

UNTERSUCHUNGEN ZUR TOPOLOGIE DER INTERAKTION
ATYPISCHER ALLOSTERISCHER MODULATOREN MIT DEM
M₂-ACETYLCHOLIN-REZEPTOR

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Andreas Dittmann
aus
Karaganda (Kasachstan)

Bonn 2003

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. med. Klaus Mohr

2. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Bönisch

Tag der Promotion:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 1999 bis zum Juli 2003 in der Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Instituts der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr angefertigt.

Danksagung

In erster Linie danke ich Gott für das Wunder menschlicher Begegnungen.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Seine kompetente, ausgeglichene und präzise Arbeitsweise werden mir stets ein Vorbild bleiben. Die Zeit der Mitarbeit in seiner Arbeitsgruppe ist schon jetzt zum wertvollen Teil meines Lebens geworden.

Herrn Prof. Dr. Heinz Bönisch danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Bernd Wiedemann danke ich für die Abnahme der mündlichen Prüfung im Nebenfach.

Herrn PD Dr. Christian Tränkle danke ich ganz herzlich für seine Freundschaft und die betreuende Begleitung dieser Arbeit vor allem hinsichtlich komplexer Computergestützter Analysen.

Frau Iris Jusen sei gedankt für die stets liebevolle Unterstützung im Labor.

Frau Irmgard Knöbel und Frau Mechthild Kepe haben unermüdlich zum angenehmen Arbeitsklima in der Abteilung beigetragen.

Allen Arbeitskollegen danke ich für wertvolle Ideen und für ihre Freundschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, meiner lieben Frau Erika und meinen Kindern Julia, Thomas und Peter Samuel. Ohne ihr Verständnis und ihre Hilfe wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

MEINER LIEBEN FRAU ERIKA
UND
MEINEN LIEBEN KINDERN JULIA, THOMAS UND PETER SAMUEL

1. EINLEITUNG	1
1.1 ACETYLCHOLIN.....	1
1.2 MUSKARINISCHE ACETYLCHOLIN-REZEPTOREN.....	1
1.3 ALLOSTERISCHE MODULATION DER MUSKARIN-REZEPTOREN.....	2
1.4 FRAGESTELLUNG.....	3
2. MATERIALIEN UND METHODEN	6
2.1 MATERIALIEN	6
2.1.1 <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	6
2.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	8
2.1.3 <i>Zubereitungen</i>	9
2.1.4 <i>Geräte und Apparaturen</i>	15
2.2 ORTHOSTERISCHE ANTAGONISTEN	16
2.3 ALLOSTERISCHE MODULATOREN.....	17
2.4 MEMBRANSUSPENSIONEN	22
2.4.1 <i>Membransuspensionen aus Herzventrikeln des Hausschweins</i>	23
2.4.2 <i>Membransuspensionen aus CHO-Zellen</i>	24
2.4.3 <i>Membransuspensionen aus COS7-Zellen</i>	26
2.5 COMPUTERPROGRAMME	33
2.6 ANALYTISCHE METHODEN	33
2.6.1 <i>Proteinbestimmung</i>	33
2.6.2 <i>Gehalts- und Reinheitsbestimmung der Plasmid-DNA</i>	33
2.6.3 <i>Zellzahlbestimmung</i>	34
2.7 EXPERIMENTE UNTER GLEICHGEWICHTSBEDINGUNGEN	35
2.7.1 <i>Homologe kompetitive Inhibition</i>	36
2.7.2 <i>Heterologe allosterische Interaktion</i>	40
2.8 DISSOZIATIONSEXPERIMENTE	42
2.8.1 <i>Dissoziationsexperimente mit Mehrpunkterfassung</i>	45
2.8.2 <i>Dissoziationsexperimente mit Zweipunkterfassung</i>	47
2.9 INTERAKTION ZWISCHEN ALLOSTERISCHEN MODULATOREN	49
2.10 STATISTISCHE METHODEN.....	51
2.10.1 <i>Vergleich unterschiedlicher Modelle</i>	51
2.10.2 <i>Vergleich von Mittelwerten</i>	52
3. ERGEBNISSE	53

3.1	CHARAKTERISIERUNG DER [³ H]NMS-BINDUNG AN MEMBRANSUSPENSIONEN.....	53
3.1.1	<i>Membransuspensionen aus Herzventrikeln des Hausschweins.....</i>	53
3.1.2	<i>Membransuspensionen aus CHO-Zellen</i>	54
3.1.3	<i>Membransuspensionen aus COS7-Zellen.....</i>	55
3.2	VERZÖGERUNG DER [³ H]NMS-DISSOZIATION DURCH ALLOSTERISCHE MODULATOREN	57
3.2.1	<i>Allosterische Wirksamkeit von W84</i>	58
3.3	HEXAMETHONIUM ALS ALLOSTERISCHER MODULATOR UND ALS ANTAGONIST DER [³ H]NMS-DISSOZIATIONS-VERZÖGERUNG	59
3.3.1	<i>Eigeneffekt von Hexamethonium auf die [³H]NMS-Dissoziation.....</i>	60
3.3.2	<i>Antagonistischer Effekt von Hexamethonium gegenüber dem [³H]NMS- Dissoziations-Verzögerungs-Effekt allosterischer Modulatoren.....</i>	63
3.3.3	<i>Konzentrations-Effekt-Beziehungen eines allosterischen Modulators in Ab- und Anwesenheit eines Antagonisten</i>	63
3.3.4	<i>Hexamethonium als Antagonist gegenüber Gallamin.....</i>	68
3.3.5	<i>Hexamethonium als Antagonist gegenüber WDuo3.....</i>	71
3.3.6	<i>Hexamethonium als Antagonist gegenüber EHW21</i>	74
3.3.7	<i>Hexamethonium als Antagonist gegenüber Duo3</i>	77
3.3.8	<i>Hexamethonium als Antagonist gegenüber Tacrin.....</i>	80
3.3.9	<i>Hexamethonium als Antagonist gegenüber Eburnamonin</i>	83
3.4	Mg ²⁺ ALS ALLOSTERISCHER MODULATOR UND ALS ANTAGONIST DER [³ H]NMS- DISSOZIATIONS-VERZÖGERUNG	90
3.4.1	<i>Eigeneffekt von Mg²⁺ auf die [³H]NMS-Dissoziation</i>	90
3.4.2	<i>Mg²⁺ als Antagonist gegenüber Tacrin</i>	91
3.4.3	<i>Mg²⁺ als Antagonist gegenüber EHW21.....</i>	91
3.5	EINFLUSS DES LÖSUNGSVERMITTLERS DMSO	95
3.5.1	<i>Eigeneffekt von DMSO auf die [³H]NMS-Dissoziation.....</i>	96
3.5.2	<i>Einfluss von DMSO auf die allosterische Wirksamkeit von W84</i>	97
3.6	DISSOZIATIONSEXPERIMENTE AN MEMBRANSUSPENSIONEN AUS COS7-ZELLEN ZUR IDENTIFIZIERUNG DER VERANTWORTLICHEN EPITOPE FÜR DIE M ₂ /M ₅ -SELEKTIVITÄT ALLOSTERISCHER MODULATOREN	98
3.6.1	<i>W84.....</i>	99
3.6.2	<i>Alcuronium</i>	100
3.6.3	<i>CARALL</i>	102

3.6.4	<i>WDuo3</i>	103
3.6.5	<i>Duo3</i>	104
3.6.6	<i>Tacrin</i>	107
3.6.7	<i>EHW21</i>	108
3.7	ABHÄNGIGKEIT DER ALLOSTERISCHEN WIRKUNG VON DER ART DER MEMBRANSUSPENSION UND DEN VERSUCHSCHARAKTERISTIKA.....	110
3.7.1	<i>Duo3</i>	112
3.7.2	<i>WDuo3</i>	113
3.7.3	<i>Tacrin</i>	115
3.7.4	<i>EHW21</i>	116
3.8	EINFLUSS ALLOSTERISCHER MODULATOREN AUF DIE GLEICHGEWICHTSBINDUNG VON [³ H]NMS.....	118
4.	DISKUSSION	121
4.1	EINFLUSS DER METHODIK DER DISSOZIATIONSEXPERIMENTE AUF DIE MESSERGEBNISSE.....	121
4.2	ABHÄNGIGKEIT DER ALLOSTERISCHEN WIRKUNG VON DER AMINOSÄURESEQUENZ, DER GLYKOSYLIERUNG UND DEM EXPRESSIONSSYSTEM DES REZEPTORS.....	123
4.3	ANTAGONISMUS-UNTERSUCHUNGEN ZUR BESCHREIBUNG DER INTERAKTION ATYPISCHER ALLOSTERISCHER MODULATOREN MIT DEM M ₂ -REZEPTOR.....	129
4.3.1	<i>Obidoxim und Magnesium-Ionen als bekannte antagonistische Werkzeuge</i>	129
4.3.2	<i>Hexamethonium als neues antagonistisches Werkzeug zur weiteren Charakterisierung atypischer allosterischer Modulatoren</i>	130
4.3.3	<i>Gemeinsamkeiten und Unterschiede der drei antagonistischen Werkzeuge Hexamethonium, Obidoxim und Magnesium-Ionen</i>	133
4.4	ZIELGERICHTETE MUTAGENese ZUR BESCHREIBUNG DER TOPOLOGIE DER REZEPTORINTERAKTION ATYPISCHER ALLOSTERISCHER MODULATOREN.....	134
4.5	LITERATURBEFUNDE ZUR TOPOLOGIE DER ALLOSTERISCHEN BINDUNGSSTELLEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG EIGENER ERGEBNISSE.....	138
4.5.1	<i>Die „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“</i>	138
4.5.2	<i>Von der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ unterschiedliche Bindungsstellen</i>	142
4.6	TACRIN UND EBURNAMONIN ALS LIGANDEN DER „GEMEINSAMEN ALLOSTERISCHEN BINDUNGSSTELLE“ AM M ₂ ACETYLCHOLIN-REZEPTOR.....	143

4.7	DUO3 UND EHW21 ALS LIGANDEN AN „WEITEREN ALLOSTERISCHEN BINDUNGSSTELLEN“ AM M ₂ ACETYLCHOLIN-REZEPTOR	146
4.7.1	<i>EHW21 in Abgrenzung zu Tacrin</i>	146
4.7.2	<i>Duo3 in Abgrenzung zu W84, WDuo3 und Gallamin</i>	146
4.7.3	<i>Duo3 und EHW21 binden an unterschiedlichen „weiteren allosterischen Bindungsstellen“</i>	148
4.8	AFFINITÄTSSTEIGERUNG AM [³ H]NMS BESETZTEN M ₂ -REZEPTOR UND ÄNDERUNG DER ALLOSTERISCHEN MODULATION DER GLEICHGEWICHTSBINDUNG VON [³ H]NMS DURCH STRUKTURELLE VERÄNDERUNGEN AN DUO3 UND DURCH DIMERISIERUNG DES TACRIN	149
4.8.1	<i>Duo3 in Abgrenzung zu WDuo3</i>	149
4.8.2	<i>EHW21 in Abgrenzung zu Tacrin</i>	151
4.9	ZUSAMMENSTELLUNG DER MERKMALE ATYPISCHER ALLOSTERISCHER MODULATOREN DUO3, TACRIN UND EHW21 IM VERGLEICH ZUM TYPISCHEN ALLOSTERISCHEN MODULATOR WDuo3	152
5.	ZUSAMMENFASSUNG	156
6.	LITERATURVERZEICHNIS	159
7.	STATISTIK	168
8.	PUBLIKATIONSLISTE	169
8.1	ABSTRAKTA / KONGRESSMITTEILUNGEN.....	169
9.	LEBENS LAUF	170

1. Einleitung

1.1 Acetylcholin

Im vegetativen Nervensystem spielt das Acetylcholin eine zentrale Rolle bei der Übertragung von Nervenimpulsen. Im parasympathischen Nervensystem ist Acetylcholin der Überträgerstoff in den Ganglien und am Erfolgsorgan. In den Ganglien findet man den nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor, einen Ligand gesteuerten Ionenkanal, und am Erfolgsorgan ist es ein muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor, ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der die Signalwirkung von Acetylcholin in die Zelle transduziert. Im Sympathikus dient das cholinerge Prinzip nur in den Ganglien der Weiterleitung des Nervenimpulses. Auch an der motorischen Endplatte in der Skelettmuskulatur ist es das Acetylcholin, das an der Schnittstelle von Nervenimpuls und nachgeschalteten biochemischen Prozessen seine Wirkung entfaltet. Acetylcholin spielt jedoch nicht nur in der nikotinergeren und muskarinergeren Nervenimpulsübertragung eine Rolle, sondern in einer Vielzahl von Geweben. Als Beispiel seien Epithelzellen der Atemwege und der Epidermis, mesotheliale, endotheliale Zellen (Kirkpatrick et al., 2001) sowie Thrombozyten und Lymphozyten (Fujii und Kawashima, 2001) genannt. Das nicht-neuronale Acetylcholin übt dabei zahlreiche Funktionen aus: Mitose, trophische Funktionen, Cilientätigkeit und Zell-Zell-Kontakte. Marker eines solchen nicht-neuronalen cholinergen Systems (Wessler et al., 1998; Wessler et al., 1999; Grando et al., 2003; Wessler et al., 2003) sind: das Acetylcholin (ACh) selbst, das für seine Synthese verantwortliche Enzym, die Cholin-Acetyltransferase (ChAT), der Cholin-Transporter (CHT1) (Haberberger et al., 2002) sowie muskarinische und nikotinische Rezeptoren.

1.2 Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren

Die muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren gehören zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Man geht davon aus, dass G-Protein gekoppelte Rezeptoren in die Zellmembran derart eingelagert sind, dass das N-terminale Ende des Rezeptorproteins extrazellulär und das C-terminale Ende intrazellulär zu liegen kommen (Abbildung 58, S. 141). Der Rezeptorpeptid-Faden durchzieht die Zellmembran sieben mal, wodurch jeweils drei intrazelluläre (i1 – i3) und drei extrazelluläre (o1 – o3) Aminosäuren-Schleifen und sieben transmembranäre Domänen (TM1 - TM7) entstehen. Die transmembranären Domänen sind ringförmig ange-

ordnet (Pogozheva et al., 1997; Palczewski et al., 2000). Zum heutigen Zeitpunkt sind fünf Rezeptor-Subtypen von M_1 bis M_5 bekannt (Caulfield und Birdsall, 1998). Der M_2 -Rezeptor befindet sich vor allem im Herzen und in der glatten Muskulatur. Daneben findet sich in der glatten Muskulatur auch der M_3 -Rezeptor. Das Gehirn enthält den M_1 -Rezeptor (Cortex, Hippocampus), den M_4 -Rezeptor (Striatum), den M_5 -Rezeptor (Substantia nigra) und den M_3 -Rezeptor. Die Funktionen der Drüsen werden durch die Rezeptoren M_1 und M_3 gesteuert. Die Rezeptoren M_1 , M_3 und M_5 können die Phospholipase C (PLC) über das G-Protein $G_{q/11}$ aktivieren. Die Phospholipase C vermag dann ihrerseits aus dem Membranlipid Phosphatidylinositol die sekundären Botenstoffe Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) abzuspalten. Die Rezeptoren M_2 und M_4 hemmen in den meisten Fällen die Adenylatzyklase (AC) über das G-Protein $G_{i/o}$, was zur Abnahme der cAMP-Konzentration führt (Richards, 1991; Felder, 1995; Broadley und Kelly, 2001). In der Peripherie sind die Muskarin-Rezeptoren unter anderem an der Regulation der Kontraktion der glatten Muskulatur, der Drüsensekretion und der Modulation der Frequenz und der Kontraktionskraft des Herzens beteiligt. Im ZNS spielen die Muskarin-Rezeptoren eine Rolle bei der Kontrolle der motorischen Aktivität, der Regulation von Temperatur, der kardiovaskulären Regulation und bei Gedächtnisvorgängen. Weiterhin spielt das muskarinische cholinerge System eine Rolle bei der Regulation der Cannabinoid-Rezeptoren im Hippocampus (Kim et al., 2002). Die nachgeschalteten Effekte der muskarinischen Rezeptoren werden durch Bindung des endogenen Liganden Acetylcholin an der sogenannten orthosterischen Bindungsstelle vermittelt. Direkte Parasympathomimetika, wie das namensgebende Muskarin, Carbachol und Pilocarpin, sowie Parasympatholytika, wie Atropin, Scopolamin, Pirenzepin und Darifenacin entfalten ihren agonistischen bzw. antagonistischen Effekt ebenfalls über die orthosterische Bindungsstelle. Die orthosterische Bindungsstelle ist von extrazellulär zugänglich (Caulfield und Birdsall, 1998) und liegt im oberen Drittel einer Tasche, die von den ringförmig angeordneten transmembranären Domänen gebildet wird. Die polare Aminogruppe von Acetylcholin interagiert mit einem Asparagin-Rest der dritten transmembranären Domäne (Spalding et al., 1994).

1.3 Allosterische Modulation der Muskarin-Rezeptoren

Die Bindung (Lazareno et al., 1998) und die Effekte (Birdsall et al., 1999) sowohl der Agonisten als auch der Antagonisten der Muskarin-Rezeptoren können allosterisch

moduliert werden. Allosterische Modulatoren können hierbei im Falle einer positiven Kooperativität die Bindung des orthosterischen Liganden fördern und im Falle einer negativen Kooperativität die Bindung desselben erniedrigen. Im speziellen Fall der neutralen Kooperativität bindet der allosterische Modulator zwar an den Acetylcholin-Rezeptor, lässt aber die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden unbeeinflusst (Ehlert, 1988; Christopoulos et al., 1998). Die Förderung oder die Hemmung der Gleichgewichtsbindung kommt durch eine unterschiedliche Beeinflussung der Dissoziation und der Assoziation orthosterischer Liganden durch die allosterischen Modulatoren zustande. Allosterische Modulatoren der Muskarin-Rezeptoren sind strukturell sehr heterogen. Als Beispiele seien Alcuronium, D-Tubocurarin, Pancuronium, Gallamin, W84, Verapamil, Hexamethonium und Obidoxim genannt (Tucek und Proska, 1995; Holzgrabe und Mohr, 1998). Dennoch ist es gelungen, eine „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ zu identifizieren, über die viele der bekannten Modulatoren ihre allosterischen Effekte vermitteln (Ellis und Seidenberg, 1992; Holzgrabe et al., 2000). Man kann davon ausgehen, dass die „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ weiter extrazellulär (Voigtländer et al., 2003) liegt als die orthosterische Bindungsstelle.

