonz.	30 μM	50 μM
B_{max}	1997 cpm	1119 cpm
K_d	0.44 nM	1.09 nM
Rezeptordichte	0.98 pmoles/mg Protein	0.33 pmoles/mg Protein

4.4.3 Konkurrenzexperiment

Dosis-Bindungskurven zu $V_{1a}R$, $V_{2}R$, OTR mit w24, w55 und w56 wurden bereits von Huang Xiang durchgeführt. In der folgenden Arbeit wurde die Bindungsfähigkeit dieser Peptide auf $V_{1b}R$ zuerst anhand eines Konkurrenzversuches mit zwei verschiedenen Konzentrationen (1 μM und 10 μM) getestet. Wie in Abb. 15 zu erkennen ist binden alle drei Peptide mit fast gleicher Affinität wie der natürliche Ligand AVP an dem Rezeptor. w55 zeigt bei 1 μM im Vergleich zu den anderen Peptiden eine schlechtere Bindung.

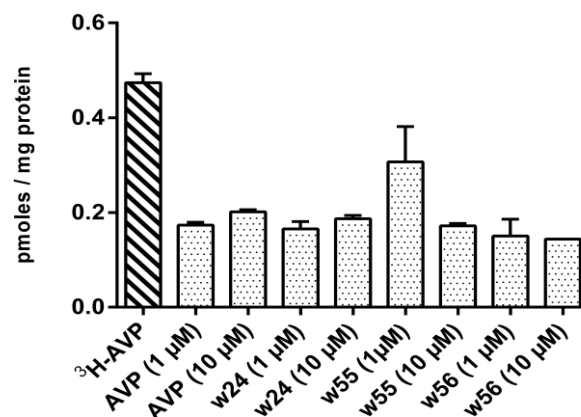


Abb. 15: Verdrängungsfähigkeit von ^3H -AVP aus $V_{1b}R$ durch w24, w55, w56 Membranen wurden mit 1 nM ^3H -AVP und 1 μM bzw. 10 μM AVP, w24, w55 oder w56 eine Stunde inkubiert und die Radioaktivität vom noch verbleibenden ^3H -AVP gemessen. Gestreifter Balken repräsentiert die totale Bindung durch ^3H -AVP. Werte sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM.

4.4.4 Dosis-Bindungskurve an $V_{1b}R$

Da das Konkurrenzexperiment mit jeweils zwei Konzentrationen aus w24, w55 und w56 ein positives Ergebnis zeigte, wurden mehrere Konzentrationen der Peptide getestet. Aus der resultierenden Dosis-Bindungskurve ergibt sich die mittlere inhibitorische Konzentra-

tion der Liganden (IC_{50}). Der IC_{50} Wert gibt jene Konzentration an, die nötig ist um 50% der radioaktiven Bindung zu inhibieren. Die Zellmembranen einer stabilen Zelllinie mit exprimierten $V_{1b}R$ wurden, wie in Kapitel 3.1.7 beschrieben, geerntet und die Zellmembransuspension mit 1 nM 3H -AVP und 0.3 nM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM und 10000 nM w24 und w55 bzw. 3000 nM bei w55 inkubiert. Die Werte wurden auf 100% des höchst gemessenen Wertes normalisiert und mit GraphPad Prism die IC_{50} Werte und die Kurvensteigungen berechnet, indem die Daten mit einer nichtlinearen sigmoidalen Dosis Kurve (log(inhibitor) vs. Response - Variable slope) ausgewertet wurden.

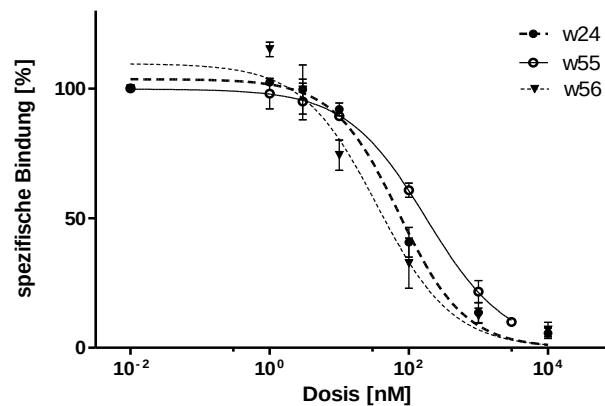


Abb. 16: Dosis-Bindungskurve an $V_{1b}R$ Membransuspension von Zellen mit $V_{1b}R$ wurde mit 1 nM 3H -AVP und sieben Konzentrationen w24, w55, w56 eine Stunde inkubiert. Werte sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Dissoziationskonstante (K_i) kann nach zwei verschiedenen Methoden ausgerechnet werden. Einerseits wurde die Berechnung mittels GraphPad Prism nach folgender Formel berechnet:

$$\log EC_{50} = \log (10^{\log K_i} * (1 + \text{RadioligandnM} / \text{HotK_dnM}))$$

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{(X - \log EC_{50})})$$

Wobei RadioligandnM die eingesetzte Konzentration (in nM) des radioaktiv markierten AVP und HotK_dnM die Dissoziationsgleichgewichtskonstante (K_d) aus den Rezeptorsättigungsexperimenten darstellen. Andererseits kann K_i nach Cheng-Prusoff mit der folgenden Gleichung berechnet werden, wobei A^* die eingesetzte Konzentration des radioaktiv markierten AVP ist:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{A^*}{K_d}}$$

Neben IC_{50} und K_i stellt weiters der Selektivitätsindex (SI) einen wichtigen Parameter dar. SI lässt sich berechnen aus dem Quotienten der Affinität der Peptide zu $V_{1a}R$, $V_{1b}R$, OTR und V_2R und beschreibt somit die Selektivität der Peptide zu V_2R . Je größer SI von 1 ist, umso selektiver ist das Peptid. Die ausgerechneten IC_{50} und K_i Werte und der Selektivitätsindex (SI) zu $V_{1a}R$, $V_{1b}R$, V_2R und OTR sind in Tab. 12 zusammengefasst.

Tab. 12: Rezeptorbindungseigenschaften von w24, w55, w56 an AVP / OT Rezeptoren

Rezeptorbindung am humanen V_2 – Rezeptor				
Peptid	IC_{50} (nM)	K_i^1 (nM)	K_i^2 (nM)	SI V_2R/V_2R
AVP	2.559	0.86	0.84	1
w24	63.4 ± 24.07	44.93 ± 16.69	19.16 ± 5.6	1
w55	23.7 ± 5.65	16.98 ± 3.9	6.48 ± 1.6	1
w56	7.2 ± 1.48	5.19 ± 1.03	2.07 ± 0.47	1
Rezeptorbindung am humanen V_{1a} – Rezeptor				
Peptid	IC_{50} (nM)	K_i^1 (nM)	K_i^2 (nM)	SI $V_2R/V_{1a}R$
w24	19858.5 ± 2752.5	10048.84 ± 718.30	< 30000	1.29
w55	8879.0 ± 1782.0	4597.31 ± 1217.78	< 30000	1.60
w56	742.4 ± 88.35	382.27 ± 70.84	346.5 ± 67.5	1.35
Rezeptorbindung am humanen V_{1b} – Rezeptor				
Peptid	IC_{50} (nM)	K_i^1 (nM)	K_i^2 (nM)	SI $V_2R/V_{1b}R$
w24	87.8 ± 20.35	6.18 ± 1.58	34.0 ± 4.8	1.04
w55	220.2 ± 33.23	14.72 ± 3.26	96.34 ± 17.8	1.15
w56	39.9 ± 15.34	2.53 ± 0.91	15.95 ± 5.65	1.10
Rezeptorbindung am humanen OT – Rezeptor				
Peptid	IC_{50} (nM)	K_i^1 (nM)	K_i^2 (nM)	SI V_2R/OTR
w24	8814.0 ± 30	4561.09 ± 63.12	6428.5 ± 2347.5	1.22
w55	11052.0 ± 1942.0	5700.93 ± 906.19	961.9 ± 438.1	1.34
w56	1375 ± 70.00	712.04 ± 48.48	709.1 ± 48.4	1.42

Daten zu $V_{1a}R$, V_2R und OTR wurden von Huang Xiang ermittelt. Daten sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM aus zwei bis vier unabhängigen Experimenten; K_i^1 : berechnet nach Cheng-Prusoff; K_i^2 : berechnet mit Graph-Pad Prism

4.5 G-Protein Aktivierung

4.5.1 Zyklase Assay

V_2R gehört zur Familie der G_s - gekoppelten Rezeptoren. Bei Aktivierung von G_s - gekoppelten Rezeptoren wird die Adenylatcyclase aktiviert, worauf letztendlich die cAMP

Konzentration in der Zelle steigt. Die Zellen wurden über Nacht mit ^3H -Adenin inkubiert und am nächsten Tag mit w24, w55 und w56 behandelt. Da ^3H -Adenin für die Synthese von cAMP verwendet wurde, war das entstandene cAMP radioaktiv markiert. cAMP wurde auf Dowex Säulen aufgetragen und dann eluiert. Die Radioaktivität wurde anschließend mit einem beta-Counter gemessen. Trotz mehrerer Versuche war das Experiment nicht erfolgreich. Daher wurde die Aktivierung auf $V_2\text{R}$ mithilfe des Luciferase Assays getestet. Im Gegensatz zu $V_{1a}\text{R}$, $V_{1b}\text{R}$ und OTR, welche zu den G_q -gekoppelten Rezeptoren gehören, werden Zellen mit $V_2\text{R}$ nicht mit NFAT sondern mit CRE transfiziert. Im folgenden Kapitel werden Aktivierungsexperimente an $V_{1a}\text{R}$, $V_{1b}\text{R}$, $V_2\text{R}$ und OTR dargestellt.

4.5.2 Luciferase Assay

Für die Bestimmung der Aktivierung von $V_{1a}\text{R}$, $V_{1b}\text{R}$, $V_2\text{R}$ und OTR durch w24, w55 und w56 wurden Luciferase Assays durchgeführt. Die Zellen wurden wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben mit einem Reporter Gen kotransfiziert und 18 h mit w24, w55 und w56 inkubiert. Natives AVP bzw. OT wurden als Positivkontrolle ebenfalls getestet. Die eingesetzten Konzentrationen lagen zwischen 0.03 nM und 10 μM . In Abb. 17 sind die resultierenden Dosis-Wirkungskurven dargestellt. Alle Werte wurden in Triplikaten durchgeführt. Da sich nicht überall die gleiche Anzahl an Zellen befindet wurden die erhaltenen Luciferase Werte an die GFP-Werte angepasst. Der Mittelwert der höchsten Konzentration der Kontrolle wurde 100% gesetzt. Alle anderen Werte wurden danach normalisiert. EC_{50} Werte und Kurvensteigungen wurden unter Verwendung von GraphPad Prism ausgerechnet, indem die Werte mit einer nichtlinearen sigmoidalen Kurve (nonlinear fit - log(agonist) vs. response – Variable slope (four parameters)) ausgewertet wurden.

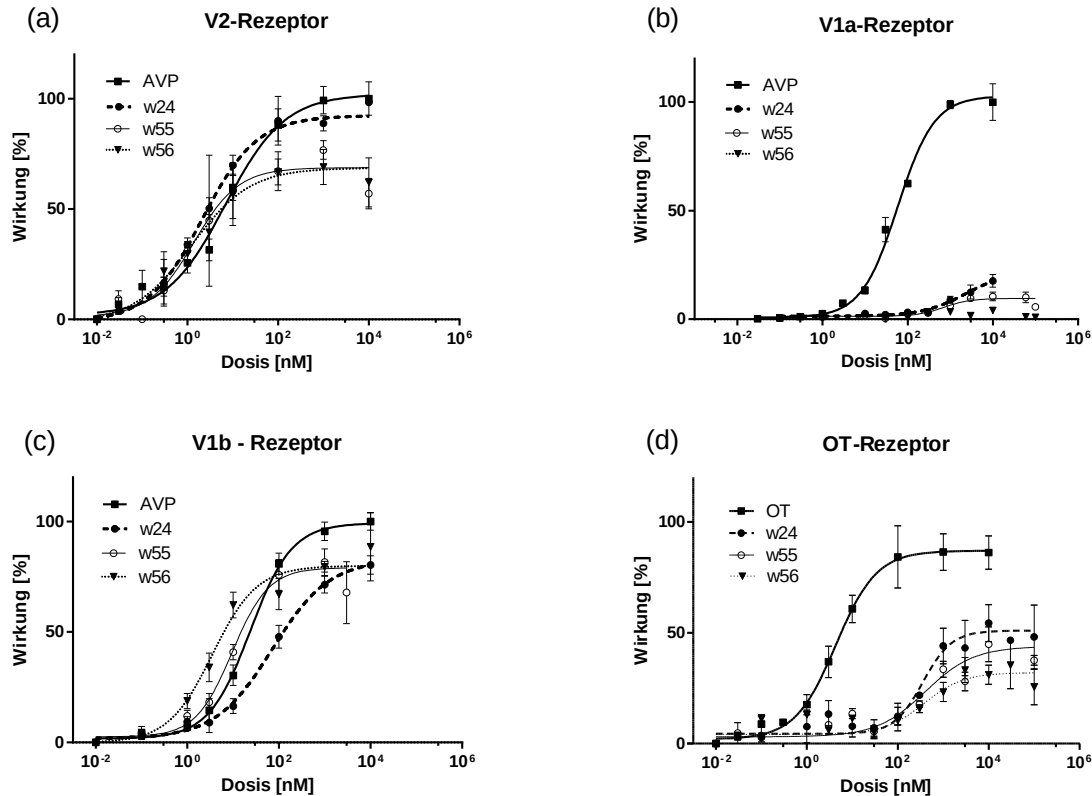


Abb. 17: Dosis-Wirkungskurven an $V_{1a}R$, $V_{1b}R$, V_2R und OTR $V_{1a}R$, $V_{1b}R$, V_2R und OTR exprimierende Zellen wurden mit NFAT bzw. CRE Reporter Gen transfiziert und 18 h mit sieben bis acht Konzentrationen von AVP, w24, w55 und w56 bei 37°C inkubiert. Werte sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM aus drei bis vier unabhängigen Experimenten.

Wie in Abb. 17 zu sehen ist, verursachen die Peptide keine oder nur bei hohen Konzentration eine Aktivierung von $V_{1a}R$ und OTR . w55 und w56 weisen bei V_2R die Eigenschaften eines Partialagonisten auf, da sie nur zu einer teilweisen Aktivierung des Rezeptors führen. w24 hingegen erreicht fast 90 % der höchstmöglichen Aktivierung. $V_{1b}R$ kann durch die drei Peptide gut aktiviert werden. Eine Zusammenfassung der resultierenden EC_{50} Werte, Kurvensteigungen und Ergebnisse des errechneten maximalen Effekts (E_{max}) ist in Tab. 13 zu finden.

Tab. 13: Rezeptoraktivierung durch AVP / OT und w24, w55, w56

Aktivierung am humanen V₂ – Rezeptor				
Peptid	EC₅₀ (nM)	E_{max} (%)	Hill^a	SI V₂R/V₂R
AVP	8.93 ± 1.75	100	0.9 ± 0.06	1
w24	2.17 ± 0.05	90.4	0.84 ± 0.13	1
w55	1.60 ± 0.17	67.3	1.01 ± 0.13	1
w56	1.91 ± 0.32	67.2	0.84 ± 0.06	1
Aktivierung am humanen V_{1a} – Rezeptor				
Peptid	EC₅₀ (nM)	E_{max} (%)	Hill^a	SI V₂R/V_{1a}R
AVP	71.28 ± 2.42	100	1.01 ± 0.13	1.13
w24	1249.75 ± 103.57	21.8	1.12 ± 0.31	1.47
w55	654.43 ± 114.1	9.3	0.83 ± 0.15	1.42
w56	keine Aktivierung	---	---	---
Aktivierung am humanen V_{1b} – Rezeptor				
Peptid	EC₅₀ (nM)	E_{max} (%)	Hill^a	SI V₂R/V_{1b}R
AVP	23.49 ± 2.58	100	1.05 ± 0.2	1.06
w24	73.47 ± 0.88	83.4	0.74 ± 0.13	1.21
w55	9.66 ± 0.47	79.7	0.96 ± 0.06	1.10
w56	3.48 ± 0.09	80.6	1.04 ± 0.1	1.03
Aktivierung am humanen OT – Rezeptor				
Peptid	EC₅₀ (nM)	E_{max} (%)	Hill^a	SI V₂R/OTR
OT	3.96 ± 0.3	100	1.08 ± 0.21	1.20*
w24	462.05 ± 15.25	58.6	1.19 ± 0.39	1.37
w55	420.83 ± 63.27	50.4	0.87 ± 0.2	1.38
w56	435.07 ± 59.1	36.8	1.21 ± 0.17	1.37

Werte wurden berechnet aus Mittelwert ± SEM von drei bis vier unabhängigen Experimenten, *: SI berechnet für AVP am OTR

Basierend auf die Ergebnisse der Bindungs- und Aktivierungsexperimente (siehe Tab. 12 und Tab. 13) zeigen die drei Peptide hinsichtlich V₂R sowohl gute Bindungs- als auch Aktivierungseigenschaften. w24 (K_i = 19.16 nM, EC₅₀ = 2.17 nM), w55 (K_i = 6.48 nM, EC₅₀ = 1.60 nM) und w56 (K_i = 2.07 nM, EC₅₀ = 1.91 nM) weisen im Vergleich zu AVP (K_i = 0.84 nM, EC₅₀ = 8.93 nM) zwar eine niedrigere Affinität, jedoch eine bessere Rezeptoraktivierung auf. Der maximale Effekt wird allerdings auch bei einer Konzentration von 10 µM vor allem bei w55 (E_{max} = 67.3%) und w56 (E_{max} = 67.2%) nicht erreicht, woraus zu schließen ist, dass es sich hierbei um partielle Agonisten handelt. Im Gegensatz hierzu werden V_{1a}R und OTR sehr schwach oder gar nicht aktiviert.

4.6 Ergebnisse zu FACS-Untersuchungen

Wie in Kapitel 4.4.4 und Kapitel 4.5.2 zu sehen ist, zeigen die Peptide w24, w55 und w56 hinsichtlich Bindung und Aktivierung eine Selektivität zu V₂R. Der nächste Schritt war es eine therapeutisch einsetzbare Wirkung dieser Liganden zu finden. Es wird im Folgenden untersucht, ob die Agonisten die Faltung des mutierten Rezeptors (V₂L219 - Rezeptor) im ER fördern und ihn somit an die Zelloberfläche verhelfen. Solche Liganden werden als pharmakologische Faltungshelfer oder Pharmako-Chaperone bezeichnet. Zum anderen wird die Internalisierung des V₂Rs nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit den Liganden untersucht. In Kapitel 3.3.2 und Kapitel 3.3.3 werden die Ergebnisse dazu dargestellt. Beide Experimente basieren auf die Messung des Rezeptoranteils auf der Zelloberfläche. Da es sich um fluoreszenzmarkierte Rezeptoren handelt, kann die Intensität der Fluoreszenz und somit der Anteil der Rezeptoren direkt mit FACS bestimmt werden.

4.6.1 Pharmako-Chaperone

Im Folgenden wird untersucht, ob w24, w55 und w56 den falsch gefalteten V₂L219 – Rezeptor an die Zelloberfläche verhelfen können. HEK-293 Zellen wurden mit V₂R und V₂L219R transient transfiziert. Um sicher zu stellen, dass der Rezeptor beim Wildtyp (V₂R) an der Oberfläche exprimiert wird, wurde eine Fluoreszenzmikroskopieaufnahme durchgeführt. Wie in Abb. 18 zu sehen ist, befindet sich der Rezeptor sowie extra- als auch intrazellulär.

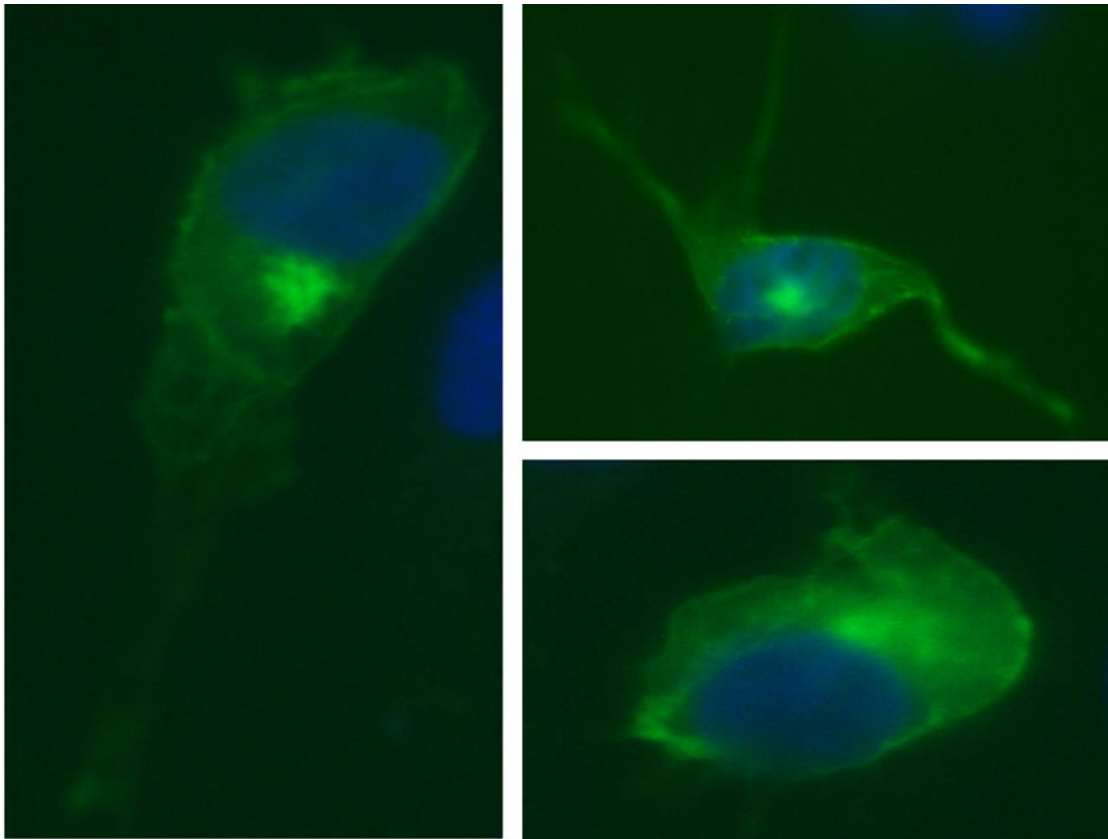


Abb. 18: Fluoreszenzmikroskopie zu V₂R mit Grün Fluoreszierendem Protein (GFP) Aufnahme durchgeführt von Mag. Mattias Spork. DNA im Zellkern wurde mit DAPI angefärbt (blau). V₂R ist intra-, sowie extrazellulär zu erkennen (grün)

Der nächste Schritt war es die transfizierten Zellen mit 10 nM, 100 nM, 300 nM und 1000 nM OPC, w24, w55 und w56 bei 37°C für eine Zeitdauer von 24 h zu inkubieren. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mit V₂R und V₂L219R gemessen. Eine eindeutige Positivkontrolle stellt die Temperaturumstellung auf 28°C statt 37°C dar. Da OPC (Tolvaptan), ein V₂ – Rezeptorantagonist, die Eigenschaft als Pharmako-Chaperone bei vielen Mutationen des V₂R bewies⁵¹, wurde dessen Wirkung ebenfalls an dieser Mutante getestet. Aus dem Grund, dass OPC nur in DMSO löslich ist, wurde ebenfalls eine Blindprobe mit DMSO durchgeführt. Der resultierende Wert wurde von allen Behandlungen mit OPC abgezogen. Alle Werte wurden in Duplikate durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Zellen suspendiert, mit PBS gewaschen und die Fluoreszenz des GFPs mit FACS gemessen. Die Fluoreszenz der unbehandelten Zellen wurde jeweils auf 1 gesetzt, alle anderen Werte relativ dazu. Wie in Abb. 19 zu sehen ist, zeigen weder OPC noch die Testpeptide w24, w55 und w56 einen positiven Effekt hinsichtlich Rezeptortransports zur Plasmamembran. Abb. 20 zeigt den Unterschied der Fluoreszenzstärke zwischen V₂R und V₂L219R. Es ist zu erkennen, dass der Rezeptor bei V₂R im Vergleich zu V₂L219R, da er

zum Großteil an der Oberfläche lokalisiert ist, ein stärkeres Signal zeigt. Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism.

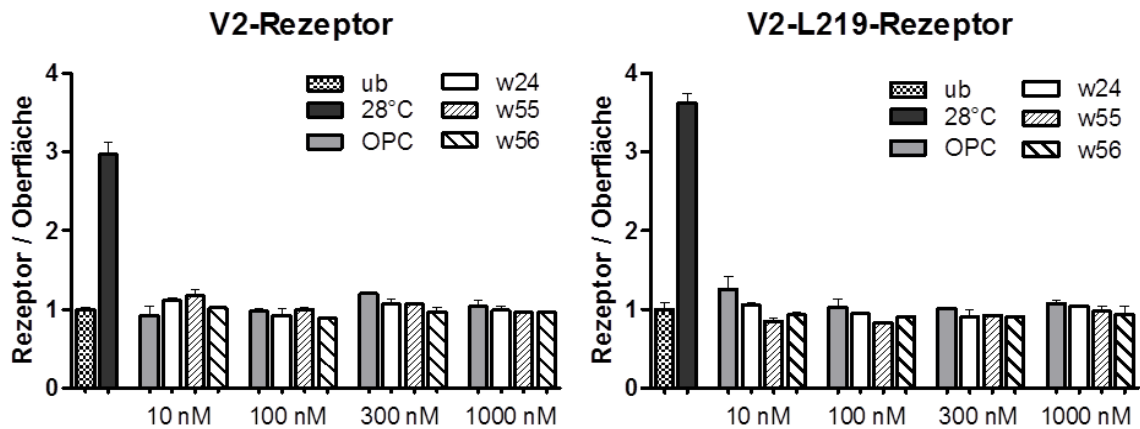


Abb. 19: Pharmakologische Wirkung als Pharmako-Chaperone von OPC, w24, w55 und w56
Zellen mit exprimierten V₂R bzw. V₂L219 R wurden mit 10 nM, 100 nM, 300 nM und 1000 nM OPC, w24, w55 und w56 bei 37°C 24 h inkubiert. Als Positivkontrolle diente die Temperaturumstellung auf 28°C statt 37°C. Alle Bemessungen wurden in Duplikate durchgeführt. Werte sind dargestellt als Mittelwert ± SEM.

Abb. 20 zeigt den tatsächlichen Unterschied der Fluoreszenzstärke und somit den Unterschied des Rezeptoranteils auf der Zelloberfläche von V₂R und V₂L219R exprimierenden Zellen. Es ist zu erkennen, dass die Expression des Rezeptors an der Zelloberfläche bei der Mutante um das 5-Fache vermindert ist. Eine Temperaturumstellung bewirkt bei beiden Rezeptortypen ein erhöhter Transport des Rezeptors zur Oberfläche.

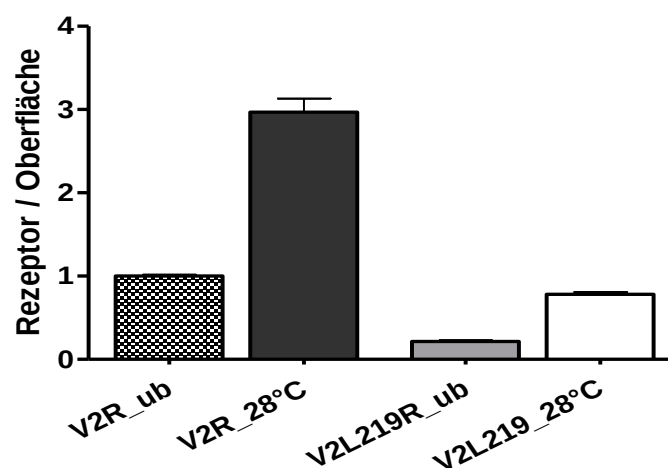


Abb. 20: Unterschied des Rezeptoranteils auf die Zelloberfläche zwischen V₂R und V₂L219R
Für die Darstellung des Unterschiedes der Fluoreszenz zwischen V₂R und V₂L219R wurden beide Zelllinien miteinander verglichen. Der Wert der unbehandelten V₂R Zellen wurde auf 1 gesetzt. Die Mutante sowohl auch die Behandlung beider Zelllinien bei 28°C wurde relativ dazu gesetzt.

4.6.2 Ergebnisse zu Efflux

Wie in Kapitel 4.6.1 zu sehen ist, weisen die Peptide keine Wirkung eines Pharmako-Chaperones auf. Es war jedoch unklar, ob dieser Effekt durch ein unausführbares Eindringen der Plasmamembran verhindert wurde oder ob die Peptide die Fähigkeit einen falsch gefalteten Rezeptor zur richtigen Faltung zu verhelfen nicht besitzen. Demnach wurden HEK-293 Zellen bei verschiedenen pH-Werten (pH=6; pH=7.4) mit einem Fluorescein-markiertem Nonapeptid inkubiert. Die verschiedenen eingesetzten pH-Werte sollten die Ladung des Peptids verändern, so dass das Eindringen der Plasmamembran möglicherweise erleichtert wird. Die Inkubation erfolgte mit 1 μ M Peptid 30 min bei 37°C. Um an der Membran gebundenes Peptid zu entfernen wurden jeweils bei jedem pH-Wert die Zellen mit 100% FCS einmal bei 0°C und einmal bei 37°C gewaschen. In Tab. 14a wird die Sequenz des Nonapeptids dargestellt. Wie in Tab. 14b zu sehen ist, sinkt die Fluoreszenz der gewaschenen Zellen im Gegensatz zu den ungewaschenen Zellen beinahe auf Niveau der unbehandelten HEK-293 Zellen, was ein Hinweis darauf gibt, dass das Peptid zum Großteil an der Plasmamembran gebunden ist und sie nicht durchdringt. Eine weitere Vermutung war, dass eingedrungenes Peptid sofort von Proteasen angegriffen und abgebaut werden könnte. In diesem Fall müsste ein Absinken der Fluoreszenz während der Messung beobachtet werden, was bei diesem Experiment ebenfalls nicht zu erkennen war.

Tab. 14: Plasmamembranpermeation eines Fluorescein-markierten Nonapeptids

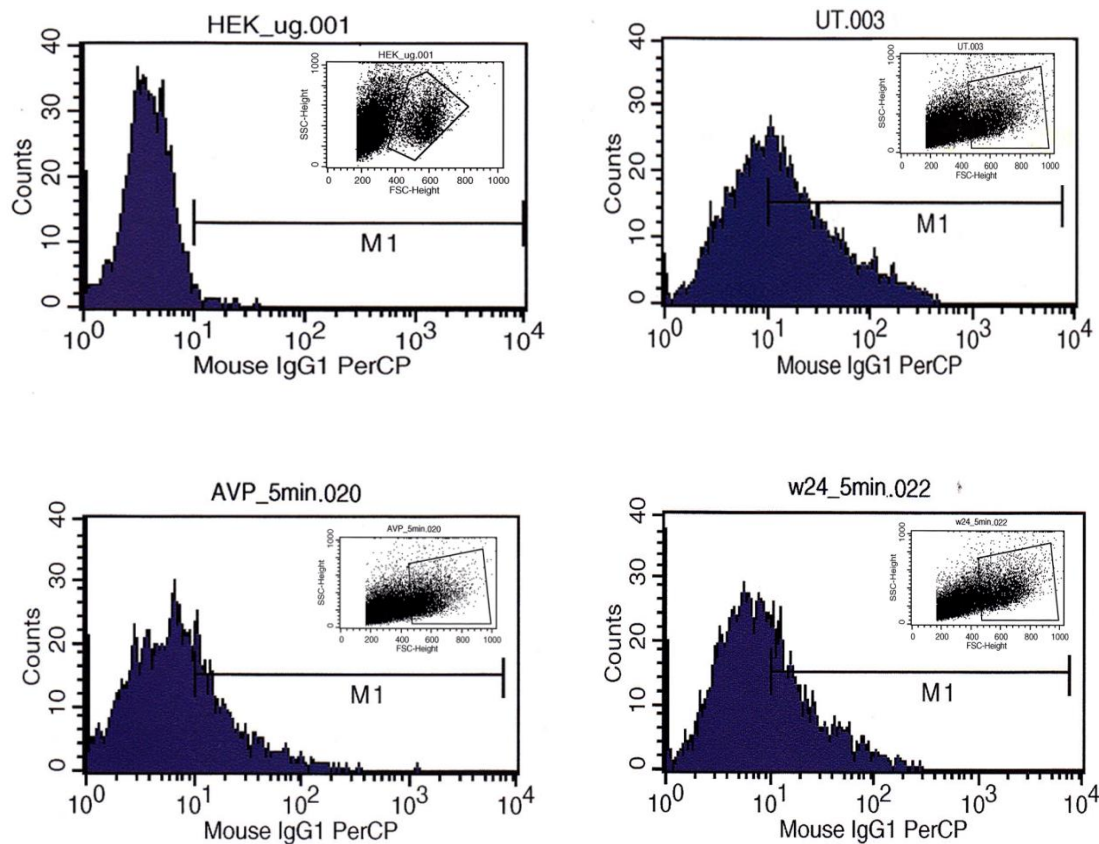
a)	Peptid	Sequenz
	d[Val4,X8]-VP MMW108-A	dCYFVNCP [DAP (Fluoresceine)] G*
b)	Behandlung	Mittlere Fluoreszenzeinheit (MFU)
	Unbehandelt	10.3
	pH=6; nicht gewaschen	43.4
	pH=6; 2x mit 100% FCS bei 0°C gewaschen	21.6
	pH=6; 2x mit 100% FCS bei 37°C gewaschen	20.2
	pH=7.4; nicht gewaschen	58.6
	pH=7.4; 2x mit 100% FCS bei 0°C gewaschen	17.6
	pH=7.4; 2x mit 100% FCS bei 37°C gewaschen	15.2

a) Sequenz des Fluorescein-markierten Peptids. b) Die Zellen wurden mit 1 μ M Fluorescein-markiertes Peptid 30 min bei unterschiedlichen pH-Werten inkubiert. Die Fluoreszenz wurde jeweils bei nicht gewaschenen, mit 100% FCS bei 0°C und mit 100% FCS bei 37°C gewaschenen Zellen gemessen. Ein Absinken der Fluoreszenz nach dem Waschprozess gibt einen Hinweis darauf, dass das Peptid zum Großteil extrazellulär bindet und die Membran daher nicht durchdringt.

4.6.3 Rezeptorinternalisierung

Die Rezeptorinternalisierung nach Inkubation mit AVP, w24, w55 und w56 wurde getestet. Hierfür wurden HEK-293 Zellen mit V₂R-FLAG transfiziert und für unterschiedliche Zeiträume (0 min, 2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 1 h, 2 h, 4 h) mit den Peptiden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, suspendiert und mit dem ersten Antikörper, Anti-FLAG M2, inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, Rat Anti-Mouse IgG1 PerCP. Anschließend wurde gewaschen und die Fluoreszenz des gebundenen Antikörpers mittels FACS gemessen. Alle Bemessungen wurden in Duplikate durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism unter Verwendung einer exponentiellen Kurve (One-phase association).

In Abb. 21 sind die Originaldaten des Experimentes dargestellt. Wie in Abb. 22 zu sehen ist verursacht die Behandlung mit AVP eine Internalisierung von bis zu 60% aller Rezeptoren. Im Vergleich dazu internalisiert der Rezeptor nach Inkubation mit w24, w55 und w56 nur gering.



