



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**NSC 23766, ein häufig verwandter Hemmstoff der Rac1-Aktivierung,
wirkt zusätzlich als kompetitiver Antagonist an Muskarinischen
Acetylcholinrezeptoren**

Autor: Magdolna Krisztina Lévy
Institut / Klinik: Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und
Toxikologie
Doktorvater: Prof. Dr. T. Wieland

Die monomere GTPase Rac1 spielt eine Rolle bei oxidativem Stress, Herzhypertrophie und kardialer Dysfunktion. Inhibitoren, die die Rac1-Aktivierung hemmen, eröffnen deshalb vielversprechende neue therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung kardialer Erkrankungen und wurden bereits in Tiermodellen untersucht. Der am häufigsten benutzte Hemmstoff ist NSC23766 (NSC), der die Rac1-Aktivierung durch den Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) Tiam1 hemmt. Die Aktivierung der monomeren GTPase RhoA durch deren spezifische GEFs wird von NSC nicht beeinflusst.

Im Herzen ist der vorherrschende muskarinische Acetylcholinrezeptor der Typ 2 (M2-mAChR). Der M2-mAChR führt unter physiologischen Bedingungen im Rahmen der parasympatischen Regulation zu negativen chronotropen, dromotropen und inotropen Antworten. Bei Ratten mit Herzinsuffizienz wurde beschrieben, dass die Aktivierung des M2-mAChR unerwarteter Weise eine Steigerung der Kontraktionskraft auslösen kann. Bekanntermaßen führt die Stimulation von M2-mAChR auch zur Aktivierung monomerer GTPasen der Rho-Familie, im Besonderen von Rac1. Diese Arbeit zeigt, dass in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten der M2-mAChR nicht nur eine Rac1-Aktivierung sondern auch eine RhoA-Aktivierung induzieren konnte, die erstaunlicher Weise ebenfalls durch NSC blockiert wurde. Zudem hemmte NSC in neonatalen Rattenherzen eine M2-mAChR-induzierte, Rho-Kinase-abhängige positive inotrope Antwort, die der positiv inotropen Antwort im Insuffizienzmodell analog war. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den Mechanismus aufzuklären, über den NSC sowohl die M2-mAChR-induzierten, Rac1-, als auch die RhoA-abhängigen Signalwege zu hemmen vermag.

Interessanterweise führte NSC zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die Carbachol-induzierte Zunahme der Inotropie im neonatalen Rattenherz. Die maximal erreichbare Steigerung der Inotropie blieb dagegen unverändert. Dies deutet auf einen kompetitiven Antagonismus von NSC am M2-mAChR hin. Um die Frage zu klären, ob die Wirkung von NSC spezifisch für den M2-mAChR ist oder ebenfalls zur Hemmung von anderen, den gleichen Signalweg benutzenden Rezeptoren führt, wurde die Carbachol- und die Adenosin-induzierte Aktivierung des G-Protein-regulierten Kaliumkanals GIRK in humanen Vorhofmyozyten gemessen. NSC hemmte den Carbachol-induzierten nicht aber den Adenosin-induzierten K^+ -Strom. In Übereinstimmung hatte NSC keinen Einfluss auf die A1-Adenosinrezeptor-induzierte, positive inotrope Antwort am neonatalen Rattenherz. Um die pharmakologischen Eigenschaften von NSC zu charakterisieren, wurde die Carbachol-induzierte Konzentrationserhöhung an intrazellulären Ca^{2+} -Ionen in HEK-293-Zellen gemessen, die rekombinant den M1-, M2-, oder M3-mAChR exprimierten. In den Zellen wurden dazu eine $G\alpha_{q15}$ -Chimere exprimiert, die auch G_i -gekoppelte Rezeptoren wie den M2-mAChR dazu befähigt, die Phospholipase C zu aktivieren und damit messbare Anstiege der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu induzieren. NSC führte bei allen drei mAChR-Typen zu konzentrationsabhängigen Rechtsverschiebungen der Carbachol-Konzentrations-Wirkungs-Kurven, ohne dabei die maximale Ca^{2+} -Konzentrationserhöhung zu beeinflussen. Es wirkte deshalb wiederum eindeutig als kompetitiver Antagonist an den untersuchten mAChRs. Eine Schild-Analyse der erhaltenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven bestätigte diesen kompetitiven Antagonismus und erlaubte die Berechnung von Affinitätskonstanten für NSC im Bereich von 3 – 5 μ M.

Diese Arbeit belegt damit, dass NSC nicht nur ein Inhibitor der Tiam1-abhängigen Rac1-Aktivierung, sondern auch ein unspezifischer, kompetitiver Antagonist der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren ist.