Die Effekte einiger sogenannter atypischer allosterischer Modulatoren sind mit dem Konzept einer „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ nicht vereinbar (Mohr und Tränkle, 1994; Tränkle und Mohr, 1997; Tränkle et al., 2003). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass es weitere allosterische Bindungsstellen an den Muskarin-Rezeptoren geben könne. Mittlerweile wurde eine „zweite allosterische Bindungsstelle“ postuliert, an der Modulatoren interagieren, die an der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ keine Effekte vermitteln (Lazareno et al., 2000; Lazareno et al., 2002).

1.4 Fragestellung

Die Substanzen **Duo3** (1.1.1.1, S. 19) und **Tacrin** (2.3.1.8, S. 21) sind als *atypische allosterische Modulatoren* (Potter et al., 1989; Tränkle et al., 1996; Tränkle et al., 2003) des M₂-Rezeptors bekannt. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung von Duo3 und Tacrin sind steil und zeigen damit, dass die Interaktion dieser atypischen allosterischen Modulatoren nicht dem Massenwirkungsgesetz folgt. Die Antagonisierbarkeit des dissoziationsverzögernden Effektes von Duo3 und Tacrin durch die antagonistischen Werkzeuge Obidoxim (Ellis

und Seidenberg, 1992; Tränkle und Mohr, 1997) und Magnesium-Ionen (Schulz, 1998; Burgmer et al., 1998) ist wesentlich schwächer ausgeprägt, als es der Fall ist bei den typischen allosterischen Modulatoren Gallamin und WDuo3. Für Duo3 ist weiterhin gezeigt worden, dass die Pufferabhängigkeit der allosterischen Wirksamkeit (Schröter et al., 2000) ebenfalls geringer ausgeprägt ist als bei WDuo3. Die in dieser Arbeit angestellten Untersuchungen hatten zum Ziel, mehr Einblick in die Interaktion atypischer allosterischer Modulatoren mit M₂-Rezeptoren zu erlangen. Der atypische allosterische Interaktions-Charakter von Tacrin ist bislang durch die Annahme erklärt worden, dass zwei Tacrin-Moleküle gleichzeitig am M₂-Rezeptor gebunden sein müssen, um einen allosterischen Effekt auszulösen (Potter et al., 1989; Mohr und Tränkle, 1994). Zu Beginn dieser Arbeit wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass eine Verbrückung zweier Tacrin-Moleküle mittels einer Hexyl-Kette den atypischen allosterischen Charakter von Tacrin eliminieren sollte, so dass das *Tacrin-Dimer* die Orthoster-Bindung am M₂-Rezeptor in einer „eins zu eins Interaktion“ typisch allosterisch modulieren sollte. Dafür wurde eigens für diese Arbeit ein Tacrin-Dimer mit der Arbeitsbezeichnung **EHW21** (Strukturformel in 2.3.1.9, S. 21) von der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Holzgrabe (Würzburg) synthetisiert. Hier wurde EHW21 dann erstmals in Dissoziations-Experimenten und in Gleichgewichtsbindungs-Untersuchungen mit [³H]NMS sowie in Antagonismus-Untersuchungen mit Hexamethonium getestet.

Antagonismus-Untersuchungen mit *Obidoxim* gegenüber Gallamin (Ellis und Seidenberg, 1992) und anderen typischen allosterischen Modulatoren wie WDuo3, Alcuronium und W84 (Tränkle und Mohr, 1997) haben zum Konzept einer „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ geführt. Die Ergebnisse aus Antagonismus-Untersuchungen mit Obidoxim und später mit *Magnesium-Ionen* gegenüber den atypischen allosterischen Modulatoren Tacrin und Duo3 waren jedoch nicht einheitlich, wenngleich sie den atypischen Charakter der allosterischen Wirkung von Tacrin und Duo3 nicht in Frage stellten. Mit Magnesium-Ionen als antagonistisches Prinzip ließ sich die atypische Wirkung von Tacrin deutlicher zeigen als mit Obidoxim. Jedoch muss Mg²⁺ aufgrund seiner niedrigen Affinität zum [³H]NMS besetzten Rezeptor in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt werden, was diesen Untersuchungen Löslichkeits-bedingte Grenzen auferlegt. Es schien daher sinnvoll, ein drittes antagonistisches Werkzeug zur eingehenderen Charakterisierung atypischer allosterischer Modulatoren einzuführen. Deshalb wurde **Hexamethonium**

(2.3.1.6, S. 20) in dieser Arbeit als Antagonist gegenüber Tacrin und Duo3 eingesetzt. Hexamethonium vereint zwei wesentliche Eigenschaften in sich. Erstens ist Hexamethonium, wie Obidoxim und auch Magnesium-Ionen, selbst ein allosterischer Modulator des M₂-Rezeptors, jedoch mit submaximaler Wirkung. Dieser Umstand ermöglicht den Einsatz von Hexamethonium als Antagonist gegenüber dem [³H]NMS-dissoziationsverzögernden Effekt von anderen Modulatoren. Zweitens kann Hexamethonium als Grundstruktur der gut untersuchten Hexan-bisammonium-Derivate, wie W84 und dem zum Radioalloster weiterentwickelten Dimethyl-W84 (Tränkle et al., 1998), aufgefasst werden. Damit bildet es eine gute Ergänzung zu Obidoxim, welches die Grundstruktur der Bispyridinium-Derivate, wie zum Beispiel WDuo3, in sich trägt. Der allosterische Modulator **Eburnamonin** (Strukturformel in 2.3.1.4, S. 19), ein Förderer der Acetylcholin-Bindung (Proska und Tucek, 1996; Jakubik et al., 1997), wurde in die Antagonismus-Untersuchungen eingeschlossen, weil er wie Tacrin wegen steiler Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung als atypisch aufgefasst werden kann. **WDuo3** (2.3.1.11, S. 22) und **Gallamin** (2.3.1.5, S. 20) dienten bei diesen Untersuchungen als Referenz-Substanzen der typischen allosterischen Modulatoren.

Im zweiten Teil dieser Arbeit ergab sich die Möglichkeit, M₂/M₅ chimäre und punktmutierte -Rezeptoren (Buller et al., 2002) einzusetzen. Aus Untersuchungen an diesen Rezeptormutanten zur *Epitopabhängigkeit der M₂/M₅-Selektivität* konnten Rückschlüsse auf die Aminosäuren gezogen werden, die für die Interaktion allosterischer Modulatoren mit M₂-Rezeptoren essentiell sind. Auf der Basis dieser Befunde wurde ein dreidimensionales Modell der Alloster-Orthoster-Rezeptor-Interaktion erstellt (Voigtländer et al., 2003). Die Bindung typischer allosterischer Modulatoren W84 und Diallylcaracurin V konnte in Einklang mit den Experimentalbefunden zur Bedeutung der Aminosäuren ¹⁷⁷Tyrosin und ⁴²³Threonin simuliert werden. Hier sollten die atypischen allosterischen Modulatoren *Tacrin* und *Duo3* und das neu eingeführte *Tacrin-Dimer EHW21* auf ihre Epitopabhängigkeit der M₂/M₅-Selektivität hin getestet werden. WDuo3 wurde zu Vergleichszwecken als Vertreter der typischen allosterischen Modulatoren in die Untersuchungen eingeschlossen. Damit bot sich die Möglichkeit, Erkenntnisse zur Interaktion atypischer allosterischer Modulatoren am M₂-Rezeptor aus Antagonismus-Untersuchungen durch Informationen zur Epitopabhängigkeit der M₂/M₅-Selektivität der Modulatoren zu ergänzen und zu erweitern.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

In der nachfolgenden Auflistung der Materialien, Geräte und Apparaturen wird die Bestell- bzw. Referenznummer des jeweiligen Lieferanten oder Herstellers, sofern vorhanden, in einer rechten Spalte angegeben.

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acros Organics (Geel, Belgien)

Natriumbutyrat (110,08 g/mol)	26319
Eburnamonin (294,39 g/mol)	18690-0010

Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Würzburg)

Caracurin-bis-chlorallylat (CARALL) (737,79 g/mol)
Duo3 (764,17 g/mol)
EHW21 (Tacrin-Dimer) (478,68 g/mol)
W84 (708,50 g/mol)
WDuo3 (764,42 g/mol)

Beckman Instruments, INC (Fullerton, USA)

Ready Protein Szintillations-Cocktail, gewebelösend	586604
---	--------

Calbiochem-Novabiochem GmbH (Schwalbach)

G418 Sulfat (Geneticin®)	345810
--------------------------	--------

Fluka (Buchs, Schweiz)

DMF (N,N-Dimethylformamid) (73,10 g/mol)	40248
DMSO (Dimethylsulfoxid) (78,13 g/mol)	41640

Gibco Invitrogen Ltd (Paisley, Großbritannien)

NZY-Broth, powder	13635-024
-------------------	-----------

Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Wyhlen)

Alcuronium (737,79 g/mol)

Merck KGaA (Darmstadt)

Glucose DAB (198,17 g/mol)	10.8346
KH ₂ PO ₄ (136,09 g/mol)	1.04873
Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O (177,99 g/mol)	1.06580
NaHCO ₃ (84,01 g/mol)	10.6329
Saccharose (342,30 g/mol)	1.07687

Qiagen GmbH (Hilden)

Qiagen Plasmid Maxi Kit (Plasmidpräparationskit: präparative Plasmid-DNA-Isolierung aus transformierten E. coli)	12162
---	-------

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)

2-Propanol, 99.5%, HPLC Qualität (60,10 g/mol)	270490
Ampicillin, Natrium Salz (371,4 g/mol)	A-9518
Atropinsulfat (676,8 g/mol)	A-0257
BES Freie Säure (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethan- sulfonsäure) (213,2 g/mol)	B-4554
CaCl ₂ • 2H ₂ O 147 (g/mol)	C-7902
DME (DMEM) Lösung (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	D-5671
DME (DMEM) Pulver (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	D-5648
DMSO (Dimethylsulfoxid) (78,13 g/mol)	D-5879
D-PBS (PBS) Pulver (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Modified)	D-5652
EDTA Säure (292,2 g/mol)	E-9884
Fetales Rinder Serum (Lot 109H3364)	F-7524
Gallamintriiodid (891,50 g/mol)	G-8134
Glycerol (92,09 g/mol)	G-5516
Hepes Natrium Salz (260,30 g/mol)	H-7006
Hepes Säure (238,30 g/mol)	H-3375
Hexamethoniumbromid (362,2 g/mol)	H-0879
IPTG (Isopropyl beta-D-thiogalactopyranosid) (238,3 g/mol)	I-6758
KH ₂ PO ₄ (136,09 g/mol)	P-5379
LB agar, Miller (Luria-Bertani)	L-3027
LB broth, Miller (Luria-Bertani) (LB-Medium Pulver)	L-3152
L-Glutamin-Lösung 200 mM	G-7513

Luria Broth	L-3522
Magnesiumchlorid Hexahydrat (203,30 g/mol)	M-2670
Na ₂ EDTA • 2H ₂ O (372,2 g/mol)	E-5134
Na ₂ HPO ₄ (142 g/mol)	S-0876
NaHCO ₃ (84,01 g/mol)	S-5761
Nährmedium F-12	N-4888
N-Methyl-Scopolamin (NMS) (398,30 g/mol)	S-8502
Penicillin-Streptomycin-Lösung (Penicillin (10.000 U/ml), Streptomycin (10 mg/ml))	P-0781
Polyethylenimin 50% (g/ml) wässrige Lösung (PEI)	P-3143
Tacrin (234,70 g/mol)	A-3773
Trypsin-EDTA-Lösung	T-3924
Trypton (Pancreatic digest of casein)	T-7293
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) (408,6 g/mol)	B-4252
Hefeextrakt	Y-0500

Sigma-ARK GmbH (Darmstadt)

Oligonukleotidprimer für die zielgerichtete Mutagenese	Einzelbestellung
Oligonukleotidprimer für die Auftragssequenzierung	Einzelbestellung

Stratagene (La Jolla, USA)

QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Ziel-gerichtete Mutagenese)	200519
---	--------

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Adi Hassel (München)

Filtermatte Whatman GF/B, Brandel	Part # FBP-148L
-----------------------------------	-----------------

Fastnacht GmbH (Bonn)

PE Szitillations-Meßgefäße 21 ml

Fischer-Scientific (Schwerte)

Borsilikatglas Reagenzgläser 16x160 mm (Kimble Glass Inc., USA)	73 500 16 100
FB Kulturröhrchen BG 16x100	FB 51330
Polystyrene (PS) Round-Bottom Tubes 5 ml	35/2054
Polystyrene (PS) Round-Bottom Tubes 5 ml	35/2059 (9401352)

Greiner Bio-One GmbH (Solingen-Wald)

Gewebekulturflasche T182 (550 ml, 182 cm ²)	660175
Gewebekulturflasche T75 (250 ml, 75 cm ²)	658175
PP-Röhrchen 15 ml	188271
PP-Röhrchen 50 ml	227261
Petri Schale klein (Kulturschale Ø 10 cm)	633161 (664160)
Petri Schale groß (Kulturschale Ø 15 cm)	639160

Nalgene (Rochester, USA)

Disposable Filter Unit (SFCA Bottle Top Filter; 0,2 µm)	2904520
---	---------

Nunc (Wiesbaden)

Zellschaber 32 cm	179707
Kryoröhrchen CryoFlex 1,5 ml	343958

Schleicher & Schüll, Dassel

GF6 Glasfaserfilter

2.1.3 Zubereitungen

Die Darstellung der Zusammensetzung der Zubereitungen wird im folgenden der ärztlichen und apothekerlichen Rezeptsprache mit den üblichen lateinischen Kürzeln angelehnt. Nur wenn nötig, wird die kompakte Darstellungsweise durch erklärenden Text ergänzt. Nährmedien, Lösungen und Puffer für Zellkulturen wurden grundsätzlich unter dem Laminar Air Flow zubereitet und im Kühlschrank aufbewahrt. Wenn nicht anders erwähnt, erfolgte die pH-Einstellung mit 1N NaOH oder 1N HCl. Der Begriff „Lösung“ bezieht sich jeweils auf eine wässrige Lösung der entsprechenden Substanz. Andernfalls wird das Lösungsmedium explizit benannt.

2.1.3.1 Lösungen

Ampicillin-Lösung 50 mg/ml

Ampicillin-Na mit 371,4 g/mol	750 mg
Aqua destillata	ad 15 ml

Die Lösung wurde steril filtriert, zu je 550 µl in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Atropin [$1,2 \times 10^{-5}$ M] in Na, K, P_i – Puffer 10 mM

Atropin-Lösung 3×10^{-4} M	4,0 ml
Na, K, P _i – Puffer 10,42 mM	ad 100,0 ml

Atropin-Lösung 3×10^{-4} M

Atropinsulfat mit 338,4 g/mol	0,010152 g
Aqua destillata	ad 100 ml

Atropin-Lösung 9×10^{-5} M

Atropin-Lösung 3×10^{-4} M	15 ml
Aqua destillata	ad 50 ml

Butyrat Stammlösung (100 mM)

Natriumbutyrat	1,11 g
Aqua destillata	ad 100 ml

CaCl₂-Lösung 0,25 M

CaCl ₂ • 2H ₂ O mit 147 g/mol	18,375 g
Aqua sterilisata	ad 500 ml

Die Lösung wurde steril filtriert, zu je 50 ml in PP-Röhrchen aliquotiert und im Kühlschrank gelagert.

Ethanol 70%

Ethanol 96%	72,9 ml
Aqua destillata	27,1 ml

G418-Stammlösung (100 mg/ml)

Als antibiotische Zugabe zum Nährmedium von stabil transfizierten CHO-Zellen ist in der G418-Stammlösung eine Wirkstärke (Potency) des Antibiotikums von 100 mg/ml erforderlich. Geniticinsulfat wurde in 5 g Glasflaschen angeliefert. Die Wirkstärke (potency) ist chargenabhängig und wird in µg/mg geliefertes Pulver angegeben. Es wurde eine genaue Einwaage in ein 50 ml PP-Röhrchen (z.B. 5000 mg Pulver) vorgenommen. Die entsprechende Menge Wasser wurde zupipettiert. Nach dem

Mischen entstand eine klare Lösung. Die Arbeitsbank wurde sterilisiert, ebenso das PP-Röhrchen, die Pipette, die Umhüllung für Sterilfilter und die Spritze. Pipettenspitze und Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden einem sterilen Vorrat entnommen. Die Geniticinlösung wurde steril in ein anderes PP-Röhrchen filtriert, und zu je 1 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und bei -20°C eingefroren.

Glucose-Lösung 20% (g/ml) (Lagerung bei -20°C)

Glucose	4 g
Aqua sterilisata	ad 20 ml

Glycerol-Lösung 60% (ml/ml)

Glycerol	30,30 ml
Aqua destillata	ad 50 ml

Die Lösung wurde in PP-Röhrchen steril filtriert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Hepes-Lösung (200 mM, pH 7,4)

Hepes Natrium Salz	5,51 g
Aqua destillata	ad 100 ml
pH-Wert-Einstellung	pH 7,4

IPTG-Lösung 10 mM (Lagerung bei -20°C)

IPTG	23,83 mg
Aqua sterilisata	ad 10 ml

Na_2EDTA -Lösung (100 mM)

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,72 g
Aqua destillata	ad 100 ml

PEI-Lösung 0,1% (g/g)

PEI-Lösung 1% (g/g)	50 g
Aqua destillata	ad 500 g

PEI-Lösung 1% (g/g) (Lagerung bei RT und Lichtausschluss)

PEI Lösung 50% (g/g)	10 g
Aqua destillata	ad 500 g

Saccharose-Lösung 0,32 M

Saccharose	109,54 g
Aqua destillata	ad 1000 ml

X-Gal-Lösung 2% in DMF (g/ml) (Lagerung bei -20°C und Lichtausschluss)

X-Gal	2 g
Dimethylformamid (DMF)	ad 100 ml

2.1.3.2 Nährmedien

DMEM Nährmedium (für COS7-Zellen)

D-MEM mit L-Glutamin, mit 4500 mg/l Glucose; ohne NaHCO₃, ohne Pyruvat

DME (DMEM) Pulver	13,4 g
Penstrep (10.000 U/ml pen, 10.000 µg strep)	10 ml
NaHCO ₃	3,7 g
Aqua destillata	ad 900 ml
pH-Wert-Einstellung	pH 7,2
Aqua destillata	ad 1000 ml
+ FKS (100 ml für 10%)	100 ml

Das Nährmedium wurde in 500ml Flaschen steril filtriert und im Kühlschrank gelagert.

Luria-Bertani-Agar-Platten (für E. coli-Bakterien)

Zusammensetzung (pro Liter für 40 Kulturschalen Ø 10 cm):

LB-Agar, Pulver	37 g
Aqua destillata	ad 1000 ml
pH-Wert-Einstellung	pH 7,0

LB-Agar wurde in der Mikrowelle stufenweise erhitzt, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Nach dem Autoklavieren wurde die Agarlösung auf 55°C abgekühlt, und es wurden 400 µl Ampicillin-Lösung 50 mg/ml hinzugefügt. Die Agarlösung wurde zu jeweils 25 ml auf Kulturschalen Ø 10 cm unter Vermeidung von Luftblasen ausgegossen. Nach dem „Deckeln“ wurden die Kulturschalen im Kühlschrank aufbewahrt. Am Tag vor der Benutzung wurde das Kondenswasser im Inkubator bei 37°C entfernt, indem die Agar-Platten mit der offenen Seite nach unten gestellt und der Deckel schräg an die Platten gelehnt wurde.