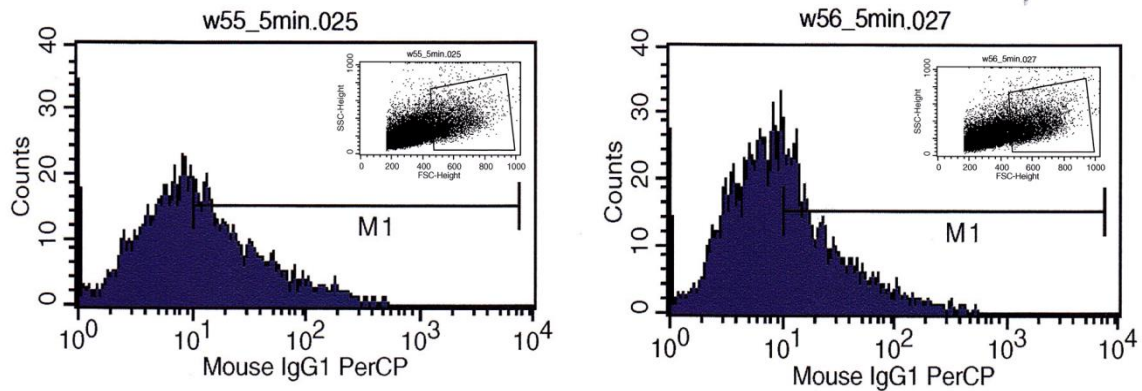


Abb. 21: Originaldaten aus FACS Die Zellen wurden 5 min mit AVP, w24, w55 und w56 inkubiert, die Rezeptoren mit fluoreszenz-markierten Antikörper markiert und mit FACS gemessen. Als Kontrollen dienen nicht transfizierte HEK-293 Zellen sowie unbehandelte Zellen mit V_2R .

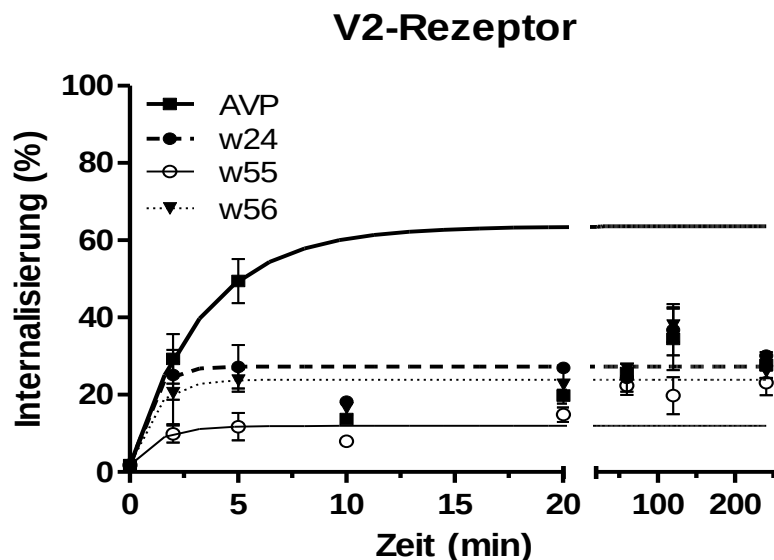


Abb. 22: Rezeptorinternalisierung des V_2 - Rezeptors durch AVP, w24, w55 und w56 V_2R exprimierende Zellen wurden mit AVP, w24, w55 und w56 für 0 min, 2 min, 5 min, 10 min, 20 min, 1 h, 2 h, 4 h bei 37°C inkubiert. Die nicht internalisierten Rezeptoren wurden mit Antikörper markiert und mittels FACS gemessen. Alle Vermessungen erfolgten in Duplikate. Werte sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

Abb. 23 zeigt einen Vergleich der Rezeptorinternalisierung durch AVP, w24, w55 und w56 bei 2 min, 5 min, 1 h, 2 h und 4 h Inkubation. Es ist zu erkennen, dass bei der Behandlung mit AVP schon innerhalb von 5 min eine Rezeptorinternalisierung von etwa 50% verursacht wird, während eine Inkubation mit w55 eine Internalisierung von nur 10% erreicht. In Tab. 15 sind alle Werte zu den Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) sowie die Werte zur maximal erreichten Rezeptorinternalisierung (Int_{max}) einerseits laut Kurvenanpassung (Fit) andererseits laut den eigentlich gemessenen Werten zusammengefasst.

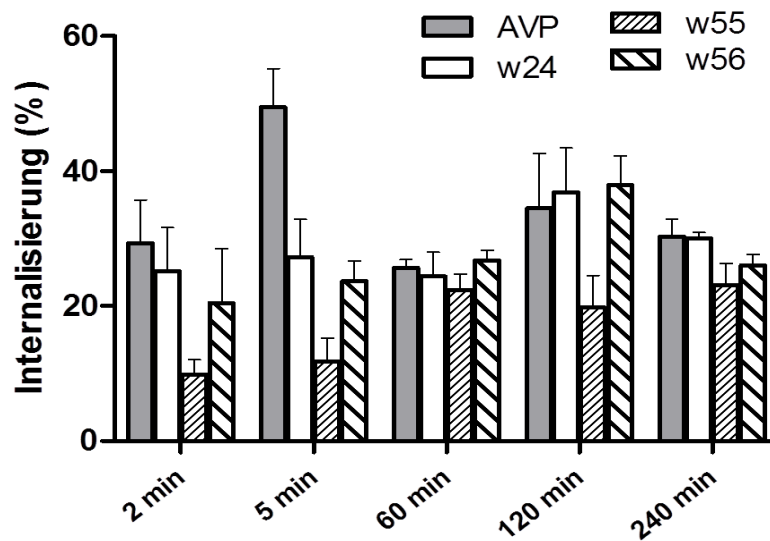


Abb. 23: Rezeptorinternalisierung des V_2 - Rezeptors bei 2 und 5 min im Vergleich Gegenüberstellung der erreichten Rezeptorinternalisierung mit AVP, w24, w55 und w56 bei 2 min und 5 min. Werte sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

Tab. 15: Rezeptorinternalisierung durch AVP, w24, w55 und w56

Peptid	Internalisierung des humanen V_2 - Rezeptors		
	$t_{1/2}$ (min)	Int. _{max} Fit(%)	Int. _{max} Messwert (%)
AVP	1.5 ± 0.7	63.6	49.5
w24	1.2 ± 0.4	27.3	27.2
w55	0.8 ± 0.5	11.9	14.9
w56	1.7 ± 0.5	23.9	20.4

Werte sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SEM aus drei unabhängigen Experimenten.

5 Diskussion

AVP und OT sind im menschlichen Organismus vorkommende Peptidhormone, die für wichtige physiologische als auch zentrale Funktionen verantwortlich sind. Die hohe Strukturverwandtschaft der Peptide macht sie unselektiv zu ihren Rezeptoren. Daher ist es von großem Interesse selektiv wirkende Substanzen zu erforschen. Diesem Ziel nachfolgend machte man sich den Ressourcen der Natur zu Nutze. Man findet sowohl in Säugetieren als auch in Vögel, Reptilien, Insekten, Schnecken und Fischen strukturähnliche Verbindungen. Äußert interessante Vertreter sind marine Kegelschnecken, bei denen man im Gegensatz zu anderen Lebewesen AVP und OT ähnliche Strukturen nicht in physiologischen Kompartimenten sondern in den zum Beutefang verwendeten Gift gefunden hat. Diese Peptide werden als Conopressine bezeichnet. Das Gift beinhaltet weiters bis zu 200 pharmakologisch aktive Komponenten. Im Laufe dieser Arbeit wurden sowie Conopressine als auch aus denen abgeleitete Strukturen nach ihren Bindungs- sowie Aktivierungseigenschaften zu allen AVP und OT Rezeptoren untersucht. Ziel war es die Selektivität der in Tab. 16 angeführten Peptide zu V_2R nachzuweisen und einen möglichen therapeutischen Einsatz zur Behandlung des Diabetes insipidus zu finden.

Tab. 16: Strukturunterschiede zwischen AVP, w24, w55 und w56

Peptid	Bezeichnung	Sequenz
Arginin-Vasopressin	AVP	CYFQNCPRG*
dV4r8-VP Desmopressin iso1	w55	dCYFVNCP _r G*
dV4r8-VP Desmopressin iso2	w56	dCYFVNCP _r G*
d[Val4,His8]-VP	w24	dCYFVNCPHG*

d: Desamino, r: D-Arginin, *: Amid; dV4r8-VP Desmopressin iso 1 und iso 2 sind stereoisomere

Zum Ersten wurden Bindungs- und Aktivierungsstudien zu allen vier Rezeptortypen ($V_{1a}R$, $V_{1b}R$, V_2R und OTR) durchgeführt. Im Laufe der vorherigen Diplomarbeit wurden bereits Dosis-Bindungskurven zu $V_{1a}R$, V_2R und OTR erstellt.

Der nächste Schritt war es die Bindungseigenschaften der Peptide (w24, w55 und w56) zu $V_{1b}R$ zu testen. Zuerst wurde das Experiment mit jeweils zwei Konzentrationen (1 μM und 10 μM , siehe Abb. 15), danach mit einer Verdünnungsreihe aus sieben Konzentrationen (siehe Abb. 16) durchgeführt. Gute Bindungseigenschaften wurden bewiesen, wenn die

Testpeptide den radioaktiv markierten Liganden aus dem Rezeptor verdrängen konnten und somit eine geringe Radioaktivität gemessen wurde. Folgend wurde die Aktivierung der Rezeptoren durch w24, w55 und w56 überprüft. Die Rezeptoraktivierung von $V_{1a}R$, $V_{1b}R$ und OTR wurde anhand der Durchführung von Luciferase Assays getestet. Geplant war es V_2R mittels Zyklase Assay zu testen, welcher einen direkten cAMP Nachweis als Signal der $G\alpha_s$ -Proteinaktivierung ermöglicht. Trotz genauer Durchführung war das Experiment auch nach mehreren Versuchen ohne Erfolg, da den verwendeten HEK-293 Zellen die Fähigkeit fehlte das aufgenommene radioaktiv markierte Adenin bei der Bildung des cAMPs einzubauen. Das gebildete cAMP konnte daher auch bei der Positivkontrolle mit Forscolin nicht nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde die Aktivierung des V_2R s ebenfalls mittels Luciferase Assay gemessen.

Wie aus Tab. 12 sowie Tab. 13 zu entnehmen ist, sieht man sowohl eine gute Bindungs- sowie Aktivierungseigenschaft auf V_2R aber auch auf $V_{1b}R$. Im Gegensatz hierzu werden $V_{1a}R$ und OTR sehr schlecht oder gar nicht aktiviert. In Abb. 24 und Abb. 25 ist die Selektivität der Peptide hinsichtlich Affinität und Aktivierung zu V_2R zusammengefasst. Da die Darstellung aller Dosis-Wirkungskurven sowie Dosis-Bindungskurven halblogarithmisch erfolgt, sind die daraus berechneten EC_{50} -Werte bzw. K_i -Werte logarithmisch normal verteilt. Wenn logarithmisch normal verteilte EC_{50}/K_i -Werte in EC_{50}/K_i -Werte umgerechnet werden, führt das aufgrund der resultierten stark verzogenen Streuung zu einer falschen Ermittlung des 95% Konfidenzintervalls (= jener Bereich um einen Parameter, indem der wahre Wert liegt)⁵³. Es ist daher notwendig die p-Skala zum Ausdruck von EC_{50} bzw. K_i zu verwenden. Die p-Skala definiert den negativen dekadischen Logarithmus einer Zahl. Zur Darstellung der Graphen wurden also die pEC_{50} -Werte (= $-\log EC_{50}$ (molar)) sowie die pK_i -Werte (= $-\log K_i$ (molar)) ausgerechnet und damit der Selektivitätsindex (SI) bestimmt. Je größer der Wert ist ($SI > 1$), umso selektiver ist das Peptid zu V_2R . Somit sind SI-Werte gleich 1 nicht selektiv. In Abb. 24 ist zu erkennen, dass die Peptide im Vergleich zu $V_{1a}R$ und OTR selektiv zu V_2R . Zu $V_{1b}R$ hingegen zeigen w24, w55 und w56 eine schwache Selektivität zu V_2R ($SI = 1.04, 1.15$ und 1.10).

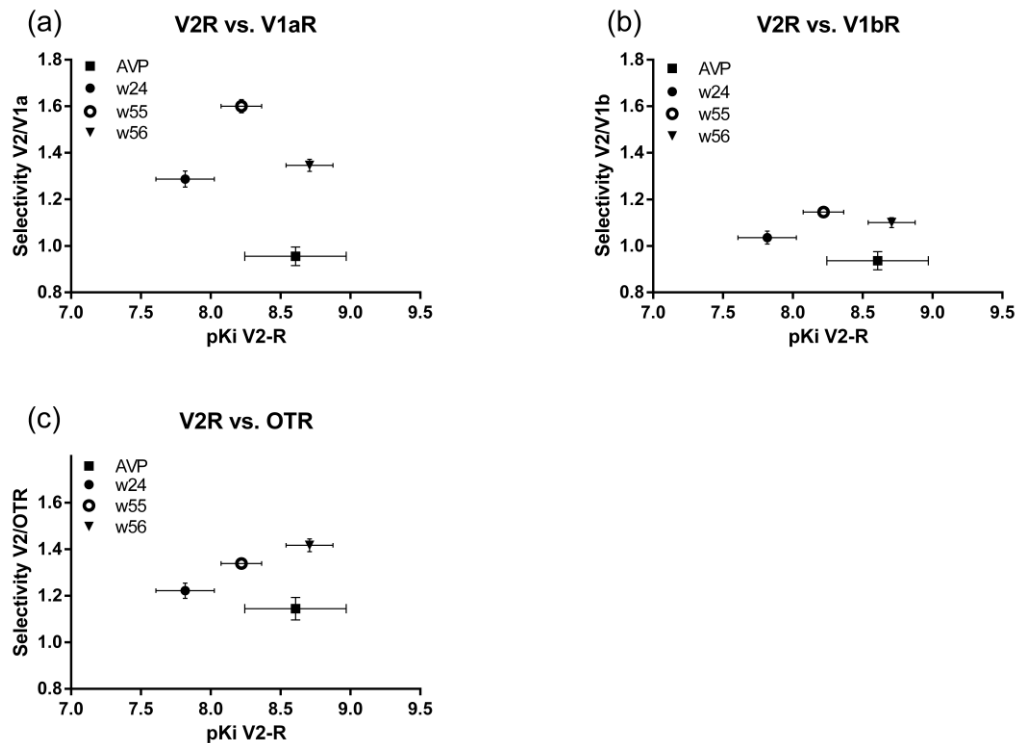


Abb. 24: Selektivität hinsichtlich Affinität am V₂R im Vergleich zu V_{1a}R, V_{1b}R und OTR pK_i Werte (-log von K_i) aus Wettbewerbsversuchen zu den Liganden am V_{1a}R, V_{1b}R und OTR wurden mit pK_i Werten der Liganden am V₂R verglichen und die Selektivität (V₂R / V_{1a}R bzw. V_{1b}R bzw. OTR) berechnet. Je näher die Werte bei 1 sind, umso unselektiver ist der geprüfte Ligand zu V₂R. Werte sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. K_i Werte zu AVP entnommen aus ²², ²³, ²⁴, ²¹

In Abb. 25 ist die Selektivität hinsichtlich Aktivierung dargestellt. Auch hier ist zu erkennen, dass V_{1b}R fast so gut aktiviert wird wie V₂R, während SI bei V_{1a}R und OTR ~ 1.4 beträgt und somit die Peptide hinsichtlich dieser beiden Rezeptoren V₂R selektiv sind. Eine Übersicht des SI hinsichtlich Rezeptorbindung und -aktivierung ist in Tab. 12 und in Tab. 13 zu finden.

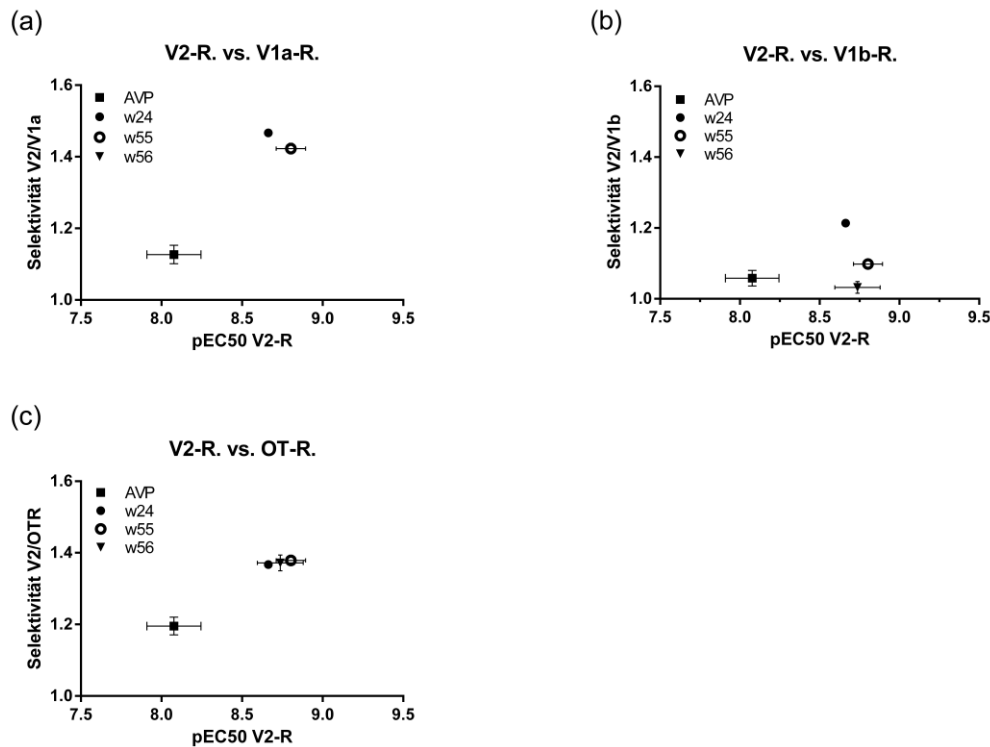


Abb. 25: Selektivität hinsichtlich Aktivierung von V₂R im Vergleich zu V_{1a}R, V_{1b}R und OTR
 pEC₅₀ Werte (-log von EC₅₀) aus Rezeptoraktivierungsexperimente zu den Liganden am V_{1a}R, V_{1b}R und OTR wurden mit pEC₅₀ Werte der Liganden am V₂R verglichen und die Selektivität (V2R / V1aR bzw. V1bR bzw. OTR) berechnet. Je näher die Werte bei 1 sind, umso unselektiver ist der geprüfte Ligand zu V₂R. Werte sind dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. EC₅₀ Wert zu AVP am OTR entnommen aus Christian Gruber und Markus Muttenthaler (nicht publiziert)

Im Folgenden werden Bindungs- sowie Aktivierungseigenschaften des V₂R genauer diskutiert. Abb. 26 zeigt den Zusammenhang zwischen Rezeptorbesetzung und Zellantwort durch AVP, w24, w55 und w56. Die aus einer bestimmten Peptidkonzentration ausgelöste Rezeptorbesetzung wurde mit der resultierenden Zellantwort der gleichen Konzentration verglichen und graphisch dargestellt. Im Vergleich zu AVP ist zu erkennen, dass vorallem w24 aber auch w55 und w56 eine schwächere Affinität besitzen, jedoch die Rezeptoraktivierung genauso gut erfolgt. Je größer der Unterschied zwischen beiden Kurven ist, umso größer ist der Unterschied zwischen Rezeptorbindung und ausgelöster Antwort.

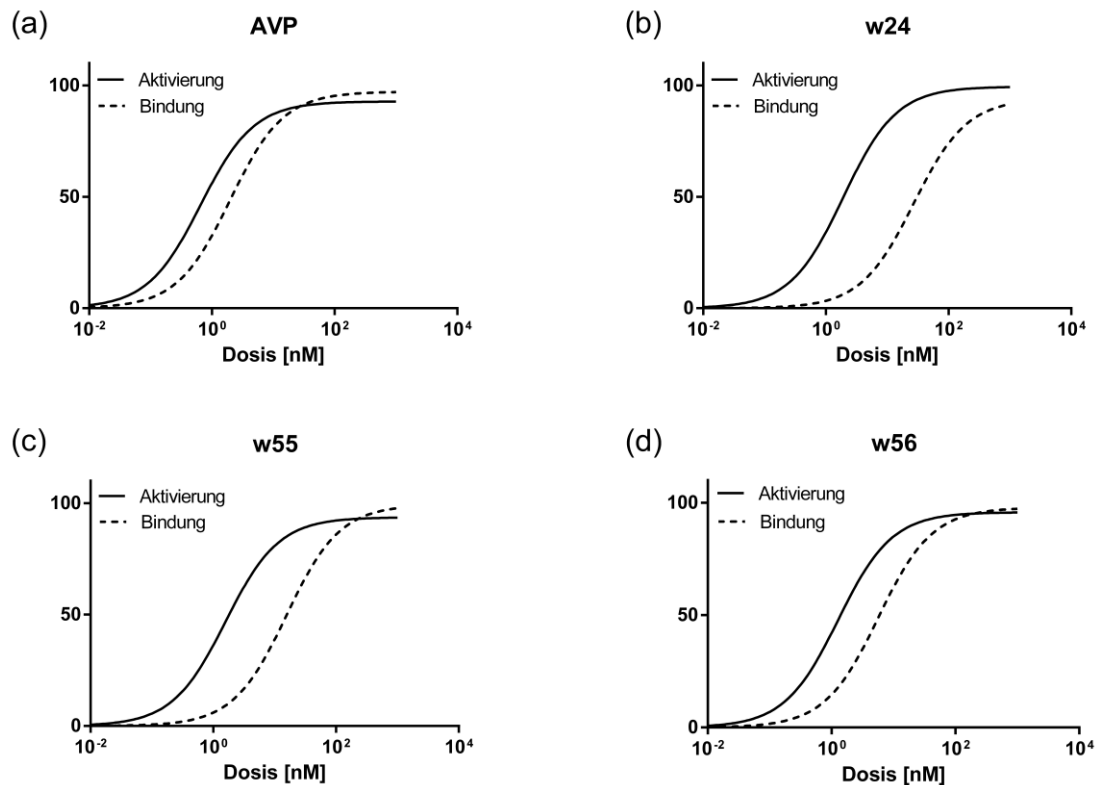


Abb. 26: Zusammenhang zwischen Rezeptorbindung und –aktivierung des V_2R Daten wurden aus Wettbewerbsversuchen und Aktivierungsexperimente an V_2R entnommen und miteinander in Korrelation gesetzt. Bei gleichen Konzentrationen des Liganden wurde die Stärke der Aktivierung mit

Bezogen auf Aktivierung des V_2R ist zu erkennen, dass vor allem w55 und w56 den maximal möglichen Effekt nicht auslösen. Sie zeigen daher typische Eigenschaften eines partiellen Agonisten. Um dieses besser beschreiben zu können, muss bedacht werden, dass der EC_{50} -Wert eines Agonisten dessen Bindungsaffinität zum Rezeptor nicht entspricht. Dies beruht auf die Tatsache, dass die Affinität des Agonisten zum Rezeptor und die aus Agonist-Rezeptor-Bindung ausgelöste Zellantwort sich zu einander nichtlinear verhalten. Der Zusammenhang des EC_{50} -Wertes eines Agonisten mit der Rezeptorbindungsaffinität ist anhand folgender Gleichung definiert:

$$EC_{50} = \frac{K_i}{(1 + \tau)} = K_i$$

τ beschreibt die Wirkstärke eines Agonisten und die Fähigkeit des Rezeptorsystems die Rezeptoraktivierung in eine Zellantwort umzuwandeln. Hohe τ Werte treten bei vollen Agonisten auf, was zu großen Unterschieden zwischen K_i und EC_{50} führt (siehe Gleichung). Daraus lässt sich schließen, dass volle Agonisten eine Rezeptorreserve aufweisen,

da jene Konzentration für das Erreichen einer 50% igen Rezeptorbindung höher ist als jene für das Erreichen der halbmaximalen Aktivierung. Partielle Agonisten hingegen zeigen niedrige τ Werte. Je niedriger der maximale Effekt ist ($\tau \rightarrow 0$), umso stärker nähert sich EC_{50} zu K_i^{53} . Unter Verwendung kompletter Dosis-Wirkungskurven kann die Effizienz eines partiellen Agonisten nach Barlow, Scott, and Stephensen berechnet werden. Diese Methode ermöglicht eine Neutralisation aller Effekte zellspezifischer sowie Rezeptor-spezifischer Reiz-Antwort Mechanismen. Gleichwirkende Konzentrationen von AVP, w24, w55 und w56 wurden mittels folgender Gleichung berechnet:

$$[A] = (EC_{50}) \times \left[\frac{(\text{Antwort \%} - \text{basal})}{E_{\max} - \text{Antwort \%}} \right]^{1/n}$$

Die daraus resultierenden Konzentrationen zum Erreichen bestimmter Rezeptoraktivierung wurden für alle Peptide bezogen auf AVP in Abb. 27 dargestellt. Jede Gerade ist durch eine Steigung und einem Ordinatenabschnitt definiert, aus denen sich die funktionelle Affinität (K_p) des partiellen Agonisten bestimmen lässt:

$$K_p = \frac{\text{Steigung}}{\text{Ordinatenabschnitt}} \times \left(1 - \frac{\tau_p}{\tau_a} \right)$$

Die obige Gleichung zeigt, dass die Schätzung der Aktivität umso genauer erfolgt, je geringer der Effekt des partiellen Agonisten. Da τ_p (p = partieller Agonist) deutlich kleiner als τ_a (a = voller Agonist), gilt $\tau_p / \tau_a \rightarrow 0$. Eine Übersicht über τ und K_p Werte ist in Tab. 17 zu finden.

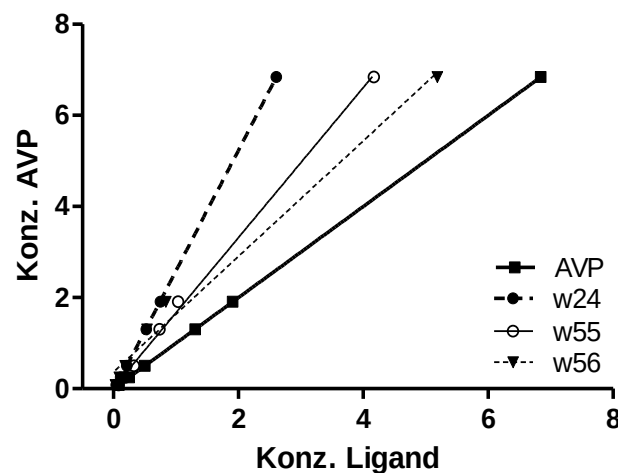


Abb. 27: Rezeptoraktivierung des V_2R durch AVP im Vergleich zu den Liganden w24, w55 und w56 Rezeptorantwort des V_2R durch AVP, w24, w55 und w56 wurden bei gleichen Konzentrationen miteinander in Korrelation gesetzt

Tab. 17: τ und K_p Werte zu w24, w55 und w56

Peptid	τ - Wert	K_p
w24	7.8	- 47.88
w55	3.05	70.53
w56	0.08	3.44

Wie bereits besprochen zählen sowohl alle AVP Rezeptoren als auch der OT Rezeptor zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren, genaugenommen zu der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptorfamilie A. Sie zeigen mit 40-85% iger Übereinstimmung der Aminosäuresequenz große Ähnlichkeiten untereinander auf, insbesondere innerhalb der 7-TM Regionen und der extrazellulären Schleifen^{23, 54}. Zudem zeigen sie typische, strukturelle Charakteristika vieler G-Protein gekoppelter Rezeptoren: Glykosylierung an Asparagin in der extrazellulären Domäne, eine Disulfidbrücke zwischen der ersten und zweiten extrazellulären Schleife sowie zwei Palmitoylreste im C-Terminus, welche eine Verankerung mit der Plasmamembran ermöglichen. Die Ligandenbindung erfolgt extrazellulär innerhalb der ringförmig angeordneten 7-TM Helixes (siehe Abb. 28)¹⁹. Diese Anordnung formt eine 20 Å tiefe und 14 Å breite taschenähnliche Vertiefung, welche genügend Platz zum Andocken des zyklischen Teils von AVP bzw. OT anbietet⁵⁴.

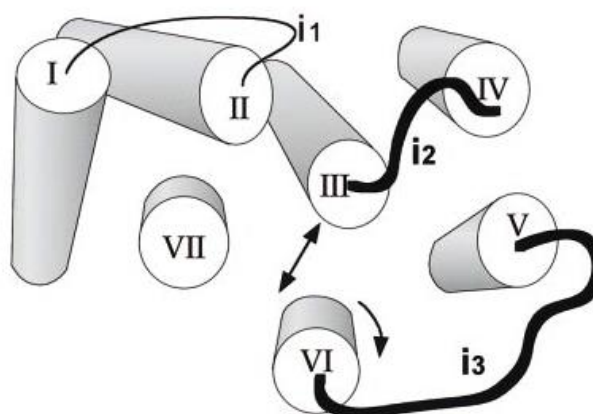


Abb. 28: Schematische Darstellung der Anordnung der 7-TM Helixes Illustration der ringförmigen Anordnung der 7-TM Helixes am Beispiel von Rhodopsin, betrachtet von der intrazellulären Seite. Die durch TMIII-TMVII geformte Tasche, bietet eine Möglichkeit zum Andocken des zyklischen Teils von AVP und OT. Abbildung entnommen aus Bockeaert P. & Pin J.P.³⁴

In Betracht auf V_2R befinden sich am untersten Teil der Tasche hauptsächlich hydrophobe Reste, welche mit dem N-terminalen Aminosäuretriplett CYF des AVPs interagieren⁵⁴. Die Anwesenheit von Phe in Position 3 verleiht AVP dessen hohe Affinität zu V_2R und ist so-

mit notwendig für die Rezeptorbindung²⁵. Bei näherer Betrachtung der Peptidsequenz zeigen w24 (d[Val4, His8]-VP), w55 (dV4r8-VP Desmopressin iso1) sowohl auch w56 (dV4r8-VP Desmopressin iso2) in Position 3 das Vorhandensein von Phe, was die gute Bindung sowie Aktivierung des V₂R erklären könnte. Weiters ist bewiesen, dass der Austausch von Arg-8 sowie die Desaminierung des N-terminalen Cys keinen Einfluss auf die Affinität zum Rezeptor verursachen²⁵.

Anhand der durchgeführten Experimente zeigen w24, w55 und w56 keine Bindung oder Aktivierung weder zu V_{1a}R noch zu OTR. Um dieses Phänomen erklären zu können, müssen beide Rezeptoren genauer betrachtet werden: Molekulare Modellierungen von Ligand-Bindungsstudien zu V_{1a}R zeigten, dass die N-terminale Kette von AVP aus der durch die 7-TM gebildeten Tasche hervorragt und an der ersten extrazellulären Schleife des Rezeptors andockt. Dies ermöglicht eine Interaktion zwischen Arg-8 des Peptides und Tyr115 der extrazellulären Schleife des Rezeptors. Studien bewiesen, dass der Austausch von Tyr115 aber auch von Arg-8 die Rezeptor-Ligand-Interaktion enorm verringert^{16, 25}. Des Weiteren zeigen DAVP (8-D-Arginin Vasopressin) und DDAVP (1-Desamino-8-D-Arginin Vasopressin) keine Affinität zu V_{1a}R, woraus zu schließen ist, dass die natürlich vorkommende L-Form des Arg sowie die Aminogruppe in Cys-1 bei der Bindung ebenfalls von Bedeutung sind²⁵. Anhand dieser Aspekte lässt sich erklären, dass der Aminosäureaustausch in Position 8 durch His bei w24 sowie durch D-Arg bei w55 und w56 als auch die Desaminierung von Cys-1 die Affinität zu V_{1a}R beeinflussen und somit weder Rezeptorbindung noch -aktivierung erfolgen konnten.

Im Hinblick auf OTR interagieren TMIII, IV und VI sowie die zweite extrazelluläre Schleife mit dem zyklischen Teil von OT, während der N-Terminus des Rezeptors gemeinsam mit der ersten extrazellulären Schleife die C-terminale Tripeptidkette des Peptids bindet. Hormone mit einem identischen zyklischen Teil und einem Austausch von Lys durch Arg in Position 8 binden mit gleicher Affinität wie OT zu OTR. Dies deutet darauf hin, dass der zyklische Teil des Peptids bei der Rezeptorbindung von größerer Bedeutung ist als die lineare Kette. Die Anwesenheit von Ile in Position 3 ist für die hohe Affinität des OT zu OTR verantwortlich und somit essentiell¹⁶. Demnach verursacht Phe-3 statt Ile-3 eine Minderung der Affinität von w24, w55 und w56 zu OTR.

Im Gegensatz zu V_{1a}R und OTR zeigen alle drei Peptide eine hohe Affinität zu V_{1b}R. Vorherige Publikationen zeigten, dass der Austausch von Glu in Position 4 durch eine Amino-

säure mit stark hydrophober Seitenkette die Interaktion des Liganden mit V_{1b}R stark begünstigt. Demnach wurde der erste V_{1b}R selektive Agonist d[Cha4]-AVP, welches in Position 4 Cyclohexylalanin enthält, synthetisiert. Dieses zeigte eine hohe Selektivität zu V_{1b}R. Dem hingegen führt die Substitution von Val, führend zu d[Val4]-AVP, zu einer Erhöhung der Selektivität von V_{1b}R/V_{1a}R und V_{1b}R/OTR, jedoch nicht von V_{1b}R/V₂R^{55, 56}. Daraus lässt sich schließen, dass Peptide mit einer Desaminierung von Cys1 und einem Val in Position 4 eine gute Affinität zu V_{1b}R als auch V₂R zeigen.

Neben der Beschreibung der Bindungs- und Aktivierungseigenschaften der Peptide zu allen AVP und OT Rezeptoren, war die pharmakologische Charakterisierung des V₂R sowie dessen Mutante V₂L219R die zweite Zielsetzung dieser Diplomarbeit. Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurde getestet, ob w24, w55 und w56 die Eigenschaft eines Pharmako-Chaperones aufweisen. Es wurde die V₂R Mutante L219, welche in Position 219 Arg statt Leu enthält, hierfür herangezogen. Wie aus Abb. 19 zu entnehmen ist, zeigen alle Peptide kein Pharmako-Chaperone-Effekt. Um dieses Phänomen erklären zu können, müssen die Eigenschaften eines Pharmako-Chaperones angeschaut werden. Erstens muss der geeignete Wirkstoff die Plasmamembran durchdringen, im Cytosol angelangt nicht von Proteasen zerstört werden und letztendlich den falsch gefalteten Rezeptor stabilisieren, sodass der Rezeptor von der Proteinqualitätskontrolle des ER nicht erkannt wird⁵¹. Jedoch zeigen alle Peptide keine Permeabilität durch die Zellmembran, was aus Tab. 14 zu entnehmen ist. Die Permeabilität einer Substanz ist von der Molekülgröße sowie von der Hydrophobizität abhängig. Je kleiner und lipophiler das Molekül, umso besser die Permeabilität⁵¹. In Betracht auf die vorliegenden Peptide wird die Permeabilität durch einerseits einer Molekülgröße von über 1000 Dalton, andererseits durch die Anwesenheit von polaren Aminosäuren wie Cystein, Tyrosin und Glycin sowie der basischen Aminosäure Arginin erschwert. Somit können die vorliegenden Peptide nicht als Pharmako-Chaperone agieren.

Des Weiteren wurde untersucht, ob die Eigenschaft eines Agonisten mit funktioneller Selektivität auf die drei Peptide zutrifft. Diese aktivieren einerseits den G-Protein Signalweg und hemmen andererseits die Internalisierung des Rezeptors durch Arrestin-Antagonismus. Agonisten mit dieser Eigenschaft werden als „biased agonist“ oder „functionally selective compound“ bezeichnet²². Bezogen auf V₂R handelt es sich bei der Internalisierung um einen β -Arrestin abhängigen Prozess. β -Arrestin bildet mit V₂R einen stabilen Komplex, was zu einer intrazellulären Akkumulation des Rezeptors führt⁴³. Frühere Studien zeigten, dass Partialagonisten im Vergleich zu vollen Agonisten eine verminderte Desensibilisierung

und somit Internalisierung des Rezeptors verursachen⁵⁷. Anhand der durchgeführten Experimente ist zu erkennen, dass der Partialagonisten w55 und w56 eine verringerte Internalisierung als der volle Agonist AVP verursacht. Der Partialagonist w56 zeigte jedoch im Vergleich zu w55 einen schwächeren Effekt. Bezogen auf den vollen Agonisten AVP zeigen frühere Analysen eine schnell auftretende Internalisierung des V₂ Rezeptors mit einer Halbwertszeit von 5-7 min und einem maximalen Wert von 71% innerhalb der ersten 20 min⁵⁸. Wie in Abb. 22 zu sehen ist, zeigen die durchgeführten Experimente bereits nach 5 min Inkubation mit AVP eine Internalisierung von ungefähr 60%. Jedoch ist dieses Experiment nicht vertrauenswürdig, da einerseits die Zellen aufgrund der Transfektion und der darauffolgenden Aufteilung viel Stress ausgesetzt waren. Dies hatte eine schlechte Messqualität mittels FACS zur Folge. Andererseits lag zwischen Inkubation und Vermessung eine Zeitspanne von 2-3 Stunden. Innerhalb dieses Zeitraumes kann es zu der weiteren Expression des Rezeptors kommen und damit zur anschließenden Erkennung durch den Antikörper, was zu verfälschten Ergebnissen führen kann.

Anhand der durchgeführten Experimente ist zu schließen, dass w24, w55 sowie w56 eine Selektivität zu V₂R im Vergleich zu V_{1a}R und OTR zeigen. V_{1b}R wird aber dennoch gut aktiviert. Jedoch ist V_{1b}R zentral lokalisiert, welches eine Interaktion mit peripheral vorhandenem Peptid im Organismus unmöglich ist. Hinsichtlich des Pharmako-Chaperone Effektes zeigen alle Peptide ein negatives Ergebnis. Aufgrund ihrer Molekülgröße sowie die geringe Hydrophobizität, ist keine Permeabilität der Peptide durch die Zellmembran möglich. Dadurch können die Peptide nicht mit dem mutierten intrazellulär liegenden Rezeptor interagieren. Dies verhindert den Einsatz dieser Peptide bei der Therapie des nephrogenen Diabetes insipidus. Im Gegensatz hierzu können w24, w55 und w56 möglicherweise bei der Behandlung des zentralen Diabetes insipidus vom Einsatz sein. Aufgrund der Selektivität zu V₂R sowie der Blockade des β -Arrestin Signalweges und damit der Rezeptorinternalisierung, kann die endogen ausgebliebene Wirkung des AVPs ersetzt werden und über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten werden.

Es ist jedoch nötig anhand der Durchführung einiger Experimente den genauen Internalisierungsprozess sowie die Interaktion mit β -Arrestin zu untersuchen. Ebenfalls ist für die genaue Charakterisierung der G-Protein Aktivierung die Vermessung der cAMP Konzentration bei der Aktivierung mehrerer stabiler Zelllinien mittels Durchführung von Zykase Assays nötig.

6 Abstract (Deutsch)

Arginine-Vasopressin (AVP) und Oxytocin (OT) sind zyklische Nonapeptide, welche von der Neurohypophyse gebildet werden. Eine Disulfidbrücke zwischen Cys in Position 1 und 6 bildet einen Ring bestehend aus 6 Aminosäuren und einer linearen Kette aus 3 Aminosäuren. AVP und OT wirken via drei AVP- ($V_{1a}R$, $V_{1b}R$, V_2) und einem OT-Rezeptor. Diese gehören zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. In der vorliegenden Diplomarbeit wird auf V_2R , der in der Niere lokalisiert ist, fokussiert. AVP und OT weisen sowohl physiologische als auch zentrale Wirkungen auf, die dem Organismus von großer Bedeutung sind. Demnach sind Störungen bei der Synthese oder Rezeptormutationen mit der Entstehung von Krankheiten wie Diabetes insipidus, Bettnässen, Bluthochdruck, kongestive Herzinsuffizienz und Hyponatriämie verbunden. Da sowohl AVP und OT als auch ihre Rezeptoren große Strukturähnlichkeiten aufweisen, führen eingesetzte Therapeutika oft zu Kreuzreaktionen und somit zu Nebenwirkungen. Die Erforschung selektiver Liganden ist daher von großem Interesse. Im Hinblick auf die natürlichen Ressourcen sind AVP und OT ähnliche Verbindungen in allen Lebewesen ausgehend von Insekten bis hin zu Säugetieren zu finden. Sehr interessante Vertreter sind marine Kegelschnecken. Sie produzieren zum Fang ihrer Beutetiere ein Gift, welches viel pharmakologisch aktive Komponenten enthält, davon Conopressine. Diese unterscheiden sich von AVP und OT nur in einigen Aminosäuren. Im Laufe dieses Projektes wurden 54 natürliche sowie synthetische Peptidanaloga hinsichtlich Rezeptoraffinität und –aktivierungsfähigkeit der AVP/OT Rezeptoren mit dem Fokus auf V_2R getestet. Anhand der Durchführung von Verdrängungsbindungsversuche sowie Luciferase Reporter Assays konnte gezeigt werden, dass Desaminierung des AVPs in Position 1 sowie der Aminosäureaustausch von Glu durch Val in Position 4 und von L -Arg durch D -Arg bzw. durch His die Affinität und somit die Aktivierung von $V_{1a}R$ als auch OTR enorm verringerte. Jedoch blieb die Affinität zu $V_{1b}R$ unverändert. Die weitere Zielsetzung war es eine Behandlungsmöglichkeit der drei Peptide hinsichtlich Diabetes insipidus zu beschreiben. Für eine effiziente Therapie dieser Erkrankung sollte das optimale Arzneimittel die Eigenschaften eines Pharmako-Chaperones sowie die eines Agonisten mit funktioneller Selektivität aufweisen. Anhand der durchgeführten Experimente konnte festgestellt werden, dass die große Molekülmasse sowie die niedrige Hydrophobizität der Peptide deren Permeabilität durch die Plasmamembran verhindern und somit der Effekt des Pharmako-Chaperones nicht auftreten konnte. Bezüglich funktioneller Se-

ektivität konnten w55 und w56 ein positives Ergebnis aufweisen. Eine genaue Charakterisierung des Internalisierungsprozesses ist mittels Durchführung verschiedener Experimente nötig.

7 Abstract (Englisch)

Arginine-vasopressin (AVP) and oxytocin (OT) are cyclic nonapeptides synthesized by the posterior pituitary. A disulfide bond between Cys residues in position 1 and position 6 forms a ring consisting of 6 aminoacids and a 3-residue tail. In humans, these peptide hormones act via three AVP receptors (vascular $V_{1a}R$, pituitary $V_{1b}R$, renal V_2) and one OT receptor, which are members of the G-protein coupled receptor family. The presented work focuses on the V_2R that is expressed in the kidney. AVP and OT regulate peripheral as well as central functions of prime importance. Endocrine disrupters or receptor mutations lead to disease appearance such as diabetes insipidus, bedwetting, congestive heart failure, hypotension, hyponatremia and bleeding disorders. The high structural similarity of both peptides and the receptors leads to cross reactivity and consequently to adverse effects while using peptide ligands for therapy. According to this the investigation of selective compounds is a matter of particular interest. Regarding to nature's opportunities, AVP and OT are found in all organisms from insects to animals. Very interesting creatures are marine cone snails. To capture their prey they produce venom containing a lot of pharmacological active components including conopressins. Conopressins differ only in few aminoacids from AVP/OT. In the course of this project, 54 natural and synthetic peptide analogues have been tested for their ability to bind and/or activate AVP/OT receptors with a focus on the V_2 receptor. Radioligand competition binding experiments and functional luciferase reporter assays had shown that deamination in AVP in position 1 as well as substitution of glutamine residue in position 4 by Val and of L -Arg in position 8 by D -Arg or rather His increased the selectivity towards the V_2R and $V_{1b}R$ isoforms. The second aim of this study was to find an opportunity to treat diabetes insipidus. An obvious treatment for this disease is possible with a drug that combines pharmacochaperone properties together with noninternalizing activities. Based on the conducted experiments it could be shown that all peptides do not show any pharmacochaperone properties. Because of the high molecular weight and the low hydrophobicity the peptides are not able to penetrate the cell membrane. In regard to the noninternalizing activities the two peptides w55 and w56 had shown to be biased agonists. This means that they are able to activate the G-protein cascade but not the β -Arrestin dependent receptor internalisation. In the future, it will be necessary to characterize the detailed internalisation process by performing diverse experiments.

Literaturverzeichnis

- (1) Ganesan, A., The impact of natural products upon modern drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* **2008**, 12, 306-17.
- (2) Koehn, F. E.; Carter, G. T., The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, 4, 206-20.
- (3) Newman, D. J.; Cragg, G. M., Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod* **2007**, 70, 461-77.
- (4) Olivera, B. M.; Rivier, J.; Clark, C.; Ramilo, C. A.; Corpuz, G. P.; Abogadie, F. C.; Mena, E. E.; Woodward, S. R.; Hillyard, D. R.; Cruz, L. J., Diversity of Conus neuropeptides. *Science* **1990**, 249, 257-63.
- (5) Teuscher, E.; Melzig, M. F.; Lindequist, U., *Biogene Arzneimittel: Ein Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie*. ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 2004.
- (6) Adermann, K.; John, H.; Ständker, L.; Forssmann, W. G., Exploiting natural peptide diversity: novel research tools and drug leads. *Curr Opin Biotechnol* **2004**, 15, 599-606.
- (7) Gruber, C. W.; Muttenthaler, M.; Freissmuth, M., Ligand-based peptide design and combinatorial peptide libraries to target G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des* **2010**, 16, 3071-88.
- (8) Gruber, C. W.; O'Brien, M., Uterotonic plants and their bioactive constituents. *Planta Med* **2011**, 77, 207-20.
- (9) Tsetlin, V., Snake venom alpha-neurotoxins and other 'three-finger' proteins. *Eur J Biochem* **1999**, 264, 281-6.
- (10) Escoubas, P., Molecular diversification in spider venoms: a web of combinatorial peptide libraries. *Mol Divers* **2006**, 10, 545-54.
- (11) Possani, L. D.; Becerril, B.; Delepierre, M.; Tytgat, J., Scorpion toxins specific for Na⁺-channels. *Eur J Biochem* **1999**, 264, 287-300.
- (12) Halai, R.; Craik, D. J., Conotoxins: natural product drug leads. *Nat Prod Rep* **2009**, 26, 526-36.
- (13) Craig, A. G.; Bandyopadhyay, P.; Olivera, B. M., Post-translationally modified neuropeptides from Conus venoms. *Eur J Biochem* **1999**, 264, 271-5.
- (14) Becker, S.; Terlau, H., Toxins from cone snails: properties, applications and biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol* **2008**, 79, 1-9.
- (15) Möller, C.; Marí, F., A vasopressin/oxytocin-related conopeptide with gamma-carboxyglutamate at position 8. *Biochem J* **2007**, 404, 413-9.
- (16) Gimpl, G.; Fahrenholz, F., The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* **2001**, 81, 629-83.
- (17) Manning, M.; Stoev, S.; Chini, B.; Durroux, T.; Mouillac, B.; Guillon, G., Peptide and non-peptide agonists and antagonists for the vasopressin and oxytocin V1a, V1b, V2 and OT receptors: research tools and potential therapeutic agents. *Prog Brain Res* **2008**, 170, 473-512.
- (18) Nakamura, K.; Fujiwara, Y.; Mizutani, R.; Sanbe, A.; Miyauchi, N.; Hiroshima, M.; Yamauchi, J.; Yamashita, T.; Nakamura, S.; Mori, T.; Tsujimoto, G.; Tanoue, A., Effects of vasopressin V1b receptor deficiency on adrenocorticotropin release from anterior pituitary cells in response to oxytocin stimulation. *Endocrinology* **2008**, 149, 4883-91.

- (19) Barberis, C.; Mouillac, B.; Durroux, T., Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. *J Endocrinol* **1998**, 156, 223-9.
- (20) Insel, T. R., The challenge of translation in social neuroscience: a review of oxytocin, vasopressin, and affiliative behavior. *Neuron* **2010**, 65, 768-79.
- (21) Manning, M.; Misicka, A.; Olma, A.; Bankowski, K.; Stoev, S.; Chini, B.; Durroux, T.; Mouillac, B.; Corbani, M.; Guillon, G., Oxytocin and vasopressin agonists and antagonists as research tools and potential therapeutics. *J Neuroendocrinol* **2012**, 24, 609-28.
- (22) Jean-Alphonse, F.; Perkovska, S.; Frantz, M. C.; Durroux, T.; Méjean, C.; Morin, D.; Loison, S.; Bonnet, D.; Hibert, M.; Mouillac, B.; Mendre, C., Biased agonist pharmacochaperones of the AVP V2 receptor may treat congenital nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol* **2009**, 20, 2190-203.
- (23) Chini, B.; Manning, M., Agonist selectivity in the oxytocin/vasopressin receptor family: new insights and challenges. *Biochem Soc Trans* **2007**, 35, 737-41.
- (24) Dutertre, S.; Croker, D.; Daly, N. L.; Andersson, A.; Muttenthaler, M.; Lumsden, N. G.; Craik, D. J.; Alewood, P. F.; Guillon, G.; Lewis, R. J., Conopressin-T from *Conus tulipa* reveals an antagonist switch in vasopressin-like peptides. *J Biol Chem* **2008**, 283, 7100-8.
- (25) Chini, B.; Mouillac, B.; Ala, Y.; Balestre, M. N.; Trumpp-Kallmeyer, S.; Hoflack, J.; Elands, J.; Hibert, M.; Manning, M.; Jard, S., Tyr115 is the key residue for determining agonist selectivity in the V1a vasopressin receptor. *EMBO J* **1995**, 14, 2176-82.
- (26) Mouillac, B.; Chini, B.; Balestre, M. N.; Elands, J.; Trumpp-Kallmeyer, S.; Hoflack, J.; Hibert, M.; Jard, S.; Barberis, C., The binding site of neuropeptide vasopressin V1a receptor. Evidence for a major localization within transmembrane regions. *J Biol Chem* **1995**, 270, 25771-7.
- (27) Corbani, M.; Trueba, M.; Stoev, S.; Murat, B.; Mion, J.; Boulay, V.; Guillon, G.; Manning, M., Design, synthesis, and pharmacological characterization of fluorescent peptides for imaging human V1b vasopressin or oxytocin receptors. *J Med Chem* **2011**, 54, 2864-77.
- (28) Wisniewski, K.; Galyean, R.; Tariga, H.; Alagarsamy, S.; Croston, G.; Heitzmann, J.; Kohan, A.; Wisniewska, H.; Laporte, R.; Rivière, P. J.; Schteingart, C. D., New, potent, selective, and short-acting peptidic V1a receptor agonists. *J Med Chem* **2011**, 54, 4388-98.
- (29) Muttenthaler, M.; Andersson, A.; de Araujo, A. D.; Dekan, Z.; Lewis, R. J.; Alewood, P. F., Modulating oxytocin activity and plasma stability by disulfide bond engineering. *J Med Chem* **2010**, 53, 8585-96.
- (30) Hicks, C.; Jorgensen, W.; Brown, C.; Fardell, J.; Koehbach, J.; Gruber, C. W.; Kassiou, M.; Hunt, G. E.; McGregor, I. S., The non-peptide oxytocin receptor agonist WAY 267,464: receptor binding profile, prosocial effects and distribution of c-Fos expression in adolescent rats. *J Neuroendocrinol* **2012**.
- (31) Donaldson, Z. R.; Young, L. J., Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. *Science* **2008**, 322, 900-4.
- (32) Janzsó, G.; Rákhely, G.; Leitgeb, B., Comprehensive structural characterization of the cyclic disulphide-bridged nonapeptides, Arg- and Lys-conopressins. *J Mol Graph Model* **2009**, 27, 881-8.
- (33) Närejoja, K.; Näsman, J., Selective targeting of G-protein-coupled receptor subtypes with venom peptides. *Acta Physiol (Oxf)* **2012**, 204, 186-201.
- (34) Bockaert, J.; Pin, J. P., Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* **1999**, 18, 1723-9.
- (35) Ji, T. H.; Grossmann, M.; Ji, I., G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* **1998**, 273, 17299-302.

- (36) Gether, U.; Kobilka, B. K., G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* **1998**, 273, 17979-82.
- (37) Aktories, K.; Forth, W., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. ed.; Urban & Fischer: München, 2010.
- (38) Jacoby, E.; Bouhelal, R.; Gerspacher, M.; Seuwen, K., The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem* **2006**, 1, 761-82.
- (39) Fredriksson, R.; Lagerström, M. C.; Lundin, L. G.; Schiöth, H. B., The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **2003**, 63, 1256-72.
- (40) Levoye, A.; Dam, J.; Ayoub, M. A.; Guillaume, J. L.; Jockers, R., Do orphan G-protein-coupled receptors have ligand-independent functions? New insights from receptor heterodimers. *EMBO Rep* **2006**, 7, 1094-8.
- (41) Harmar, A. J.; Hills, R. A.; Rosser, E. M.; Jones, M.; Buneman, O. P.; Dunbar, D. R.; Greenhill, S. D.; Hale, V. A.; Sharman, J. L.; Bonner, T. I.; Catterall, W. A.; Davenport, A. P.; Delagrèze, P.; Dollery, C. T.; Foord, S. M.; Gutman, G. A.; Laudet, V.; Neubig, R. R.; Ohlstein, E. H.; Olsen, R. W.; Peters, J.; Pin, J. P.; Ruffolo, R. R.; Searls, D. B.; Wright, M. W.; Spedding, M., IUPHAR-DB: the IUPHAR database of G protein-coupled receptors and ion channels. *Nucleic Acids Res* **2009**, 37, D680-5.
- (42) Hamm, H. E., The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem* **1998**, 273, 669-72.
- (43) Terrillon, S.; Barberis, C.; Bouvier, M., Heterodimerization of V1a and V2 vasopressin receptors determines the interaction with beta-arrestin and their trafficking patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, 101, 1548-53.
- (44) Luttrell, L. M.; Lefkowitz, R. J., The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* **2002**, 115, 455-65.
- (45) Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, F.; Starke, K., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. ed.; Urban & Fischer Verlag: München, 2010.
- (46) Barki-Harrington, L.; Rockman, H. A., Beta-arrestins: multifunctional cellular mediators. *Physiology (Bethesda)* **2008**, 17-22.
- (47) Xiao, K.; Sun, J.; Kim, J.; Rajagopal, S.; Zhai, B.; Villén, J.; Haas, W.; Kovacs, J. J.; Shukla, A. K.; Hara, M. R.; Hernandez, M.; Lachmann, A.; Zhao, S.; Lin, Y.; Cheng, Y.; Mizuno, K.; Ma'ayan, A.; Gygi, S. P.; Lefkowitz, R. J., Global phosphorylation analysis of beta-arrestin-mediated signaling downstream of a seven transmembrane receptor (7TMR). *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, 107, 15299-304.
- (48) Oueslati, M.; Hermosilla, R.; Schönenberger, E.; Oorschot, V.; Beyermann, M.; Wiesner, B.; Schmidt, A.; Klumperman, J.; Rosenthal, W.; Schüle, R., Rescue of a nephrogenic diabetes insipidus-causing vasopressin V2 receptor mutant by cell-penetrating peptides. *J Biol Chem* **2007**, 282, 20676-85.
- (49) Di Iorgi, N.; Napoli, F.; Allegri, A. E.; Olivieri, I.; Bertelli, E.; Gallizia, A.; Rossi, A.; Maghnie, M., Diabetes insipidus--diagnosis and management. *Horm Res Paediatr* **2012**, 77, 69-84.
- (50) Oueslati, M.; Hermosilla, R.; Schönenberger, E.; Oorschot, V.; Beyermann, M.; Wiesner, B.; Schmidt, A.; Klumperman, J.; Rosenthal, W.; Schüle, R., Rescue of a nephrogenic diabetes insipidus-causing vasopressin V2 receptor mutant by cell-penetrating peptides. *J Biol Chem* **2007**, 282, 20676-85.
- (51) Los, E. L.; Deen, P. M.; Robben, J. H., Potential of nonpeptide (ant)agonists to rescue vasopressin V2 receptor mutants for the treatment of X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Neuroendocrinol* **2010**, 22, 393-9.

- (52) Robben, J. H.; Kortenoeven, M. L.; Sze, M.; Yae, C.; Milligan, G.; Oorschot, V. M.; Klumperman, J.; Knoers, N. V.; Deen, P. M., Intracellular activation of vasopressin V2 receptor mutants in nephrogenic diabetes insipidus by nonpeptide agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, 106, 12195-200.
- (53) Kenakin, T. P., *A Pharmacology Primer*. ed.; Elsevier Academic Press: USA, 2009.
- (54) Czaplewski, C.; Kazmierkiewicz, R.; Ciarkowski, J., Vasopressin V2 receptor/bioligand interactions. *Letters in Peptide Science* **1998**, 5, 333-335.
- (55) Guillon, G.; Derick, S.; Pena, A.; Cheng, L. L.; Stoev, S.; Seyer, R.; Morgat, J. L.; Barberis, C.; Gal, C. S.; Wagnon, J.; Manning, M., The discovery of novel vasopressin V1b receptor ligands for pharmacological, functional and structural investigations. *J Neuroendocrinol* **2004**, 16, 356-61.
- (56) Cheng, L. L.; Stoev, S.; Manning, M.; Derick, S.; Pena, A.; Mimoun, M. B.; Guillon, G., Design of potent and selective agonists for the human vasopressin V1b receptor based on modifications of [deamino-cys1]arginine vasopressin at position 4. *J Med Chem* **2004**, 47, 2375-88.
- (57) January, B.; Seibold, A.; Whaley, B.; Hipkin, R. W.; Lin, D.; Schonbrunn, A.; Barber, R.; Clark, R. B., beta2-adrenergic receptor desensitization, internalization, and phosphorylation in response to full and partial agonists. *J Biol Chem* **1997**, 272, 23871-9.
- (58) Pfeiffer, R.; Kirsch, J.; Fahrenholz, F., Agonist and antagonist-dependent internalization of the human vasopressin V2 receptor. *Exp Cell Res* **1998**, 244, 327-39.

Anhang

1	Daten des Rezeptorbindungsexperimentes zu stabilen $V_{1b}R$ Zelllinien	91
2	Daten des Rezeptorbindungsexperimentes von SF-TAP V_2R und SF-TAP V_2L219	91
3	Daten des Rezeptorbindungsexperimentes von stabilen SF-TAP V_2R und SF-TAP V_2L219R Zelllinien	91
4	Daten des Rezeptorsättigungsexperimentes von $V_{1b}R$	92
5	Kompetitionsexperimentdaten von w24, w55 und w56 an $V_{1b}R$; n=3.....	92
6	Luciferase Assay Daten an V_2R	94
7	Luciferase Assay Daten an $V_{1a}R$	95
8	Luciferase Assay Daten an $V_{1b}R$	97
9	Luciferase Assay Daten an OTR	99
10	FACS Daten zu Pharmacochaperone	100
11	FACS Daten zu Efflux.....	101
12	FACS Daten zu Internalisierung	102

1 Daten des Rezeptorbindungsexperimentes zu stabilen V_{1b}R Zelllinien

Receptor_Zelllinie	3H-AVP	non-spec. AVP	cpm Werte	cpm Werte
V _{1b} -gfp_1a	0.5 nM		614	426,07
V _{1b} -gfp_1a	0.5 nM	1 µM	152	190,67
V _{1b} -gfp_2a	0.5 nM		448,4	495,33
V _{1b} -gfp_2a	0.5 nM	1 µM	200,33	120,67
V _{1b} -gfp_3a	0.5 nM		471,33	566,67
V _{1b} -gfp_3a	0.5 nM	1 µM	190	205,73
V _{1b} -gfp_1a	5 nM		3371,53	4285,8
V _{1b} -gfp_1a	5 nM	1 µM	1545,2	1458,07
V _{1b} -gfp_2a	5 nM		4259,67	3979,8
V _{1b} -gfp_2a	5 nM	1 µM	1842,33	1724,33
V _{1b} -gfp_3a	5 nM		3907,53	3792,2
V _{1b} -gfp_3a	5 nM	1 µM	1453,8	1687,8

2 Daten des Rezeptorbindungsexperimentes von SF-TAP V₂R und SF-TAP V₂L219

Receptor	3H-AVP	non-spec. AVP	cpm Werte	cpm Werte
SF-TAP wt	2.5 nM		2123,53	1751,4
SF-TAP wt	2.5 nM	1 µM	955,07	926,73
SF_TAP L219	2.5 nM		884,07	954,73
SF-TAP L219	2.5 nM	1 µM	845,07	840,47

3 Daten des Rezeptorbindungsexperimentes von stabilen SF-TAP V₂R und SF-TAP V₂L219R Zelllinien

Receptor_Zelllinie	3H-AVP	non-spec. AVP	cpm Werte	cpm Werte
	2 nM			24637,9
	2 nM			24706,9
	2 nM			23254,8
SF-TAP wt_B	2 nM		13226	12073,3
SF-TAP wt_B	2 nM	1 µM	303,67	312,13
SF-TAP wt_C	2 nM		438,07	395
SF-TAP wt_C	2 nM	1 µM	332,07	310,07
SF-TAP wt_D	2 nM		9290,27	8288,93
SF-TAP wt_D	2 nM	1 µM	273,33	288,07
SF-TAP wt_E	2 nM		306,4	325,8
SF-TAP wt_E	2 nM	1 µM	228,47	259
SF-TAP wt_H	2 nM		6900	7379,67
SF-TAP wt_H	2 nM	1 µM	225	224,4
SF-TAP L219_4	2 nM		211,27	224
SF-TAP L219_4	2 nM	1 µM	174,67	177,67

SF_TAP L219_6	2 nM		197,33	211,33
SF_TAP L219_6	2 nM	1 µM	157,67	163,67

4 Daten des Rezeptorsättigungsexperimentes von V_{1b}R

Rezeptor	3H-AVP	3H-AVP conc.final (nM)	non.spec. AVP	cpm Werte
HEK-V _{1b} R gfp	10 nM	11.14 nM		4317.40
Duplikat		11.14 nM		4222.87
HEK-V _{1b} R gfp		11.14 nM	1 µM	3180.47
Duplikat		11.14 nM	1 µM	3791.53
HEK-V _{1b} R gfp	3 nM	2.8 nM		1325.40
Duplikat		2.8 nM		1154.07
HEK-V _{1b} R gfp		2.8 nM	1 µM	899.73
Duplikat		2.8 nM	1 µM	1020.13
HEK-V _{1b} R gfp	1 nM	0.9 nM		536.33
Duplikat		0.9 nM		584.47
HEK-V _{1b} R gfp		0.9 nM	1 µM	372.33
Duplikat		0.9 nM	1 µM	361.33
HEK-V _{1b} R gfp	0.3 nM	0.24 nM		222.67
Duplikat		0.24 nM		251.67
HEK-V _{1b} R gfp		0.24 nM	1 µM	139.00
Duplikat		0.24 nM	1 µM	151.00
HEK-V _{1b} R gfp	0.1 nM	0.08 nM		86.00
Duplikat		0.08 nM		89.67
HEK-V _{1b} R gfp		0.08 nM	1 µM	58.67
Duplikat		0.08 nM	1 µM	61.80
HEK-V _{1b} R gfp	0.03 nM	0.02 nM		45.00
Duplikat		0.02 nM		45.00
HEK-V _{1b} R gfp		0.02 nM	1 µM	32.67
Duplikat		0.02 nM	1µM	27.33
HEK-V _{1b} R gfp	0.01 nM	0.007		42.13
Duplikat		0.007		35.73
HEK-V _{1b} R gfp		0.007	1 µM	38.40
Duplikat		0.007	1 µM	26.67

5 Konkurrenzexperimentdaten von w24, w55 und w56 an V_{1b}R; n=3

Peptid	Competing Peptide conc. [nM]	3H-AVP	non-spec. AVP	07.03.12	09.03.12	13.03.12
3H AVP total		1 nM		15719.0	16443.8	13578.5
"		1 nM		16235.8	16249.4	12687.6
"		1 nM		15894.6	16799.0	13340.7
w24	10000	1 nM		228.40	97.33	99.33
Duplikat		1 nM		188.07	83.00	91.67
w24		1 nM	1 µM	167.07	139.00	136.33
Duplikat		1 nM	1 µM	170.00	59.00	75.00
w24	1000	1 nM		265.47	119.67	132.00
Duplikat		1 nM		248.00	96.67	106.33
w24	100	1 nM		381.67	160.80	222.67
Duplikat		1 nM		415.33	163.07	235.00

w24	10	1 nM		556.33	425.87	400.67
Duplikat		1 nM		553.67	473.00	381.47
w24	3	1 nM		607.40	417.00	445.33
Duplikat		1 nM		648.33	474.33	380.00
w24	1	1 nM		619.87	5.47	392.67
Duplikat		1 nM		619.07	537.00	426.33
w24	0.3	1 nM		628.80	511.00	411.33
Duplikat		1 nM		581.67	433.40	408.40
w24	0	1 nM		916.67		
Duplikat		1 nM		758.07		
w55	3000	1 nM		210.07	96.00	109.67
Duplikat		1 nM		233.40	94.00	124.40
w55		1 nM	1 µM	178.40	85.73	74.00
Duplikat		1 nM	1 µM	177.00	117.07	85.33
w55	1000	1 nM		314.67	167.00	165.67
Duplikat		1 nM		302.67	162.33	158.07
w55	100	1 nM		477.07	366.73	377.00
Duplikat		1 nM		485.33	384.73	547.13
w55	10	1 nM		572.67	538.33	472.40
Duplikat		1 nM		623.13	521.33	97.00
w55	3	1 nM		674.00	514.67	463.00
Duplikat		1 nM		658.00	451.40	383.07
w55	1	1 nM		636.67	504.47	442.33
Duplikat		1 nM		540.67	532.00	457.67
w55	0.3	1 nM		648.73	568.13	392.00
Duplikat		1 nM		662.07	579.67	454.40
w56	10000	1 nM		192.73	130.00	89.00
Duplikat		1 nM		177.07	122.67	92.67
w56		1 nM	1 µM	168.67	97.00	96.40
Duplikat		1 nM	1 µM	145.00	90.67	98.73
w56	1000	1 nM		214.67	110.67	87.33
Duplikat		1 nM		225.73	120.67	475.07
w56	100	1 nM		365.07	196.00	163.67
Duplikat		1 nM		349.33	193.67	147.00
w56	10	1 nM		493.47	452.33	372.47
Duplikat		1 nM		528.00	415.33	324.00
w56	3	1 nM		638.67	471.67	433.67
Duplikat		1 nM		616.00	559.47	383.00
w56	1	1 nM		639.07	578.33	102.67
Duplikat		1 nM		647.07	348.33	86.40
w56	0.3	1 nM		548.00	584.13	471.33
Duplikat		1 nM		593.33	580.67	482.73

6 Luciferase Assay Daten an V₂R

30.01.2012

GFP-Marion (Counts)

AVP_10μM 215323	AVP_10μM 223310	AVP_10μM 223862	w24_10μM 219050	w24_10μM 227532	w24_10μM 235314	0	0	0	0	0	0
AVP_1μM 215590	AVP_1μM 214699	AVP_1μM 222940	w24_1μM 227028	w24_1μM 222351	w24_1μM 220033	0	0	0	0	0	0
AVP_100nM 218409	AVP_100nM 223059	AVP_100nM 228469	w24_100nM 221394	w24_100nM 213884	w24_100nM 220658	0	0	0	0	0	0
AVP_10nM 211998	AVP_10nM 221576	AVP_10nM 222335	w24_10nM 216871	w24_10nM 219717	w24_10nM 225833	0	0	0	0	0	0
AVP_3nM 215735	AVP_3nM 222939	AVP_3nM 225010	w24_3nM 221889	w24_3nM 222760	w24_3nM 224826	0	0	0	0	0	0
AVP_1nM 223901	AVP_1nM 220416	AVP_1nM 222144	w24_1nM 219066	w24_1nM 219904	w24_1nM 221224	0	0	0	0	0	0
AVP_0.3nM 229746	AVP_0.3nM 217784	AVP_0.3nM 217549	w24_0.3nM 216712	w24_0.3nM 215238	w24_0.3nM 217841	0	0	0	0	0	0
AVP_0.03nM 221135	AVP_0.03nM 231749	AVP_0.03nM 229008	w24_0.03 221106	w24_0.03nM 226296	w24_0.03nM 235159	0	0	0	0	0	0

Luciferase_Marion (CPS)

AVP_10μM 22258	AVP_10μM 24698	AVP_10μM 26455	w24_10μM 16771	w24_10μM 29161	w24_10μM 25638	0	0	0	0	0	0
AVP_1μM 24702	AVP_1μM 13880	AVP_1μM 18355	w24_1μM 22860	w24_1μM 19697	w24_1μM 21917	0	0	0	0	0	0
AVP_100nM 18910	AVP_100nM 17450	AVP_100nM 15102	w24_100nM 14071	w24_100nM 16087	w24_100nM 20546	0	0	0	0	0	0
AVP_10nM 13319	AVP_10nM 16592	AVP_10nM 18818	w24_10nM 20045	w24_10nM 21206	w24_10nM 16071	0	0	0	0	0	0
AVP_3nM 11622	AVP_3nM 10369	AVP_3nM 11151	w24_3nM 18003	w24_3nM 12604	w24_3nM 17449	0	0	0	0	0	0
AVP_1nM 12916	AVP_1nM 12209	AVP_1nM 12100	w24_1nM 11638	w24_1nM 14869	w24_1nM 11424	0	0	0	0	0	0
AVP_0.3nM 10961	AVP_0.3nM 12368	AVP_0.3nM 10170	w24_0.3nM 13074	w24_0.3nM 14905	w24_0.3nM 15992	0	0	0	0	0	0
AVP_0.03nM 6600	AVP_0.03nM 8353	AVP_0.03nM 7232	w24_0.03nM 7122	w24_0.03nM 7734	w24_0.03nM 8345	0	0	0	0	0	0

03.02.2012

Plattendesign

AVP 10μM	AVP 10μM	AVP 10μM	w24 10μM	w24 10μM	w24 10μM	w55 10μM	w55 10μM	w55 10μM	w56 10μM	w56 10μM	w56 10μM
AVP 1μM	AVP 1μM	AVP 1μM	w24 1μM	w24 1μM	w24 1μM	w55 1μM	w55 1μM	w55 1μM	w56 1μM	w56 1μM	w56 1μM
AVP 100nM	AVP 100nM	AVP 100nM	w24 100nM	w24 100nM	w24 100nM	w55 100nM	w55 100nM	w55 100nM	w56 100nM	w56 100nM	w56 100nM
AVP 10nM	AVP 10nM	AVP 10nM	w24 10nM	w24 10nM	w24 10nM	w55 10nM	w55 10nM	w55 10nM	w56 10nM	w56 10nM	w56 10nM
AVP 3nM	AVP 3nM	AVP 3nM	w24 3nM	w24 3nM	w24 3nM	w55 3nM	w55 3nM	w55 3nM	w56 3nM	w56 3nM	w56 3nM
AVP 1nM	AVP 1nM	AVP 1nM	w24 1nM	w24 1nM	w24 1nM	w55 1nM	w55 1nM	w55 1nM	w56 1nM	w56 1nM	w56 1nM
AVP 0.3nM	AVP 0.3nM	AVP 0.3nM	w24 0.3nM	w24 0.3nM	w24 0.3nM	w55 0.3nM	w55 0.3nM	w55 0.3nM	w56 0.3nM	w56 0.3nM	w56 0.3nM
AVP 0.03nM	AVP 0.03nM	AVP 0.03nM	w24 0.03nM	w24 0.03nM	w24 0.03nM	w55 0.03nM	w55 0.03nM	w55 0.03nM	w56 0.03nM	w56 0.03nM	w56 0.03nM

GFP-Marion (Counts)