Luria-Bertani-Nährmedium (für E. coli-Bakterien)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Aqua destillata	ad 900 ml
pH-Wert-Einstellung	pH 7,0
Aqua destillata	ad 1000 ml

Das Nährmedium wurde zu je 500 ml in mit Alufolien abgedeckten Erlenmeyerkolben autoklaviert (Programm 3, 25 min, 121°C). Für eine Starterkultur wurden 200 ml Nährmedium in einem Becherglas autoklaviert (12 ml pro gepicktem Klon).

Luria-Bertani-Nährmedium (für E. coli-Bakterien) (Alternative Herstellung)

LB-Medium Pulver	25 g
Aqua destillata	ad 1000 ml

Nährmedium F-12-CHO (für CHO-Zellen)

Nährmedium F-12	500 ml
Fetales Kälber Serum	45 ml
Penicillin-Streptomycin Lösung	5 ml
L-Glutamin Lösung (200 mM)	3 ml
G418 Stammlösung (100 mg/ml)	1 ml

NZY⁺-Nährmedium (für E. coli-Bakterien)

NZY-Nährmedium	10 ml
Glucose-Lösung 20%	200 µl

Die Herstellung erfolgte in einem sterilen PP-Röhrchen unmittelbar vor dem Gebrauch.

NZY-Nährmedium (für E. coli-Bakterien)

NZY Broth, Pulver	4,2 g
Aqua destillata	ad 200 ml
pH-Wert-Einstellung	pH 7,5

Das Nährmedium wurde autoklaviert (Programm 3, 15 min, 121°C) und im Kühlschrank aufbewahrt.

2.1.3.3 PufferBBS (2x)-Puffer, pH 6,95 (BES 50 mM, NaCl 280 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM)

BES mit 213,2 g/mol	5,33 g
NaCl mit 58,44 g/mol	8,1816 g
Na ₂ HPO ₄ mit 177,99 g/mol	0,1335 g
Aqua destillata	ad 400 ml
pH-Wert-Einstellung	pH 6,95
Aqua destillata	ad 500 ml

Die Lösung wurde in 500 ml Flaschen steril filtriert, auf 50 ml PP-Röhrchen aliquotiert und bei -20°C eingelagert.

KH₂PO₄ - Puffer - 0,5 M (Lagerung bei RT und Lichtausschluss)

KH ₂ PO ₄ Merck 1.04873.0250	68,05 g
Aqua destillata	ad 1000 ml

Na, K, P_i – Puffer 5 mM

Na, K, P _i - Puffer 40 mM	62,50 ml
Aqua destillata	ad 500,00 ml

Na, K, P_i-Puffer 5 mM, pH 7,4 (4 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄)

KH ₂ PO ₄	0,7708 g
Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O	4,1094 g
Aqua destillata	ad 5000 ml
pH-Wert-Einstellung mit 1N H ₃ PO ₄	pH 7,4

Na, K, P_i – Puffer 5,21 mM

Na, K, P _i - Puffer 40 mM	65,13 ml
Aqua destillata	ad 500,00 ml

Na, K, P_i – Puffer 10,42 mM

Na, K, P _i - Puffer 40 mM	130,25 ml
Aqua destillata	ad 500,00 ml

Na, K, P_i – Puffer 40 mM

Na ₂ HPO ₄ - Puffer 0,5 M	200 ml
KH ₂ PO ₄ - Puffer - 0,5 M	40 ml
Aqua destillata	ad 3000 ml

Na₂HPO₄ - Puffer - 0,5 M (Lagerung bei RT und Lichtausschluss)

Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O Merck 1.06580.0500	177,99 g
Aqua destillata	ad 2000 ml

PBS-Puffer, pH 7,2 (DPBS) ohne CaCl₂, ohne MgCl₂

D-PBS (PBS) Pulver	9,6 g
Aqua destillata	ad 900 ml
pH-Wert-Einstellung	pH 7,2
Aqua destillata	ad 1000 ml

Der Puffer wurde in 500 ml Flaschen steril filtriert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Puffer 1 (Homogenisationspuffer: 20 mM Hepes / 10 mM Na₂EDTA)

Hepes Stammlösung (200 mM / pH 7,4)	50 ml
Na ₂ EDTA-Lösung (100 mM)	50 ml
Aqua destillata	ad 500 ml

Puffer 2 (Storage Puffer: 20 mM Hepes / 0,1 mM Na₂EDTA)

Hepes Stammlösung (200 mM / pH 7,4)	50 ml
Na ₂ EDTA-Lösung (100 mM)	0,5 ml
Aqua destillata	ad 500 ml

TE-Puffer, pH 8,0 (Tris 10 mM, EDTA 1 mM)

EDTA Säure mit 292,2 g/mol	0,02922 g
Aqua destillata	ad 80 ml
1N NaOH bis alles gelöst ist	n ml
Tris-Base mit 121,14 g/mol	0,12114 g
pH-Wert-Einstellung	pH 8,0
Aqua destillata	ad 100 ml

Der Puffer wurde steril filtriert und im Kühlschrank aufbewahrt.

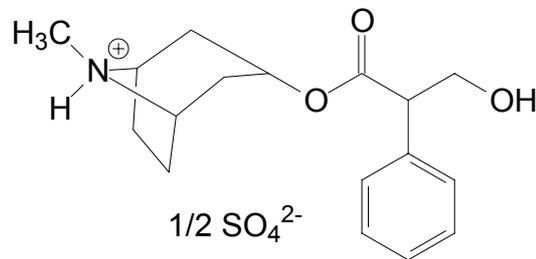
2.1.4 Geräte und Apparaturen

Beckman AVANTI-J25 Zentrifuge (Palo Alto, USA)
 Beckman DU 640 UV-Spektralphotometer (München)
 Beckman L7-35 Ultrazentrifuge (Palo Alto, USA)
 Beckman LS 6000 SC Flüssigkeits-Szintillations-Zählgerät (Palo Alto, USA)
 BIO-FLOW Technik Laminar Air Flow (Meckenheim)
 Brandel Cell Harvester MB-482 (Gaithersburg, USA)
 Carl Zeiss Axiovert 25 Mikroskop (Jena)
 Einzelfilteranlage mit acht Positionen (Pharmazeutisches Institut, Bonn)
 Eppendorf Zentrifuge 5417C (Westbury, USA)
 Forma Scientific Orbital Shaker, Model: 4520 (Marjetta, USA)
 Forma Scientific Water Jacketed Inkubator, Model: 3121 (Marjetta, USA)
 GFL 1083 Schüttelwasserbad (Burgwedel)
 Heraeus BB 6060 Brutschrank, Kendro Laboratory Products (Hanau)
 Kinematica Polytron (Littau, Schweiz)
 Kühlkammer Viessmann Typ 7135 063 mit
 Kühlaggregat Viessmann KF 830 (Deutschland)
 Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 (Norwalk, USA)
 Potter Elvehjem Glashomogenisator (Deutschland)
 Schärfe-System CASY 1 Zellzählssystem (Scotch Plains, USA)
 Taylor-Wharton 750 RS Stickstofftank (West Sacramento, USA)
 Tuttnauer 3870 ELV Autoklav (Hempstead, USA)
 VF2 Rotationsmischgerät (Staufen)
 Vortex Genie 2 Rotationsmischgerät (Zürich, Schweiz)
 Waring Blendor Homogenisator (New Hartford, USA)

2.2 Orthosterische Antagonisten

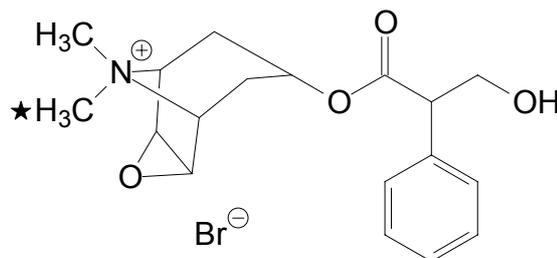
Der Radioligand [^3H]N-Methyl-Scopolamin ([^3H]NMS) wurde eingesetzt, um die orthosterische Bindungsstelle am muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor zu markieren. N-Methyl-Scopolamin (NMS) diente in homologen kompetitiven Inhibitionsexperimenten der Verdrängung von [^3H]NMS, um die jeweilige Membransuspension hinsichtlich des K_D - und B_{\max} -Wertes (2.7.1, S. 36) zu charakterisieren. Mithilfe von Atropin konnte in Dissoziations- und Inhibitions-Experimenten die unspezifische Bindung bestimmt werden.

2.2.1.1 Atropin



Lieferant / Bestellnummer:	Sigma	A-0257
Summenformel / Molekulargewicht:	$(\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$	676,80 g/mol

2.2.1.2 N-Methyl-Scopolamin, [^3H]N-Methyl-Scopolamin



★ Position der radioaktiven Markierung

N-Methyl-Scopolamin

Lieferant / Bestellnummer:	Sigma	S-8502
Summenformel / Molekulargewicht:	$\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{NO}_4 \cdot \text{CH}_3\text{Br}$	398,30 g/mol

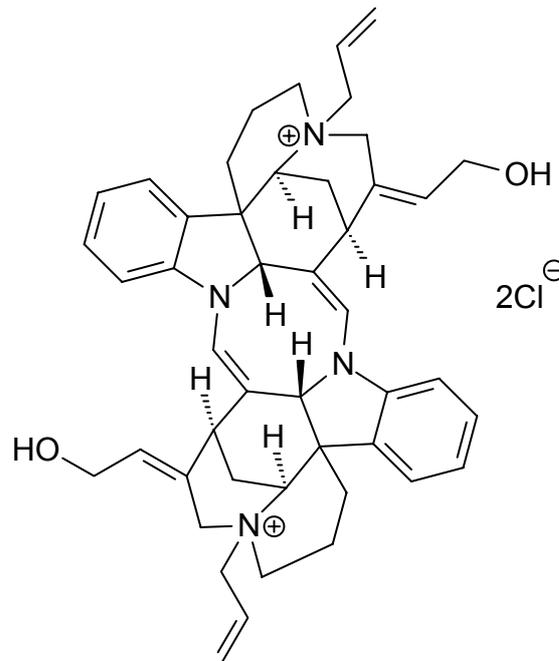
[^3H]N-Methyl-Scopolamin

Lieferant:	Perkin Elmer Life Sciences (Boston, USA)
Spezifische Aktivität:	70 bis 82 Ci/mmol (je nach Charge)

2.3 Allosterische Modulatoren

Die nachfolgend aufgeführten Substanzen modulieren den muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor, was sich darin zeigt, dass sie die [³H]NMS-Dissoziation aus dem Rezeptor-Ligand-Komplex verlangsamen. Für eine potentielle Weiterentwicklung der Modulatoren zum Arzneistoff ist die Kenntnis der allgemeinen pharmakologischen Eigenschaften der Modulatoren wichtig, weshalb sie hier kurz erwähnt werden. Substanzen, die nicht käuflich erhältlich waren, wurden dankenswerterweise vom Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe, Pharmazeutisches Institut, Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

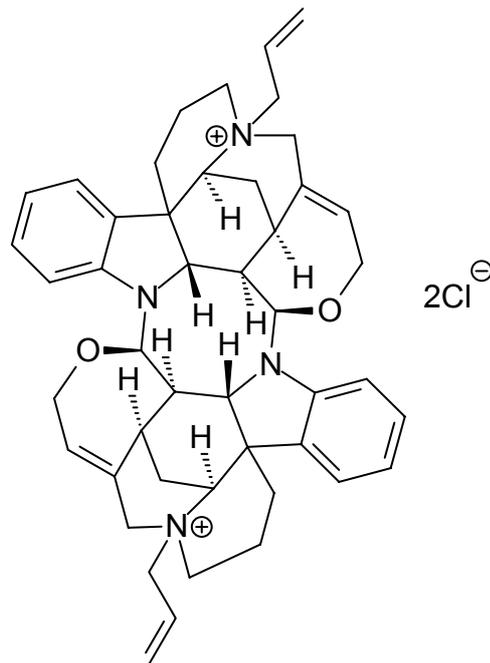
2.3.1.1 Alcuronium



- IUPAC: N,N'-Diallylnortoxiferinium-dichlorid
- Herkunft: Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen
- Summenformel / Molekulargewicht: $C_{44}H_{50}N_4O_2Cl_2$ 737,79 g/mol

Alcuronium (Alloferin[®]) ist ein semi-synthetisches stabilisierendes Muskelrelaxans abgeleitet vom Alkaloid C-Toxiferin-I aus Kalebassencurare (Forth et al., 1998). Als Kalebassencurare werden Extrakte aus beispielsweise der Pflanze *Strychnos toxifera*, Loganiaceae bezeichnet, die von südamerikanischen Indianern als Pfeilgifte in ausgehöhlten Kürbissen (Calebassen) aufbewahrt wurden.

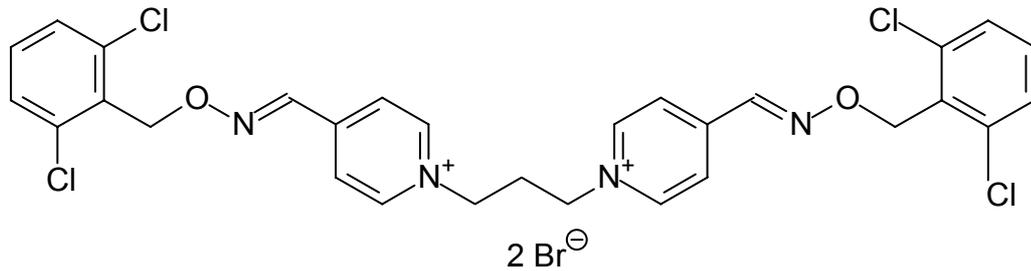
2.3.1.2 CARALL



- IUPAC: Caracurin-bis-chlorallylat (Diallylcaracurin V)
- Herkunft: Dr. Darius P. Zlotos (Synthese), Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe
- Summenformel / Molekulargewicht: $C_{44}H_{50}N_4O_2Cl_2$ 737,79 g/mol

Diallylcaracurin V (Zlotos et al., 2000) ist ein Derivat des Alkaloids Caracurin V aus der Rinde von *Strychnos toxifera*, *Loganiaceae*. Diallylcaracurin V kann formal als Dimer des Strychnins aufgefasst werden. Strychnin selbst ist ein Gift, welches zu Krampfanfällen und Lähmung des Atemzentrums führt. Strychnin ist ein kompetitiver Antagonist am Glycin-Rezeptor auf Motoneuronen im Rückenmark (Forth et al., 1998). Es stammt aus den Samen eines indischen Baumes *Strychnos nux vomixa*, *Loganiaceae*.

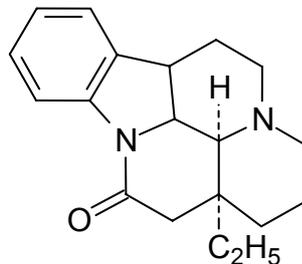
2.3.1.3 Duo3



- IUPAC: 4,4'-bis[(2,6-dichloro-benzyloxy-imino)-methyl]-1,1'-propan-1,3-diyl-bis-pyridinium-dibromid
- Herkunft: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe
- Summenformel / Molekulargewicht: $C_{29}H_{26}N_4O_2Br_2Cl_4$ 764,17 g/mol

Die Bispyridinium-Analoga Duo3 und WDuo3 sind Aryl-substituierte Derivate des TMB-4. TMB-4 (1,1'-Trimethylen-bis (4-aldoximinopyridinium)-dibromid) und Obidoxim (Toxogonin[®]), strukturell miteinander verwandt, können nach Vergiftungen mit Organophosphaten die Acetylcholinesterase durch Umphosphorylierung reaktivieren.

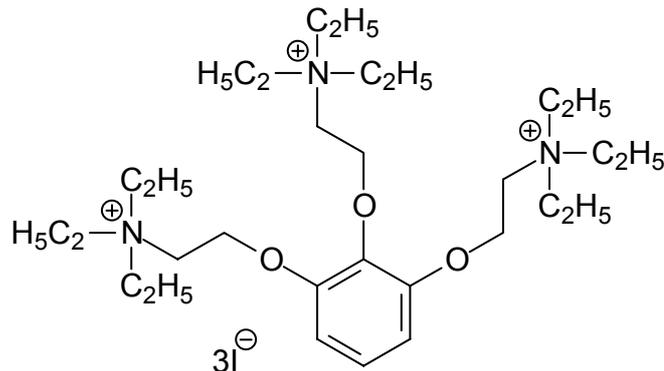
2.3.1.4 Eburnamonin



- IUPAC: (-)-Eburnamonin
- Lieferant / Bestellnummer: Acros 18690-0010
- Summenformel / Molekulargewicht: $C_{19}H_{24}N_2O$ 296,39 g/mol

Eburnamonin ist ein Vinca-Alkaloid aus der Pflanze *Vinca minor/major*, *Apocynaceae* dem „antihypoxische“ (Ferretti et al., 1982) Eigenschaften zugeschrieben werden. Die sogenannte „zerebrale metabolische Insuffizienz“ und chronische ischämische Zustände des Gehirns (Marolda et al., 1978; Linee et al., 1981) stellen potentielle geriatrische Indikationen von fragwürdigem Wert dar.

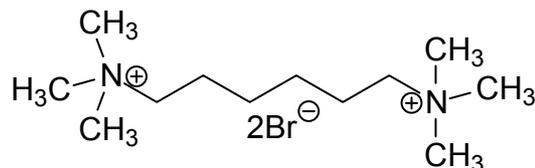
2.3.1.5 Gallamin



- IUPAC: 1,2,3-tri(beta-diethylaminoethoxy)-benzen-triethiodid
- Lieferant / Bestellnummer: Sigma G-8134
- Summenformel / Molekulargewicht: $C_{30}H_{60}N_3O_3I_3$ 891,50 g/mol

Gallamin (Flaxedil[®]) ist ein synthetisches nicht-depolarisierendes Muskelrelaxans (Katz und Eakins, 1966). Als solches eingesetzt führt es zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Arrhythmie und Hypertension. Gerade diese Herzwirkung (Brown, Jr. und Crout, 1970) war es, die dazu führte, dass die allosterische Modulation der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren (Clark und Mitchelson, 1976) entdeckt wurde.