216692	220669	219047	218984	223366	232901	233202	227590	228788	231719	234491	236052
216070	214574	219995	229233	220207	218002	220910	222486	225489	227643	224396	238110
217016	219185	225205	220385	213800	217660	217886	220371	224461	227858	227753	236197
216729	218623	220262	214634	216098	217344	215618	217883	218663	223764	230634	229967
214212	218354	214331	213077	215439	215678	217429	222366	218559	224549	227829	233097
226447	214791	215630	212527	215698	215047	218470	217307	221788	225467	229044	238980
225379	215025	212550	216156	216598	215472	217885	219865	224693	228508	230411	247568
225456	229401	225288	220480	219052	229434	226171	221204	227864	231913	241407	252958

Luciferase_Marion (CPS)

17574	17901	20064	21199	18892	16683	20596	16511	25903	16634	20170	19741
24043	19473	26442	21683	21983	21366	20552	15121	22293	24667	21169	24773
18732	19628	28030	21752	41506	29077	20537	21676	32060	17073	20735	24388
18680	18721	22288	17139	17710	26541	20143	16765	20001	17570	20170	27901
13062	17681	15437	20025	15802	16685	27644	22369	21652	26233	20239	24706
16867	13477	15532	14453	15080	16044	15574	16989	14794	20167	16583	19174
13048	13876	14847	17894	14339	10349	16795	15181	19888	20747	18572	16323
13888	13047	14127	11103	11741	10942	12561	12531	14673	14109	15818	15695

03.02.2012

GFP-Marion (Counts)

211494	215349	216863	216893	224856	237808	235996	230610	218952	225185	231290	234719
208878	213401	221601	229409	224198	221900	219065	224268	233171	228210	221798	232954
212963	221014	233786	224870	218977	219232	220016	222033	226461	234742	228022	232886
210319	218265	229420	219946	218018	219092	218828	219530	215249	230486	233243	228958
212666	222442	220538	218791	218552	217408	218460	219460	222779	223118	235204	232622
225555	226518	222428	217558	218889	220604	218321	224207	217837	218943	232459	244229
227608	219822	219817	220277	219008	215289	221438	220064	219643	220017	229042	253559
240165	228214	220793	223536	217170	224158	228351	223099	226666	228084	243713	253287

Luciferase Marion (CPS)

28525	19477	28987	19594	17821	21179	24759	21314	21928	16623	17498	16996
28318	27060	24097	25262	24375	20718	19261	19075	18660	18899	25455	25966
20963	26034	25852	31140	29344	28908	23131	20055	24584	27282	18408	23594
19514	23168	28825	20038	21213	25004	19696	30190	16349	24309	17531	19048
20643	19354	12609	19427	15714	9573	14244	18947	24016	19597	12502	20561
16752	15242	15836	15979	15520	19591	19091	18786	21501	13169	27199	20873
18489	13378	14744	14279	12339	16096	14873	19534	15319	23960	20886	19427
18442	13437	21923	17213	10646	10507	18267	19825	18343	17993	22582	16285

28.03.2012

Plattendesign

AVP 10 µM	AVP 10 µM	AVP 10 µM	w55 10 µM	w55 10 µM	w55 10 µM	w56 10 µM	w56 10 µM	w56 10 µM			
AVP 1 µM	AVP 1 µM	AVP 1 µM	w55 1 µM	w55 1 µM	w55 1 µM	w56 1 µM	w56 1 µM	w56 1 µM			
AVP 100 nM	AVP 100 nM	AVP 100 nM	w55 100 nM	w55 100 nM	w55 100 nM	w56 100 nM	w56 100 nM	w56 100 nM			
AVP 10 nM	AVP 10 nM	AVP 10 nM	w55 10 nM	w55 10 nM	w55 10 nM	w56 10 nM	w56 10 nM	w56 10 nM			
AVP 1 nM	AVP 1 nM	AVP 1 nM	w55 1 nM	w55 1 nM	w55 1 nM	w56 1 nM	w56 1 nM	w56 1 nM			
AVP 0.1 nM	AVP 0.1 nM	AVP 0.1 nM	w55 0.1 nM	w55 0.1 nM	w55 0.1 nM	w56 0.1 nM	w56 0.1 nM	w56 0.1 nM			
0 nM	0 nM	0 nM									

GFP-Marion (Counts)

183566	179553	178497	182582	188977	192171	192888	179342	181102	0	0	0
178928	182198	188864	188398	177210	178872	176096	181815	182616	0	0	0
189503	186325	187488	183988	175358	178237	183112	180011	182402	0	0	0
176525	183665	183825	178798	181246	180422	179199	180747	173754	0	0	0
177693	185309	188328	178465	178547	181273	177067	176246	178418	0	0	0
193664	176935	181451	180808	175483	178670	174680	173722	179290	0	0	0
193205	180130	178624	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Luciferase Marion (CPS)

115924	126705	98474	121875	135194	107865	105906	103583	101557	0	0	0
106918	116849	138714	126247	100395	109647	116823	127421	113773	0	0	0
109152	122112	124871	107504	126515	113657	108918	116122	123369	0	0	0
75626	97196	112983	104580	108359	100580	88602	121110	102961	0	0	0
78379	80547	87703	90125	116846	111165	136035	119273	106585	0	0	0
68902	73446	75897	91851	99058	99475	103285	110103	101961	0	0	0
48902	54463	57802	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

7 Luciferase Assay Daten an V_{1a}R

10.02.2012

Plattendesign

AVP 10 µM	AVP 10 µM	AVP 10 µM	w24 100 µM	w24 100 µM	w24 100 µM	w55 100 µM	w55 100 µM	w55 100 µM	w56 100 µM	w56 100 µM	w56 100 µM
AVP 1 µM	AVP 1 µM	AVP 1 µM	w24 30 µM	w24 30 µM	w24 30 µM	w55 30 µM	w55 30 µM	w55 30 µM	w56 30 µM	w56 30 µM	w56 30 µM
AVP 100 nM	AVP 100 nM	AVP 100 nM	w24 10 µM	w24 10 µM	w24 10 µM	w55 10 µM	w55 10 µM	w55 10 µM	w56 10 µM	w56 10 µM	w56 10 µM
AVP 10 nM	AVP 10 nM	AVP 10 nM	w24 3 µM	w24 3 µM	w24 3 µM	w55 3 µM	w55 3 µM	w55 3 µM	w56 3 µM	w56 3 µM	w56 3 µM
AVP	AVP	AVP	w24	w24	w24	w55	w55	w55	w56	w56	w56

3 nM	3 nM	3 nM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM
AVP	AVP	AVP	w24	w24	w24	w55	w55	w55	w56	w56	w56
1 nM	1 nM	1 nM	300 nM	300 nM	300 nM	300 nM	300 nM	300 nM	300 nM	300 nM	300 nM
AVP	AVP	AVP	w24	w24	w24	w55	w55	w55	w56	w56	w56
0.3 nM	0.3 nM	0.3 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM
AVP	AVP	AVP	w24	w24	w24	w55	w55	w55	w56	w56	w56
0.03 nM	0.03 nM	0.03 nM	30 nM	30 nM	30 nM	30 nM	30 nM	30 nM	30 nM	30 nM	30 nM

GFP-Marion (Counts)

314812	302346	287887	345407	331885	365131	383103	395493	401506	319865	356394	383925
326118	320969	297360	333814	338058	346489	356816	342161	351777	321505	349911	373455
344512	358969	346374	327503	348589	347261	314553	325020	323585	290598	335720	332663
329772	346702	338405	343016	335122	365441	295547	313898	319183	310570	352323	341024
316174	341705	322164	306289	329410	329689	296803	314605	301165	314867	325204	343551
302570	330779	336255	303853	311937	329722	296800	308316	310719	302910	318004	331027
300260	305799	315707	307869	299328	303279	288691	311270	306806	325297	309146	325326
296032	294565	322923	303182	312123	322392	316158	311460	276959	340525	328867	326000

Luciferae Marion (CPS)

2327	1307	3647	275	170	232	175	146	177	101	131	133
713	945	799	231	255	622	403	247	185	124	111	131
705	538	785	264	187	193	153	170	182	75	113	142
523	376	382	188	129	171	103	107	121	110	106	116
253	215	185	119	123	141	101	182	94	105	151	138
149	123	123	111	92	89	100	105	100	127	104	102
87	89	115	87	87	71	85	96	116	125	88	229
91	77	83	104	117	72	68	74	70	111	134	99

28.02.2012**Plattendesign**

AVP	AVP	AVP	w24	w24	w24	w55	w55	w55	w56	w56	w56
10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM
AVP	AVP	AVP	w24	w24	w24	w55	w55	w55	w56	w56	w56
1 µM	1 µM	1 µM	3 µM	3 µM	3 µM	3 µM	3 µM	3 µM	3 µM	3 µM	3 µM
AVP	AVP	AVP	w24	w24	w24	w55	w55	w55	w56	w56	w56
100 nM	100 nM	100 nM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM
AVP	AVP	AVP	w24	w24	w24	w55	w55	w55	w56	w56	w56
10 nM	10 nM	10 nM	300 nM	300 nM	300 nM	300 nM	300 nM	300 nM	300 nM	300 nM	300 nM
AVP	AVP	AVP	w24	w24	w24	w55	w55	w55	w56	w56	w56
3 nM	3 nM	3 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM
AVP	AVP	AVP	0 nM	0 nM	0 nM						
1 nM	1 nM	1 nM									
AVP	AVP	AVP									
0.3 nM	0.3 nM	0.3 nM									
AVP	AVP	AVP									
0.03 nM	0.03 nM	0.03 nM									

GFP-Marion (Counts)

280721	280879	269424	264443	296368	307172	268336	299247	281087	271362	310259	310421
274774	221820	256528	259675	280417	277247	268636	272424	279825	259760	286339	305210
296013	292631	273056	262921	256846	272926	260251	253806	248515	251525	257270	262947
258280	275232	259325	244204	218319	231517	253023	264144	267520	260585	293147	261571
269929	275715	276138	244549	263220	256310	256994	276176	255302	262538	269063	281413
259924	261877	270492	245672	218179	227140						
264549	259212	277353									
269142	271573	253231									

Luciferae Marion (CPS)

67121	66366	65774	9241	11087	9125	6744	9516	7506	5223	5350	5686
42562	26698	37092	7753	6125	8143	5336	5498	5717	3525	4324	4452
18851	22523	19698	5640	4898	5586	5310	5237	4287	4517	4474	4210
6606	6498	6446	3978	2904	3194	3395	3256	3553	4970	4794	5024
3786	4179	4207	2325	2701	2662	2743	2712	2480	3221	3429	3381
2861	2874	3353	2037	1646	2109						
2630	2282	2513									
2499	2697	2427									

16.03.2012**Plattendesign**

AVP	AVP	AVP	w24	w24	w24	w55	w55	w55	w56	w56	w56
10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM	10 µM
AVP	AVP	AVP	w24	w24	w24	w55	w55	w55	w56	w56	w56
1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM

AVP 100 nM	AVP 100 nM	AVP 100 nM	w24 100 nM	w24 100 nM	w24 100 nM	w55 100 nM	w55 100 nM	w55 100 nM	w56 100 nM	w56 100 nM	w56 100 nM
AVP 10 nM	AVP 10 nM	AVP 10 nM	w24 10 nM	w24 10 nM	w24 10 nM	w55 10 nM	w55 10 nM	w55 10 nM	w56 10 nM	w56 10 nM	w56 10 nM
AVP 1 nM	AVP 1 nM	AVP 1 nM	w24 1 nM	w24 1 nM	w24 1 nM	w55 1 nM	w55 1 nM	w55 1 nM	w56 1 nM	w56 1 nM	w56 1 nM
AVP 0.1 nM	AVP 0.1 nM	AVP 0.1 nM	w24 0.1 nM	w24 0.1 nM	w24 0.1 nM	w55 0.1 nM	w55 0.1 nM	w55 0.1 nM	w56 0.1 nM	w56 0.1 nM	w56 0.1 nM
0 nM	0 nM	0 nM									

GFP-Marion (Counts)

222238	221664	231019	302154	316898	331334	292918	281805	297643			
238809	232201	227692	278049	275822	261354	274476	267744	286634			
273537	267053	279619	266094	264673	259662	258432	254650	268743			
318886	295371	290327	258813	240241	260842	253394	249892	247875			
254914	244395	281696	253373	250122	218358	234981	258448	256350			
279225	278193	271993	251821	250221	267096	265909	237537	250180			
279345	258200	263981									

Luciferae Marion (CPS)

696	2989	1259	271	249	269	225	227	204			
554	1048	518	178	155	145	138	137	143			
398	416	315	139	114	105	123	105	109			
132	155	195	103	91	85	92	95	89			
85	90	93	84	81	83	83	80	85			
114	92	75	75	72	73	86	72	81			
76	70	67									

26.03.2012

GFP-Marion (Counts)

284000	285418	275182	270712	286328	282818	279903	286909	285326			
265602	267671	254634	258341	257406	268299	241705	261925	271117			
286917	289396	286675	261557	249741	266764	254042	256549	245520			
276163	276749	288297	237914	241350	243674	229316	242521	247064			
266443	249243	263300	237758	237275	236028	239127	246040	237052			
233163	243642	233095	236617	237130	249305	236690	247279	247193			
241341	245372	252197									

Luciferae Marion (CPS)

17189	22612	21161	8365	6302	3574	2150	3656	3973			
16979	20108	18382	2176	1785	1509	1554	1743	1468			
8280	7392	8113	1681	882	930	993	896	723			
2293	2576	2119	733	603	690	596	806	737			
960	793	993	579	617	662	649	634	635			
598	707	658	536	694	688	724	572	704			
460	613	677									

8 Luciferase Assay Daten an V_{1b}R

09.03.2012

Plattendesign

AVP 10 µM	AVP 10 µM	AVP 10 µM	w24 10 µM	w24 10 µM	w24 10 µM	w55 3 µM	w55 3 µM	w55 3 µM	w56 10 µM	w56 10 µM	w56 10 µM
AVP 1 µM	AVP 1 µM	AVP 1 µM	w24 1 µM	w24 1 µM	w24 1 µM	w55 1 µM	w55 1 µM	w55 1 µM	w56 1 µM	w56 1 µM	w56 1 µM
AVP 100 nM	AVP 100 nM	AVP 100 nM	w24 100 nM	w24 100 nM	w24 100 nM	w55 100 nM	w55 100 nM	w55 100 nM	w56 100 nM	w56 100 nM	w56 100 nM
AVP 10 nM	AVP 10 nM	AVP 10 nM	w24 10 nM	w24 10 nM	w24 10 nM	w55 10 nM	w55 10 nM	w55 10 nM	w56 10 nM	w56 10 nM	w56 10 nM
AVP 3 nM	AVP 3 nM	AVP 3 nM	w24 3 nM	w24 3 nM	w24 3 nM	w55 3 nM	w55 3 nM	w55 3 nM	w56 3 nM	w56 3 nM	w56 3 nM
AVP 1 nM	AVP 1 nM	AVP 1 nM	w24 1 nM	w24 1 nM	w24 1 nM	w55 1 nM	w55 1 nM	w55 1 nM	w56 1 nM	w56 1 nM	w56 1 nM

AVP 0.1 nM	AVP 0.1 nM	AVP 0.1 nM	w24 0.1 nM	w24 0.1 nM	w24 0.1 nM	w55 0.1 nM	w55 0.1 nM	w55 0.1 nM	w56 0.1 nM	w56 0.1 nM	w56 0.1 nM
0 nM	0 nM	0 nM									

GFP-Marion (Counts)

178161	177930	177804	181830	183156	194783	192015	189435	182771	186583	192823	192832
180569	173132	180375	191870	183068	179079	179451	188298	186791	186178	180642	188993
177759	179549	186482	179259	175736	175994	175501	177272	182838	188235	183476	189069
176419	175169	180288	172482	172131	177095	174841	173945	174356	182433	187154	184974
175068	180101	177572	173537	173330	172919	173845	173593	176161	176783	187754	186050
183864	178597	172538	170376	171340	173246	172766	173952	172554	175040	182448	194770
185950	175661	172429	172339	173038	169982	176800	174497	174437	175036	182507	200717
192223	185020	176858									

Luciferae Marion (CPS)

1409	1299	1228	1232	1271	1167	1109	859	1201	1592	1191	1058
1077	1172	1310	1064	1111	1140	1100	1048	1289	1194	1112	1305
1131	1134	1022	1119	793	840	943	974	990	1146	1069	1311
639	629	616	597	683	563	850	710	748	1487	1003	1184
538	539	556	520	623	544	574	542	599	729	1010	696
497	557	490	625	550	596	543	504	784	632	674	913
734	506	699	540	633	738	488	682	515	649	586	609
591	583	621									

15.03.2012

GFP-Marion (Counts)

178276	179417	178056	176722	185324	193649	190271	188530	181018	183230	189902	191799
175780	173572	177968	185745	182794	176144	178013	178911	187968	184053	181046	188861
176551	176395	185225	178474	174862	173777	175760	176894	179930	186362	182032	186042
174520	178360	180692	173076	172687	174081	173628	172314	174862	181540	185560	183516
177445	180300	174925	172036	171761	173049	173020	174988	176439	174586	187157	185044
184531	179117	173343	169900	171746	173998	172688	172965	170802	173553	180322	191343
184979	175946	171711	170612	171818	170302	173989	171810	171924	172773	180767	196347
193537	185123	177266									

Luciferae Marion (CPS)

633	854	760	623	752	844	2685	951	959	861	646	590
725	1135	852	598	703	714	651	574	777	793	765	841
607	707	801	604	605	484	715	729	551	621	678	582
484	418	444	478	462	441	420	532	493	613	837	725
349	432	432	341	316	430	409	507	438	539	760	553
332	285	324	310	425	329	339	316	400	434	444	586
329	271	293	368	321	424	280	338	322	369	356	510
225	220	307									

26.03.2012

Plattendesign

AVP 10 µM	AVP 10 µM	AVP 10 µM	w24 10 µM	w24 10 µM	w24 10 µM	w55 10 µM	w55 10 µM	w55 10 µM	w56 10 µM	w56 10 µM	w56 10 µM
AVP 1 µM	AVP 1 µM	AVP 1 µM	w24 1 µM	w24 1 µM	w24 1 µM	w55 1 µM	w55 1 µM	w55 1 µM	w56 1 µM	w56 1 µM	w56 1 µM
AVP 100 nM	AVP 100 nM	AVP 100 nM	w24 100 nM	w24 100 nM	w24 100 nM	w55 100 nM	w55 100 nM	w55 100 nM	w56 100 nM	w56 100 nM	w56 100 nM
AVP 10 nM	AVP 10 nM	AVP 10 nM	w24 10 nM	w24 10 nM	w24 10 nM	w55 10 nM	w55 10 nM	w55 10 nM	w56 10 nM	w56 10 nM	w56 10 nM
AVP 1 nM	AVP 1 nM	AVP 1 nM	w24 1 nM	w24 1 nM	w24 1 nM	w55 1 nM	w55 1 nM	w55 1 nM	w56 1 nM	w56 1 nM	w56 1 nM
AVP 0.1 nM	AVP 0.1 nM	AVP 0.1 nM	w24 0.1 nM	w24 0.1 nM	w24 0.1 nM	w55 0.1 nM	w55 0.1 nM	w55 0.1 nM	w56 0.1 nM	w56 0.1 nM	w56 0.1 nM
0 nM	0 nM	0 nM									

GFP-Marion (Counts)

168919	169362	170738	169158	174284	182795	179813	178993	170687	172043	175846	180935
169728	166222	170017	177068	172180	168645	167433	171042	177001	171710	167894	177487
168229	167314	174600	168435	166217	166451	165644	168360	170546	176519	171565	176228
165146	166504	171085	163866	163483	166150	164735	163428	163585	170243	172398	173164
165253	167837	165296	162298	162682	163149	162826	162087	164733	163736	173450	171465
173835	168840	163695	159507	160832	160791	161503	161716	160047	162095	169056	178031
176134	168081	161015									

Luciferae Marion (CPS)

524	423	369	363	433	372	440	225	217	277	404	234
282	271	264	231	267	318	282	345	221	237	315	340
191	209	177	172	166	203	298	231	190	186	200	248

188	127	143	107	107	132	119	181	150	194	166	195
96	98	97	114	110	104	107	105	139	100	127	125
88	96	97	99	93	89	92	81	82	124	96	166
76	77	91									

9 Luciferase Assay Daten an OTR

23.01.2012

Plattendesign

OT 10 µM	OT 10 µM	OT 10 µM	w24 100 µM	w24 100 µM	w24 100 µM	w55 100 µM	w55 100 µM	w55 100 µM	w56 100 µM	w56 100 µM	w56 100 µM
OT 1 µM	OT 1 µM	OT 1 µM	w24 30 µM	w24 30 µM	w24 30 µM	w55 30 µM	w55 30 µM	w55 30 µM	w56 30 µM	w56 30 µM	w56 30 µM
OT 100 nM	OT 100 nM	OT 100 nM	w24 10 µM	w24 10 µM	w24 10 µM	w55 10 µM	w55 10 µM	w55 10 µM	w56 10 µM	w56 10 µM	w56 10 µM
OT 10 nM	OT 10 nM	OT 10 nM	w24 3 µM	w24 3 µM	w24 3 µM	w55 3 µM	w55 3 µM	w55 3 µM	w56 3 µM	w56 3 µM	w56 3 µM
OT 3 nM	OT 3 nM	OT 3 nM	w24 1 µM	w24 1 µM	w24 1 µM	w55 1 µM	w55 1 µM	w55 1 µM	w56 1 µM	w56 1 µM	w56 1 µM
OT 1 nM	OT 1 nM	OT 1 nM	w24 300 nM	w24 300 nM	w24 300 nM	w55 300 nM	w55 300 nM	w55 300 nM	w56 300 nM	w56 300 nM	w56 300 nM
OT 0.3 nM	OT 0.3 nM	OT 0.3 nM	w24 100 nM	w24 100 nM	w24 100 nM	w55 100 nM	w55 100 nM	w55 100 nM	w56 100 nM	w56 100 nM	w56 100 nM
OT 0.03 nM	OT 0.03 nM	OT 0.03 nM	w24 30 nM	w24 30 nM	w24 30 nM	w55 30 nM	w55 30 nM	w55 30 nM	w56 30 nM	w56 30 nM	w56 30 nM

GFP-Marion (Counts)

282940	282627	275614	248230	256065	262026	268758	283264	301304	289728	289799	280402
275225	271458	273200	256635	264826	277675	291106	289993	281725	280293	275389	287784
271122	273343	267985	252498	271665	286113	280206	277103	280343	262302	279526	293124
269969	281370	281519	248496	269197	281385	271219	264207	279351	280785	280856	286802
267867	276835	281980	254892	277386	273752	275684	278687	281080	273930	281479	290282
277140	280918	282682	267832	278713	275495	271710	276466	279684	283290	283651	284912
273369	275495	282999	275650	271154	273983	274296	267190	282148	282586	284974	286583
271939	284746	295465	284808	284579	280990	275830	281671	286983	287669	280623	286770

Luciferae Marion (CPS)

1939	1503	1298	1169	736	886	882	1118	927	834	1062	671
1088	1217	1579	1762	1054	1778	936	1942	1650	993	1165	727
1073	1389	858	964	1368	1013	894	2975	856	835	747	1202
940	909	1094	806	1435	1236	690	551	819	1137	830	845
837	791	640	1090	659	789	833	668	592	587	831	1041
628	478	670	744	550	799	598	487	525	544	485	707
422	401	396	582	477	504	393	395	498	1072	666	603
329	291	455	522	688	624	400	521	514	518	638	585

28.01.2012

Plattendesign

OT 10 µM	OT 10 µM	OT 10 µM	w24 10 µM	w24 10 µM	w24 10 µM	w55 10 µM	w55 10 µM	w55 10 µM	w56 10 µM	w56 10 µM	w56 10 µM
OT 1 µM	OT 1 µM	OT 1 µM	w24 3 µM	w24 3 µM	w24 3 µM	w55 3 µM	w55 3 µM	w55 3 µM	w56 3 µM	w56 3 µM	w56 3 µM
OT 100 nM	OT 100 nM	OT 100 nM	w24 1 µM	w24 1 µM	w24 1 µM	w55 1 µM	w55 1 µM	w55 1 µM	w56 1 µM	w56 1 µM	w56 1 µM
OT 10 nM	OT 10 nM	OT 10 nM	w24 300 nM	w24 300 nM	w24 300 nM	w55 300 nM	w55 300 nM	w55 300 nM	w56 300 nM	w56 300 nM	w56 300 nM
OT 3 nM	OT 3 nM	OT 3 nM	w24 100 nM	w24 100 nM	w24 100 nM	w55 100 nM	w55 100 nM	w55 100 nM	w56 100 nM	w56 100 nM	w56 100 nM
OT 1 nM	OT 1 nM	OT 1 nM	0 nM	0 nM	0 nM						
OT 0.3 nM	OT 0.3 nM	OT 0.3 nM									
OT 0.03 nM	OT 0.03 nM	OT 0.03 nM									

GFP-Marion (Counts)

207514	211499	211860	208876	215525	227055	226488	220428	217983	221217	229313	229108
209059	205679	209817	213798	215081	209079	212234	216159	218305	217900	217431	229099
208516	211151	214105	209644	208264	209141	210471	213081	216258	220827	220273	230143
205997	207653	208690	206114	205924	209352	208839	209952	213064	217575	224111	224716
207596	209305	208701	207007	209397	210835	209901	210290	214227	215979	221893	224763
217111	208851	209367	206078	206289	207285						
219489	210090	209458									

216096	220607	216866									
Luciferae Marion (CPS)											
1866	1648	2172	1291	1360	1452	1379	1740	2067	1494	1395	1080
2494	2972	1856	1369	1659	1367	1415	1435	2700	1131	1182	1684
1968	2680	2236	1393	1861	1516	1512	1501	1330	1365	1212	1768
1905	1650	2119	1206	1758	1029	1455	1291	1076	1117	1450	1372
1892	1426	1323	1576	1416	1600	1046	1152	1177	1147	1366	1366
1065	1286	1318	962	941	1025						
1558	1629	2004									
1236	1247	1241									

03.04.2012

Plattendesign

OT 10 µM	OT 10 µM	OT 10 µM	w24 10 µM	w24 10 µM	w24 10 µM	w55 10 µM	w55 10 µM	w55 10 µM	w56 10 µM	w56 10 µM	w56 10 µM
OT 1 µM	OT 1 µM	OT 1 µM	w24 1 µM	w24 1 µM	w24 1 µM	w55 1 µM	w55 1 µM	w55 1 µM	w56 1 µM	w56 1 µM	w56 1 µM
OT 100 nM	OT 100 nM	OT 100 nM	w24 100 nM	w24 100 nM	w24 100 nM	w55 100 nM	w55 100 nM	w55 100 nM	w56 100 nM	w56 100 nM	w56 100 nM
OT 10 nM	OT 10 nM	OT 10 nM	w24 10 nM	w24 10 nM	w24 10 nM	w55 10 nM	w55 10 nM	w55 10 nM	w56 10 nM	w56 10 nM	w56 10 nM
OT 3 nM	OT 3 nM	OT 3 nM	w24 3 nM	w24 3 nM	w24 3 nM	w55 3 nM	w55 3 nM	w55 3 nM	w56 3 nM	w56 3 nM	w56 3 nM
OT 1 nM	OT 1 nM	OT 1 nM	w24 1 nM	w24 1 nM	w24 1 nM	w55 1 nM	w55 1 nM	w55 1 nM	w56 1 nM	w56 1 nM	w56 1 nM
OT 0.1 nM	OT 0.1 nM	OT 0.1 nM	w24 0.1 nM	w24 0.1 nM	w24 0.1 nM	w55 0.1 nM	w55 0.1 nM	w55 0.1 nM	w56 0.1 nM	w56 0.1 nM	w56 0.1 nM
OT 0.03 nM	OT 0.03 nM	OT 0.03 nM	w24 0.03 nM	w24 0.03 nM	w24 0.03 nM	w55 0.03 nM	w55 0.03 nM	w55 0.03 nM	w56 0.03 nM	w56 0.03 nM	w56 0.03 nM

GFP-Marion (Counts)

189384	184982	181336	178715	178510	181166	182134	178758	180825	183455	189722	193041
189523	176093	169216	175166	173498	172932	176603	173528	178231	176992	183791	197047
181242	177488	172777	172387	176633	178630	176299	176775	179643	181923	182570	189842
178296	177525	172088	173968	169984	174607	171949	172876	173949	180413	187749	182947
177776	174648	174540	169630	175561	170952	175309	176540	173858	177914	176311	179223
178990	174716	175541	174132	170298	170293	169508	171520	174442	176706	173765	184738
177074	166140	170899	176221	172892	169138	164831	173429	175462	172522	174080	175676
179051	176986	174641	170044	178047	181979	183465	177217	174629	177204	177414	181733

Luciferae Marion (CPS)

615	722	752	379	476	445	1946	931	426	509	343	358
728	749	514	594	338	422	355	797	578	293	286	376
986	419	591	306	287	209	305	246	269	220	229	286
755	644	454	226	168	149	195	232	214	227	245	253
1155	515	315	189	265	163	192	313	191	221	189	199
400	481	345	145	143	212	151	142	138	164	230	246
236	179	251	155	144	171	159	246	170	139	222	150
215	214	184	115	162	148	159	199	679	191	172	207

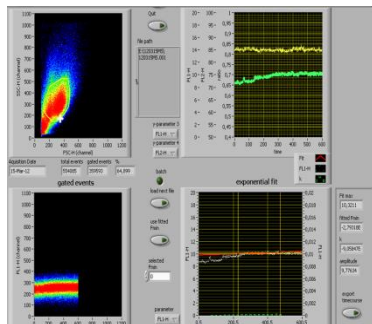
10 FACS Daten zu Pharmacochaperone

AVPR2-Konstrukt	Substanz	Konz. [nM]	MFU/FL1-H	MFU/FL1-H
WT-GFP	-	-	22,71	22,14
WT-GFP	28°C	-	70,26	62,88
WT-GFP	DMSO	-	30,93	28,67
WT-GFP	Tolvaptan	10	25,58	30,70
WT-GFP	Tolvaptan	100	28,20	30,14
WT-GFP	Tolvaptan	300	33,76	34,84
WT-GFP	Tolvaptan	1000	32,21	29,16
WT-GFP	w24	10	24,24	25,66
WT-GFP	w24	100	22,74	18,67
WT-GFP	w24	300	22,60	25,45
WT-GFP	w24	1000	23,28	21,05
WT-GFP	w55	10	24,54	28,20
WT-GFP	w55	100	23,10	21,84
WT-GFP	w55	300	23,64	24,15
WT-GFP	w55	1000	21,44	21,74
WT-GFP	w56	10	22,27	23,41
WT-GFP	w56	100	20,33	19,33
WT-GFP	w56	300	20,22	23,16
WT-GFP	w56	1000	21,26	21,83
L219R-GFP	-	-	4,55	5,13
L219R-GFP	28°C	-	16,88	18,13

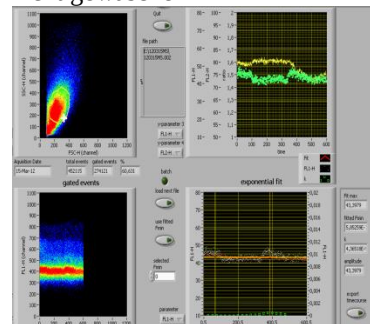
L219R-GFP	DMSO	-	6,08	5,64
L219R-GFP	Tolvaptan	10	6,28	7,90
L219R-GFP	Tolvaptan	100	5,45	6,48
L219R-GFP	Tolvaptan	300	6,02	5,79
L219R-GFP	Tolvaptan	1000	6,42	6,04
L219R-GFP	w24	10	5,22	5,00
L219R-GFP	w24	100	4,55	4,56
L219R-GFP	w24	300	4,78	3,94
L219R-GFP	w24	1000	5,04	5,05
L219R-GFP	w55	10	4,26	3,94
L219R-GFP	w55	100	4,01	#WERT!
L219R-GFP	w55	300	4,41	4,50
L219R-GFP	w55	1000	5,02	4,38
L219R-GFP	w56	10	4,33	4,67
L219R-GFP	w56	100	4,26	4,47
L219R-GFP	w56	300	4,39	4,35
L219R-GFP	w56	1000	5,03	4,03

11 FACS Daten zu Efflux

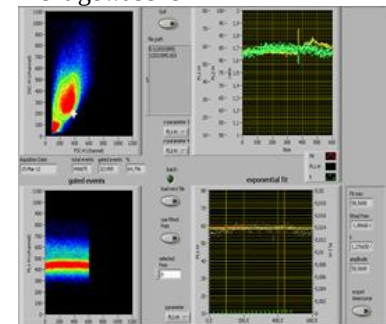
unbehandelt



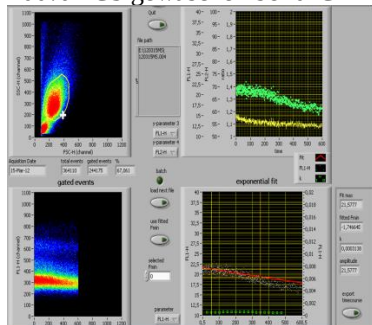
1 μM Peptid; pH=6.0;
nicht gewaschen



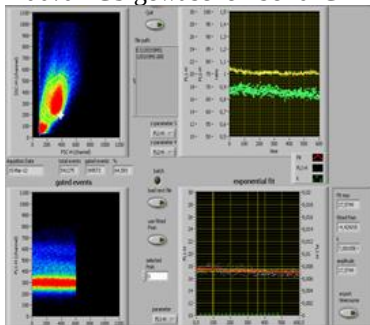
1 μM Peptid; pH=7.4;
nicht gewaschen



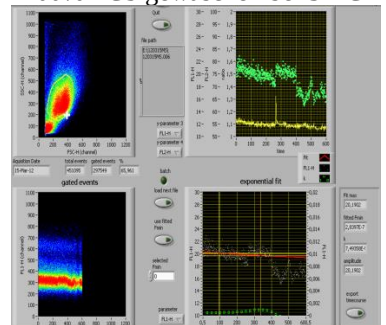
1 μM Peptid; pH=6.0; 2x mit
100% FCS gewaschen bei 0°C



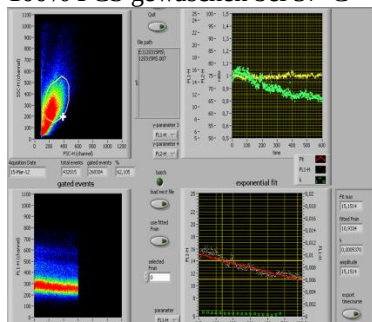
1 μM Peptid; pH=7.4; 2x mit
100% FCS gewaschen bei 0°C