2.3.1.6 Hexamethonium



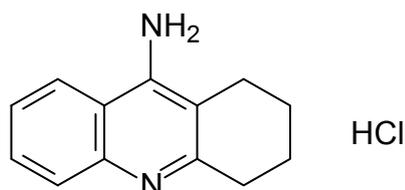
- IUPAC: 1,6-hexandiaminium,-N,N,N,N',N',N'-hexamethyl-dibromid
- Lieferant / Bestellnummer: Sigma H-0879
- Summenformel / Molekulargewicht: $C_{12}H_{30}N_2Br_2$ 362,2 g/mol

Hexamethonium ist ein Ganglienblocker (Toyama et al., 1975), der den un-spezifischen Ionenkanal des nikotinischen Acetylcholin-Rezeptors blockiert. Neben der sehr unspezifischen Möglichkeit den Blutdruck durch Hexamethonium zu senken (Pauca, 1988), wird Hexamethonium im Wesentlichen als Experimentalsubstanz in vitro eingesetzt. In der jüngsten Zeit sorgte Hexamethonium in den USA für Aufsehen, weil in der „Hexamethonium Asthma Studie“ eine Freiwillige verstarb (Savulescu und Spriggs, 2002).

2.3.1.7 Magnesium-Ionen (Mg²⁺)

- IUPAC: Magnesiumchlorid Hexahydrat
- Lieferant / Bestellnummer: Sigma M-2670
- Summenformel / Molekulargewicht: MgCl₂ · 6H₂O 203,30 g/mol

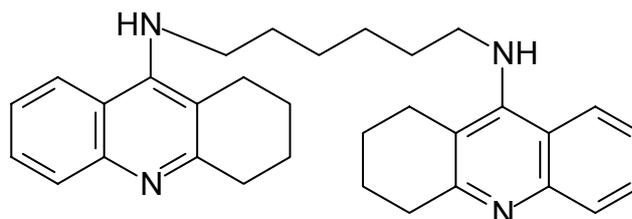
2.3.1.8 Tacrin



- IUPAC: 9-amino-1,2,3,4-tetra-hydroacridin-hydrochlorid
- Lieferant / Bestellnummer: Sigma A-3773
- Summenformel / Molekulargewicht: C₁₃H₁₄N₂ · HCl 234,70 g/mol

Tacrin (Cognex[®]) ist ein reversibler und zentral gängiger Acetylcholinesterase-Hemmstoff, der bei Morbus Alzheimer (Freeman und Dawson, 1991) eingesetzt wird. Vor allem seine Hepatotoxizität (Watkins et al., 1994), die sich im Anstieg von Transaminasen widerspiegelt, hat seinen Einsatz als Arzneimittel jedoch stark begrenzt.

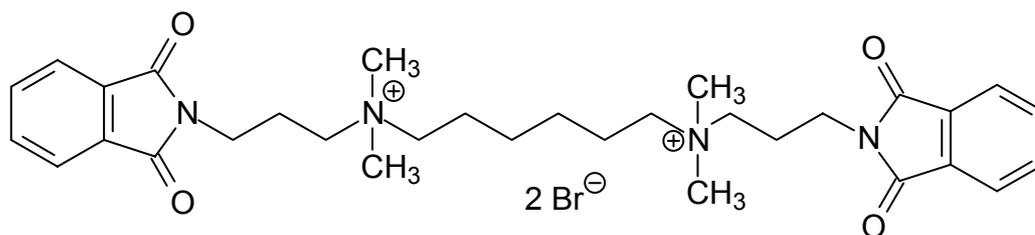
2.3.1.9 Tacrin-Dimer / EHW21



- IUPAC: 1,6-bis(amino-1,2,3,4-tetrahydro-acridinyl)-hexan
- Herkunft: Dr. Eberhard Heller (Synthese), Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe
- Summenformel / Molekulargewicht: C₃₂H₃₈N₄ 478,68 g/mol

Das Tacrin-Dimer EHW21 ist wie das Tacrin selbst ein Hemmstoff der Acetylcholinesterase (Hu et al., 2002). Seine allosterische Wirkung an Muskarin-Rezeptoren wird in dieser Arbeit erstmals beschrieben.

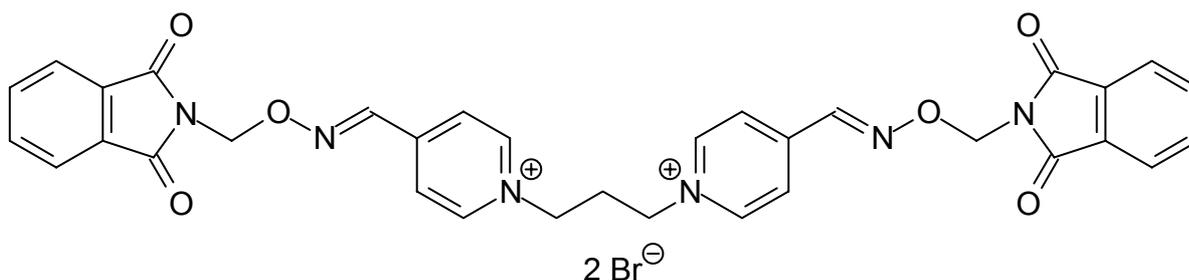
2.3.1.10 W84



- IUPAC: Hexan-1,6-bis(dimethyl-3'-phthalimidopropyl-ammonium-bromid)
- Herkunft: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe
- Summenformel / Molekulargewicht: $C_{32}H_{44}N_4O_4Br_2$ 708,50 g/mol

W84 ist ein experimentelles Antidot bei Vergiftungen mit Organophosphaten. Zusammen mit Atropin übt W84 einen überadditiven Schutzeffekt vor den cholino-mimetischen Vergiftungserscheinungen aus (Kords et al., 1968).

2.3.1.11 WDuo3



- IUPAC: 1,3-bis[4(phthalimidomethoxyimino-methyl)-pyridinium-1yl]-propan-dibromid
- Herkunft: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe
- Summenformel / Molekulargewicht: $C_{33}H_{28}N_6O_6Br_2$ 764,42 g/mol

Das Bispyridinium-Analogum WDuo3 ist wie Duo3 ein Aryl-substituiertes Derivat des TMB-4.

2.4 Membransuspensionen

Drei unterschiedliche Membransuspensionen wurden in dieser Arbeit hergestellt: (1) Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins, (2) Membransuspensionen aus CHO-Zellen und (3) Membransuspensionen aus COS7-Zellen. Das Arbeiten mit Herzventrikelgewebe vom Hausschwein erfolgte grundsätzlich bei einer Temperatur von 4°C in der Kühlkammer Viessmann Typ 7135 063 mit Kühlaggregat Viessmann KF 830. Notwendige Zentrifugationsschritte wurden mittels

einer Beckman L7-35 Ultrazentrifuge mit dem Rotortyp 35 vollzogen. Arbeiten mit CHO- sowie COS7-Zellen wurden grundsätzlich unter dem BIO-FLOW Technik Laminar Air Flow ausgeführt. Hierbei wurden sterilisierte Utensilien und Gefäße, sowie steril filtrierte Zubereitungen verwendet. Die Bebrütung der Zellen erfolgte, wenn nicht ausdrücklich anders angegeben, im Wasser-ummantelten Forma Scientific Inkubator bei 37°C, 5% CO₂-Begasung und 96% Luftfeuchtigkeit. Zentrifugiert wurde mit der Beckman AVANTI-J25 Zentrifuge.

2.4.1 Membransuspensionen aus Herzventrikeln des Hausschweins

Membransuspensionen aus Herzventrikeln des Hausschweins wurden mit der Bezeichnung „HSV-(M₂)“ versehen. Im folgenden ist die Herstellung dieser Membransuspensionen beschrieben: Die Herzen frisch geschlachteter Hausschweine wurden vom Schlachthof in Köln zur Verfügung gestellt. Auf Eis transportiert, wurden die Herzen anschließend in einer Kühlkammer bei 4°C weiterverarbeitet. Beim Zerlegen der Herzen in Vorhöfe und Kammern wurden das Fettgewebe und die Sehnen möglichst vollständig entfernt, und die Organteile in ca. 40 g schwere Stücke geschnitten. Die derart gewonnenen Organstücke wurden in Gefrierbeuteln verpackt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Am Tag der Herstellung der Membransuspension wurde ein ca. 40 g schweres Organstück des linken Ventrikels angetaut, mit einem Messer möglichst fein zerteilt und zweimal mit ca. 20 ml Saccharoselösung 0,32 M gewaschen. Die erhaltene Gewebesuspension wurde auf ca. 400 ml mit Saccharoselösung 0,32 M aufgefüllt und im Waring Blendor Homogenisator homogenisiert (Einstellung: 5 mal im Abstand von 30 s jeweils 10 s lang auf Stufe „high“). Eine weitere Zerkleinerung der Gewebesuspension erfolgte nach Auffüllung mit Saccharoselösung 0,32 M auf 800 ml mit Hilfe des Potter Elvehjem Glashomogenisators (Einstellung: 5 ca. 40 s dauernde Auf- und Abbewegungen bei 1.750 U/min). Die Suspension wurde bei 2.000 U/min 11 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde einer Zentrifugation bei 32.000 U/min für einen Zeitraum von 41 min zugeführt. Das anfallende Sediment wurde in ca. 160 ml Na, K, P_i-Puffer 5 mM, pH 7,4 resuspendiert und unter Zuhilfenahme des Potter Elvehjem Glashomogenisators homogenisiert (Einstellung: 5 ca. 40 s dauernde Auf- und Abbewegungen bei 1.500 U/min). Die derart gewonnene Membransuspension wurde zu jeweils 1,25 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße abgefüllt, und nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingelagert.

2.4.2 Membransuspensionen aus CHO-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden Membransuspensionen aus Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) gewonnen. Diese CHO-Zellen waren mit humanem, muskarinischen M₂ oder M₅ Acetylcholin-Rezeptor-Gen stabil transfiziert. Beide Zell-Linien wurden dankenswerterweise von N.J.M. Birdsall (National Institute for Medical Research, Mill Hill, London) zur Verfügung gestellt. Die jeweilige Membransuspension wurde entweder mit der Bezeichnung „CHO-hM₂“ oder „CHO-hM₅“ bezeichnet. CHO-hM₂-Membransuspensionen wurden in dieser Arbeit wie nachfolgend beschrieben hergestellt. CHO-hM₅-Membransuspensionen wurden hingegen dankenswerterweise von Seraina Duda (Pharmakologie und Toxikologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

2.4.2.1 Ausfrieren der CHO-Zellen

Eine Gewebekulturflasche T182 mit 20 ml Nährmedium F-12-CHO und ein 50 ml PP-Röhrchen mit 9 ml Nährmedium F-12-CHO wurden vorgelegt. Die CHO-Zellsuspension wurde dem Stickstofftank entnommen, schnell aufgetaut und in das PP-Röhrchen überführt. Zum Abtrennen des DMSO wurde zentrifugiert (Rotor JS 7.5 / 1000 rpm / 4 min / 3°C). Das Pellet wurde in 2 bis 3 ml Nährmedium F-12-CHO aufgenommen und zur Inkubation in die Gewebekulturflasche T182 überführt. Das Zellwachstum wurde beobachtet, und das Nährmedium bei Bedarf ausgetauscht.

2.4.2.2 Einfrieren der CHO-Zellen

Eine Gewebekulturflasche T182 mit einer CHO-Zellkultur wurde aus dem Vermehrungszyklus abgesondert und das Nährmedium abgesaugt. Zur Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche wurden 4 ml Trypsin-EDTA Lösung zugegeben. Zusätzliches Abschlagen war zulässig. Auf die abgelösten CHO-M₂-Zellen wurden 12 ml Nährmedium F-12-CHO gegeben. Die Kulturflasche wurde drei mal mit der entstandenen Zellsuspension gespült. Die Zentrifugation der Zellsuspension erfolgte in einem 50 ml PP-Röhrchen (Rotor JS 7.5 / 1000 rpm / 4 min / 3°C). Das Pellet wurde in 4 ml Nährmedium F-12-CHO aufgenommen und resuspendiert. Es wurden 4 beschriftete Cryovials mit 100 µl DMSO vorgelegt. Jeweils 900 µl der Zellsuspension wurden auf die 4 Cryovials verteilt. Der 10%ige Zusatz des DMSO diente dem Gefrierschutz der Zellen. Die Cryovials wurden zum langsamen Einfrieren in die -80°C Gefriertruhe überführt. Die Langzeitlagerung erfolgte in Flüssigstickstoff.

2.4.2.3 Splitten der CHO-Zellen

Zwecks Vermehrung wurden die CHO-Zellen, wenn sie ca. 90% konfluent waren, aus einer auf fünf (oder aus fünf auf siebzehn) Gewebekulturflaschen verteilt. Dazu wurde das Nährmedium einer (oder fünf) Gewebekulturflasche(n) T182 abgesaugt, und die Zellen wurden mittels 4 ml Trypsin-EDTA-Lösung und Abschlagen vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Auf die abgelösten Zellen wurden 12 ml Nährmedium F-12-CHO gegeben, und die Kulturflasche wurde drei mal mit der entstandenen Zellsuspension gespült. Die Zellsuspension wurde in einem (bzw. mehreren) 50 ml PP-Röhrchen zentrifugiert (Rotor JS 7.5 / 1000 rpm / 4 min / 3°C). Fünf bzw. siebzehn Gewebekulturflaschen mit 20 ml Nährmedium F-12-CHO wurden vorgelegt. Das Sediment wurde mit 12 ml (Splittvorgang 1:5) bzw. 36 ml (Splittvorgang 5:17) Nährmedium F-12-CHO aufgenommen und resuspendiert. Die vorgelegten Gewebekulturflaschen wurden mit jeweils 2 ml der Zellsuspension angeimpft, und in den Inkubator gestellt.

2.4.2.4 Membranpräparation aus CHO-Zellen

Ausgehend von einer Gewebekulturflasche wurden nach zwei bis drei Tagen die Zellen auf fünf Gewebekulturflaschen gesplittet. Nach weiteren drei Tagen konnten die CHO-Zellen üblicherweise auf 16 Kulturflaschen vermehrt werden. Diese Zellmenge war ausreichend für eine Membranpräparation. Am Vortag der Membranpräparation wurde jeder Gewebekulturflasche 1 ml Butyratlösung 100 mM dazugegeben. Die CHO-Zellen wurden aus vier Gruppen von jeweils vier Kulturflaschen geerntet, wenn sie zu ca. 90% konfluent waren. Nach dem Abgießen des Nährmediums wurden in jede Kulturflasche jeweils 3 ml Puffer 1 gegeben. Die Zellen wurden zwei mal gründlich, jedoch schnell, abgeschabt, in ein PP-Röhrchen überführt, und auf Eis gelagert. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurden die Gewebekulturflaschen mit jeweils weiteren 1,5 ml Puffer 1 gespült. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellsuspension nicht gefror. Dem Zellaufschluss mit dem Kinematica Polytron (Einstellung: 2 mal auf Stufe 6 langsam hochfahren, 6 sec halten, dann langsam herunterfahren) folgte die Zentrifugation (Rotor JA 25.50 / 40.000 x g / 10 min / 2°C). Die Pellets wurden in 30 ml Na, K, P_i-Puffer 5 mM resuspendiert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Um den Reinheitsgrad des Membranhomogenats zu erhöhen, wurde die Zentrifugation wiederholt. Die erhaltenen Pellets wurden in 9 ml Na, K, P_i-Puffer 5 mM (bei 16 Gewebekulturflaschen) aufgenommen, und die

Membransuspension wurde zu jeweils 1035 µl auf beschriftete Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt. Der Lagerung der Membransuspension bei -80°C wurde die Schockgefrierung vorgeschaltet.

2.4.3 Membransuspensionen aus COS7-Zellen

COS7-Zellen sind mit dem SV40-Virus transformierte Nierenepithelzellen der afrikanischen grünen Meerkatze (Gluzman, 1981). Sie wurden dankenswerterweise von J. Ellis (The Pennsylvania State University College of Medicine, Hershey, Pennsylvania, USA) zur Verfügung gestellt und dienten als Ausgangsmaterial für die Gewinnung diverser Membransuspensionen, die in Tabelle 1, S. 27 gelistet sind. Mit Plasmid-DNA, deren Herkunft in der Tabelle 1 angegeben ist, wurden die COS7-Zellen nach der Methode der Calciumphosphat-Präzipitation (Chen und Okayama, 1988) transient transfiziert. Die jeweils eingesetzte Plasmid-DNA enthielt das Gen für den humanen, Muskarin-Rezeptor des M_2 und M_5 Subtyps, für vier verschiedene M_2/M_5 chimäre Muskarin-Rezeptoren oder für drei unterschiedliche Punktmutanten des humanen M_2 Rezeptors. Für die Gewinnung der M_2 und M_5 Rezeptoren geht man von den beiden Plasmiden Hm2pCD und Hm5pCDp1 (Okayama und Berg, 1983; Bonner et al., 1987; Bonner et al., 1988) aus. Die für die M_2/M_5 -chimären Muskarinrezeptoren (Wess et al., 1990; Wess et al., 1992; Ellis et al., 1993) kodierenden Plasmide sind von den beiden erwähnten Plasmiden abgeleitet. Durch zielgerichtete Mutagenese (Hutchison et al., 1978) mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) können in den Wildtyprezeptoren oder auch in den M_2/M_5 -chimären Rezeptoren Aminosäuren gezielt ausgetauscht werden, was zu den Punktmutanten führt. Damit für die Transfektion der COS7-Zellen ausreichende Mengen an Plasmid-DNA zur Verfügung stehen, werden kompetente *E. coli* Bakterien (K12-Stamm XL1-Blue) mit dem entsprechenden Plasmid transformiert. Nach einem Vermehrungszyklus der Bakterien wird die so amplifizierte Plasmid-DNA mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi Kit gewonnen (DNA-Plasmid-Amplifikation).