1 μM Peptid; pH=6.0; 2x mit
100% FCS gewaschen bei 37°C

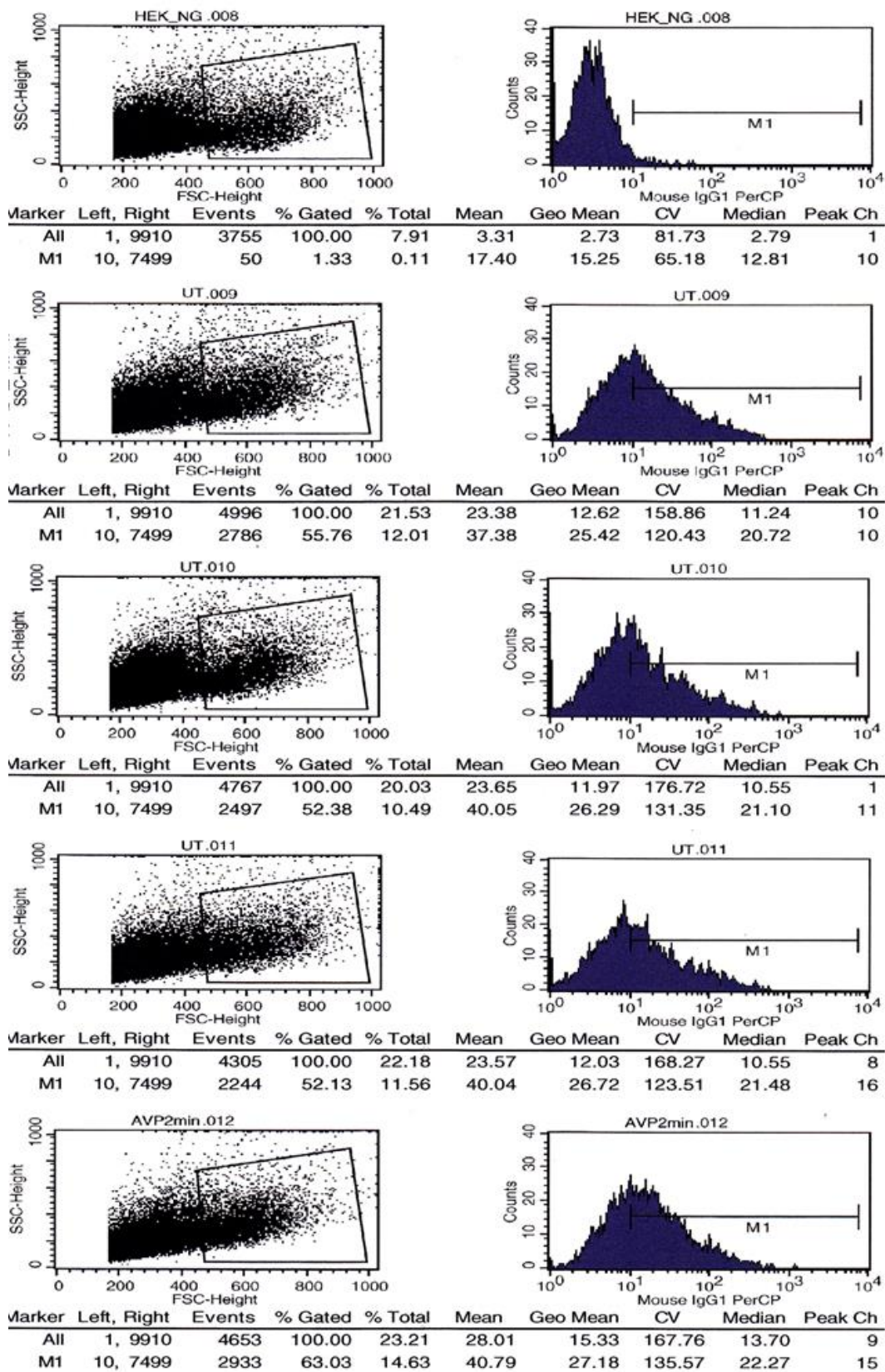


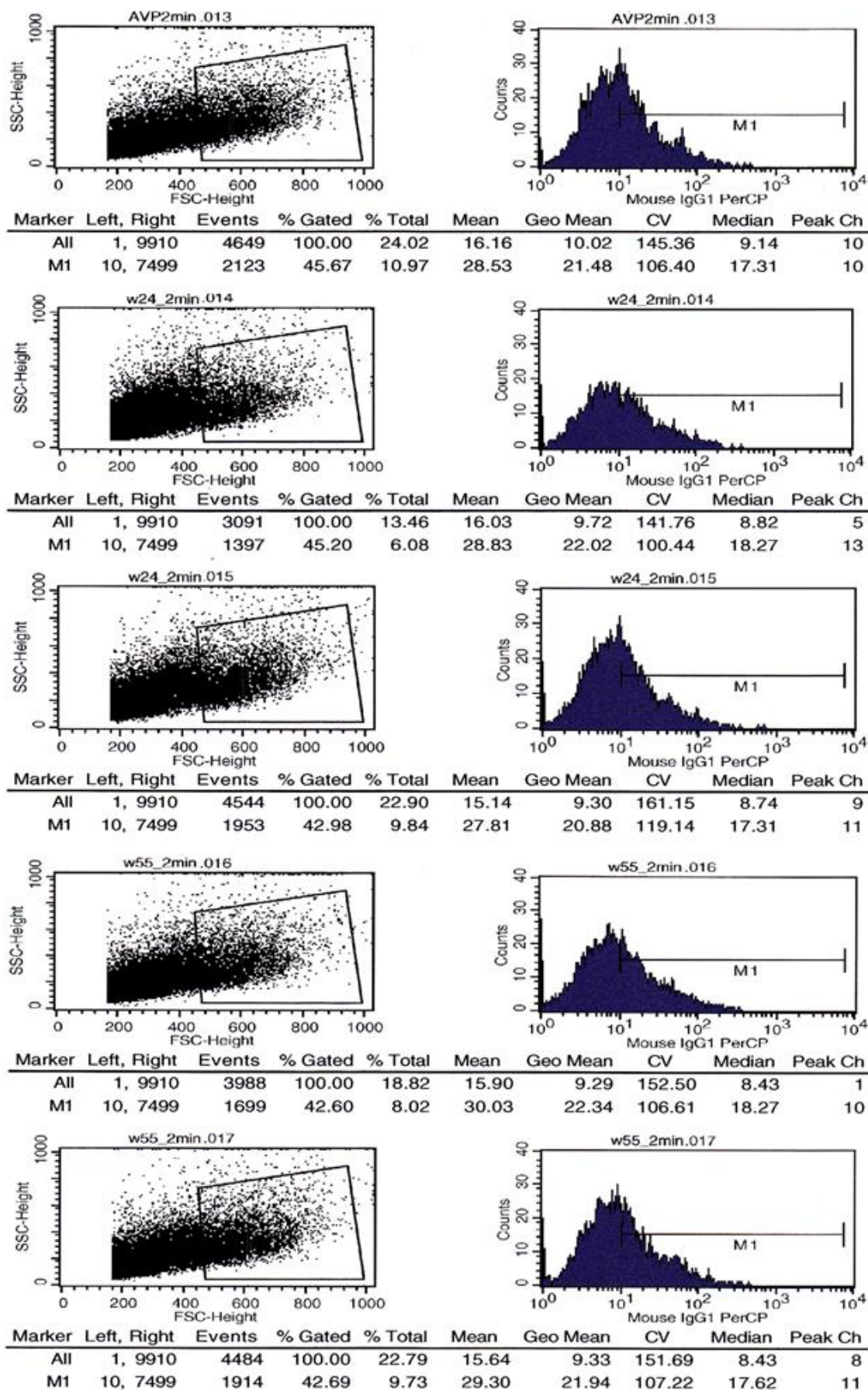
1 μM Peptid; pH=7.4; 2x mit
100% FCS gewaschen bei 37°C

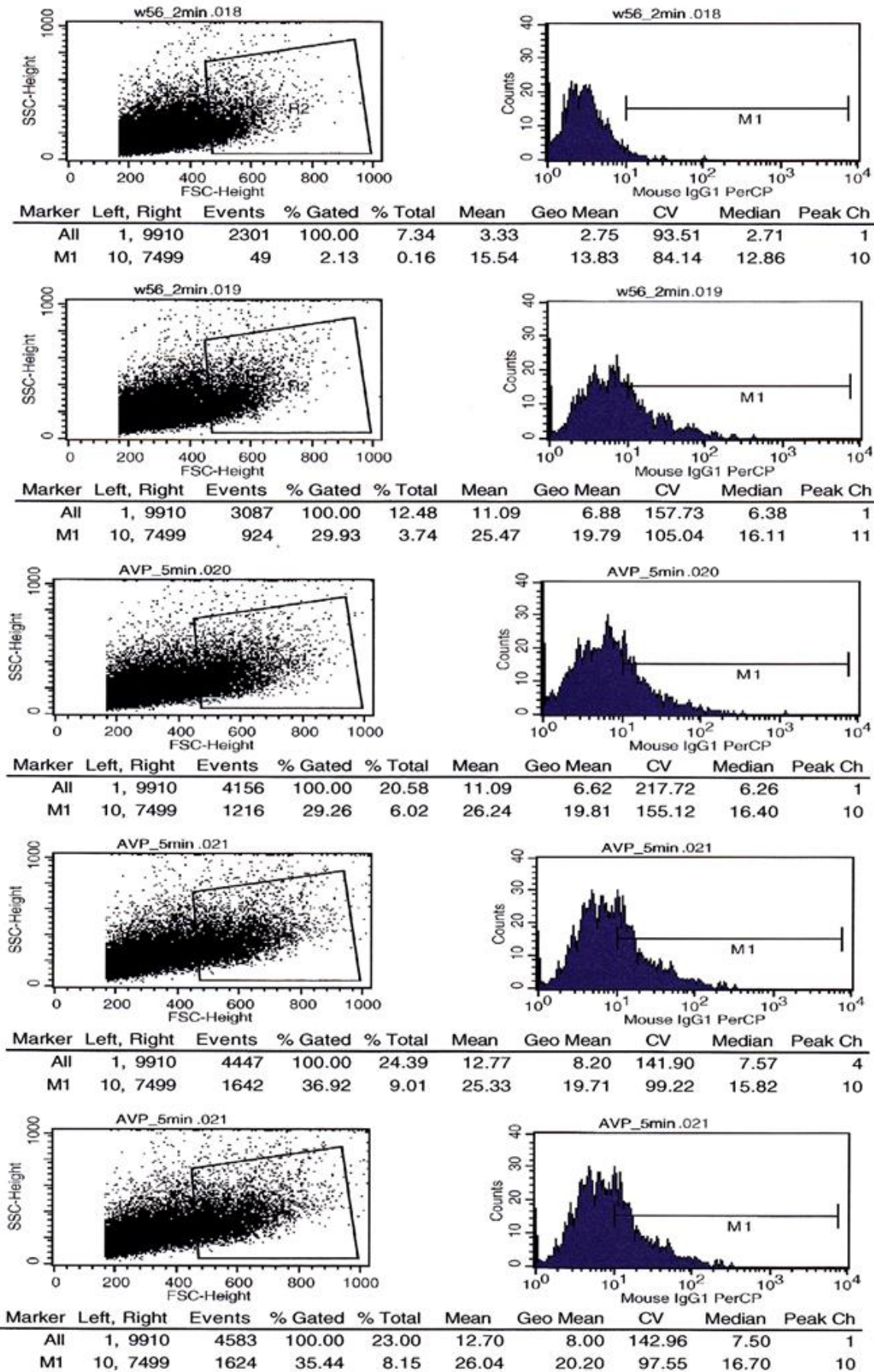


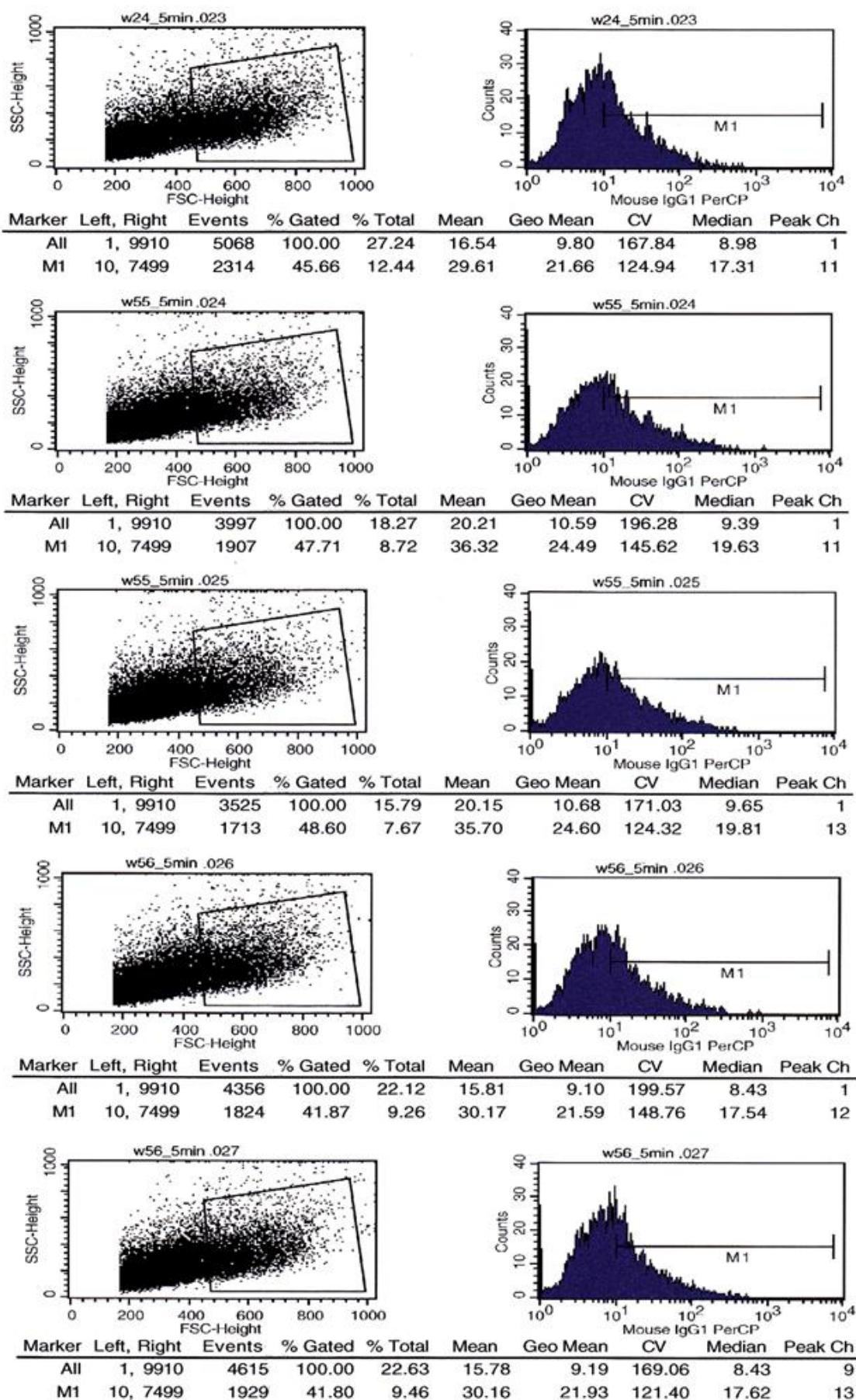
12 FACS Daten zu Internalisierung

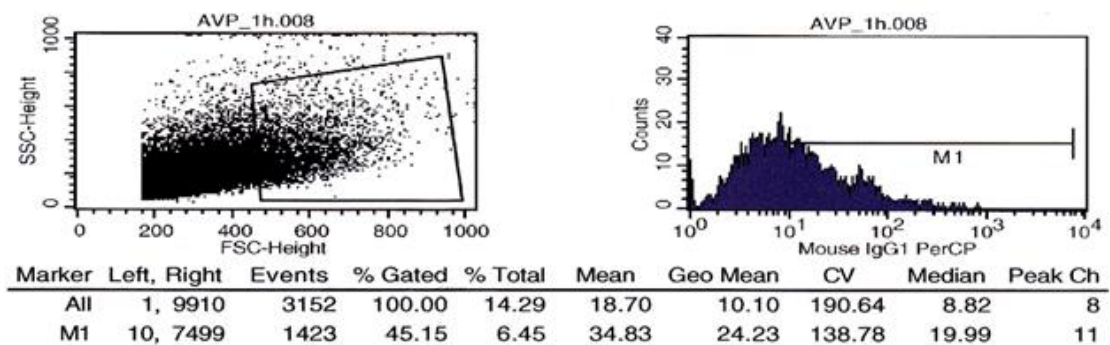
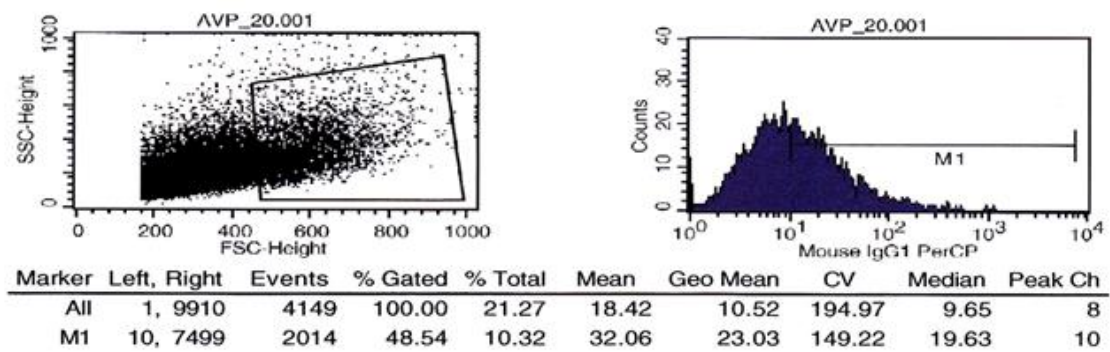
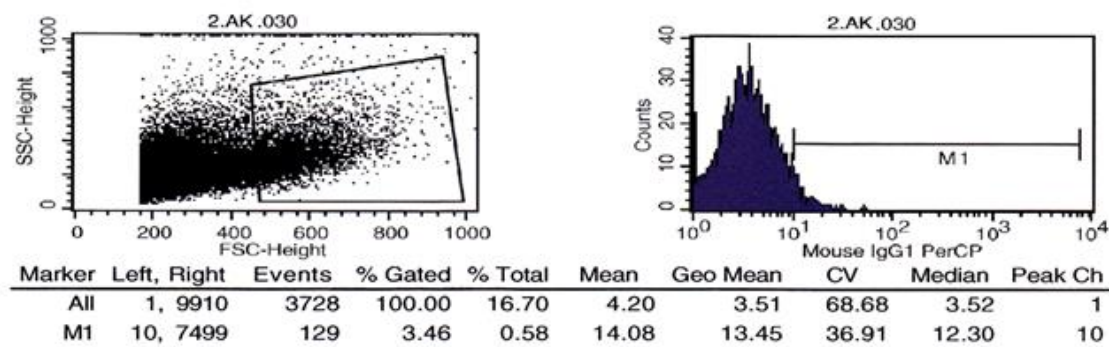
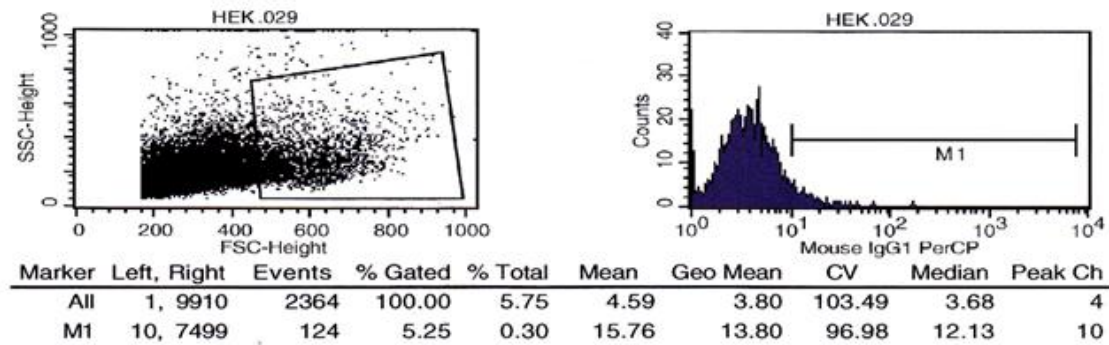
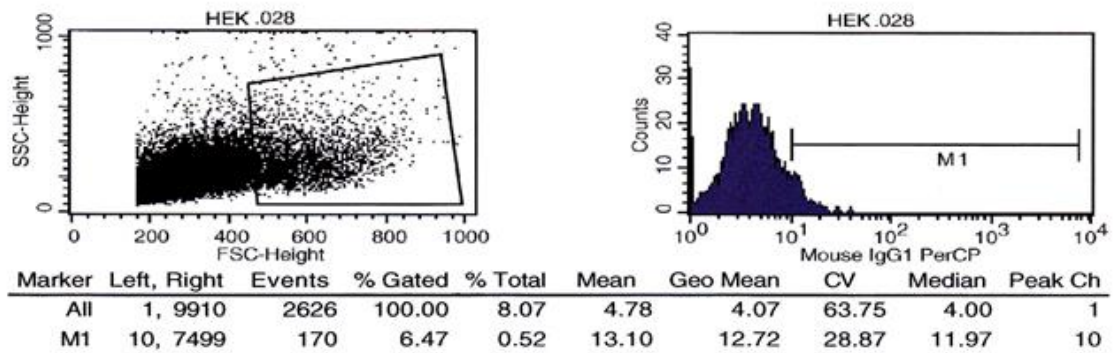
24.05.2012

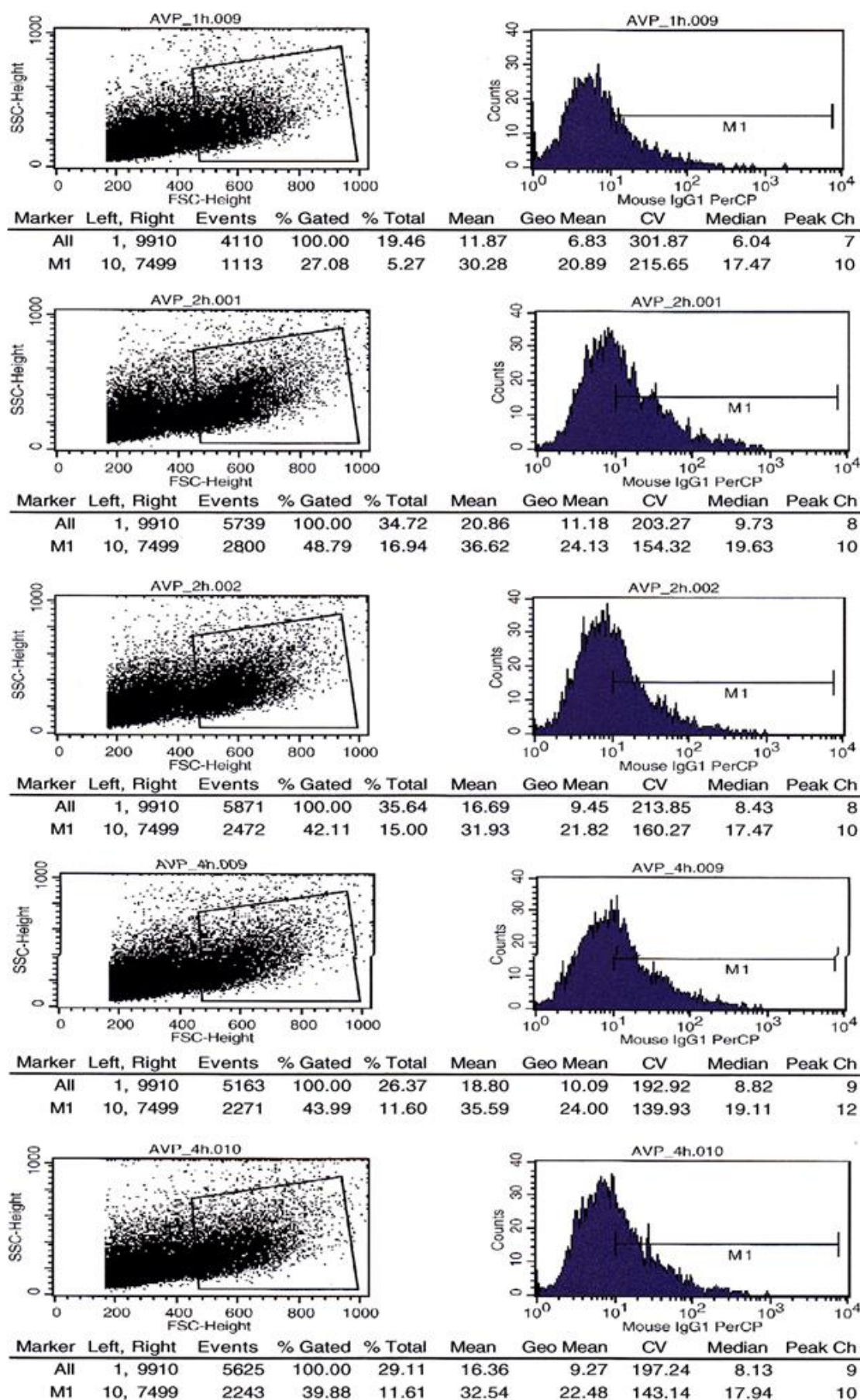


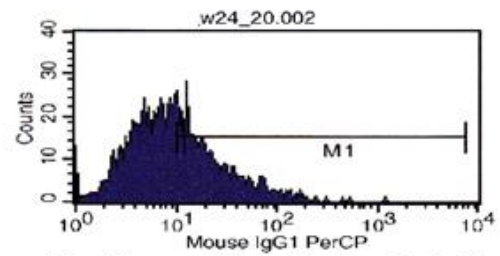
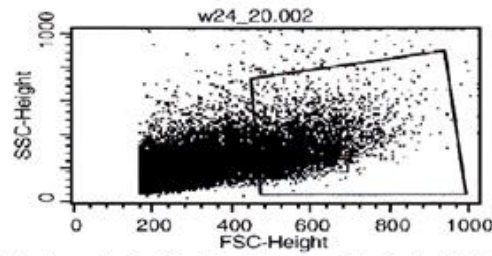




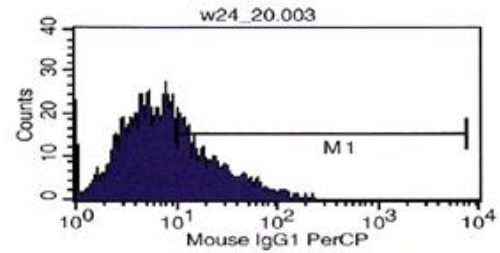
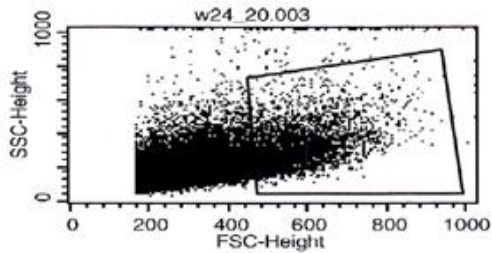




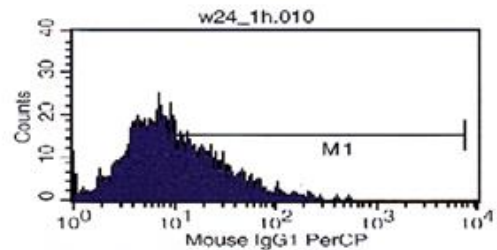
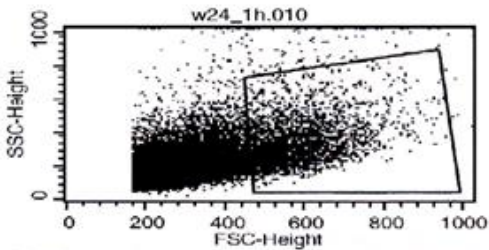




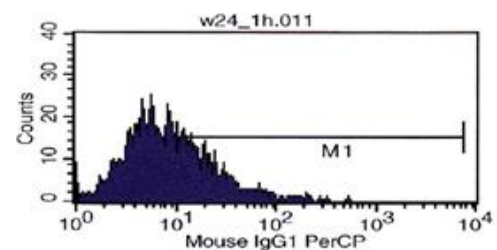
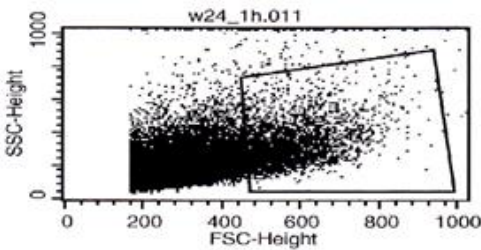
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	3945	100.00	18.92	14.98	8.99	191.95	8.28	12
M1	10, 7499	1609	40.79	7.72	28.82	21.50	143.01	17.94	12



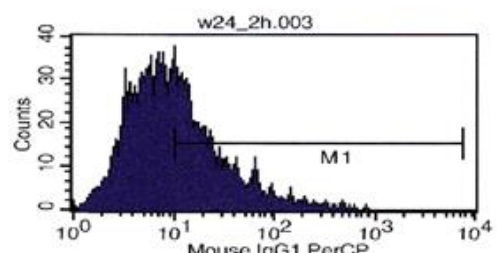
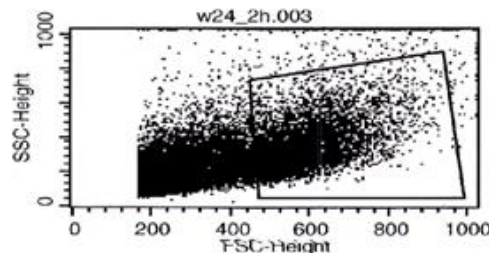
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	3787	100.00	16.99	11.83	7.46	140.23	6.85	7
M1	10, 7499	1270	33.54	5.70	25.20	20.01	92.42	16.85	10



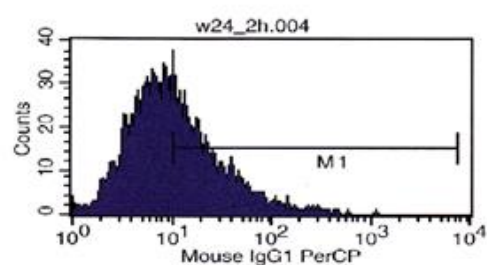
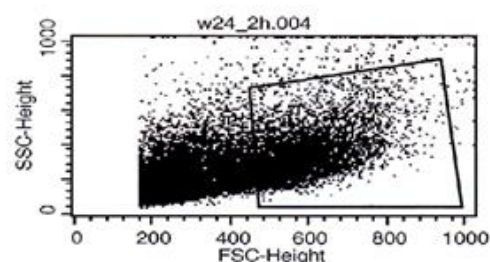
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	3309	100.00	14.60	15.06	9.07	156.78	7.91	6
M1	10, 7499	1323	39.98	5.84	29.47	22.51	109.50	19.63	11



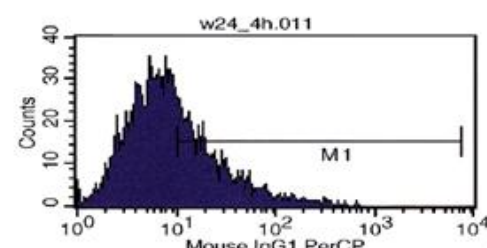
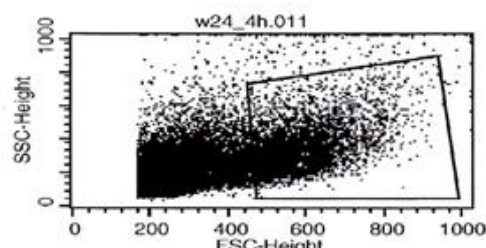
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	3154	100.00	12.69	12.82	8.09	160.38	7.30	5
M1	10, 7499	1160	36.78	4.67	25.80	20.07	114.61	16.70	11



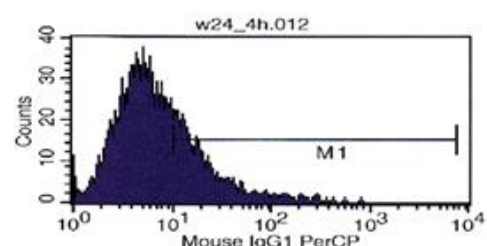
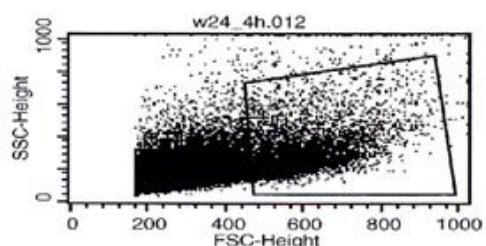
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	6113	100.00	35.10	16.05	9.38	193.70	8.51	9
M1	10, 7499	2612	42.73	15.00	30.11	21.37	145.22	17.47	10



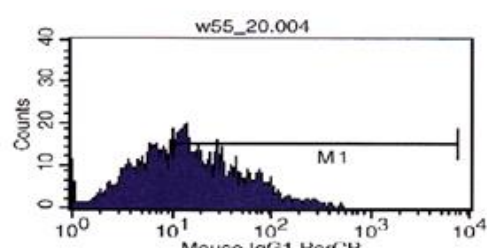
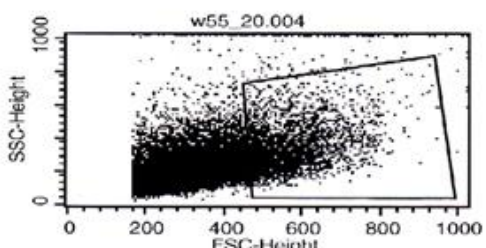
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	5655	100.00	31.30	16.76	9.84	192.32	8.82		9
M1	10, 7499	2485	43.94	13.76	30.85	22.03	145.09	18.27		10



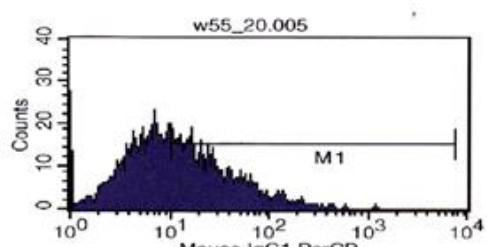
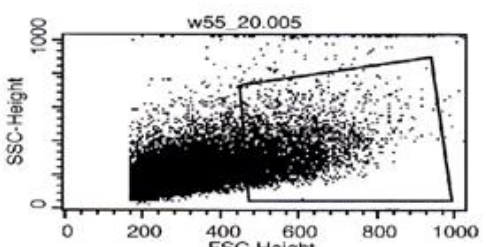
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	5162	100.00	25.52	13.26	8.06	189.29	7.30		5
M1	10, 7499	1788	34.64	8.84	28.04	20.37	136.95	16.70		10



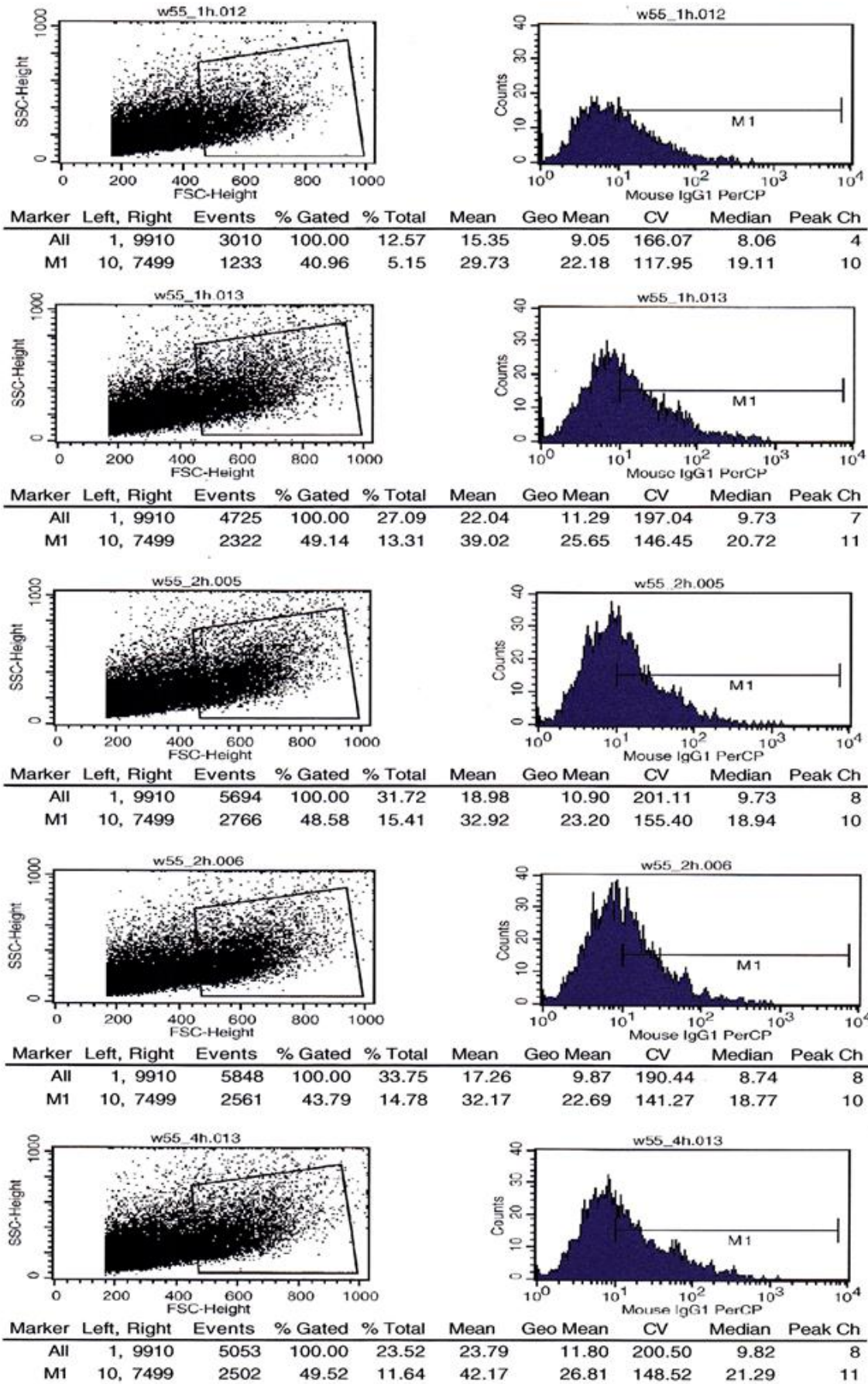
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	5088	100.00	18.20	10.95	6.51	230.36	5.78		5
M1	10, 7499	1341	26.36	4.80	27.87	19.46	160.97	15.96		10

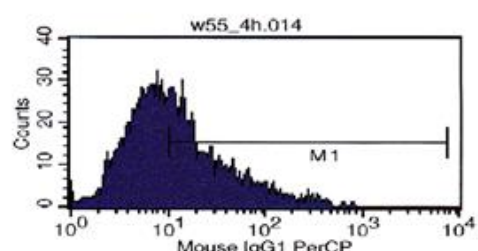
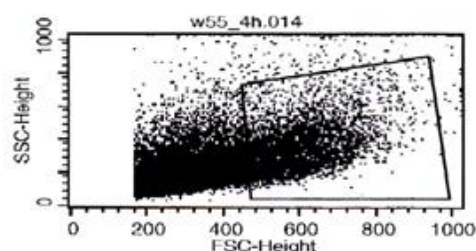


Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	3068	100.00	14.40	25.17	13.63	150.61	12.52		13
M1	10, 7499	1816	59.19	8.52	38.62	26.85	115.21	22.27		13

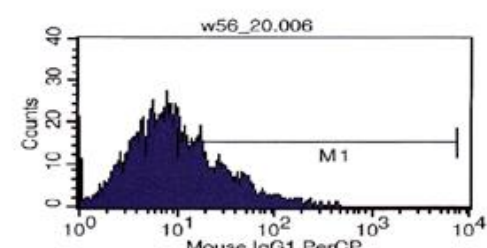
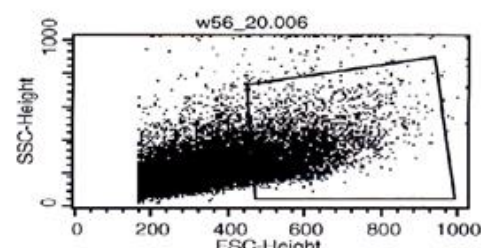


Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	3538	100.00	16.28	20.63	11.03	184.63	9.82		1
M1	10, 7499	1750	49.46	8.05	36.06	25.08	137.44	20.72		10

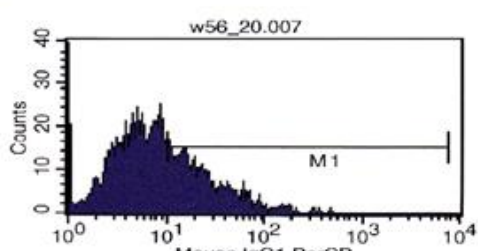
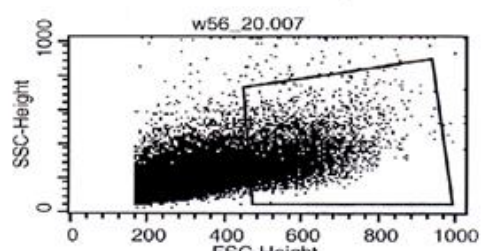




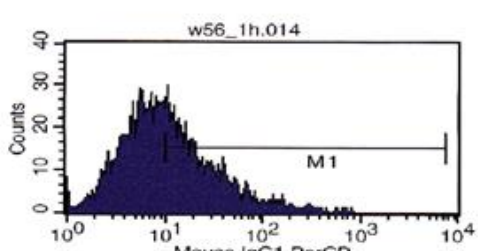
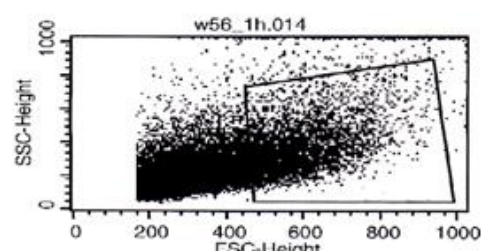
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	5272	100.00	24.62	21.25	10.86	204.18	9.22		7
M1	10, 7499	2465	46.76	11.51	38.96	24.95	150.39	19.28		13



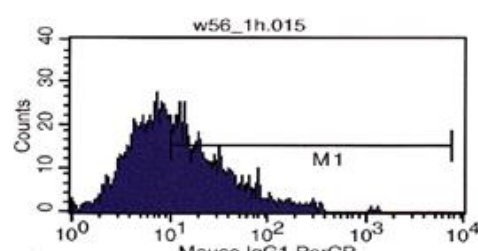
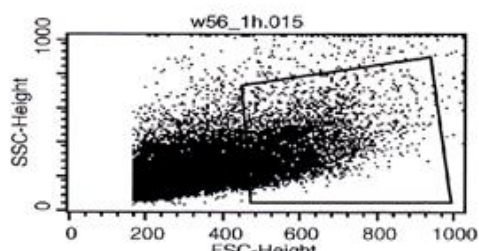
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	4013	100.00	19.37	15.66	9.12	166.63	8.20		7
M1	10, 7499	1643	40.94	7.93	30.40	22.49	117.98	18.94		10



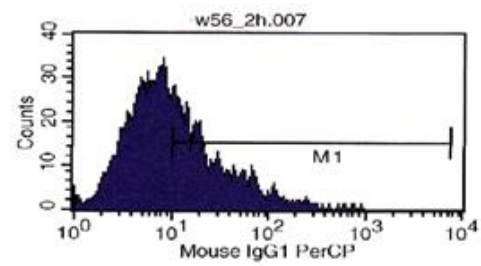
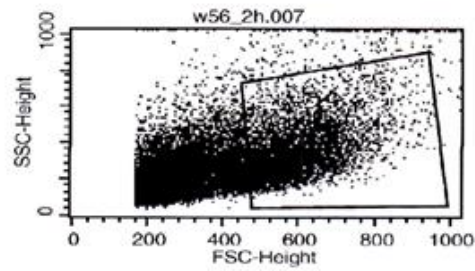
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	3747	100.00	17.05	13.08	7.94	167.28	7.30		1
M1	10, 7499	1345	35.90	6.12	27.19	20.90	117.11	17.78		10



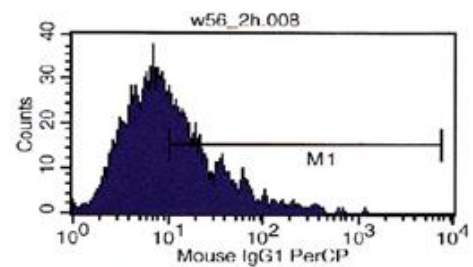
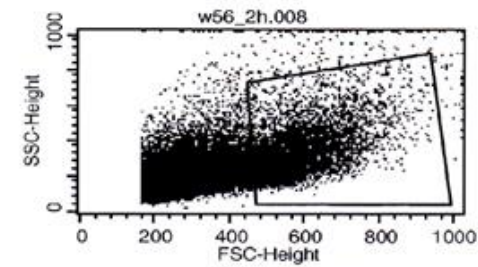
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	4606	100.00	25.15	18.93	10.18	207.60	8.90		10
M1	10, 7499	2083	45.22	11.37	35.07	23.39	154.46	18.94		10



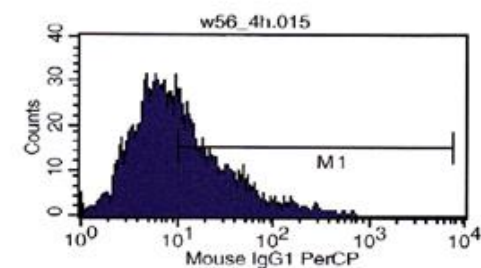
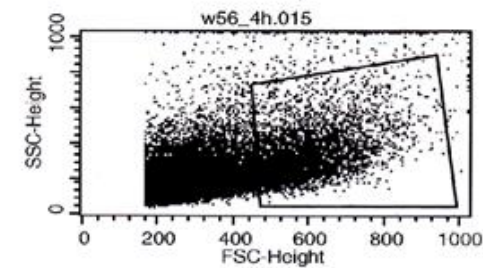
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	4155	100.00	22.36	19.53	10.69	204.15	9.31		7
M1	10, 7499	1936	46.59	10.42	35.35	24.16	153.31	19.90		12



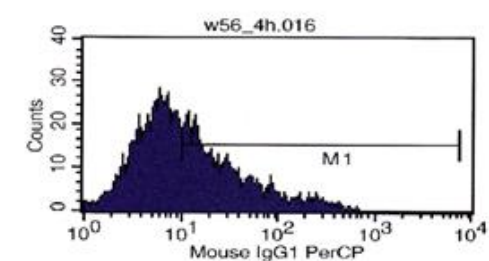
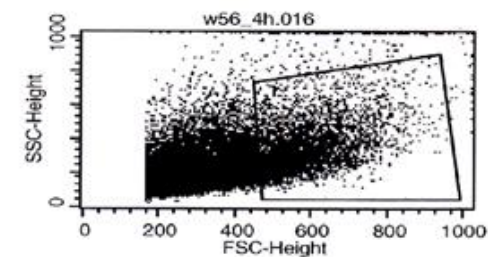
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	5470	100.00	29.03	16.86	9.39	208.41	8.13	7
M1	10, 7499	2231	40.79	11.84	33.28	22.95	152.21	18.60	10



Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	5483	100.00	27.99	16.39	9.29	208.42	8.20	6
M1	10, 7499	2238	40.82	11.42	32.07	22.18	153.95	18.11	10

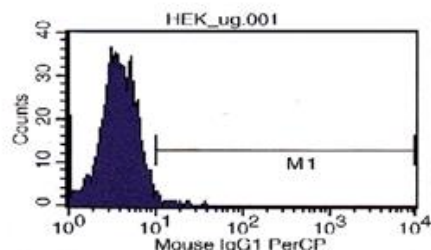
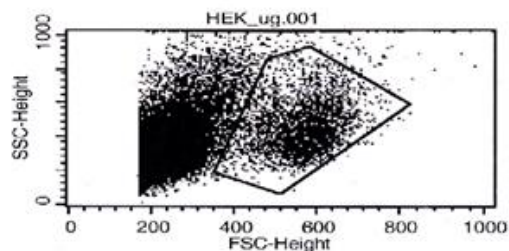


Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	5076	100.00	20.56	17.70	9.43	204.15	8.13	4
M1	10, 7499	2053	40.45	8.32	35.61	23.64	145.47	19.11	10

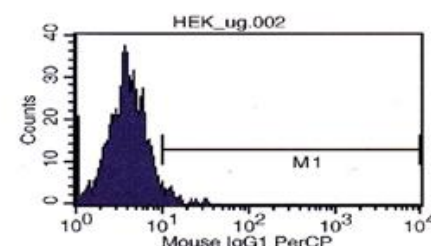
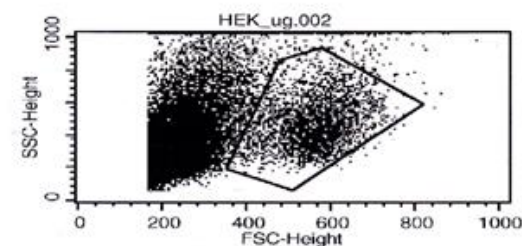


Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	4527	100.00	18.45	22.81	10.77	209.97	8.98	5
M1	10, 7499	2081	45.97	8.48	43.14	26.28	150.57	20.35	11

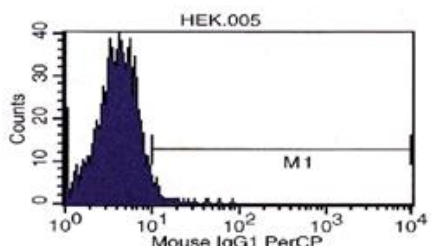
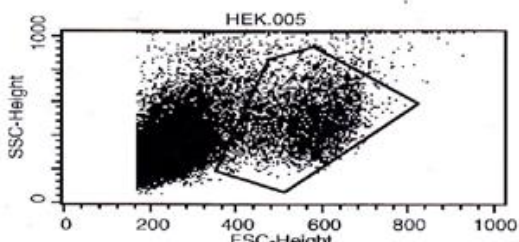
07.06.2012



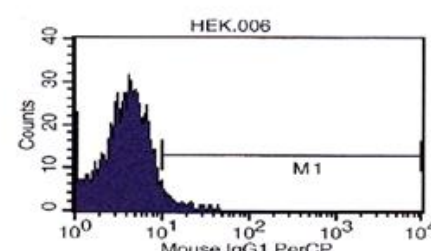
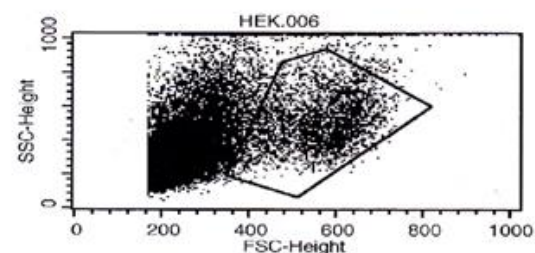
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	3102	100.00	12.26	4.14	3.72	49.60	3.79	1
M1	10, 9910	37	1.19	0.15	13.78	13.10	38.47	11.34	10



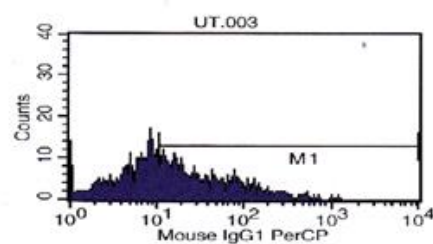
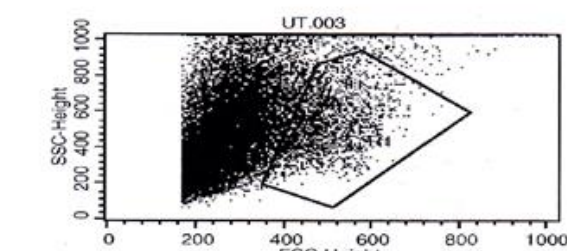
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2795	100.00	8.86	4.16	3.65	55.06	3.75	1
M1	10, 9910	50	1.79	0.16	13.56	12.95	36.22	11.86	10



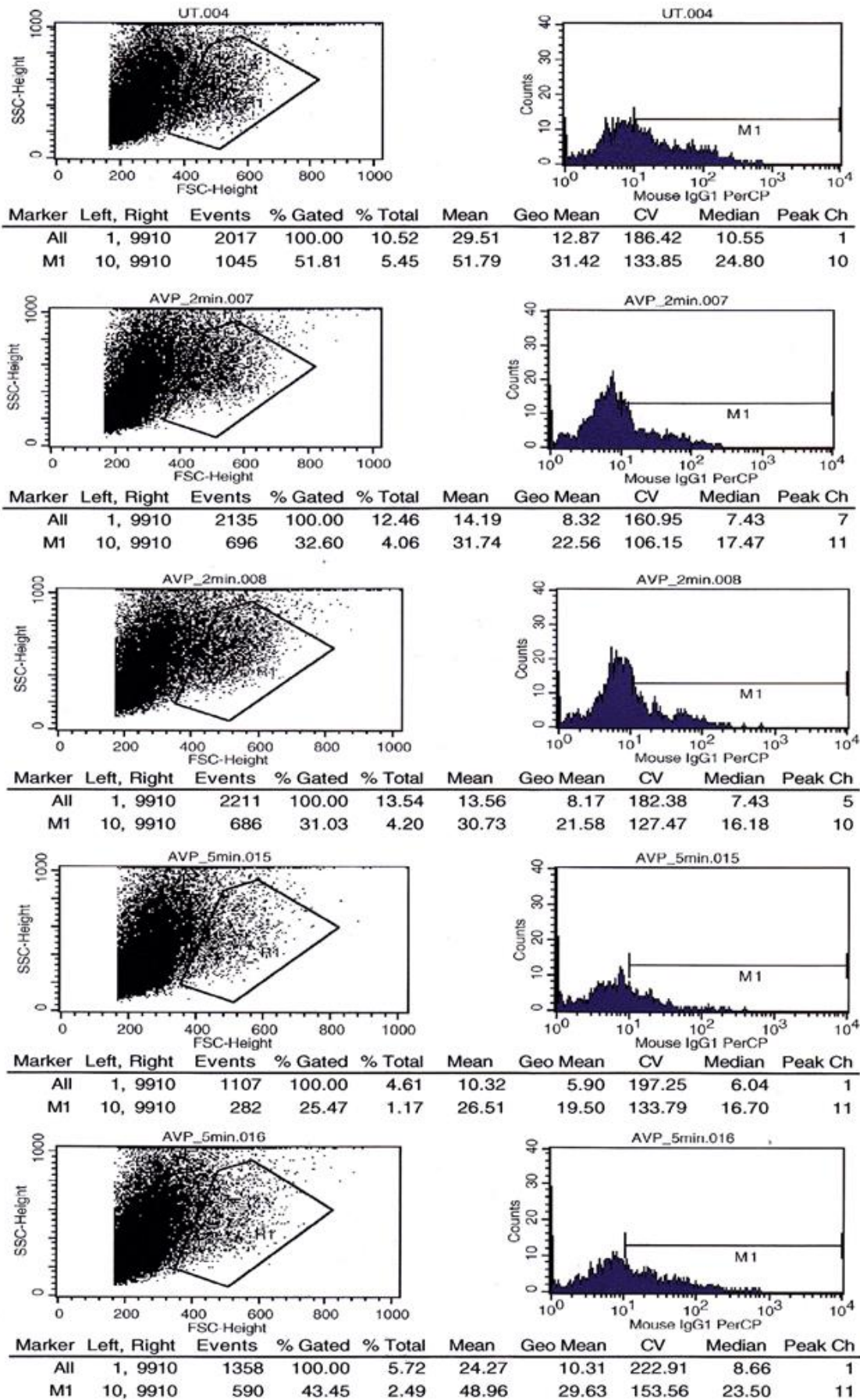
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	3787	100.00	17.65	4.49	3.96	63.06	4.10	1
M1	10, 9910	70	1.85	0.33	15.67	13.85	73.60	11.55	11

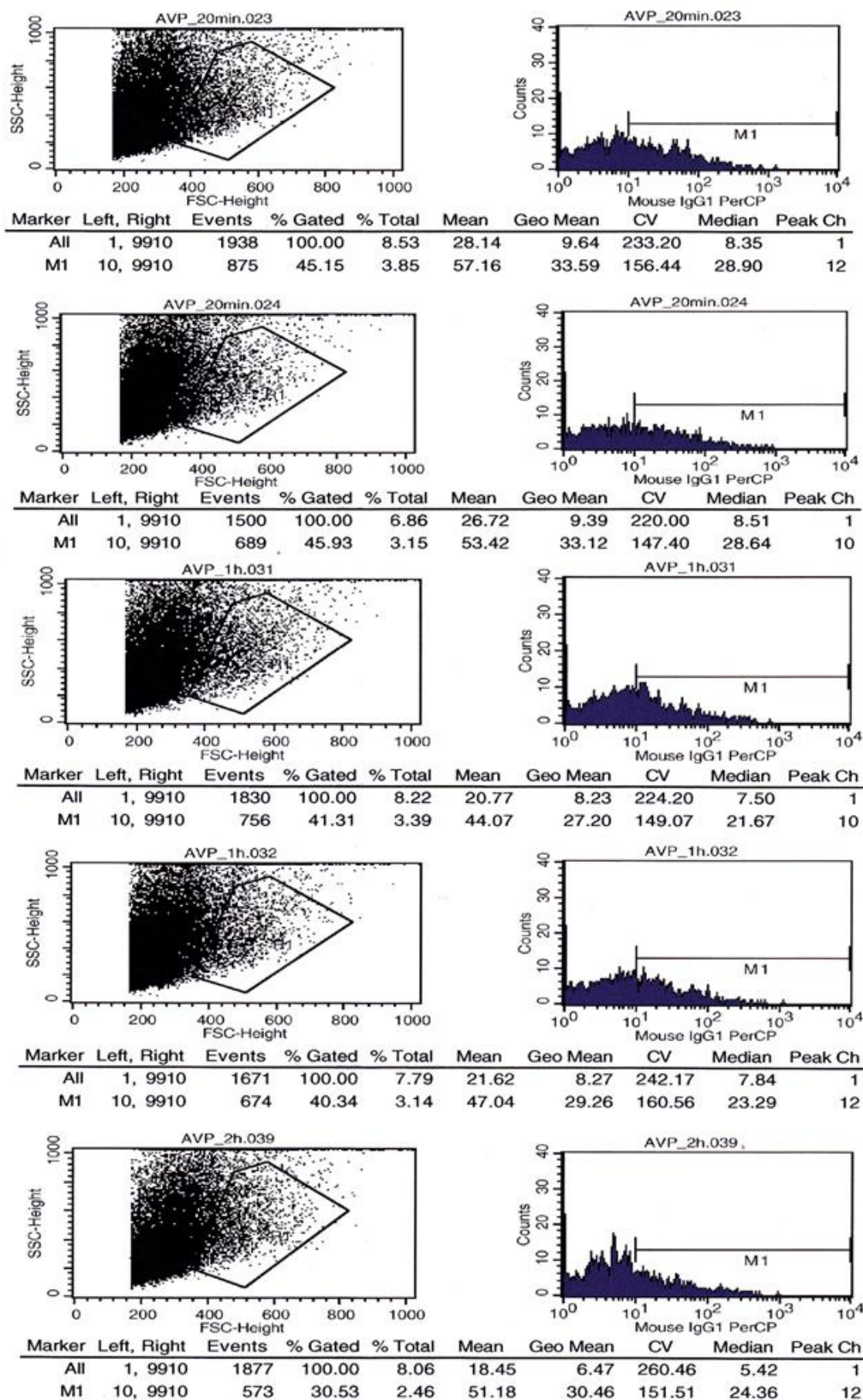


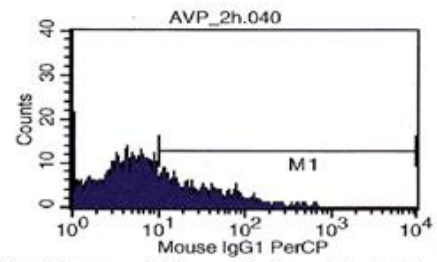
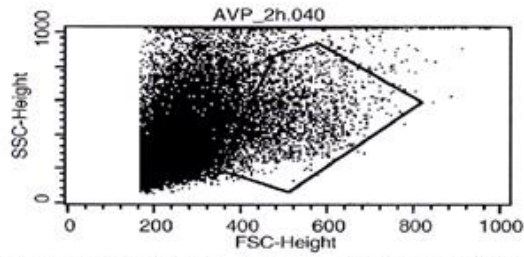
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	3003	100.00	13.37	4.35	3.67	64.69	3.96	1
M1	10, 9910	81	2.70	0.36	14.80	13.87	43.52	12.30	10



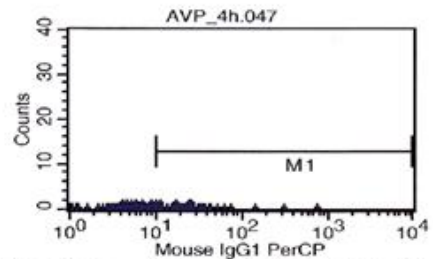
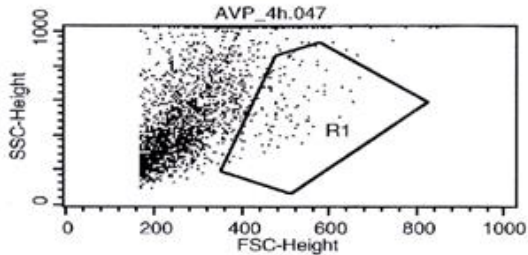
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1965	100.00	11.45	31.03	13.76	203.53	11.65	7
M1	10, 9910	1098	55.88	6.40	51.05	30.63	154.54	24.36	11



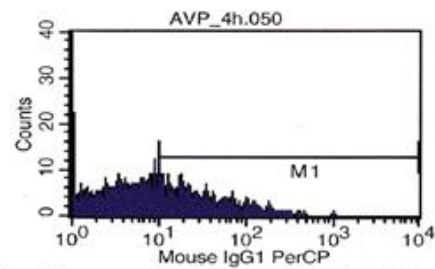
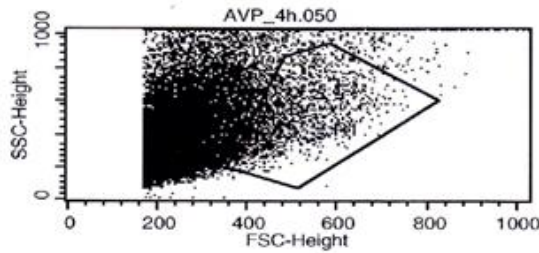




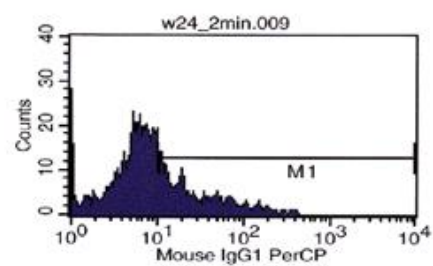
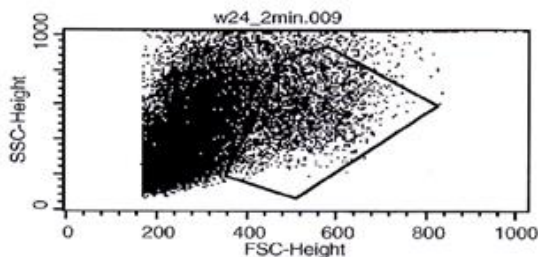
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	2011	100.00	9.26	16.79	6.84	241.71	5.88		1
M1	10, 9910	604	30.03	2.78	45.58	29.00	143.67	24.25		11



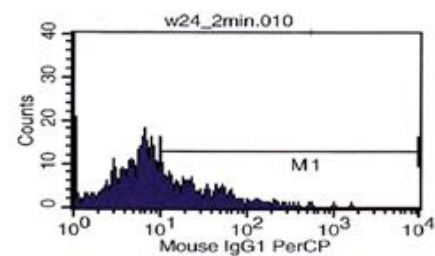
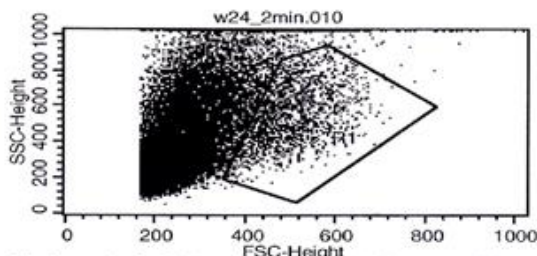
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	102	100.00	5.00	24.88	10.50	302.84	9.65		4
M1	10, 9910	49	48.04	2.40	45.95	24.90	228.92	21.67		10



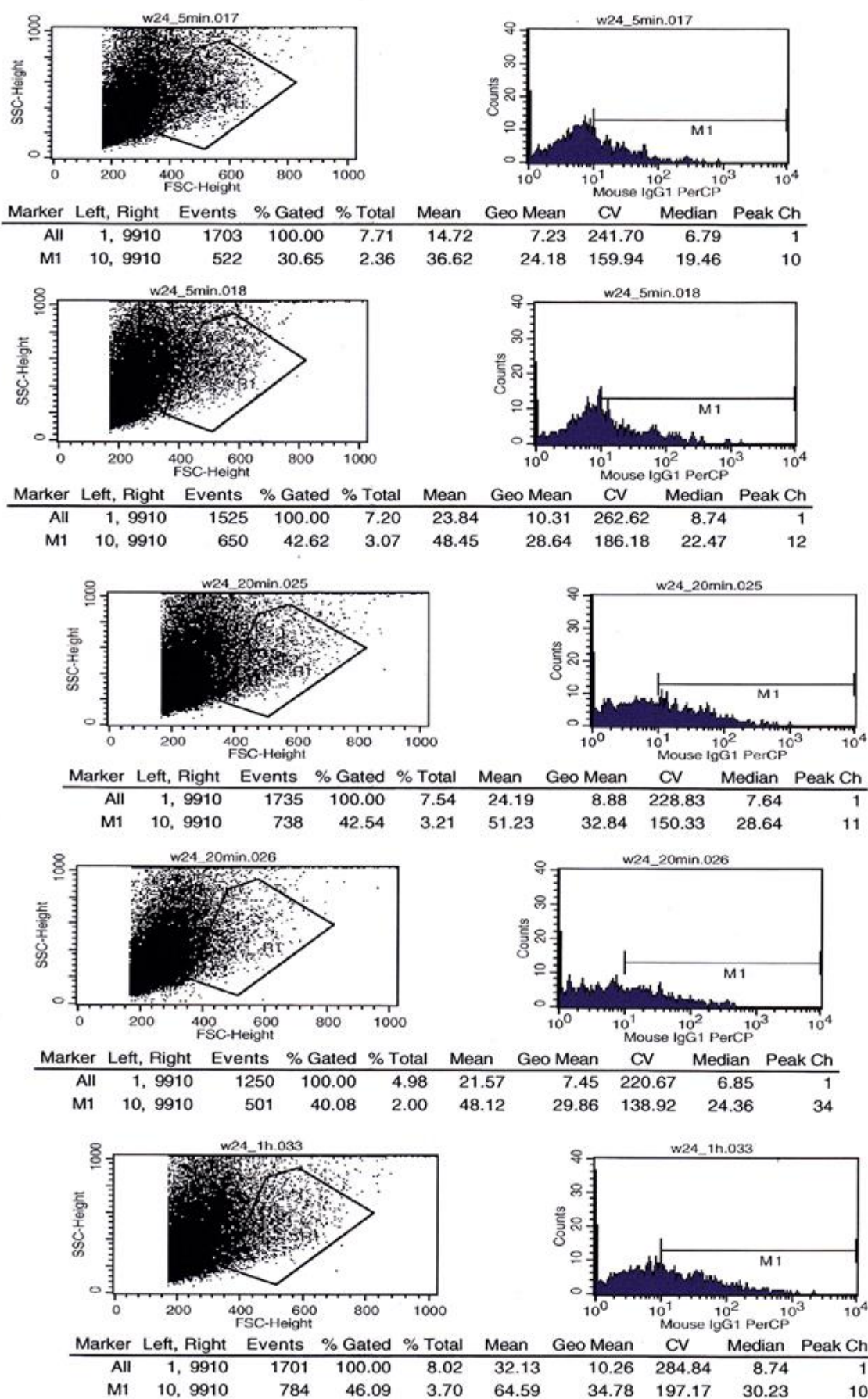
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	1785	100.00	7.95	20.27	7.77	218.40	7.23		1
M1	10, 9910	708	39.66	3.15	44.79	29.18	140.05	23.71		10

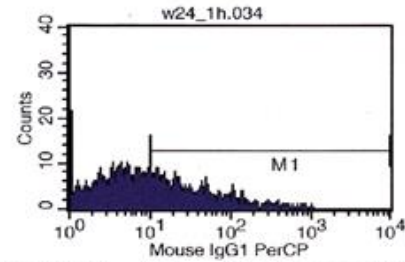
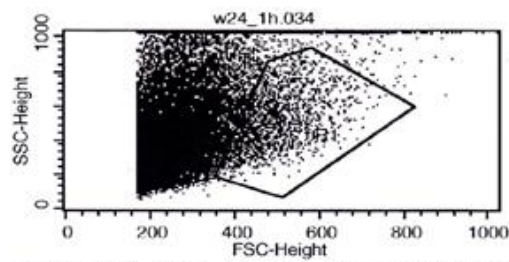


Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	2505	100.00	14.41	15.53	8.24	196.98	7.43		1
M1	10, 9910	783	31.26	4.51	37.17	24.51	129.08	18.94		10

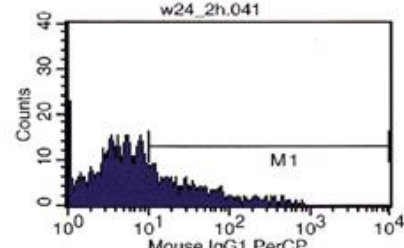
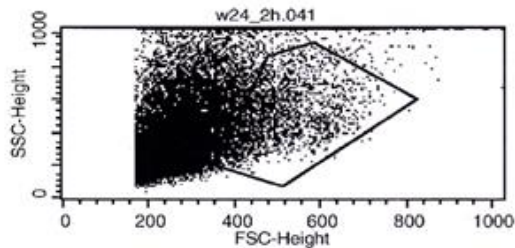


Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	Ch
All	1, 9910	1758	100.00	8.44	18.44	8.43	298.86	7.17		1
M1	10, 9910	599	34.07	2.88	43.82	26.58	203.22	21.87		10

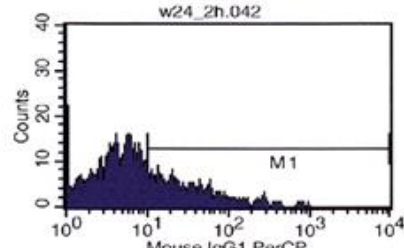
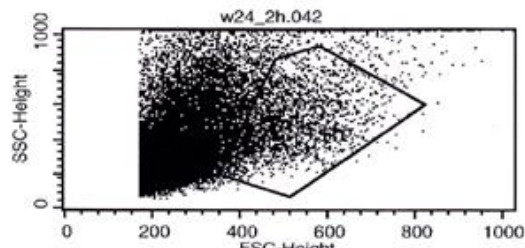




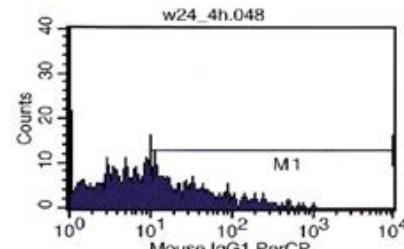
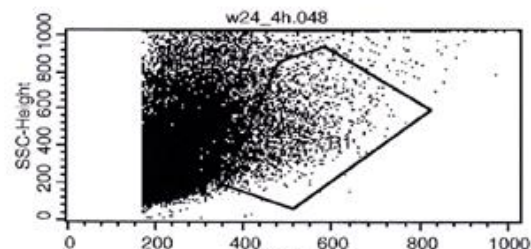
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1795	100.00	8.29	28.05	9.46	258.50	8.35	1
M1	10, 9910	805	44.85	3.72	57.24	31.74	176.21	24.58	10



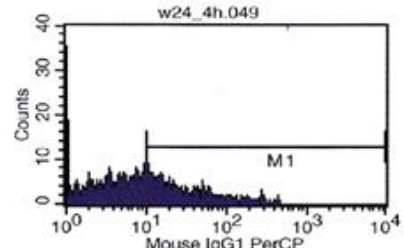
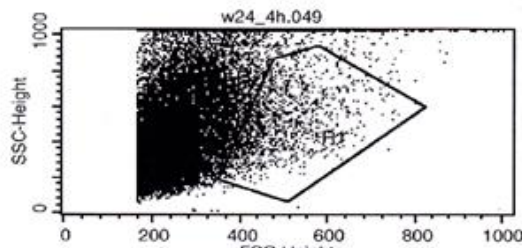
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2192	100.00	10.09	17.67	6.77	264.35	5.83	1
M1	10, 9910	667	30.43	3.07	48.08	28.33	158.82	23.08	11