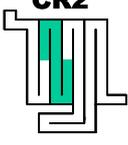
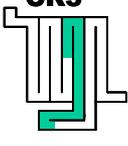
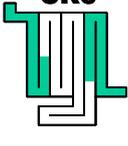
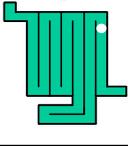
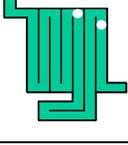
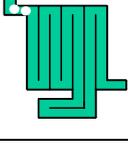
Membran-Suspension	Rezeptor-Symbol	Aminosäure-sequenz	Mutagenese mittels PCR	Herstellung der Membran-suspension
COS7-hM ₂		hM ₂ 1-466	Keine (Wildtyp)	Diese Arbeit
COS7-hM ₅		hM ₅ 1-532	Keine (Wildtyp)	Diese Arbeit
COS7-CR1		hM ₂ 1-69, hM ₅ 77-532	Wess et. al. ¹	S. Buller ^{4,5}
COS7-CR2		hM ₅ 1-76, hM ₂ 70-155, hM ₅ 163-532	Wess et. al. ¹	S. Buller ^{4,5}
COS7-CR3		hM ₅ 1-162, hM ₂ 156-300, hM ₅ 336-532	Wess et. al. ¹	Diese Arbeit
COS7-CR6		hM ₂ 1-69, hM ₅ 77-445, hM ₂ 391-466	Wess et. al. ¹	Diese Arbeit
COS7-U		hM ₂ ⁴²³ Thr→His	Buller et. al. ²	Diese Arbeit
COS7-BG		hM ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln, ⁴²³ Thr→His	Voigtländer et. al. ³	S. Buller ^{4,5} A. Raasch ⁴ U. Voigtländer ⁴
COS7-BJ		hM ₂ ¹⁰ Asn→Ser ¹¹ Ser→Gly	Diese Arbeit (2.4.3.1, S. 28)	Diese Arbeit

Tabelle 1: Aus COS7-Zellen gewonnene Membransuspensionen. Angegeben sind die genaue Aminosäuresequenz der enthaltenen Rezeptoren mit dem entsprechenden Rezeptorsymbol. Die Beschreibung der zielgerichteten Mutagenese mittels PCR zur Gewinnung der für den jeweiligen

Rezeptor codierenden Plasmid-DNA kann den entsprechenden Literaturzitatzen entnommen werden. Die Membransuspensionen wurden zum Teil dankenswerterweise von Stefan Buller, Alexandra Raasch und Uta Voigtländer zur Verfügung gestellt. **Index**¹: (Wess et al., 1990; Wess et al., 1992). **Index**²: (Buller et al., 2002). **Index**³: (Voigtländer et al., 2003). **Index**⁴: Pharmakologie und Toxikologie, Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn; **Index**⁵: Department of Psychiatry, Penn State College of Medicine, Hershey, USA.

2.4.3.1 COS7-BJ-Membransuspension

Die COS7-BJ-Membransuspension enthielt punktmutierte (hM₂¹⁰Asn→Ser, ¹¹Ser→Gly) M₂ Acetylcholin-Rezeptoren. Das hierfür codierende DNA-Plasmid (BJ-Plasmid) wurde ausgehend vom Hm2pCD-Plasmid, welches von Herrn Stefan Buller zur Verfügung gestellt wurde, entwickelt. Das Design und die Herstellung des BJ-Plasmids seien in verkürzter Form dargestellt. Die genauen Arbeitsanweisungen können in der Dissertationsschrift (Buller, 2002) eingesehen werden. Durch zielgerichtete Mutagenese mittels PCR (16 Zyklen) wurden im Hm2pCD-Plasmid zwei Basen mutiert. Zwei komplementäre Oligonukleotide mit den internen Kürzeln KM15 und KM16 (KM steht für Klaus Mohr) dienten als Startermoleküle. Die Mutation wurde durch Auftragssequenzierung (Pharmazeutische Mikrobiologie, Universität Bonn) basierend auf der Sanger-Methode (Sanger et al., 1977) verifiziert. Hierzu wurde das Oligonukleotid mit dem internen Code Seq4 eingesetzt. Die Oligonukleotide KM15, KM16 und Seq4 wurden von der Firma Sigma-ARK GmbH (Darmstadt) hergestellt.

Oligonukleotid	Basensequenz 5' → 3'
KM15	CTCCTCTAACAGTGGCCTGGCTCTTACAAGTCC
KM16	GGACTTGTAAGAGCCAGGCCACTGTTAGAGGAG
Seq4	GGAGGTGGCGGTTGACTTTAATGG

Tabelle 2: Basensequenz in 5'→3'-Richtung der Oligonukleotide KM15, KM16 und Seq4. Die Basentriplets, die für die beiden ausgetauschten Aminosäuren Serin (AGT) bzw. Glycin (GGC) in der BJ-Mutante kodieren, sind grau unterlegt.

Die aus der PCR gewonnene, auf die gewünschte Mutation hin verifizierte, Plasmid-DNA wurde in E. coli Bakterien (K12-Stamm XL1-Blue) amplifiziert, damit genügend DNA für die transiente Transfektion von COS7-Zellen zur Verfügung stand.

2.4.3.2 Ausfrieren der COS7-Zellen

Aus einem Kryoröhrchen schonend ausgefrorene COS7-Zellen wurden in einer Kulturschale \varnothing 10 cm mit 15 ml des auf 37°C temperierten DMEM-Nährmediums ausgesät. Um die Zellen gut zu verteilen, wurde die Kulturschale geschwenkt und in den Inkubator gestellt. Nach etwa 8 h hafteten die Zellen am Boden der Kulturschale, und das Nährmedium, welches noch Reste des zytotoxischen DMSO enthielt, wurde ausgetauscht. Das Austauschen des Nährmediums beinhaltete das Waschen der adhären Zellen mit 10 ml PBS-Puffer. Die COS7-Zellen wurden erst gesplittet, wenn sie 60% bis 70% Konfluenz erreicht hatten.

2.4.3.3 Einfrieren der COS7-Zellen

Für die Langzeitlagerung von COS7-Zellen wurden 4 Kulturschalen \varnothing 15 cm mit Zellkultur benötigt, um 4 Kryoröhrchen als „Backups“ zu gewinnen. Das Nährmedium wurde abgesaugt, der Zellrasen mit jeweils 15 ml PBS-Puffer gespült, und die COS7-Zellen mittels 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung und 5 minütigem Inkubieren abgelöst. Ein PP-Röhrchen mit 20 ml DMEM-Nährmedium (je 5 ml pro Kulturschale) wurde vorgelegt. Die Kulturschalen wurden mit 5 ml DMEM-Nährmedium und schon enthaltener Zellsuspension in Trypsin-EDTA-Lösung sequentiell gespült und das Zellhomogenat wurde in das PP-Röhrchen überführt. Das COS7-Zellhomogenat wurde zentrifugiert (Rotor JS 7.5 / 1.000 x g / 5 min / RT), und das Sediment in 12 ml DMEM-Nährmedium resuspendiert (3 ml pro Kulturschale \varnothing 15 cm). Je 900 μ l COS7-Zellhomogenat wurden auf vier mit je 100 μ l DMSO beschickte Cryovials gegeben. Der Langzeitlagerung im Flüssigstickstoff wurde das langsame Einfrieren des mit 10% DMSO versetzten Zellhomogenates bei -80°C vorgeschaltet.

2.4.3.4 Splitten der COS7-Zellen

Zur Proliferation der COS7-Zellen wurden die Zellkulturen bei einer Konfluenz von 60% bis 70% entweder 1:4 oder 1:3 gesplittet. Die nachstehende Tabelle gibt Auskunft über die verwendeten Mengen an DMEM-Nährmedium, PBS-Puffer, Trypsin-EDTA-Lösung und dem Volumen des Inokulums in Abhängigkeit von der verwendeten Kulturschale.

Kulturschale	Inokulum	DMEM	PBS	Trypsin-EDTA
∅ 10 cm	1 ml	15 ml	10 ml	3 ml
∅ 15 cm	3 ml	30 ml	15 ml	5 ml

Tabelle 3: Angaben zu den Volumina des Inokulums, des DMEM-Nährmediums, des PBS-Puffers und der Trypsin-EDTA-Lösung je nach Größe der verwendeten Kulturschale beim Kultivieren von COS7-Zellen

Beim 1:4 Splitten wurde die COS7-Zellkolonie einer Kulturschale mit ∅ 10 cm auf zwei Kulturschalen mit ∅ 15 cm und 30 ml DMEM-Nährmedium überführt. COS7-Zellkulturen zweier Kulturschalen mit ∅ 15 cm und 30 ml DMEM-Nährmedium wurden beim 1:3 Splitten auf sechs Kulturschalen mit gleichen Parametern gesplittet. Im Einzelnen gestaltete sich der Splittvorgang wie folgt: Nach dem Absaugen des Nährmediums aus der Ursprungskulturschale, wurde der COS7-Zellrasen mit dem entsprechenden Volumen an PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden so vom Calcium-haltigen Nährmedium freigewaschen, damit die zum Ablösen der Zellen eingesetzte Trypsin-EDTA-Lösung nicht inaktiviert wurde. Die Einwirkzeit der Trypsin-EDTA-Lösung im Inkubator wurde auf ca. fünf Minuten beschränkt. Der Trypsinverdau wurde durch Zugabe von 3 ml (bzw. 9 ml) DMEM-Nährmedium (Überschuss an zweiwertigen Kationen) gestoppt. Mit 6 ml (bzw. 14 ml) entstandenem Zellhomogenat wurden die Ursprungskulturschalen zwei mal gespült. Zwei (bzw. sechs) Kulturschalen ∅ 15 cm mit 30 ml DMEM-Nährmedium wurden jeweils mit 3 ml COS7-Zellhomogenat geimpft. Die Inkubation erfolgte unter standardisierten Bedingungen (2.4 S. 22).

2.4.3.5 Transfektion der COS7-Zellen und Membranpräparation

Die Transfektion sowie die Gewinnung des Membranpräparates erfolgten nach einem festgelegten Zeitplan, der dem abendländischen Wochenrhythmus gerecht wird.

2.4.3.5.1 Ausplattieren der COS7-Zellen (Freitag)

Für das Ausplattieren wurden 15 Kulturschalen ∅ 15 cm mit 70% – 80% konfluenten COS7-Zellen benötigt. Eine Kulturschale wurde zum weiteren Splitten abgesondert. 14 Kulturschalen wurden in zwei Chargen zu je 7 Schalen aufgeteilt und nacheinander bearbeitet. Die zweite Charge wurde erst prozessiert, wenn das Zellhomogenat der ersten Charge im Becherglas war. Ziel war es, 625.000 Zellen pro

Kulturschale \varnothing 10 cm auszusähen. Zunächst wurde ein Becherglas mit 70 ml DMEM-Nährmedium vorgelegt (Endvolumen = 140 ml aus 70 ml DMEM + 35 ml Trypsin-EDTA-Lösung aus 1. Charge + 35 ml Trypsin-EDTA-Lösung aus 2. Charge). Das Nährmedium der 14 Ursprungskulturschalen wurde abgesaugt und der Zellrasen mit jeweils 15 ml PBS-Puffer gespült. Das Ablösen der COS7-Zellen erfolgte durch Draufgeben von 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung und 5 min Inkubation im Brutschrank. Jede Kulturschale wurde mit dem aus 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung und 5 ml DMEM-Nährmedium entstandenem Zellhomogenat gespült. Das COS7-Zellhomogenat wurde in das mit Nährmedium beschickte Becherglas überführt. 20 μ l Zellhomogenat wurden zum Zählen der Zellen unter dem Axiovert 25 Mikroskop mit einem Standard-Hämocytometer (Lindl, 2000) steril in ein Cap überführt. Das COS7-Zellhomogenat wurde auf vier 50 ml PP-Röhrchen zu je 35 ml verteilt und zentrifugiert (Rotor JS 7.5 / 1.000 x g / 4 min / RT). Das Sediment wurde nach Zellzählung im entsprechend berechneten Volumen DMEM-Nährmedium resuspendiert. 30 Kulturschalen \varnothing 10 cm (oder n Kulturschalen entsprechend der Zellzählung) wurden mit je 10 ml DMEM-Nährmedium befüllt. Die COS7-Zellen wurden zu je 1 ml aus dem Zellhomogenat auf die befüllten Kulturschalen \varnothing 10 cm ausgesät, und unter schon beschriebenen Bedingungen bebrütet.

2.4.3.5.2 Transfektion der COS7-Zellen (Montag)

Nachfolgend wird die Zusammensetzung des Transfektionsmediums für die COS7-Zellkolonie einer Kulturschale \varnothing 10 cm angegeben:

CaCl ₂ – Lösung (0,25M)	500 μ l
Plasmid-DNA (Gehalt in μ g/ μ l beachten)	20 μ g
BBS (2x)-Puffer	500 μ l

Die drei Komponenten wurden in der angegebenen Reihenfolge in ein PS Round-Bottom Tube 5 ml gefüllt. Es wurden so viele Aliquota des Transfektionsmediums hergestellt, wie COS7-Zellkulturen in Kulturschalen \varnothing 10 cm transient transfiziert werden sollten. Damit Calciumphosphat-DNA-Komplexe definierter Größe entstehen konnten, wurde eine Inkubationszeit von 10 bis 15 min gewählt. Jeweils 1 ml Transfektionsmedium wurde tropfenweise und unter leichten Drehbewegungen auf die Zellkultur in den Kulturschalen \varnothing 10 cm gegeben. Unter sonst üblichen Bedingungen, jedoch bei 3% CO₂-Gehalt, wurden die transfizierten COS7-Zellen über Nacht inkubiert.

2.4.3.5.3 Waschen und Inkubieren der COS7-Zellen (Dienstag)

Am Dienstag wurde das Nährmedium in den Kulturschalen abgesaugt, der Zellrasen mit 10 ml PBS-Puffer gespült, die COS7-Zellkulturen mit jeweils 10 ml DMEM-Nährmedium versorgt und unter 5% CO₂-Begasung und sonst üblichen Bedingungen inkubiert.

2.4.3.5.4 Ernten der COS7-Zellen / Membranpräparation (Donnerstag)

Das Ernten der Zellen erfolgte unter normalen, also nicht aseptischen, Bedingungen. Nach dem Abgießen des Nährmediums wurde der Zellrasen jeder Kulturschale mit je 2 ml PBS-Puffer vorsichtig gewaschen. Unter der Einwirkung von jeweils 4 ml eisgekühltem Na, K, P_i-Puffer 5 mM wurden die COS7-Zellen mit dem Zellschaber Nunc 179707 vom Boden der Kulturschale gelöst. Verteilt wurde das entstandene Zellhomogenat auf Zentrifugengläser in Eis zu je 20 ml (5x 4 ml). Je 5 entleerte Kulturschalen wurden mit 4,5 ml Na, K, P_i-Puffer 5 mM sequentiell gespült, und dieses verdünnte Zellhomogenat ebenfalls auf die Zentrifugengläser verteilt. Der Zellaufschluss erfolgte in den Zentrifugengläsern mit dem Kinematica Polytron (3x 10 sec / Stufe 6 / auf Eis). Die erhaltene Membransuspension wurde zentrifugiert (Rotor JA 25.50 / 18.000 rpm / 30 min / 4°C), und das Sediment jedes Zentrifugenglases in 2 ml Na, K, P_i-Puffer 5 mM aufgenommen und im Pottergefäß gesammelt. Jedes Zentrifugenglas wurde mit weiteren 2 ml Na, K, P_i-Puffer 5 mM durch „vortexen“ zwei mal gespült. Die zusammengeführte Membransuspension wurde entsprechend der Kapazität des Pottergefäßes (ca. 18 ml) weiter mit Na, K, P_i-Puffer 5 mM verdünnt und hierin homogenisiert. Die homogenisierte Membransuspension wurde so mit Na, K, P_i-Puffer 5 mM aufgefüllt, das jeweils 3 ml Suspension pro eingesetzter Kulturschale Ø 10 cm entstanden. Zur Lagerung bei -80°C wurde die Membransuspension zu je 1 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße gefüllt.

2.5 Computerprogramme

In nachfolgender Tabelle sind die verwendeten Computerprogramme aufgelistet. Es ist jeweils die aktuellste Version der Software angegeben, auch wenn Vorgängerversionen benutzt wurden.

Software	Hersteller
Acrobat [®] , Version 5.0	Adobe [®]
ChemWindow [®] , Version 6.0	Bio-Rad [®] Laboratories
SymApps [®] 6.0	Bio-Rad [®] Laboratories
Microsoft [®] Excel [®] 2000	Microsoft [®]
GraphPad InStat [®] , Version 3.05	GraphPad Software, Inc.
GraphPad Prism [®] , Version 3.02	GraphPad Software, Inc.
Jellyfish [®] , Version 1.5	Labvelocity [®]
Reference Manager [®] , Version 10	ISI ResearchSoft [®]
Sigma Plot [®] 2002, Version 8.0	SPSS [®] Inc.
Microsoft [®] Windows [®] XP Professional	Microsoft [®]
Microsoft [®] Word [®] 2000	Microsoft [®]

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Computerprogramme und deren Hersteller

2.6 Analytische Methoden

Lichtabsorptionsmessungen im UV-Bereich erfolgten am Beckman DU 640 UV-Spektralphotometer.

2.6.1 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Membransuspensionen aus CHO-Zellen und Herzventrikulgewebe des Hausschweins erfolgte nach einer etablierten Methode (Lowry et al., 1951).

2.6.2 Gehalts- und Reinheitsbestimmung der Plasmid-DNA

Die beim gentechnischen Arbeiten gewonnene Plasmid-DNA wurde 1 zu 50 verdünnt (6 µl Plasmid-DNA-Lösung ad 300 µl aqua destillata), und auf ihren Gehalt und ihre Reinheit mithilfe von Lichtabsorptionsmessungen analysiert.

Der Gehalt wurde nach folgender Gleichung (Brown, 1999) ermittelt:

$$1,0 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml (doppelsträngige DNA)}$$

Gleichung 1

1,0 A_{260} : Absorption (optische Dichte) gleich 1 bei Licht einer Wellenlänge von 260 nm

Der Quotient der Lichtabsorption bei 260 nm und 280 nm ist ein Maß für die Reinheit doppelsträngiger DNA. Es wurde ein Wert von 1,8 ($A_{260} / A_{280} = 1,8$) angestrebt.

2.6.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl von COS7-Zellsuspensionen wurde entweder mittels Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) oder auf elektronischem Wege mit dem Zählgerät CASY[®]1 ermittelt.

2.6.3.1 Bestimmung der Zellzahl mittels Hämocytometer

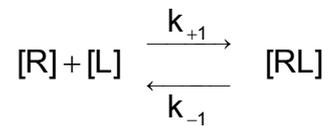
Zur Bestimmung der Zellzahl einer COS7-Zellsuspension wurde ein Deckglas angehaucht und so auf den Objektträger mit dem Hämocytometer gelegt, dass es anhaftete. Je 10 μl Zellsuspension wurden am oberen und unteren Rand des Deckglases aufgegeben, damit sich ein definiertes Volumen mittels Kapillarkräfte in die Neubauer-Zählkammer saugte. Mindestens vier große Quadrate der Zählkammer wurden ausgezählt, der Mittelwert wurde gebildet und die Zellkonzentration (Einheit: Zellen / ml) berechnet. Eine genaue Arbeitsanweisung findet sich bei (Lindl, 2000) auf Seite 102 ff.

2.6.3.2 Elektronische Zellzählung mit dem CASY[®]1

Eine Zellzählung mit Hilfe des CASY[®]1 erfolgte bei folgenden Geräteeinstellungen: Kapillargröße 150 μm , Menu 1. 20 μl Zellsuspension wurden in 10 ml sterilfiltrierter Messlösung (CASY[®]TON) suspendiert, es wurde dreimal, ohne Luftblasen einzutragen, geschwenkt und der Zählvorgang gestartet. Der Reinigungszyklus wurde mit dem Systemreiniger CASY[®]CLEAN durchgeführt. Weitere Details zu dieser Zählmethode können im Buch „Zell- und Gewebekultur“ (Lindl, 2000) auf Seite 104 ff eingesehen werden.