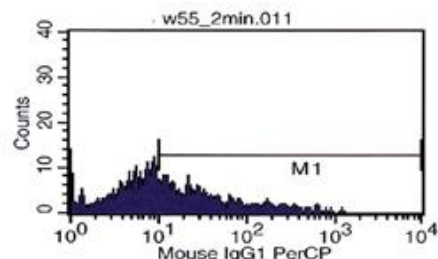
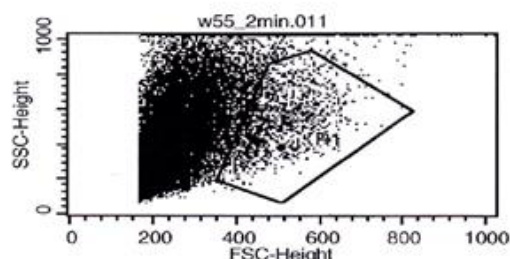
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2312	100.00	10.86	17.89	6.79	286.47	5.83	1
M1	10, 9910	685	29.63	3.22	49.96	29.32	172.11	23.93	13



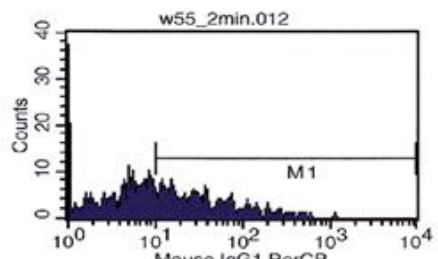
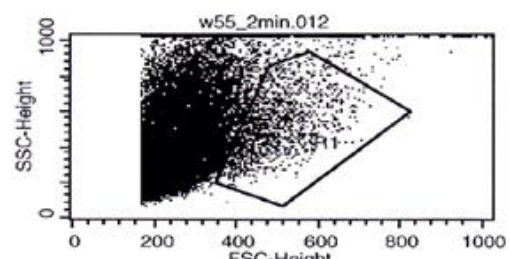
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1706	100.00	7.81	22.36	8.37	247.66	7.64	1
M1	10, 9910	694	40.68	3.18	48.56	28.96	164.42	23.08	10



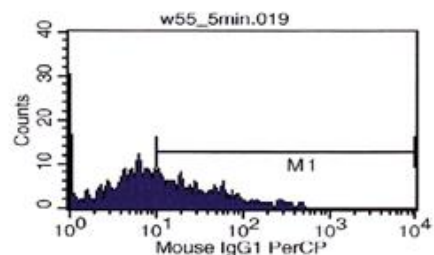
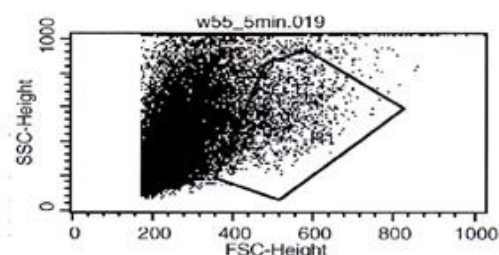
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1264	100.00	5.79	18.71	7.91	203.54	7.50	1
M1	10, 9910	502	39.72	2.30	40.38	26.36	132.53	20.54	10



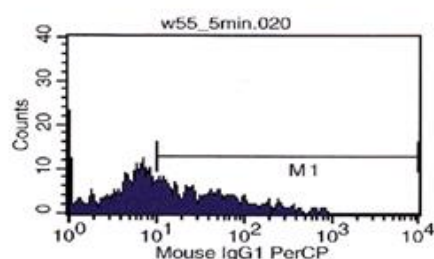
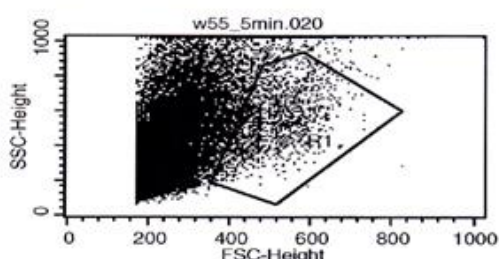
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1383	100.00	6.80	32.66	12.12	236.31	9.65	1
M1	10, 9910	673	48.66	3.31	61.46	33.01	167.74	25.95	11



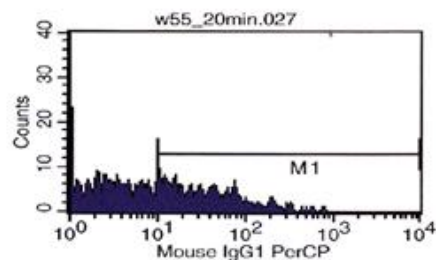
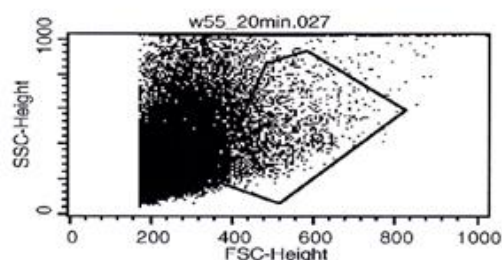
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1326	100.00	6.13	26.06	10.27	223.56	8.98	1
M1	10, 9910	610	46.00	2.82	50.93	30.85	154.97	25.60	12



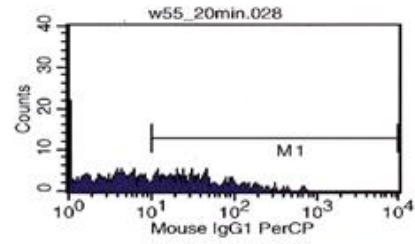
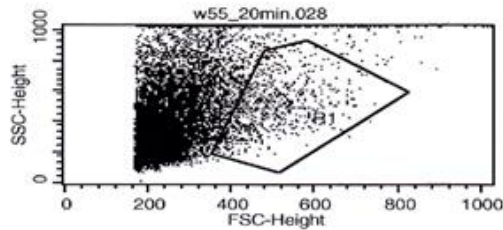
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1463	100.00	6.30	22.82	10.24	197.93	8.74	1
M1	10, 9910	659	45.04	2.84	44.31	28.31	136.95	23.08	10



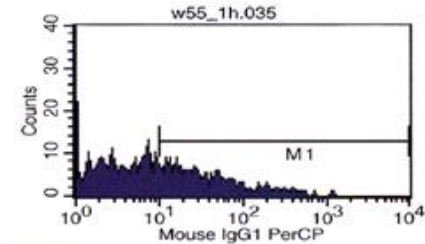
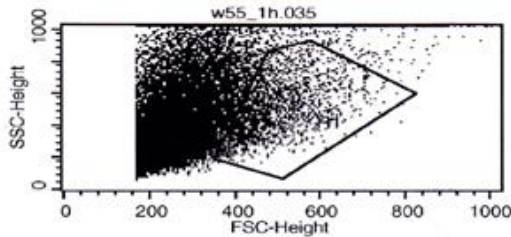
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1467	100.00	6.65	29.03	11.51	219.10	9.31	1
M1	10, 9910	687	46.83	3.12	55.92	32.73	152.57	27.38	10



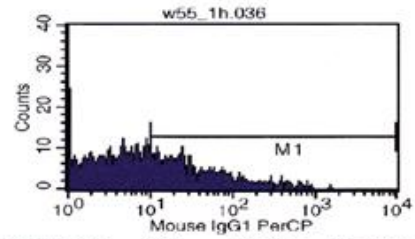
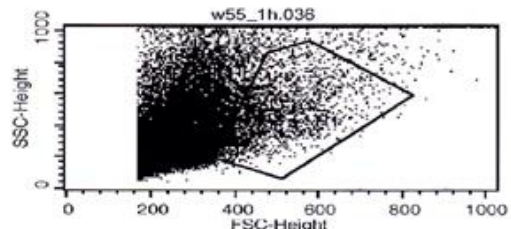
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1658	100.00	6.36	25.78	8.67	219.24	7.95	1
M1	10, 9910	749	45.17	2.87	52.68	33.46	143.94	30.78	10



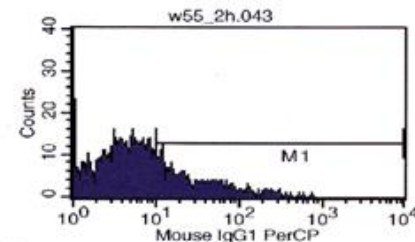
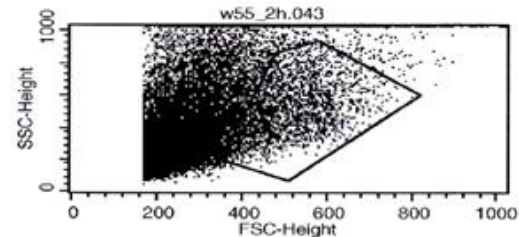
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	723	100.00	7.22	26.71	9.00	214.94	7.99	1
M1	10, 9910	332	45.92	3.31	53.80	33.51	141.80	29.43	11



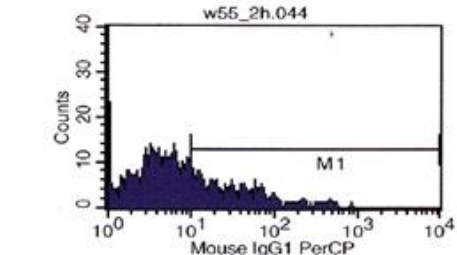
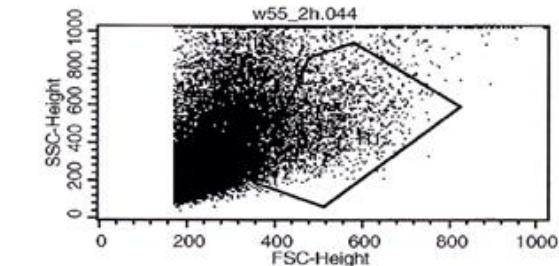
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1922	100.00	9.45	26.48	8.72	253.98	7.50	1
M1	10, 9910	803	41.78	3.95	57.60	32.99	166.15	27.14	11



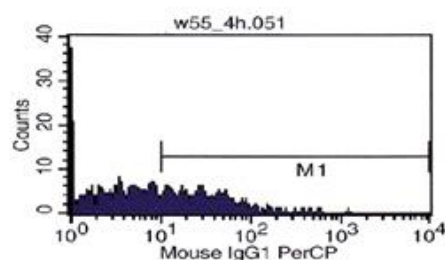
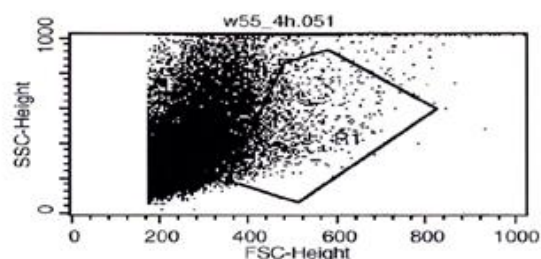
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2241	100.00	10.37	26.35	8.41	282.18	7.43	1
M1	10, 9910	954	42.57	4.41	56.56	30.67	188.79	23.71	11



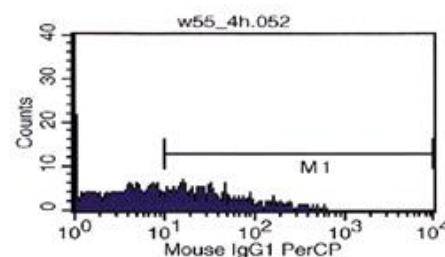
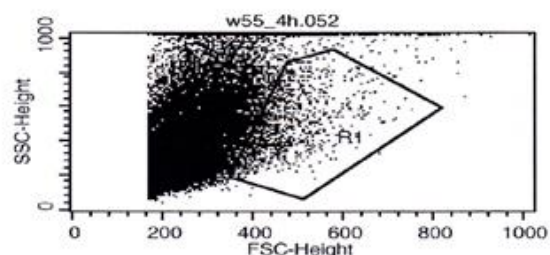
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2499	100.00	11.99	14.87	6.17	246.19	5.42	1
M1	10, 9910	683	27.33	3.28	43.01	27.24	143.31	21.67	11



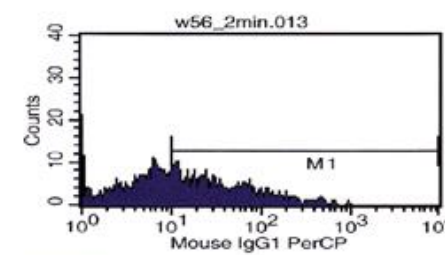
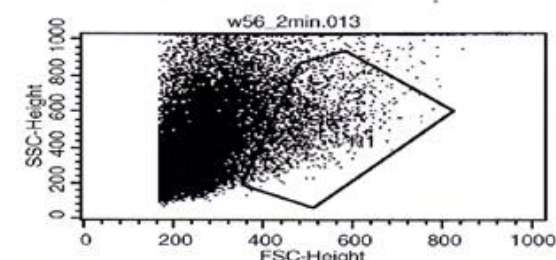
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2144	100.00	10.25	17.53	6.78	252.96	5.78	1
M1	10, 9910	655	30.55	3.13	47.57	29.56	150.49	25.03	11



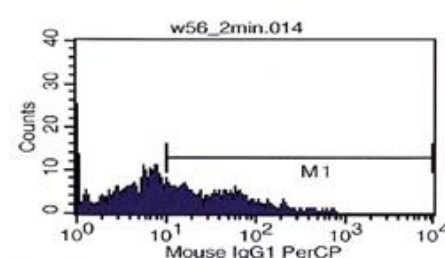
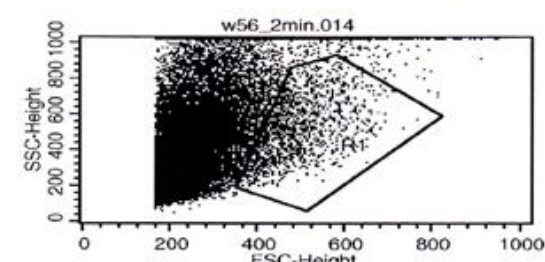
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1156	100.00	5.24	22.83	8.71	260.86	7.84	1
M1	10, 9910	510	44.12	2.31	46.46	28.67	180.59	24.14	11



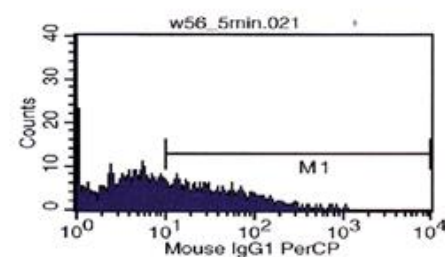
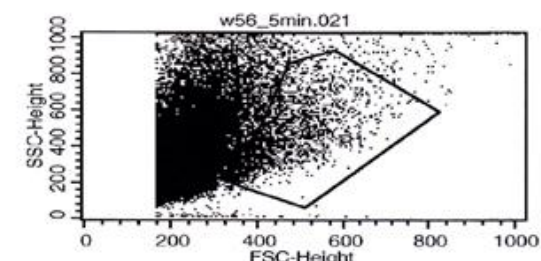
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1083	100.00	4.85	24.46	8.77	210.22	7.84	1
M1	10, 9910	481	44.41	2.16	50.09	31.34	137.83	25.95	15



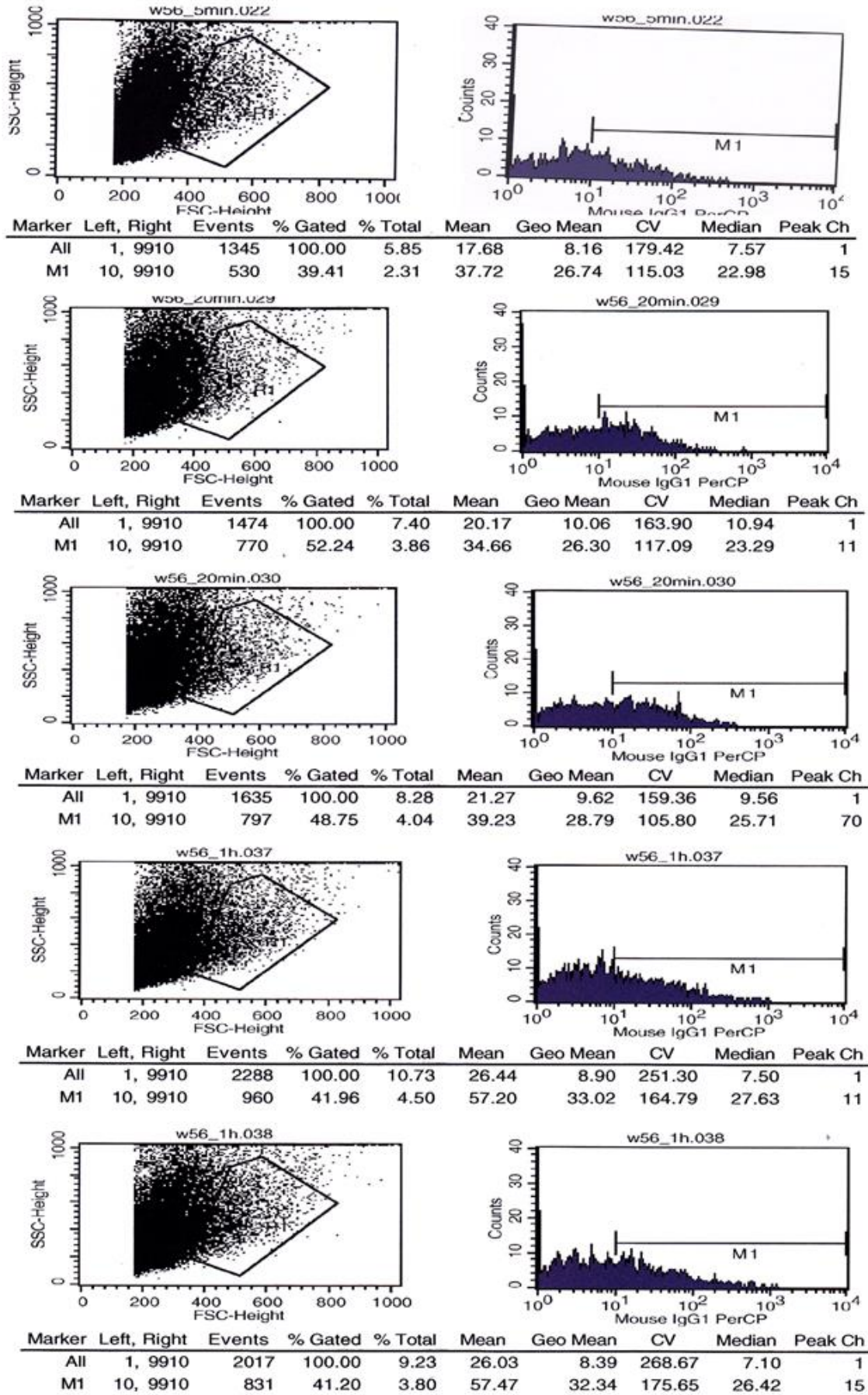
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1591	100.00	7.27	31.80	12.64	208.40	10.46	1
M1	10, 9910	816	51.29	3.73	57.06	34.10	149.24	29.30	10

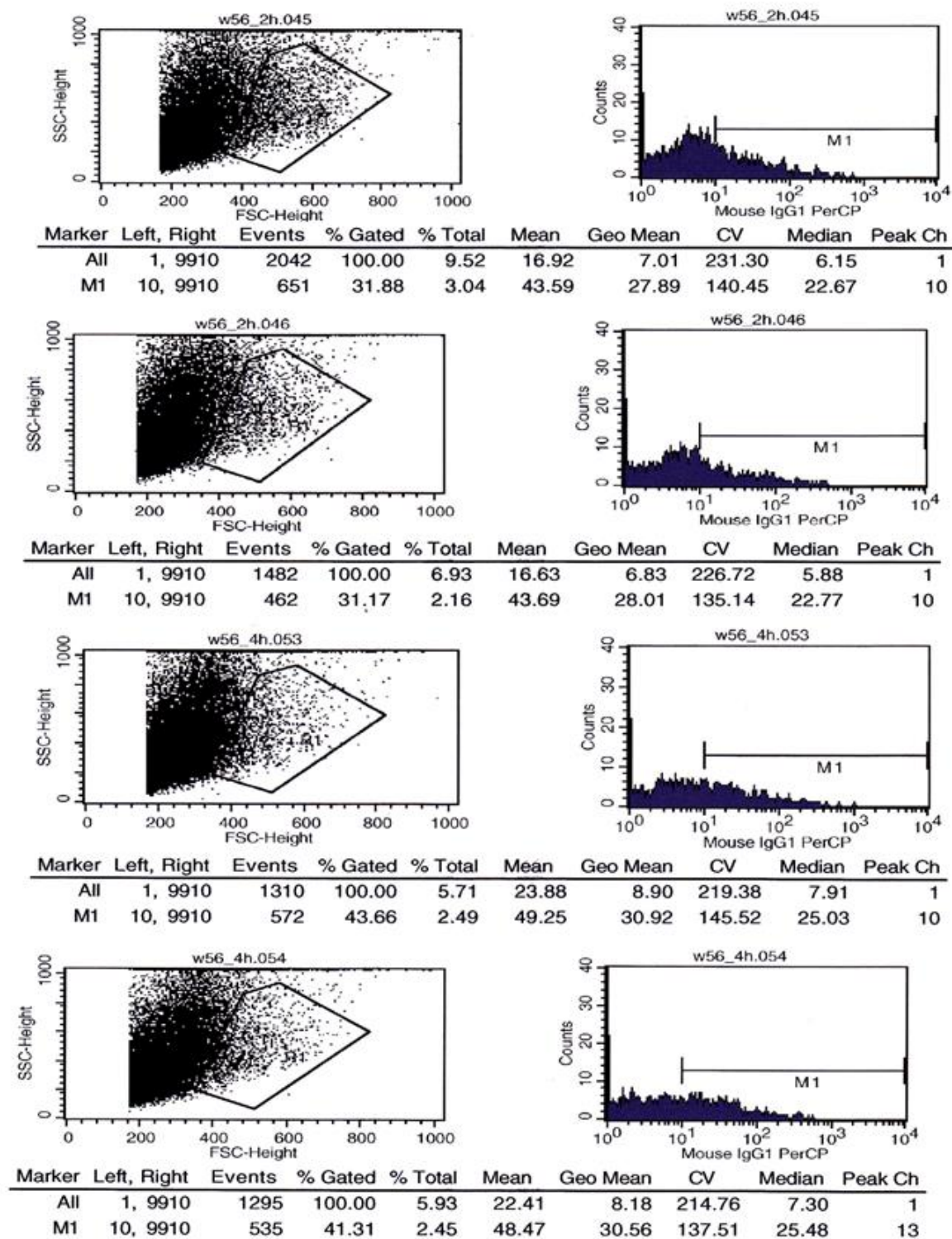


Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1424	100.00	6.67	27.74	11.13	209.91	9.31	1
M1	10, 9910	665	46.70	3.11	53.54	32.83	144.75	28.64	15

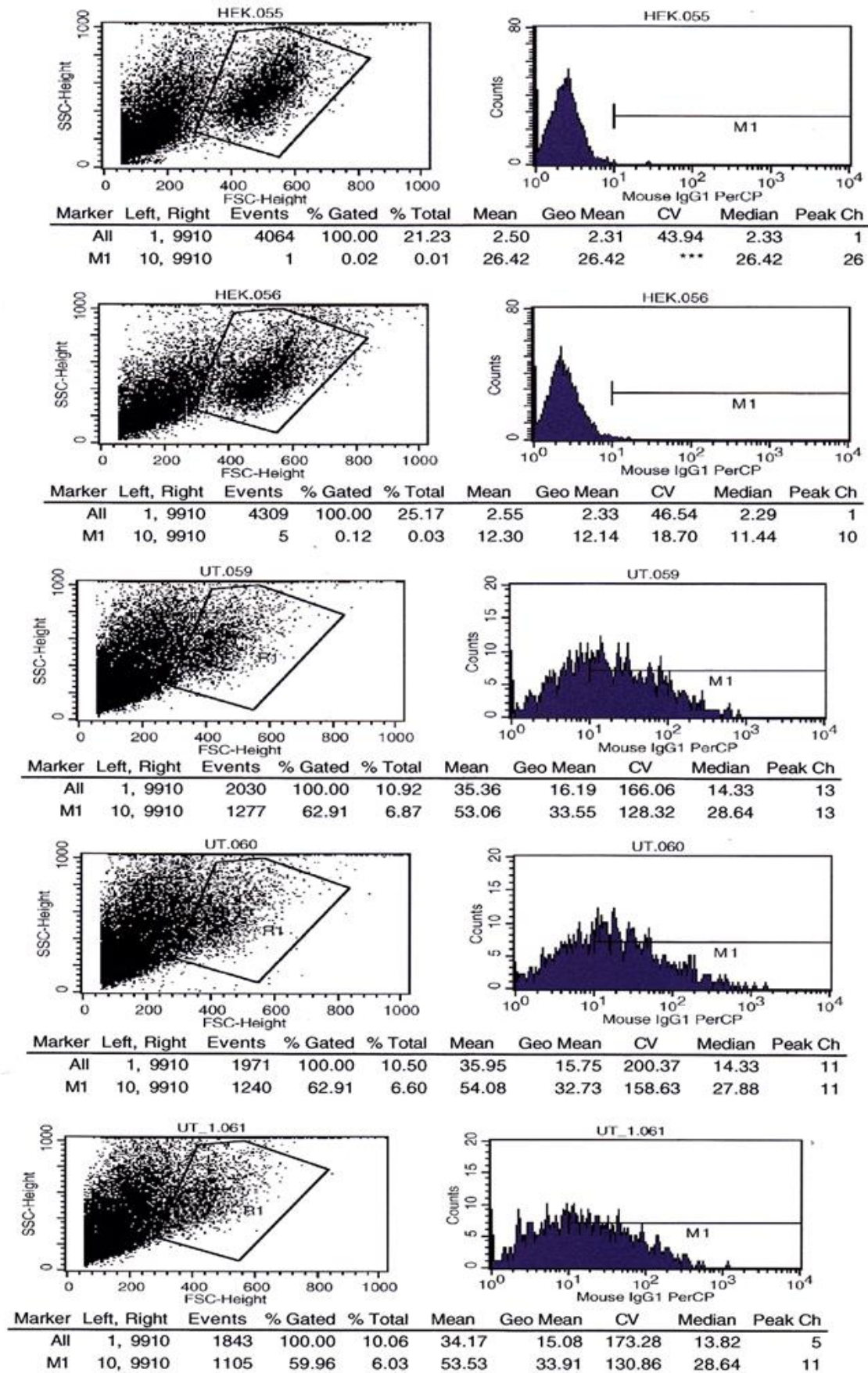


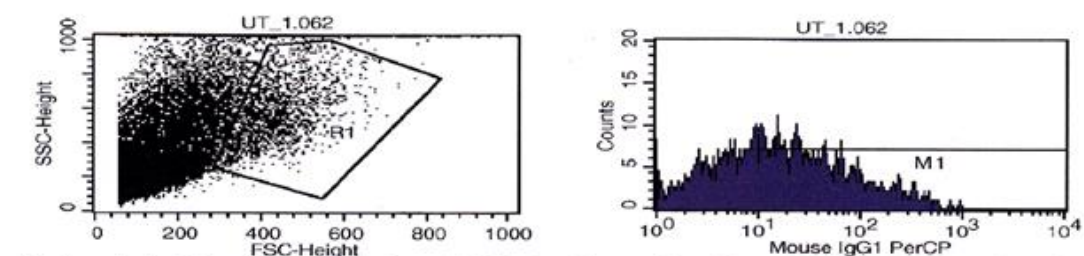
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1785	100.00	7.86	26.29	8.91	246.63	7.57	1
M1	10, 9910	759	42.52	3.34	56.23	34.01	162.26	28.90	12



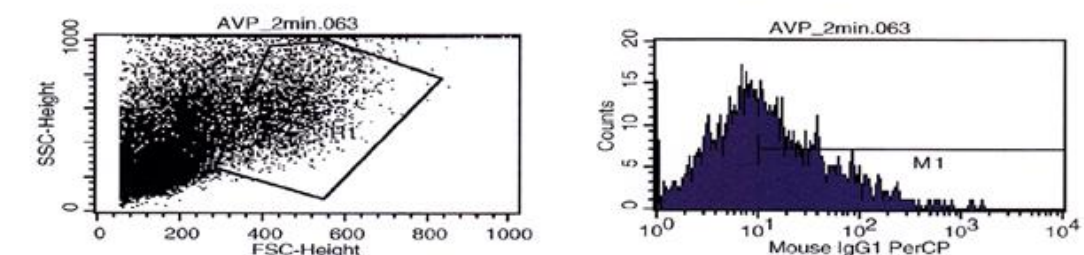


22.06.2012

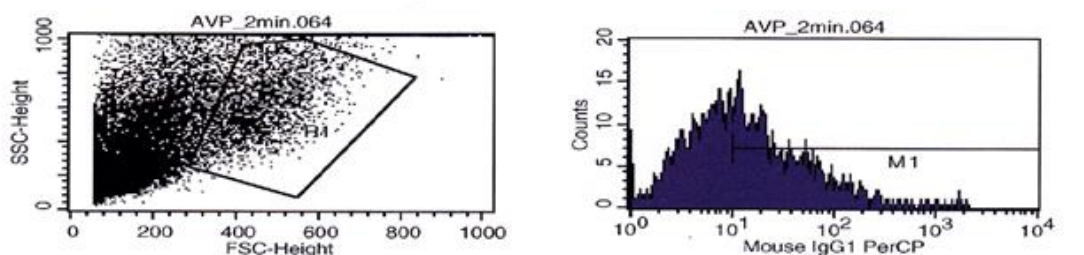




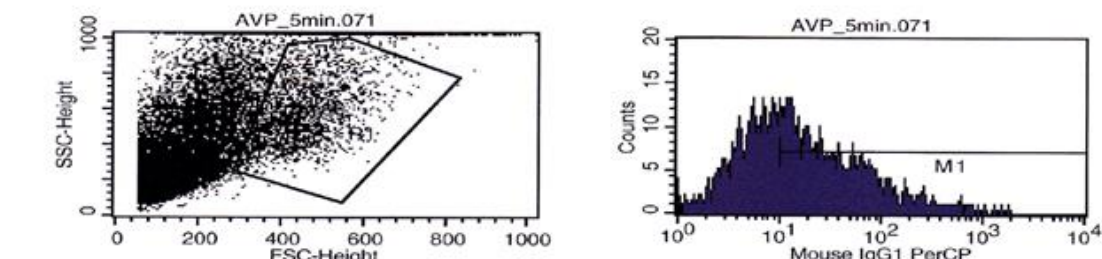
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1809	100.00	10.11	37.16	15.71	181.00	14.86	14
M1	10, 9910	1107	61.19	6.19	57.42	34.80	138.56	29.69	14



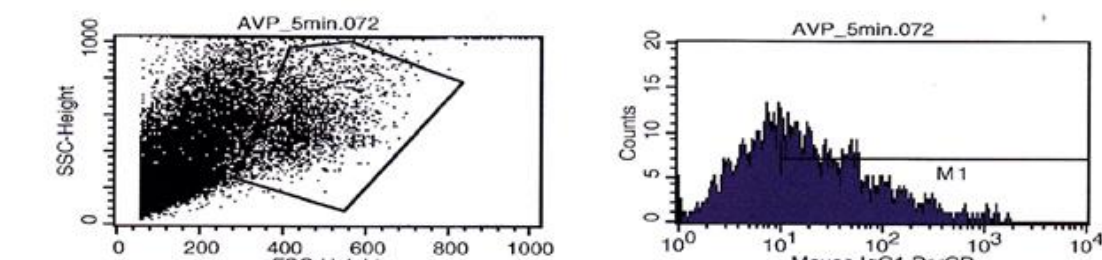
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2509	100.00	14.78	26.18	11.74	250.47	10.27	6
M1	10, 9910	1285	51.22	7.57	46.03	27.91	189.17	23.29	10



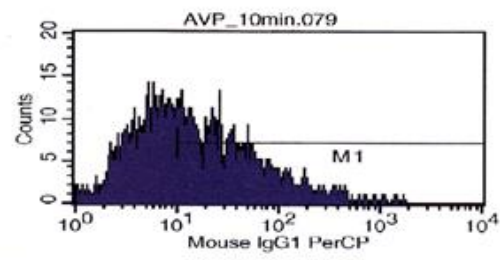
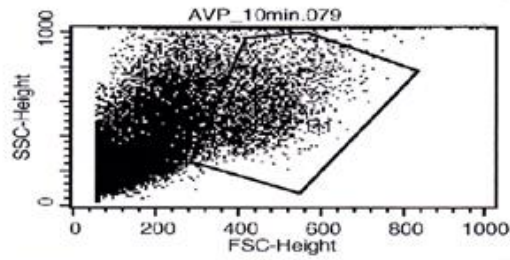
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2388	100.00	13.52	28.73	12.03	314.51	10.55	11
M1	10, 9910	1250	52.35	7.08	49.92	27.58	242.48	20.72	11



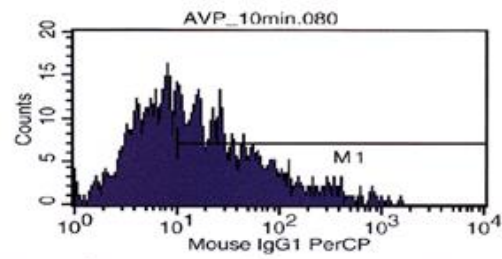
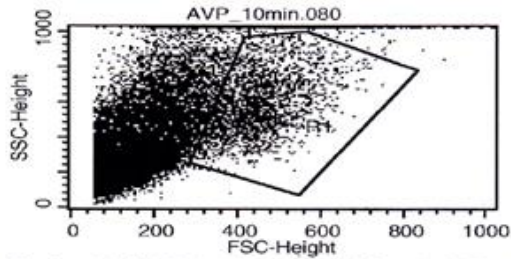
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2332	100.00	13.98	34.44	14.28	249.46	11.76	5
M1	10, 9910	1315	56.39	7.88	56.69	31.48	192.86	25.48	11



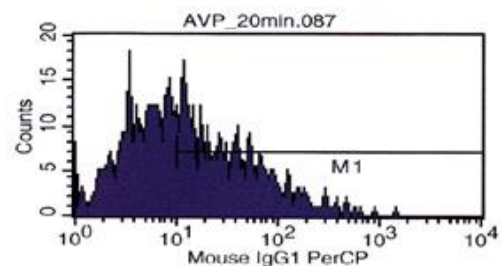
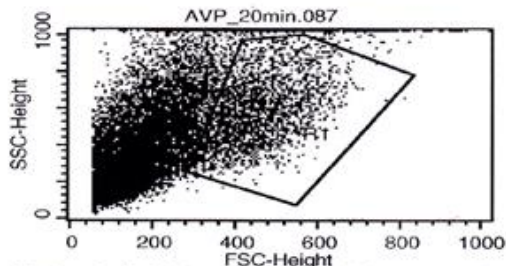
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2238	100.00	13.21	38.02	15.09	245.95	12.81	6
M1	10, 9910	1302	58.18	7.68	61.31	33.07	191.14	26.42	11



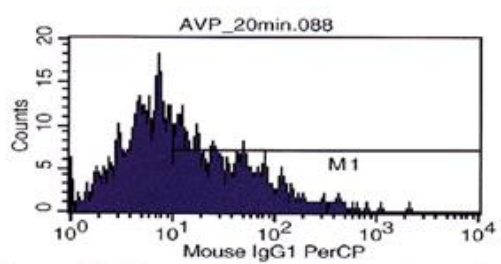
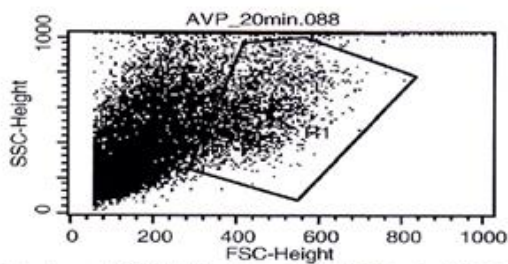
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2399	100.00	14.71	33.39	13.52	255.33	11.24	5
M1	10, 9910	1305	54.40	8.00	56.84	31.74	193.95	26.18	10