2.7 Experimente unter Gleichgewichtsbedingungen

Das Massenwirkungsgesetzes kann auf eine reversible Interaktion eines Liganden mit seinem Rezeptorprotein angewandt werden (Bennet und Yamamura, 1985). Demnach kann formuliert werden:



Gleichung 2

- [R]: Konzentration des Rezeptors
- [L]: Konzentration des Liganden
- [RL]: Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes
- k_{+1} : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
- k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation

Im Gleichgewicht verlaufen die Hin- und Rückreaktion mit gleicher Geschwindigkeit:

$$k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] = k_{-1} \cdot [RL]$$

Gleichung 3

Die Zusammenfassung der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation sowie der Dissoziation liefert die experimentell leichter zugängliche Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D , bzw. ihren reziproken Wert, die Gleichgewichtsassoziationskonstante K_A :

$$K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]}$$

Gleichung 4

- K_D : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
- K_A : Gleichgewichts-Assoziationskonstante

Die Konstanten K_D und K_A sind Maßzahlen für die Affinität des Liganden zum Rezeptorprotein.

Bei einer halbmaximalen Besetzung gilt $[R] = [RL]$ und Gleichung 4 vereinfacht sich zu:

$$K_D = [L]_{50}$$

Gleichung 5

$[L]_{50}$: Ligandkonzentration, die zur halbmaximalen Besetzung des Rezeptors führt

Die Sättigbarkeit der Bindung ist gegeben, wenn eine endliche Zahl an Rezeptoren vorhanden ist. Die Summe der freien und ligandgebundenen Rezeptoren liefert die Gesamtzahl an Rezeptoren und wird als B_{\max} bezeichnet:

$$B_{\max} = [R] + [RL]$$

Gleichung 6

Gleichung 4 und Gleichung 6 können zu einer Sättigungsisotherme nach Langmuir zusammengefasst werden:

$$[RL] = \frac{B_{\max} \cdot [L]}{K_D + [L]}$$

Gleichung 7

Mithilfe von Sättigungsbindungsexperimenten können die Parameter B_{\max} und K_D ermittelt werden. Der hohe Verbrauch des Radioliganden, ist ein Nachteil dieser Bestimmungsmethode. Für die Routinebestimmung dieser Parameter kann das im Folgenden beschriebene Verfahren der homologen kompetitiven Inhibition zum Einsatz kommen.

2.7.1 Homologe kompetitive Inhibition

Bei Konkurrenzexperimenten werden Rezeptorsuspensionen mit einer konstanten Konzentration des Radioliganden und steigenden Konzentrationen des Inhibitors inkubiert. Nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes kann die Bindung des Radioliganden an den Rezeptor bestimmt werden. Wird die Gesamtbindung des Radioliganden gegen den Logarithmus der Konzentration des Inhibitors aufgetragen, so ergibt sich ein sigmoidaler Verlauf der Messwerte, der mittels einer vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung (Barlow und Blake, 1989) beschrieben werden kann. Das Steilheitsmaß dieser Gleichung entspricht dem Hill-Koeffizienten in der

Hill-Gleichung (Hill, 1910). Demnach kann das Steilheitsmaß in der logistischen Gleichung durch den Hill-Koeffizienten quantifiziert werden:

$$[\text{LR}]_{\text{T}} = [\text{LR}]_{\text{T,Min}} + \frac{[\text{LR}]_{\text{T,Max}} - [\text{LR}]_{\text{T,Min}}}{1 + (\text{IC}_{50} / 10^{[\text{X}]})^{n_{\text{H}}}}$$

Gleichung 8

$[\text{LR}]_{\text{T}}$:	Gesamtbindung des Radioliganden
$[\text{LR}]_{\text{T,Max}}$:	Gesamtbindung in Abwesenheit des Inhibitors; oberes Kurvenplateau
$[\text{LR}]_{\text{T,Min}}$:	Gesamtbindung in Anwesenheit einer hohen Konzentration des Inhibitors; unteres Kurvenplateau
IC_{50} :	Konzentration des Inhibitors, die die Bindung des Radioliganden um 50% reduziert; Wendepunkt des Sigmoids
$[\text{X}]$:	Logarithmus der Konzentration des Inhibitors
n_{H} :	Hill-Koeffizient; Maß für die Steilheit der Kurve

Bei einer kompetitiven Verdrängung des Radioliganden durch den Inhibitor, sollte ein Hill-Koeffizient von $n_{\text{H}} = -1$ erhalten werden. Dann kann die Affinität des Inhibitors zum Rezeptor ermittelt werden (Cheng und Prusoff, 1973):

$$K_{\text{i}} = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + [\text{L}]/K_{\text{D}}}$$

Gleichung 9

K_{i} :	Affinität des Inhibitors zum Rezeptorprotein
------------------	--

Die homologe Inhibition ist ein Sonderfall des Competitionsexperimentes, bei dem sich Radioligand und Inhibitor lediglich durch die radioaktive Markierung unterscheiden. Wird die radioaktive Markierung durch Tritiierung vorgenommen, so sind die physiko-chemischen Eigenschaften des Radioliganden und der Ausgangssubstanz identisch. Die Affinität des Radioliganden und seines homologen Inhibitors zum Rezeptor ist dann gleich ($K_{\text{D}} = K_{\text{i}}$). Gleichung 9 vereinfacht sich zu:

$$K_{\text{D}} = \text{IC}_{50} - [\text{L}]$$

Gleichung 10

Somit kann der K_{D} -Wert aus dem Wendepunkt des erhaltenen Sigmoids und der Konzentration des eingesetzten Radioliganden errechnet werden. Die gleichen

Parameter liefern unter Berücksichtigung der spezifischen Bindung (DeBlasi et al., 1989) auch die maximale Anzahl von Bindungsstellen (B_{\max}):

$$B_{\max} = B_0 \cdot \frac{IC_{50}}{[L]}$$

Gleichung 11

B_0 : spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Kompetitors

2.7.1.1 Versuchsdurchführung mittels Einzelfiltration

Die homologe kompetitive Inhibition wurde als Dreifachbestimmung mit unten beschriebenen Versuchsansätzen durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Komponenten in Reagenzgläser pipettiert, geschüttelt (Vortex Genie 2 Rotationsmischgerät) und bei 23°C 120 min lang (Membransuspensionen aus Herzventrikeln des Hausschweins) im GFL 1083 Schüttelwasserbad inkubiert.

Ansatz zur Bestimmung der Gesamtbindung (Gesamtvolumen 1500 µl)

[³ H]NMS-Lösung (Endkonzentration 0,2 nM)	100 µl
Aqua destillata	50 µl
Na, K, P _i -Puffer 5,65 mM (Endkonzentration)	1100 µl
Membransuspension verdünnt in Na, K, P _i -Puffer 5 mM	250 µl

Ansatz zur Bestimmung der unspezifischen Bindung (Gesamtvolumen 1500 µl)

[³ H]NMS-Lösung (Endkonzentration 0,2 nM)	100 µl
Atropin-Lösung 3x10 ⁻⁵ M (Endkonzentration 1x10 ⁻⁶ M)	50 µl
Na, K, P _i -Puffer 5,65 mM (Endkonzentration 5 mM)	1100 µl
Membransuspension verdünnt in Na, K, P _i -Puffer 5 mM	250 µl

Ansatz zur Bestimmung der NMS-Bindung (Gesamtvolumen 1500 µl)

[³ H]NMS-Lösung (Endkonzentration 0,2 nM)	100 µl
NMS-Lösungen (Verdünnungsreihe)	50 µl
Na, K, P _i -Puffer 5,65 mM (Endkonzentration 5 mM)	1100 µl
Membransuspension verdünnt in Na, K, P _i -Puffer 5 mM	250 µl

Es kamen acht unterschiedliche Konzentrationen aus einer NMS-Verdünnungsreihe zum Einsatz (Endkonzentration: 3x10⁻¹¹ / 1x10⁻¹⁰ / 3x10⁻¹⁰ / 1x10⁻⁹ / 3x10⁻⁹ / 1x10⁻⁸ / 1x10⁻⁷ / 1x10⁻⁶ M). Atropin diente der Verdrängung von NMS und [³H]NMS aus der spezifischen Bindung, und damit zur Bestimmung der unspezifischen Bindung. Zum Abtrennen der membrangebundenen Radioaktivität wurden jeweils 1000 µl eines jeden Reaktionsansatzes über GF6 Glasfaserfilter einzeln filtriert (Einzelfilteranlage). Die Filter wurden innerhalb von max. 15 s mit 2 x 5 ml eisgekühltem Na, K, P_i-Puffer

5 mM gespült. Die Filter waren vorher zur Minimierung der unspezifischen Bindung für min. 2 h in PEI-Lösung 0,25% aufbewahrt worden. Die Filter mit der membran- gebundenen Radioaktivität wurden in PE Szintillations-Messgefäße 21 ml überführt und mit 5 ml eines gewebe-lösenden Szintillationscocktails (Ready Protein) übergossen. Nach einer Einwirkzeit von mindestens 60 min wurde die Radioaktivität der Proben im Beckman LS 6000 SC Flüssigkeits-Szintillations-Zählgerät bestimmt.

2.7.1.2 Versuchsdurchführung am Brandel Cell Harvester

Die homologe kompetitive Inhibition am Brandel Cell Harvester mit 48 Bohrungen wurde mit gleichen Reaktionsansätzen, wie in 2.7.1.1 (S. 38) beschrieben, als Zweifachbestimmung durchgeführt. Derart wurden unterschiedliche Membran- suspensionen (2.4, S. 22) untersucht. Die Inkubationszeit ($t_{\text{Inkubation}}$) bei 23°C im Schüttelwasserbad von [³H]NMS für die individuelle Membransuspension wurde nach folgender Formel berechnet:

$$t_{\text{Inkubation}} = 5 \cdot t_{1/2, \text{Dissoziation}}$$

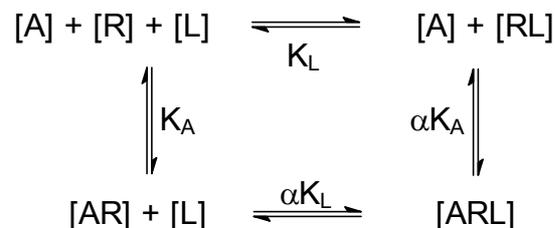
Gleichung 12

$t_{1/2, \text{Dissoziation}}$ Dissoziationshalbwertszeit des Radioliganden in Abwesenheit des Inhibitors

Es kamen neun unterschiedliche Konzentrationen aus einer NMS-Verdünnungsreihe zum Einsatz (Endkonzentration: 1×10^{-12} / 1×10^{-11} / 3×10^{-11} / 1×10^{-10} / 3×10^{-10} / 1×10^{-9} / 3×10^{-9} / 1×10^{-8} / 1×10^{-7} M). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Reaktionsansätze am Brandel Harvester über einer Filtermatte (Whatman GF/B, Brandel Part # FBP-148L) in maximal 30 s filtriert und mit eisgekühltem Na, K, P_i- Puffer 40 mM zweimal gespült. Die Filtermatte war zuvor in PEI-Lösung 0,1% für 30 min eingelegt worden. Der Filtrationsrückstand eines jeden Reaktionsansatzes konnte gewonnen werden, indem entsprechende kreisrunde Areale aus der Filtermatte gestanzt wurden. Die Filterstanzlinge mit der membran- gebundenen Radioaktivität wurden in PE Szintillations-Messgefäße 21 ml überführt und mit 5 ml eines gewebe-lösenden Szintillationscocktails (Ready Protein) übergossen. Nach einer Einwirkzeit von mindestens 60 min wurde die Radioaktivität der Proben im Beckman LS 6000 SC Flüssigkeits-Szintillations-Zählgerät bestimmt.

2.7.2 Heterologe allosterische Interaktion

Binden zwei unterschiedliche Liganden am gleichen Rezeptor an zwei unterschiedlichen Stellen, so können im Reaktionsgleichgewicht drei verschiedene Rezeptor-Ligand-Komplexe beschrieben werden (Ehlert, 1988). Man spricht vom ternären Kooperativitätsmodell.



Gleichung 13

- [A]: Konzentration des allosterischen Liganden
 [R]: Konzentration des Rezeptors
 [L]: Konzentration des orthosterischen Liganden
 [AR], [RL], [ARL]: Konzentration der jeweiligen Rezeptor-Ligand-Komplexe
 K_L : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des orthosterischen Liganden
 K_A : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des allosterischen Liganden
 α : Kooperativitätsfaktor
 $\alpha > 1$: negative Kooperativität
 $\alpha = 1$: neutrale Kooperativität
 $0 < \alpha < 1$: positive Kooperativität

Das Bindungsareal am Rezeptor, welches einen klassischen Agonisten oder Antagonisten bindet, wird als orthosterische Bindungsstelle bezeichnet. Ein allosterischer Ligand bindet an einer weiteren Bindungsstelle am Rezeptor. Dabei beeinflussen sich die Affinitäten, ausgedrückt als Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten, des orthosterischen und allosterischen Liganden wechselseitig im gleichen Ausmaß und in gleicher Richtung. Der Kooperativitätsfaktor α ist eine Maßzahl für diese gegenseitige Beeinflussung. Man spricht von negativer Kooperativität ($\alpha > 1$), wenn die jeweilige Affinität der Liganden zum Rezeptor durch die allosterische Interaktion abnimmt. Eine entsprechende Zunahme der Affinität wird als positive Kooperativität ($0 < \alpha < 1$) bezeichnet. Eine neutrale Kooperativität kommt zustande, wenn die Affinitäten unbeeinflusst bleiben ($\alpha = 1$). Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_L bzw. K_A) setzt sich aus den Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation (k_{+1}) und für die Dissoziation (k_{-1}) zusammen. Daraus wird

ersichtlich, dass die Beeinflussung der Affinität über die Verlangsamung oder Beschleunigung der Assoziation bzw. der Dissoziation zustande kommt. Eine alleinige Dissoziationsverzögerung würde demnach zu einer positiven Kooperativität, eine isolierte Assoziationsverlangsamung zu einer negativen Kooperativität, führen. Aus dem beschriebenen ternären Kooperativitätsmodell kann eine Gleichung abgeleitet werden, die der Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_A und des Kooperativitätsfaktors α dient (Ehlert, 1988):

$$B_{\text{spez}} = B_0 \cdot \frac{[L] + K_L}{[L] + K_L \cdot \left(\frac{K_A + [A]}{K_A + [A]/\alpha} \right)}$$

Gleichung 14

- B_{spez} : spezifische Bindung des orthosterischen Radioliganden in Anwesenheit des allosterischen Liganden
- B_0 : spezifische Bindung des orthosterischen Radioliganden in Abwesenheit des allosterischen Liganden

Zu diesem Zweck wird die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_L in einem homologen Kompetitionsexperiment zuvor bestimmt, und die Radioligandkonzentration $[L]$ auf den eingesetzten Wert konstant gesetzt. Die Konzentration des allosterischen Liganden $[A]$ wird variiert.

2.7.2.1 Versuchsdurchführung mittels Einzelfiltration

Die heterologe allosterische Interaktion wurde entsprechend den unten stehenden Versuchsansätzen, ansonsten aber wie die homologe kompetitive Inhibition (2.7.1.1, S. 38) mit individuell berechneten Inkubationszeiten gemessen.

Ansatz zur Bestimmung der Gesamtbindung (Gesamtvolumen 1500 μl)

$[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Lösung (Endkonzentration 0,2 nM)	100 μl
Aqua destillata	25 μl
Na, K, P_i -Puffer 5,65 mM (Endkonzentration 5 mM)	1125 μl
Membransuspension verdünnt in Na, K, P_i -Puffer 5 mM	250 μl

Ansatz zur Bestimmung der unspezifischen Bindung (Gesamtvolumen 1500 μl)

$[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Lösung (Endkonzentration 0,2 nM)	100 μl
Atropin-Lösung 6×10^{-5} M (Endkonzentration 1×10^{-6} M)	25 μl
Na, K, P_i -Puffer 5,65 mM (Endkonzentration 5 mM)	1125 μl
Membransuspension verdünnt in Na, K, P_i -Puffer 5 mM	250 μl

Ansatz zur Bestimmung der Inhibitor-Bindung (Gesamtvolumen 1500 µl)

[³ H]NMS-Lösung (Endkonzentration 0,2 nM)	100 µl
Inhibitor-Lösungen (Verdünnungsreihe)	25 µl
Na, K, P _i -Puffer 5,65 mM (Endkonzentration 5 mM)	1125 µl
Membransuspension verdünnt in Na, K, P _i -Puffer 5 mM	250 µl

Die Inkubationszeit wurde als das Fünffache der Assoziationshalbwertszeit des Radioliganden in Anwesenheit des Inhibitors berechnet. Die Assoziationshalbwertszeit des Radioliganden kann nach unten stehender Gleichung (Lazareno und Birdsall, 1995) näherungsweise berechnet werden:

$$t_{1/2 \text{ Ass, Inhibitor}} = t_{1/2 \text{ Diss, Kontrolle}} \cdot \left(1 + \frac{[X]}{EC_{50, \text{Diss}}} \right)$$

Gleichung 15

$t_{1/2 \text{ Ass, Inhibitor}}$:	Assoziationshalbwertszeit des Radioliganden in Anwesenheit des Inhibitors
$t_{1/2 \text{ Diss, Kontrolle}}$:	Dissoziationshalbwertszeit des Radioliganden in Abwesenheit des Inhibitors (Kontrollbedingungen)
[X]:	Konzentration des Inhibitors
$EC_{50, \text{Diss}}$:	Konzentration des Inhibitors, die die Dissoziationsgeschwindigkeit des Radioliganden um 50% reduziert

In den meisten Fällen kann davon ausgegangen werden, dass sich die Bindung von Rezeptor, Radioligand und Inhibitor im Gleichgewicht befindet, wenn die Inkubationszeit derart berechnet wird.

2.8 Dissoziationsexperimente

Reagieren Rezeptor R und Radioligand L entsprechend der Gleichung 2 reversibel miteinander, so lässt sich die zeitabhängige Veränderung der Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes durch nachstehende Differentialgleichung beschreiben:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] - k_{-1} \cdot [RL]$$

Gleichung 16

Im Reaktionsgleichgewicht verlaufen Assoziation ($k_{+1} \cdot [R] \cdot [L]$) und Dissoziation ($k_{-1} [RL]$) gleich schnell, die Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes verändert sich nicht. Gibt man dem Reaktionsansatz einen etwa tausendfachen Überschuss eines dem Radioliganden kompetitiven Antagonisten hinzu, so wird die

Assoziation zwischen Rezeptor und Radioligand nahezu vollständig unterbunden. Lediglich der Zerfall des Rezeptor-Radioligand-Komplexes geht unvermindert weiter. Die Abnahme der Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes kann dann so beschrieben werden:

$$-\frac{d[\text{RL}]}{dt} = k_{-1} \cdot [\text{RL}]$$

Gleichung 17

Durch Integration der oben stehenden Gleichung erhält man eine monoexponentielle Funktion, die den zeitabhängigen Dissoziationsverlauf des Radioliganden aus dem Rezeptor-Ligand-Komplex beschreibt:

$$[\text{RL}]_t = [\text{RL}]_0 \cdot e^{-k_{-1} \cdot t} + u$$

Gleichung 18

- [RL]_t: Gesamtbindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t
- [RL]₀: spezifische Bindung des Radioliganden im Bindungsgleichgewicht
- t: Zeitpunkt der Bestimmung von [RL]_t
- u: unspezifische Bindung des Radioliganden

Entsprechend der Definition der Halbwertszeit $t_{1/2}$ und durch Umformung der oberen Gleichung, kann die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante berechnet werden:

$$k_{-1} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}}$$

Gleichung 19

Wie in 2.7.2, S. 40 beschrieben, kann ein allosterischer Modulator die Geschwindigkeiten der Assoziation und der Dissoziation verändern. Während auch kompetitive Antagonisten die Assoziation beeinflussen können, ist es ein Charakteristikum der allosterischen Modulatoren, die Dissoziationsgeschwindigkeit zu verändern (Kostenis und Mohr, 1996; Lazareno und Birdsall, 1996). Denn eine Substanz, die den Zerfall des Rezeptor-Ligand-Komplexes zu modulieren vermag, muss zwangsläufig an einer anderen als der orthosterischen Bindestelle mit dem Rezeptor interagieren. In dieser Arbeit wurde nur eine Dissoziationsverlangsamung beobachtet, prinzipiell ist aber auch eine Beschleunigung der Dissoziation denkbar. Wird die auf einen Kontrollwert ($k_{-1, \text{Kontrolle}}$) bezogene Dissoziations-Geschwin-

digkeitskonstante ($k_{-1, \text{Modulator}}$) gegen den Logarithmus der Konzentration des Modulators aufgetragen, so erhält man eine sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurve, die durch eine vier Parameter enthaltende logistische Gleichung (Hill, 1910; Barlow und Blake, 1989) beschrieben werden kann:

$$\frac{k_{-1, \text{Modulator}}}{k_{-1, \text{Kontrolle}}} = \frac{k_{\text{app}}}{k_0} = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + \left(\frac{\text{EC}_{0,5}}{10^X} \right)^{n_H}}$$

Gleichung 20

$k_{-1, \text{Modulator}}$:	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit einer definierten Konzentration des Modulators; entspricht der apparenten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{app})
$k_{-1, \text{Kontrolle}}$:	Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante in Abwesenheit des Modulators auch als k_0 bezeichnet
Bottom:	unteres Kurvenplateau; maximaler Effekt
Top:	oberes Kurvenplateau
$\text{EC}_{0,5}$:	Konzentration des Modulators, die die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert; Wendepunkt des Sigmoids
[X]:	Logarithmus der Konzentration des Modulators
n_H :	Hill-Koeffizient; Maß für die Steilheit der Kurve

Der Wendepunkt der Konzentrations-Wirkungs-Kurve ($\text{EC}_{0,5}$ -Wert) liefert ein Maß für die Affinität (K_D) des Modulators zum Ligand-besetzten Rezeptor (Lazareno und Birdsall, 1995; Kostenis und Mohr, 1996; Lazareno und Birdsall, 1996), wenn folgende Bedingung erfüllt ist: In Gegenwart des allosterischen Modulators sind die Dissoziationsverläufe des Radioliganden monophasisch.

Vermittelt der Modulator am Ligand-besetzten Rezeptor seinen Effekt, indem er eine hochaffine und niedrigaffine Bindungsstelle erkennt, dann kann der konzentrations-abhängige Effekt des Modulators durch nachstehende Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{k_{-1, \text{Modulator}}}{k_{-1, \text{Kontrolle}}} = \frac{k_{\text{app}}}{k_0} = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom}) \cdot \text{Fraktion 1}}{1 + 10^{(X - \log EC_{0,5 \text{ Diss (1)}})}} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom}) \cdot (1 - \text{Fraktion 1})}{1 + 10^{(X - \log EC_{0,5 \text{ Diss (2)}})}}$$

Gleichung 21

$EC_{0,5 \text{ Diss (1/2)}}$: Konzentrationen des Modulators, die die Dissoziations-Geschwindigkeits konstante des Radioliganden für die hochaffine (1) und die niedrigaffine (2) Bindestelle für den Modulator innerhalb des jeweiligen Effektanteils halb maximal reduzieren

Fraktion 1: Effektanteil des maximal erreichbaren Effektes über die hochaffine Bindestelle; der Effektanteil der niedrigaffinen Bindestelle errechnet sich als 1-Fraktion 1.

2.8.1 Dissoziationsexperimente mit Mehrpunkterfassung

2.8.1.1 Versuchsdurchführung von Dissoziationsexperimenten mit einem allosterischen Modulator

Zur Erfassung vollständiger Dissoziationsverläufe eines Radioliganden aus seinem Rezeptor-Ligand-Komplex wurden maximal fünf Reaktionsansätze, entsprechend dem unten beschriebenen Protokoll zur Bestimmung des Dissoziationsverlaufs, in 50 ml Erlenmeyerkolben pipettiert. Die Zugabe der Membransuspension startete die Inkubationszeit. Nach 30 Minuten bei 23°C im Schüttelwasserbad wurden 3 Proben zu je 1.000 µl zur Bestimmung der Gesamtbindung des Radioliganden dem jeweiligen Reaktionsansatz entnommen.

Ansatz zur Bestimmung des Dissoziationsverlaufs

[³ H]NMS-Lösung (Endkonzentration 0,2 nM)	1.600 µl
Aqua destillata	200 µl
Na, K, P _i -Puffer (Endkonzentration 5 mM)	16.800 µl
Membransuspension verdünnt in Na, K, P _i -Puffer 5 mM	4.000 µl

Die Dissoziation des Rezeptor-Radioligand-Komplexes wurde durch Zugabe von 1.400 µl einer im PE Szintillations-Messgefäß 21 ml gemischten Startlösung der Messung zugänglich gemacht. Dabei kamen, wie nachstehend beschrieben, zwei

unterschiedliche Startlösungen zum Einsatz. Der Zusatz des allosterischen Modulators bewirkte in dieser Arbeit immer eine Dissoziationsverzögerung.

Startlösung ohne Modulator (Kontrolle) (Gesamtvolumen 1.400 µl)

Aqua destillata	700 µl
Atropin-Lösung 3×10^{-5} M (Endkonzentration 1×10^{-6} M)	700 µl

Startlösung mit allosterischem Modulator (Gesamtvolumen 1.400 µl)

Alloster-Lösung (Konzentrationsvariationen)	700 µl
Atropin-Lösung 3×10^{-5} M (Endkonzentration 1×10^{-6} M)	700 µl

Der Dissoziationsverlauf des Radioliganden in den Reaktionsansätzen wurde mittels Entnahme von 20 Proben zu je 1.000 µl über einen Zeitraum von 120 min verfolgt. Die Probenentnahme und -aufbereitung erfolgte wie unter 2.7.1.1 (S. 38) beschrieben.

2.8.1.2 Versuchsdurchführung von Dissoziationsexperimenten mit zwei allosterischen Modulatoren

Dissoziationsexperimente können auch in Anwesenheit zweier allosterischer Modulatoren durchgeführt werden. Das Versuchsprotokoll ist dabei bis auf die Startlösungen und veränderte Volumina im Reaktionsansatz so beschaffen, wie in 2.8.1.1 (S. 45) beschrieben.

Ansatz zur Bestimmung des Dissoziationsverlaufs

[³ H]NMS-Lösung (Endkonzentration 0,2 nM)	1.600 µl
Aqua destillata	150 µl
Na, K, P _i -Puffer (Endkonzentration 5 mM)	17.200 µl
Membransuspension verdünnt in Na, K, P _i -Puffer 5 mM	4.000 µl

Startlösung ohne Modulator (Kontrolle) (Gesamtvolumen 1.050 µl)

Aqua destillata	700 µl
Atropin-Lösung 6×10^{-5} M (Endkonzentration 1×10^{-6} M)	350 µl

Startlösung mit zwei allosterischen Modulatoren (Gesamtvolumen 1.050 µl)

Alloster-Lösung 1 (Konzentrationsvariationen)	350 µl
Alloster-Lösung 2 (Konzentrationsvariationen)	350 µl
Atropin-Lösung 6×10^{-5} M (Endkonzentration 1×10^{-6} M)	350 µl

2.8.2 Dissoziationsexperimente mit Zweipunkterfassung

Die theoretischen Grundlagen zur Durchführung und Auswertung von Dissoziationsexperimenten mit Zweipunkterfassung sind ausführlich beschrieben (Kostenis und Mohr, 1996). Bei einem solchen Vorgehen werden lediglich zwei Zeitpunkte im Dissoziationsverlauf zur Bestimmung der Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante (k_{-1}) erfasst. Diese Vorgehensweise ermöglicht einen wesentlich höheren Versuchsdurchsatz, als die Methode der Erfassung vollständiger Dissoziationsverläufe. Die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante (k_{-1}) kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$k_{-1} = \frac{\ln\left(\frac{[\text{RL}]_{t, \text{spez}}}{[\text{RL}]_0}\right)}{t}$$

Gleichung 22

$[\text{RL}]_{t, \text{spez}}$:	spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t
$[\text{RL}]_0$:	spezifische Bindung des Radioliganden im Bindungsgleichgewicht
t:	Zeitpunkt der Bestimmung von $[\text{RL}]_{t, \text{spez}}$

2.8.2.1 Versuchsdurchführung

Die Dissoziationsexperimente mit Zweipunkterfassung wurden mithilfe eines Brandel Cell Harvester MB-482 mit 48 Bohrungen betrieben. Die Reaktionsansätze zur Bestimmung der Gesamtbindung, der unspezifischen Bindung und zur Bestimmung der Radioligand-Dissoziation wurden in Reagenzgläser (Borsilikatglas 16 x 100 mm) pipettiert. Jeder Reaktionsansatz wurde zweifach angesetzt. Die Membransuspension wurde 30 Minuten lang bei 23°C im Schüttelwasserbad mit dem Radioliganden inkubiert.

Ansatz zur Bestimmung der Gesamtbindung (Gesamtvolumen 1.000 µl)

$[\text{}^3\text{H}]\text{NMS}$ -Lösung 100 nM (Endkonzentration 1 nM)	10 µl
Aqua destillata	10 µl
Na, K, P_i – Puffer 5,21 mM (Endkonzentration 5 mM)	480 µl
Membransuspension verdünnt in Na, K, P_i -Puffer 5 mM	500 µl

Ansatz zur Bestimmung der unspezifischen Bindung (Gesamtvolumen 1.000 µl)

[³ H]NMS-Lösung 100 nM (Endkonzentration 1 nM)	10 µl
Atropin-Lösung 3x10 ⁻⁴ M (Endkonzentration 3 µM)	10 µl
Na, K, P _i – Puffer 5,21 mM (Endkonzentration 5 mM)	480 µl
Membransuspension verdünnt in Na, K, P _i -Puffer 5 mM	500 µl

Ansatz zur Bestimmung der Radioligand-Dissoziation (Gesamtvolumen 1.000 µl)

[³ H]NMS-Lösung 100 nM (Endkonzentration 1 nM)	10 µl
Aqua destillata	10 µl
Na, K, P _i – Puffer 5,21 mM	480 µl
Membransuspension verdünnt in Na, K, P _i -Puffer 5 mM	500 µl

Der Zusatz von jeweils 1.000 µl Startlösung, angesetzt im Reagenzglas aus Borsilikat, zu den Reaktionsansätzen zur Bestimmung der Radioligand-Dissoziation machte die Dissoziation messbar.

Startlösung ohne Modulator (Kontrolle) (Gesamtvolumen 1.000 µl)

Aqua destillata	500 µl
Atropin [1,2x10 ⁻⁵ M] in Na, K, P _i – Puffer 10 mM (Atropin-Endkonzentration 6 µM)	500 µl

Startlösung mit allosterischem Modulator (Gesamtvolumen 1.000 µl)

Alloster-Lösung (Konzentrationsvariationen)	500 µl
Atropin [1,2x10 ⁻⁵ M] in Na, K, P _i – Puffer 10 mM (Atropin-Endkonzentration 6 µM)	500 µl

Die Reaktionsansätze wurden am Brandel-Harvester über einer Filtermatte (Whatman GF/B, Brandel Part # FBP-148L) in maximal 30 s filtriert und mit eiskühlem Na, K, P_i-Puffer 40 mM zweimal gespült. Die Filtermatte war zuvor in PEI-Lösung 0,1% für 30 min eingelegt worden. Die Zeit zwischen Zugabe der Startlösung und Beendigung der Reaktion mittels Filtration (t_{off}) wurde nach unten stehender Formel berechnet:

$$t_{\text{off}} = 1,75 \cdot t_{1/2, \text{Dissoziation}}$$

Gleichung 23

$t_{1/2, \text{Dissoziation}}$ Dissoziationshalbwertszeit des Radioliganden in Abwesenheit des Modulators

Dabei wurde berücksichtigt, dass [³H]NMS je nach Membransuspension eine unterschiedliche Dissoziationshalbwertszeit aufweist. Der Filtrationsrückstand eines jeden Reaktionsansatzes konnte gewonnen werden, indem entsprechende kreisrunde Areale aus der Filtermatte gestanzt wurden. Die Filterstanzlinge mit der

membrangebundenen Radioaktivität wurden in PE Szintillations-Messgefäße 21 ml überführt und mit 5 ml eines gewebe-lösenden Szintillationscocktails (Ready Protein) übergossen. Nach einer Einwirkzeit von mindestens 60 min wurde die Radioaktivität der Proben im Beckman LS 6000 SC Flüssigkeits-Szintillations-Zählgerät bestimmt.

2.9 Interaktion zwischen allosterischen Modulatoren

In dieser Arbeit wurden Dissoziationsexperimente mit unterschiedlichen allosterischen Modulatoren (1.1 S. 17) in Anwesenheit von Hexamethonium durchgeführt. Das Versuchprotokoll ist in 2.8.1.2 (S. 46) beschrieben. Obidoxim und Hexamethonium sind schwache allosterische Modulatoren (Tränkle et al., 1996) und können selbst bei höchsten Konzentrationen die Dissoziation von [^3H]NMS aus dem Rezeptor-Ligand-Komplex nur verlangsamen. Stark wirksame allosterische Modulatoren, z. B. WDuo3 oder Tacrin, dagegen vermögen bei einer entsprechenden Konzentration die Dissoziation des Radioliganden vollständig zu hemmen. In Dissoziationsexperimenten mit zwei allosterischen Modulatoren vermag der schwächer wirksame Modulator den Effekt (Dissoziationsverzögerung von [^3H]NMS) des stark wirksamen allosterischen Modulators zu antagonisieren (Ellis und Seidenberg, 1992; Tränkle und Mohr, 1997). In diesem Zusammenhang werden die schwach wirksamen allosterischen Modulatoren als Antagonisten (partiell wirksamer Agonist) und die stark wirksamen allosterischen Modulatoren einfach als Modulatoren (Agonisten) bezeichnet. Eine ausführliche Einführung in die Analyse von Dissoziationsexperimenten mit zwei allosterischen Modulatoren findet sich in der Dissertationsarbeit von Uwe Schulz (Schulz, 1998). Die Art der antagonistischen Interaktion kann durch drei verschiedene Modelle, hier als Modelle 1 bis 3 bezeichnet, beschrieben werden. Modell 1 beschreibt eine kompetitive, Modell 2 eine nicht-kompetitive und Modell 3 eine kooperative Interaktion des Antagonisten mit dem Modulator. Die Ergebnisse von Dissoziationsexperimenten mit zwei allosterischen Modulatoren, die am besten durch das Modell 1 oder 2 beschrieben werden, können mit Hilfe der Waud-Gleichung (Waud, 1975; Lazareno und Birdsall, 1993) analysiert werden. Diese Gleichung stellt eine Kombination aus einer logistischen Funktion und der Schild-Gleichung (Arunlakshana und Schild, 1958) dar:

$$\text{Effekt} = (E_{\max} - \text{basal}) / \left(1 + \left[\frac{EC_{0,5/\text{Kontrolle}} \cdot \left(\frac{[B]^s}{K_b} + 1 \right)}{[A]} \right]^{n_H} \right) + \text{basal}$$

Gleichung 24

Effekt:	Verzögerung der [³ H]NMS-Dissoziation (k_{app}/k_0); abhängige Variable
E_{\max} :	maximal erreichbarer Effekt des Modulators
basal:	Effektniveau in Abwesenheit des Modulators
[A]:	Konzentration des Modulators (Agonist); unabhängige Variable
[B]:	Konzentration des Antagonisten; unabhängige Variable
$EC_{0,5/\text{Kontrolle}}$:	Konzentration des Modulators A, in Abwesenheit des Antagonisten B, die die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert;
K_b :	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Antagonisten B
s:	Steigung der Schild-Geraden
n_H :	Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Modulators

Eine kooperative Interaktion von Modulator und Antagonist kann durch Modell 3 unter Zuhilfenahme einer erweiterten Waud-Gleichung (Lazareno und Birdsall, 1995) beschrieben werden:

$$\text{Effekt} = (E_{\max} - \text{basal}) / \left(1 + \left[\frac{EC_{0,5/\text{Kontrolle}}}{[A]} \cdot \frac{1 + [B] \cdot K_x}{1 + \beta \cdot [B] \cdot K_x} \right]^{n_H} \right) + \text{basal}$$

Gleichung 25

β :	Kooperativitätsfaktor; Maß für die Interaktion zwischen Antagonist und Modulator
K_x :	Gleichgewichts-Assoziationskonstante des Antagonisten B; ($K_x = 1/K_b$; $\log K_x = -\log K_b$)