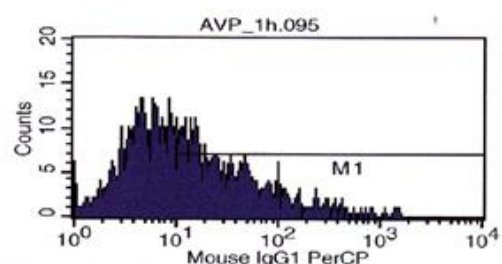
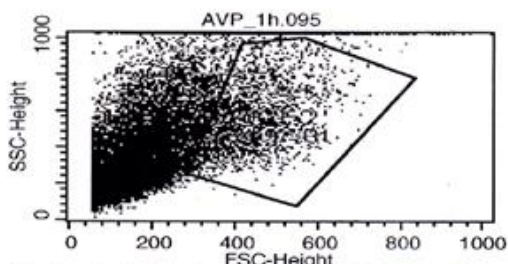
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2378	100.00	14.32	33.90	13.77	248.40	11.24	7
M1	10, 9910	1296	54.50	7.81	57.51	31.63	188.73	25.48	10



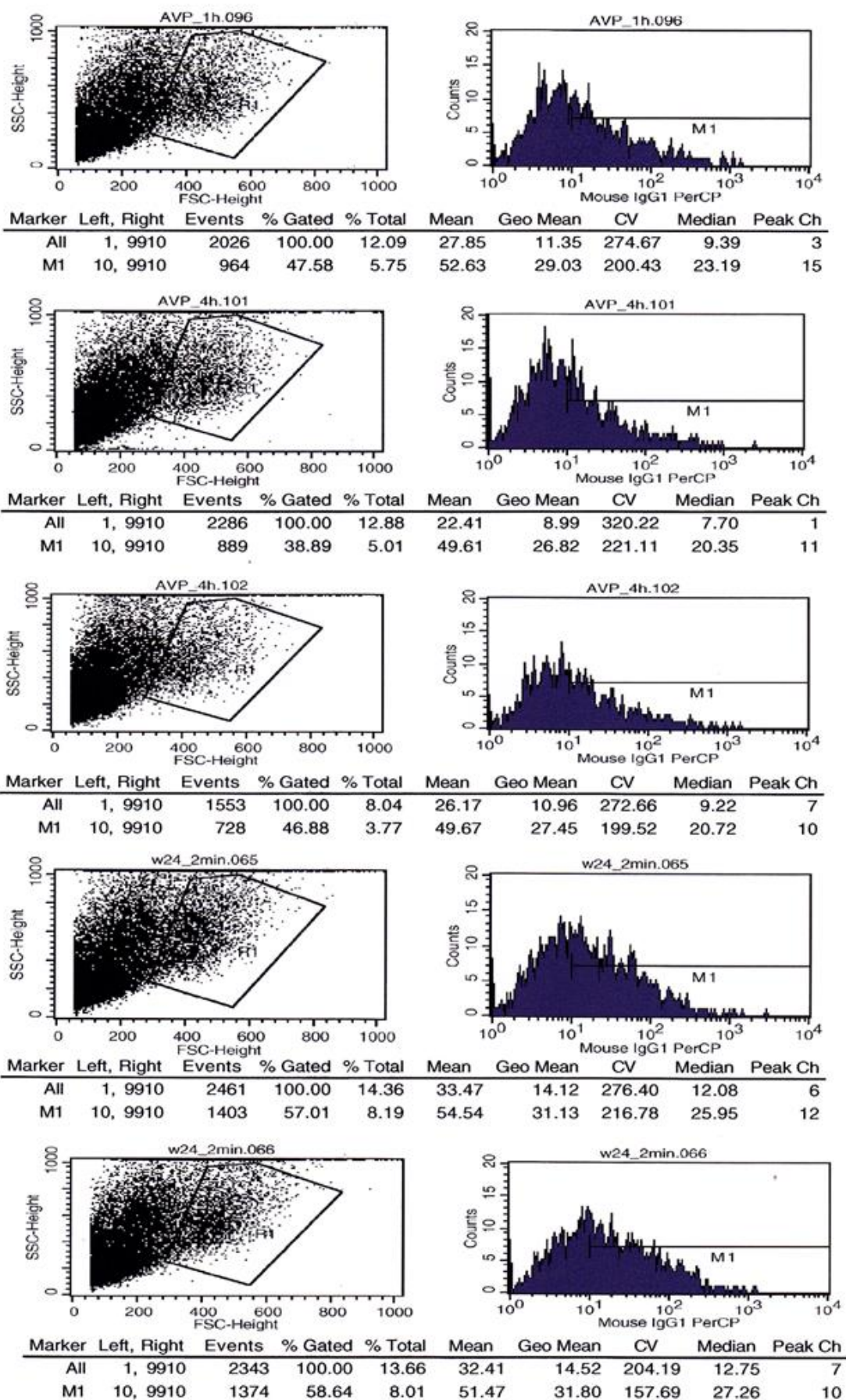
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2499	100.00	15.26	24.75	11.17	221.24	9.65	3
M1	10, 9910	1225	49.02	7.48	45.12	28.24	161.35	23.71	11

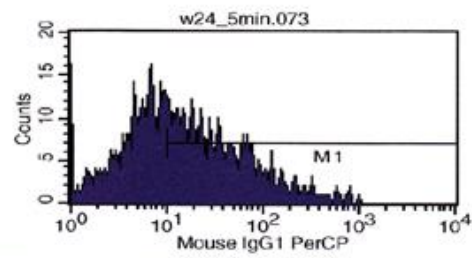
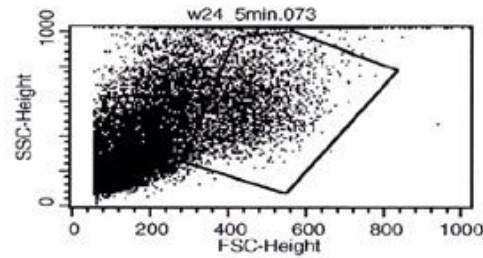


Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2197	100.00	13.02	27.51	11.73	260.08	9.56	7
M1	10, 9910	1070	48.70	6.34	50.85	30.12	191.17	25.25	11

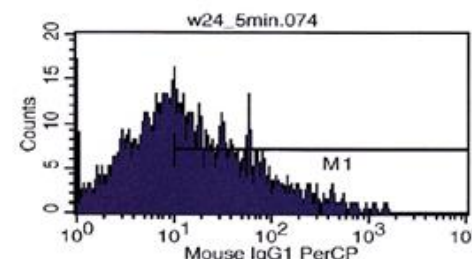
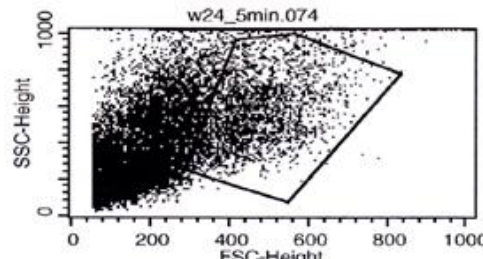


Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	1985	100.00	11.56	26.71	11.09	289.34	9.31	4
M1	10, 9910	936	47.15	5.45	50.71	28.65	212.19	23.19	12

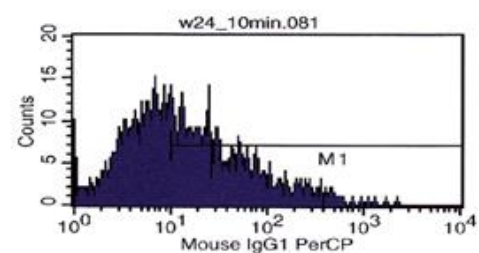
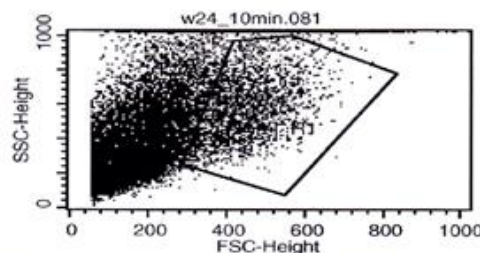




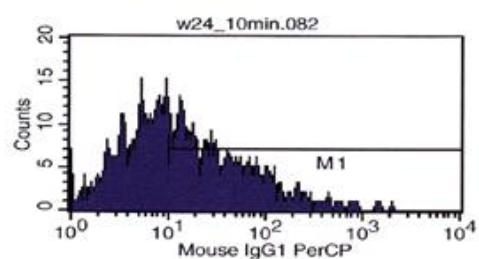
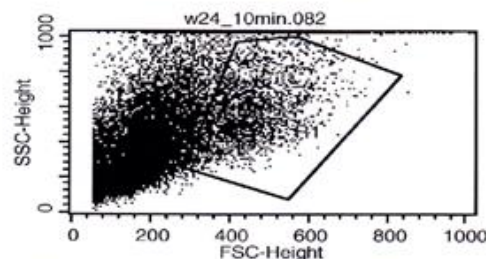
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2374	100.00	14.41	30.04	13.01	209.71	11.24	1
M1	10, 9910	1292	54.42	7.84	50.75	30.59	157.04	25.25	10



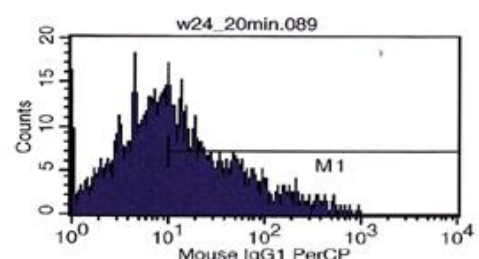
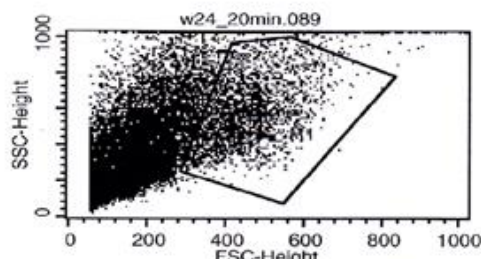
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2518	100.00	15.23	33.91	12.87	258.06	10.75	1
M1	10, 9910	1336	53.06	8.08	59.24	32.13	192.93	26.66	12



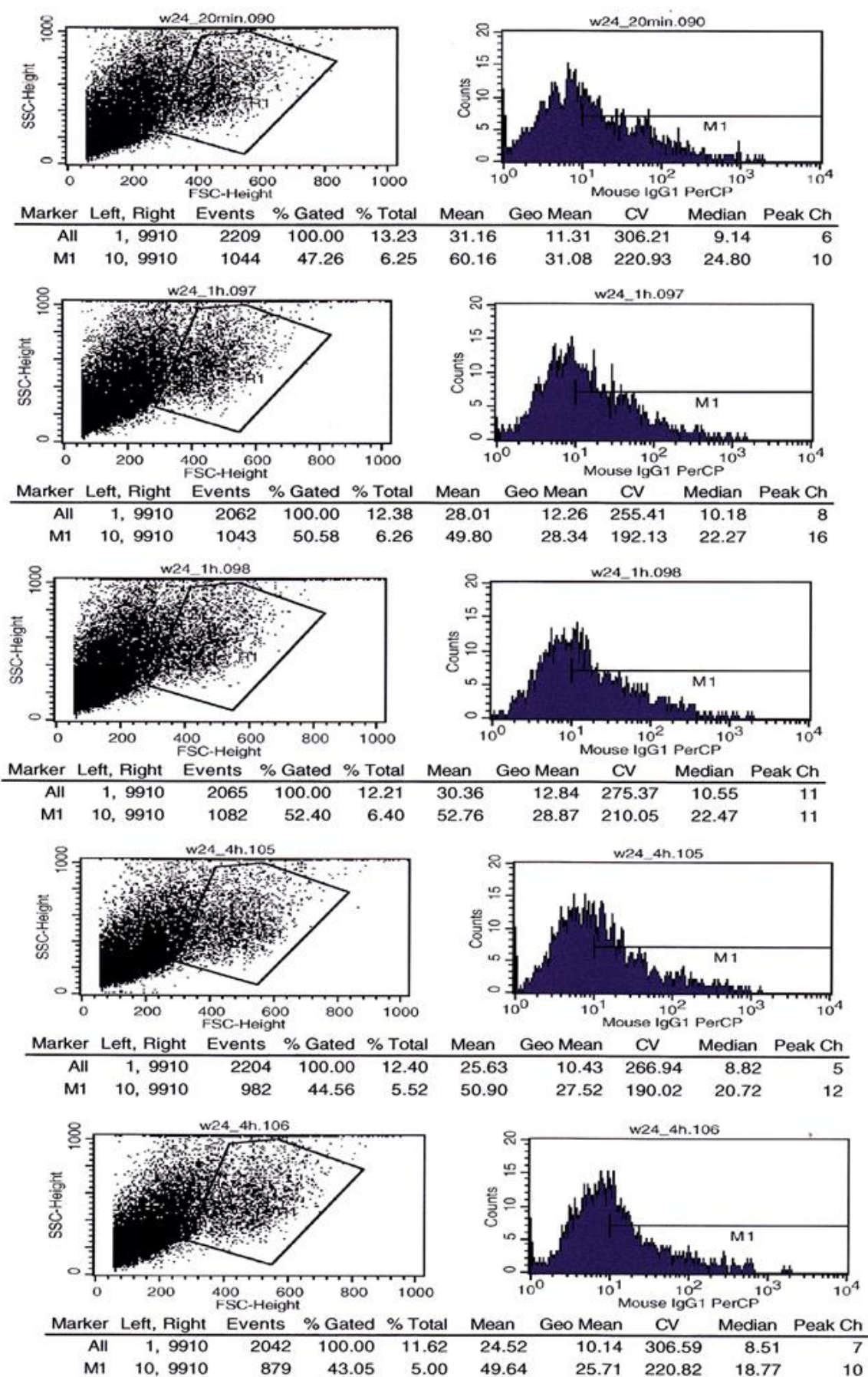
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2408	100.00	14.82	31.15	12.28	271.42	10.27	6
M1	10, 9910	1231	51.12	7.57	55.88	30.99	201.86	24.36	23

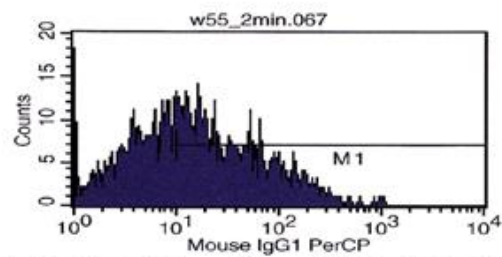
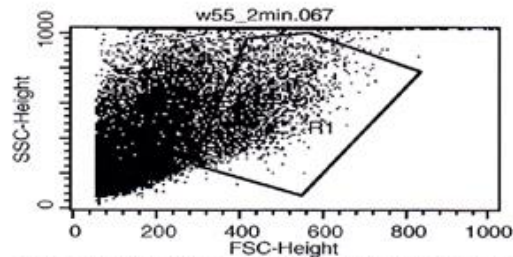


Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2303	100.00	14.11	33.37	12.70	289.77	10.55	5
M1	10, 9910	1202	52.19	7.36	59.06	31.45	217.73	25.95	12

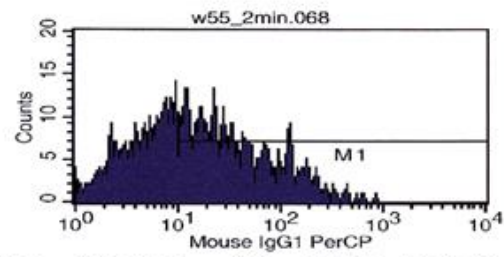
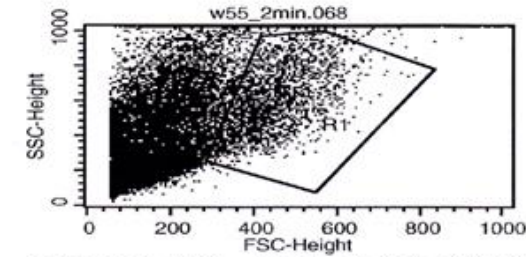


Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2439	100.00	14.77	26.67	11.20	211.76	9.39	4
M1	10, 9910	1164	47.72	7.05	50.20	30.19	149.31	23.93	13

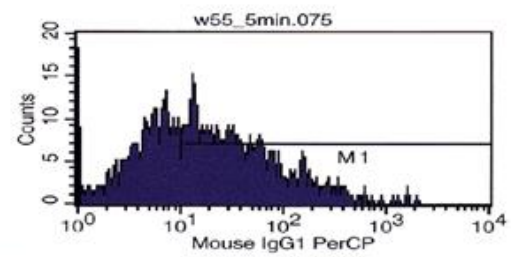
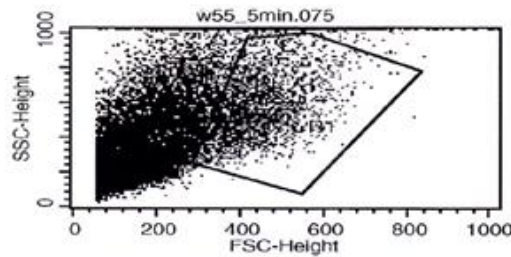




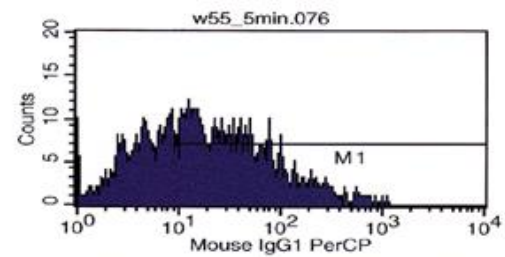
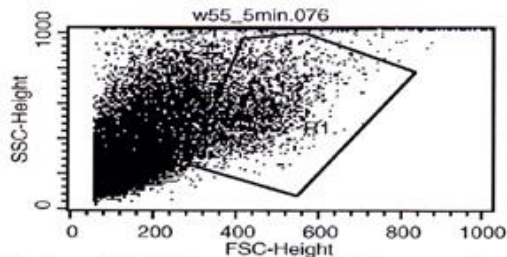
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2366	100.00	14.04	30.28	13.40	193.11	12.08	1
M1	10, 9910	1340	56.64	7.95	49.55	31.31	145.23	26.30	15



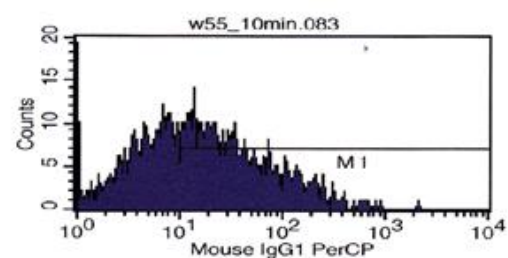
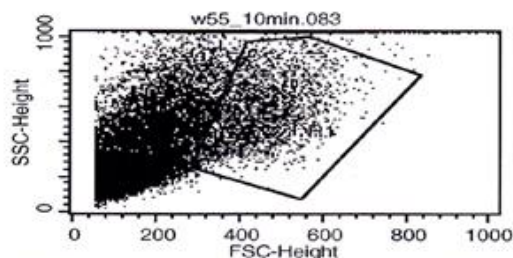
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2260	100.00	13.34	31.05	14.37	168.01	12.52	9
M1	10, 9910	1339	59.25	7.90	48.79	31.48	126.64	27.14	11



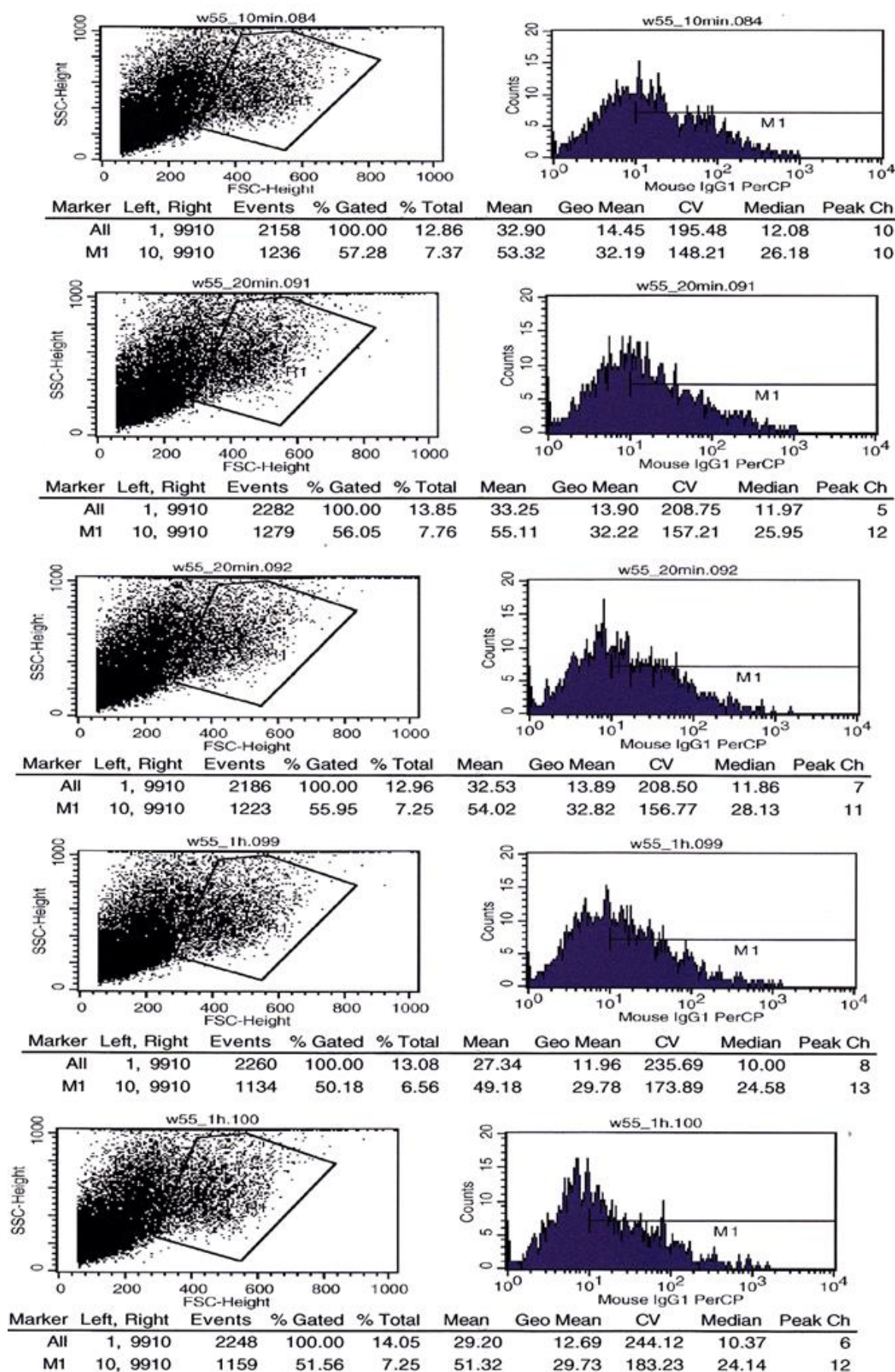
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2333	100.00	14.01	40.28	16.55	227.89	14.46	1
M1	10, 9910	1449	62.11	8.70	61.60	35.47	180.52	30.23	12

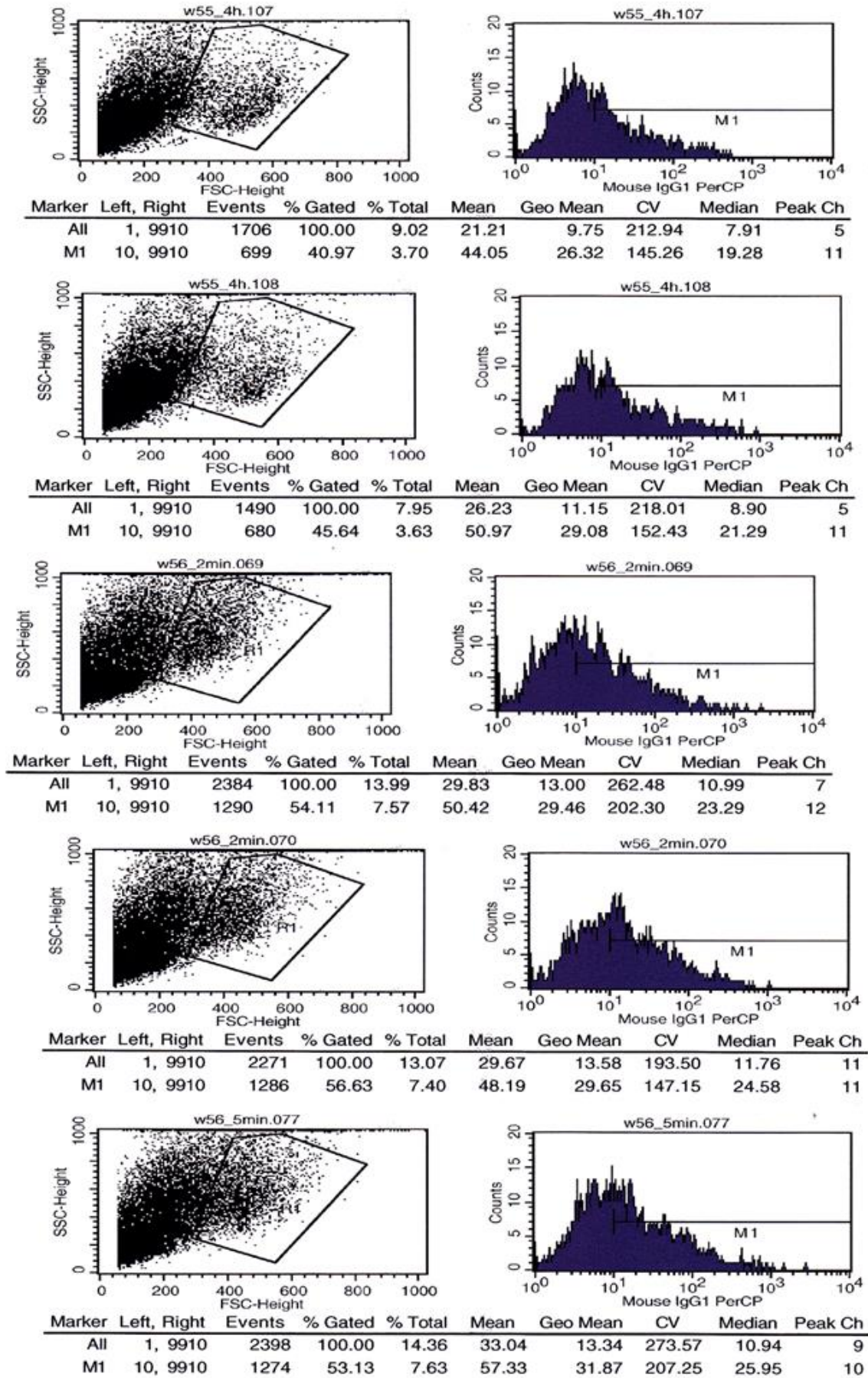


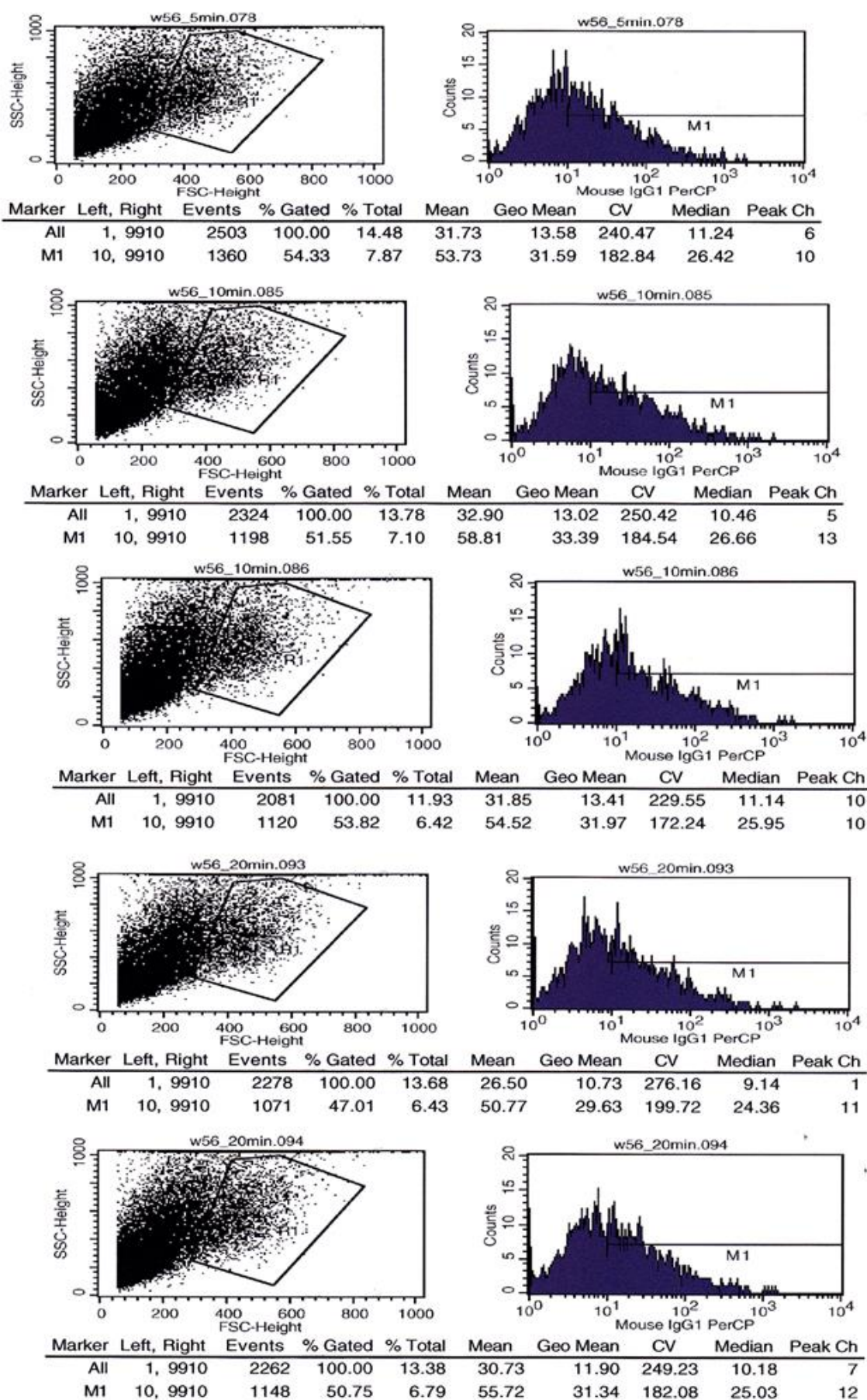
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2190	100.00	12.71	37.97	16.27	192.82	14.46	12
M1	10, 9910	1373	62.69	7.97	57.43	34.22	151.14	29.43	12

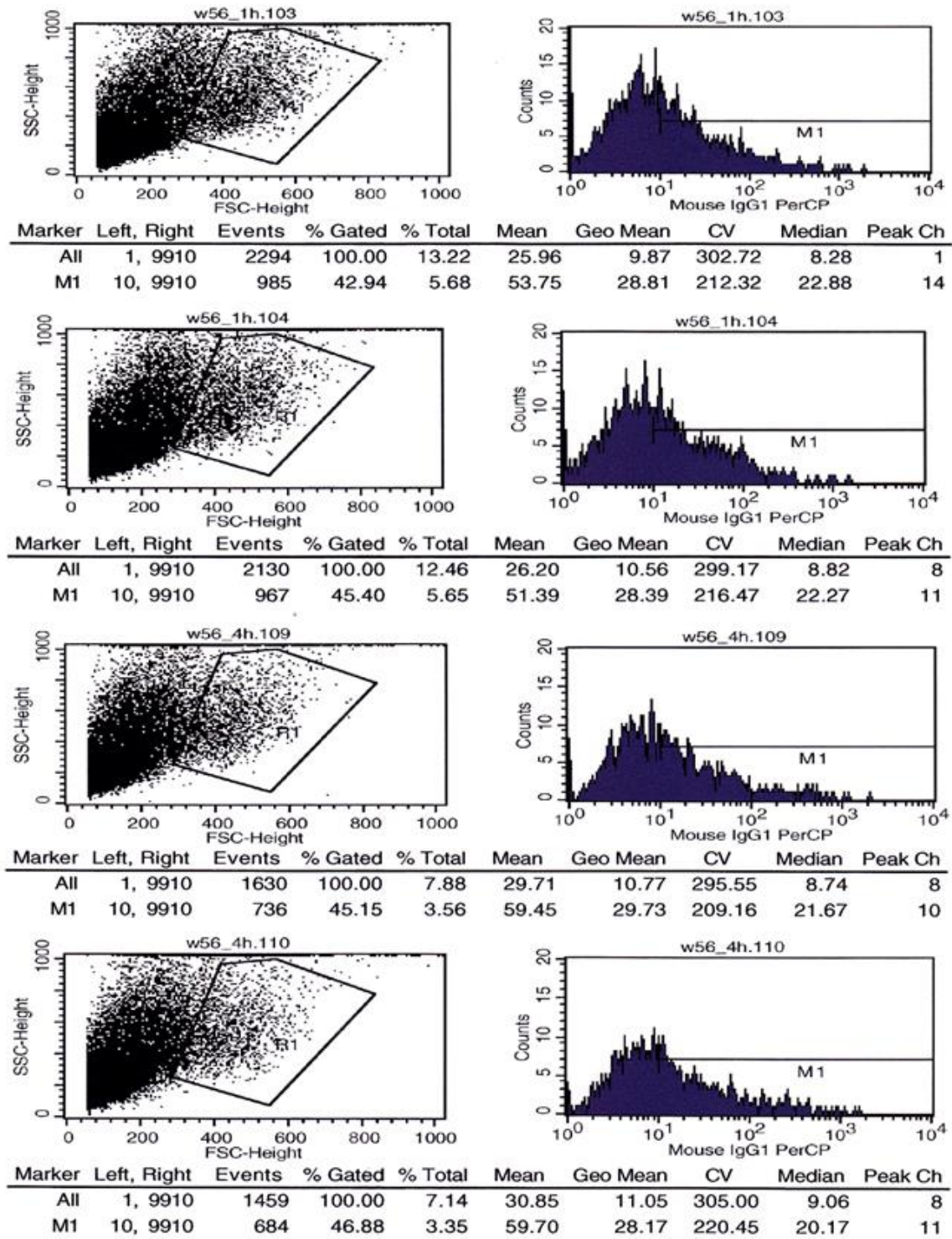


Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	2311	100.00	13.97	36.41	15.02	213.83	13.10	1
M1	10, 9910	1357	58.72	8.20	58.29	34.13	164.21	28.39	13









Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name:	Dalia Gharib
Geburtsdatum:	04.02.1987
Staatsbürgerschaft:	Österreich
Familienstand:	ledig

Bildungsweg

09/2011 - 06/2012:	Diplomarbeit an der Medizinischen Universität Wien am Institut Physiologie und Pharmakologie mit dem Thema „Pharmakologische Charakterisierung von natürlich vorkommenden und synthetisch optimierten Vasopressin Liganden“
ab 2006:	Pharmaziestudium an der Universität Wien
1997 - 2006:	GRG III, Hagenmüllergasse 30 1030 Wien
1993 - 1997:	Öffentliche Volksschule, Erdbergstraße 76 1030 Wien

Berufliche Erfahrungen

ab 10/2012	Madonnen Apotheke
02/2010 - 01/2012	AGES Pharmmed
07/2011	Madonnen Apotheke
07/2009 - 10/2009	AGES Pharmmed
08/2008 - 11/2008	Abomarketing Medianet
09/2006 - 07/2008	Integral Markt- und Meinungsforschung