Wenn Datensätze aus Dissoziationsexperimenten mit zwei allosterischen Modulatoren am besten mit dem Modell 1 (Gleichung 24 und $s = 1$) beschrieben werden konnten, dann wurde aus einem reduzierten Datensatz, lediglich zu Darstellungszwecken, eine Schild-Gerade mit der Steigung eins konstruiert. Analog dazu wurde, wenn der Datensatz besser mit Modell 2 beschrieben werden konnte (Gleichung 24 und $s \neq 1$), eine Schild-Gerade mit einer Steigung ungleich eins an den reduzierten Datensatz angepasst. In beiden Fällen lag der Geraden die Schild-Gleichung (Arunlakshana und Schild, 1958) zugrunde:

$$\log(VF - 1) = pK_b + s \cdot \log[B]$$

Gleichung 26

- VF: Verschiebungsfaktoren, berechnet aus (konstruierten) parallel verschobenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven ($VF = EC_{0,5 \text{ Antagonist}} / EC_{0,5 \text{ Kontrolle}}$)
- pK_b : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Antagonisten B
- s: Steigung der Regressionsgeraden (Schild-Steigung)

Die kooperative Interaktion zwischen Antagonist und Modulator (Modell 3, Gleichung 26) wurde mit einem reduzierten Datensatz anhand der Lanzafame-Gleichung (Lanzafame et al., 1996) dargestellt:

$$\log(VF - 1) = \log(\alpha - 1) - \log\left(\frac{\alpha \cdot K_b}{[B]} + 1\right)$$

Gleichung 27

- α : Kooperativitätsfaktor; berechnet als $\alpha = 1/\beta$ (β aus Gleichung 25)

2.10 Statistische Methoden

2.10.1 Vergleich unterschiedlicher Modelle

In Rezeptorbindungsstudien werden die Ergebnisse unter der Vorstellung von Modellen an mathematische Funktionsgleichungen angepasst. Stehen verschiedene Modelle zur Auswahl, kann mittels des F-Testes (Motulsky, 1996a; Motulsky, 1996b) statistisch entschieden werden, welches Modell die zur Verfügung stehenden Datenpunkte am besten beschreibt. Die Anzahl der Variablen einer Gleichung und die Anzahl der bestimmten Messpunkte definiert die Anzahl der Freiheitsgrade (DF):

$$DF = N - v$$

Gleichung 28

- N: Anzahl der zur Verfügung stehenden Messpunkte
- v: Anzahl der Variablen in der dem Modell zugrundeliegenden Gleichung

Die Summe der Fehlerquadrate (SS) wird nach folgender Formel berechnet:

$$SS = \sum (Y_n - R_n)^2$$

Gleichung 29

Y_n : n ermittelte Werte für die unabhängige Zielvariable (z. B. Effekt eines Modulators)

R_n : n durch Regression errechnete Werte für die unabhängige Zielvariable

Beim F-Test werden die Freiheitsgrade und die Summe der Fehlerquadrate des einfacheren Modells (Modell 1, DF_1 , SS_1 , weniger Variablen) in Verhältnis zum komplexeren Modell (Modell 2, DF_2 , SS_2 , mehr Variablen) gesetzt:

$$F = \frac{(SS_1 - SS_2) / (DF_1 - DF_2)}{SS_2 / DF_2}$$

Gleichung 30

Der errechnete F-Wert wird für ein vorher festgelegtes Signifikanzniveau ($p = 0,05$) mit tabellierten Werten verglichen, um entscheiden zu können, ob das einfachere Modell die zur Verfügung stehenden Datenpunkte hinreichend genau beschreibt, oder ob das komplexere Modell benutzt werden muss. Letztlich wird verglichen, ob die Einführung zusätzlicher Variablen die Summe der Fehlerquadrate überproportional reduzieren kann. Werden Modelle mit der gleichen Anzahl an Variablen miteinander verglichen, wird kein F-Test betrieben. Dem Modell mit der kleineren Summe der Fehlerquadrate wird der Vorzug gegeben.

Der F-Test, fest im Computerprogramm GraphPad Prism[®] verankert, war bei der Analyse von Datensätzen mithilfe von Gleichungen mit einer unabhängigen Variable ($y = f(x)$) leicht zugänglich. Der Einsatz von Gleichungen, zur Analyse von Datensätzen, mit zwei unabhängigen Variablen ($y = f(x,z)$), wie bei Dissoziationsexperimenten mit zwei allosterischen Modulatoren (2.9, S. 49), erforderte die manuelle Einbindung des F-Testes in das Computerprogramm SigmaPlot[®].

2.10.2 Vergleich von Mittelwerten

Statistische Vergleiche von Mittelwerten untereinander wurden mithilfe des Computerprogramms GraphPad InStat[®] durchgeführt. Beim Vergleich mehrerer Mittelwerte untereinander wurde der „Turkey-Kramer Multiple Comparisons Test“ und beim Vergleich von zwei Mittelwerten untereinander der zweiseitige Zweistichproben t-Test („two-tailed P value“) angewandt.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der [³H]NMS-Bindung an Membransuspensionen

Alle untersuchten Membransuspensionen wurden in Na, K, P_i – Puffer 5 mM hergestellt. Notwendige Verdünnungen wurden im gleichen Puffer vorgenommen.

3.1.1 Membransuspensionen aus Herzventrikeln des Hausschweins

Membransuspensionen aus Herzventrikeln des Hausschweines (HSV-(M₂)) wurden in homologen kompetitiven Inhibitionsexperimenten hinsichtlich ihrer [³H]NMS-Bindung charakterisiert. Die Datensätze der [³H]NMS-Gesamtbindung aufgetragen gegen den Logarithmus der NMS-Konzentration wurden mithilfe der Gleichung 8, S. 37 analysiert. In Abbildung 1 ist ein repräsentatives Experiment dargestellt.

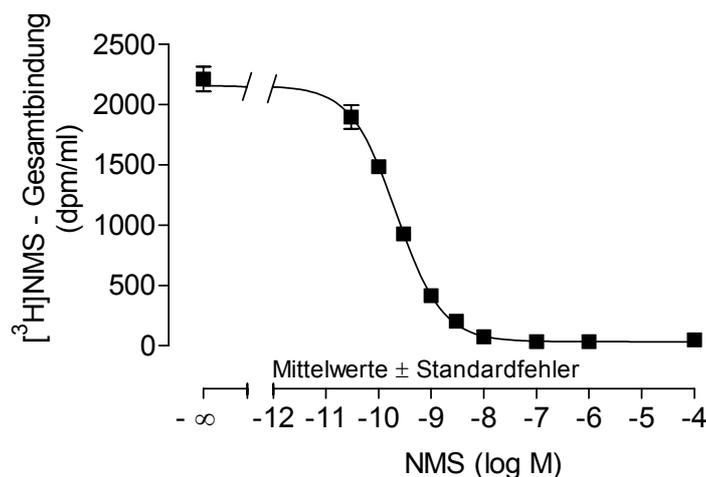


Abbildung 1: Homologe kompetitive Inhibition zwischen [³H]NMS (0,2 nM) und nicht markiertem NMS zur Charakterisierung der M₂-Rezeptoren einer Membransuspension aus Hausschwein-Herzventrikeln (HSV-(M₂)) durch die Bestimmung des pK_D- und B_{max}-Wertes. Der Hill-Koeffizient ist auf n_H = -1 konstant gesetzt. **Ordinate:** [³H]NMS-Gesamtbindung (dpm/ml). **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration des Inhibitors NMS (log M). **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus einer Dreifachbestimmung; repräsentatives Experiment. **Kurvenanpassung:** Gleichung 8, S. 37. **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Die aus den Kenngrößen der Kurvenanpassung (IC₅₀, maximales und minimales Bindungsniveau) ermittelten pK_D- und B_{max}-Werte für die einzelnen Membransuspensionen sind in Tabelle 5, S. 56 zusammengestellt. Die Steigung der Bindungskurven war bis auf eine Ausnahme in allen Fällen nicht signifikant

verschieden von $n_H = -1$ (F-Test, $p \geq 0,05$). Dies deutet auf das Vorliegen einer homogenen Population nicht interagierender Rezeptorproteine hin. Beim Inhibitions-experiment mit einer Inkubationszeit von 24 h wurde für die Bindungskurve eine Steigung von $n_H = -0,77 \pm 0,06$ gefunden. Für die Abschätzung des pK_D - und B_{max} -Wertes wurde die Steigung dennoch auf $n_H = -1$ gesetzt. In orientierenden Inhibitionsversuchen wurde eine Inkubationszeit von 12 h, 24 h und 48 h gewählt, um abschätzen zu können, ob die Bindungseigenschaften der HSV-(M₂)-Membransuspension für [³H]NMS über die genannten Zeiträume unverändert bleiben. Diese Information war nötig, um später beschriebene heterologe Inhibitionsexperimente mit langen Inkubationszeiten (3.8, S. 118) besser beurteilen zu können. Die maximale Anzahl der Bindungsstellen verringert sich nach einer Inkubationszeit von 12 h und 24 h auf etwa die Hälfte und nach 48 h auf ein Fünftel gegenüber der Anzahl bei einer Inkubationszeit von 2 h. Die Affinität für [³H]NMS bleibt jedoch nahezu unverändert (Tabelle 5, S. 56).

3.1.2 Membransuspensionen aus CHO-Zellen

CHO-hM₂-Membransuspensionen wurden in dieser Arbeit auf Vorrat hergestellt, um Arbeiten mit [³H]-Acetylcholin durchführen zu können. Das Projekt mit Acetylcholin als Radioligand wurde nicht weiter verfolgt. Daher wurde lediglich der Proteingehalt (Tabelle 5, S. 56) der CHO-hM₂-Membransuspensionen bestimmt. Eine Charge einer CHO-hM₅-Membransuspension wurde dankenswerterweise von Seraina Duda (Pharmakologie und Toxikologie, Pharmazeutisches Institut, Bonn) zur Verfügung gestellt. Die CHO-hM₂-Membransuspension vom 01.06.01 und die CHO-hM₅-Membransuspension von Seraina Duda wurden in Dissoziationsexperimenten eingesetzt. Für diese Membranpräparationen können daher Dissoziations-halbwertszeiten für [³H]NMS in Tabelle 5, S. 56 angegeben werden.

3.1.3 Membransuspensionen aus COS7-Zellen

Membransuspensionen mit humanen M_2 - und M_5 -Acetylcholin-Rezeptor und diversen M_2/M_5 -chimären Rezeptoren wurden in Dissoziationsexperimenten hinsichtlich der Dissoziationshalbwertszeit für [3 H]NMS charakterisiert. Die Werte für die Dissoziationshalbwertszeit können der Tabelle 5, S. 56 entnommen werden, und stimmen gut mit den in der Literatur berichteten Daten überein (Ellis et al., 1993; Gnagey et al., 1999; Buller, 2002). Die Dissoziationshalbwertszeit von 21,3 min für die COS7-BG-Membransuspension stimmt gut dem von Alexandra Raasch (persönliche Mitteilung) angegebenen Wert von 28 min überein. Der Wert für die COS7-BJ-Membransuspension kann nicht mit Literaturdaten verglichen werden, da der enthaltene punktmutierte Acetylcholin-Rezeptor in dieser Arbeit erstmals hergestellt wurde. Für einige Membransuspensionen wurde exemplarisch die Affinität für [3 H]NMS bestimmt. Sie lag mit Werten für $pK_D = 9,89$ bis $10,92$ im für diesen Radioliganden typischen nanomolaren Bereich ($9,92 \pm 0,02$ (Matsui et al., 1995)). Für die an den COS7-Membransuspensionen durchgeführten Untersuchungen in Dissoziationsexperimenten ist weder die Affinität für den orthosterischen Radioliganden noch die Dissoziationshalbwertszeit von [3 H]NMS maßgeblich, da immer eine versuchinterne Kontrolle erfolgte (3.5, S 95). Als Zielparameter in diesen Untersuchungen diente der Affinitätsparameter $pEC_{0,5 \text{ Diss}}$ des allosterischen Modulators an einem [3 H]NMS besetzten humanen M_2 -, M_5 - oder M_2/M_5 -chimären Rezeptor.

Membran- suspen- sion	Charge	t (h)	pK _D	B _{max} (fmol/mg Protein)	N	Protein- gehalt (mg/ml)	t _{1/2} [³ H]NMS (min)	N
Filtrationen an einer Einzelfilteranlage (Na, K, P _i – Puffer 5 mM)								
HSV-(M ₂)	26.05.99	2	9,70 ± 0,10	88 ± 11	3	2,64 ± 0,08	3,95 ± 0,15	14
HSV-(M ₂)	16.11.99	2	9,96 ± 0,09	134 ± 4	3	6,01 ± 0,33	4,49 ± 0,05	53
HSV-(M ₂)	20.10.00	2	10,47 ± 0,09	112 ± 5	3	3,41 ± 0,12	4,60 ± 0,07	33
HSV-(M ₂)	18.07.01	2	10,01 ± 0,06	81 ± 6	3	3,42 ± 0,14	4,18 ± 0,05	5
	Spalten- Mittelwert		10,04 ± 0,16	104 ± 12	12	3,87 ± 0,74	4,30 ± 0,15	105
HSV-(M ₂)	18.07.01	12	9,62	45	1	s.o.	n.b.	n.b.
HSV-(M ₂)	18.07.01	24	9,85	54	1	s.o.	n.b.	n.b.
HSV-(M ₂)	18.07.01	48	9,67	19	1	s.o.	n.b.	n.b.
Filtrationen am Brandel Cell Harvester (Na, K, P _i – Puffer 5 mM)								
HSV-(M ₂)	18.07.01	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	s.o.	5,44 ± 0,50	3
CHO-hM ₂	25.04.01	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,97 ± 0,20	n.b.	n.b.
CHO-hM ₂	07.05.01	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,61 ± 0,23	n.b.	n.b.
CHO-hM ₂	16.05.01	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	2,28 ± 0,23	n.b.	n.b.
CHO-hM ₂	22.05.01	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	2,31 ± 0,19	n.b.	n.b.
CHO-hM ₂	01.06.01	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	2,00 ± 0,14	5,66 ± 0,59	3
CHO-hM ₂	12.06.01	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	1,95 ± 0,17	n.b.	n.b.
CHO-hM ₅	Duda ^a	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	2,71 ± 0,11	86,9 ± 6,4	2
COS7-hM ₂	24.01.02	n.b.	n.b.	n.b.		n.b.	4,87 ± 0,33	7
COS7-hM ₂	Raasch ^a	2	10,75 ± 0,60	n.b.	2	n.b.	5,10 ± 0,20	3
COS7-CR1	Buller ^a	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	82,4 ± 10,8	4
COS7-CR2	Buller ^a	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	134 ± 21	3
COS7-CR3	07.02.02	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	130 ± 5	5
COS7-CR6	07.02.02	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3,90 ± 0,34	4
COS7-U	07.02.02	2	10,28 ± 0,18	n.b.	2	n.b.	15,6 ± 0,9	3
COS7-BG	24.01.02	2	10,47 ± 0,33	n.b.	2	n.b.	21,3 ± 1,8	3
COS7-BJ	24.01.02	2	10,92 ± 0,07	n.b.	2	n.b.	5,42 ± 0,71	3
COS7-hM ₅	07.02.02	10	9,89 ± 0,01	n.b.	2	n.b.	123 ± 13	9

Tabelle 5: Kenngrößen ± Standardfehler der [³H]NMS-Bindung an den eingesetzten oder auf Vorrat hergestellten Membransuspensionen (Kürzelerklärung: 2.4, S. 22 ff) aus homologen kompetitiven Inhibitionen und Dissoziationsexperimenten. **Charge**: Datum der Herstellung als Chargenbezeichnung. **t**: Inkubationszeit (h) zur Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes. **pK_D**: negativer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D berechnet nach Gleichung 10,

S. 37. B_{max} : maximale Anzahl von Bindungsstellen (fmol/mg Protein) berechnet nach Gleichung 11, S. 38 und bezogen auf den Proteingehalt (mg/ml) der Membransuspensionen. N : Anzahl der unabhängigen Experimente. $t_{1/2}$: Dissoziationshalbwertszeit berechnet nach Gleichung 19, S. 43. *n.b.*: nicht bestimmt. *s.o.*: siehe oben (Kenngröße innerhalb der Tabelle weiter oben schon angegeben). **Index**^a: von Seraina Duda, Alexandra Raasch und Stefan Buller (alle Pharmakologie und Toxikologie, Pharmazeutisches Institut, Bonn) zur Verfügung gestellte Membransuspensionen.

3.2 Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation durch allosterische Modulatoren

Alle untersuchten allosterischen Modulatoren vermochten die Dissoziation von [³H]NMS vom Acetylcholin-Rezeptor zu verzögern. Die Dissoziationsverläufe waren durchgehend monophasisch. In Abbildung 2 sind exemplarisch Dissoziationsverläufe von [³H]NMS in Ab- und in Anwesenheit des allosterischen Modulators EHW21 dargestellt. Aus solchen Verläufen kann nach Gleichung 18, S. 43 die apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} ermittelt werden.

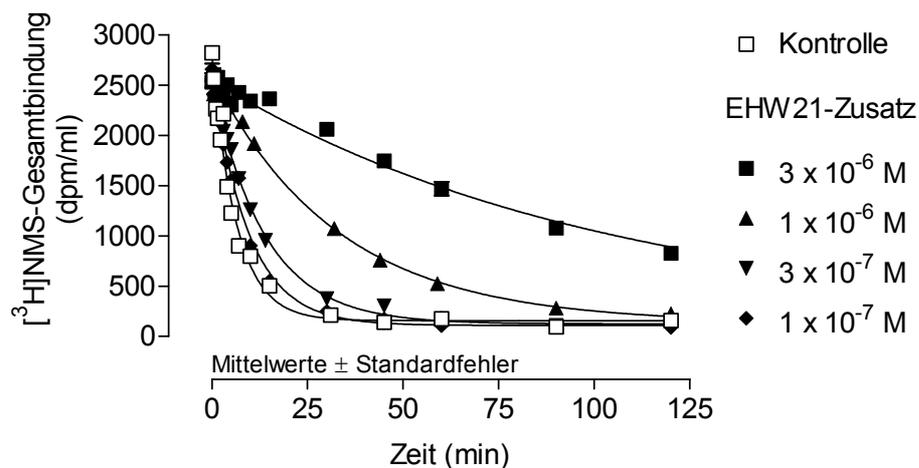


Abbildung 2: [³H]NMS-Dissoziationsverläufe in Ab- und Anwesenheit von EHW21; repräsentatives Experiment. **Ordinate**: [³H]NMS-Gesamtbindung (dpm/ml). **Abszisse**: Zeit (min). **Kurvenanpassung**: Gleichung 18, S. 43. **Versuchscharakteristika**: Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Wird die apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit des allosterischen Modulators gegen den Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators aufgetragen, so erhält man eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve für den dissoziationsverzögernden Effekt des Modulators. Da in dieser Arbeit in keinem Fall eine Beschleunigung der Dissoziation von [³H]NMS beobachtet wurde, wurde das obere Effektniveau der Konzentrations-Wirkungs-Kurven immer auf 1,00 festgesetzt. In Abbildung 3, S. 58 ist der disso-

ziationsverzögernde Effekt von EHW21, einem Tacrin-Dimer mit einer Hexyl-Zwischenkette, dargestellt. EHW21 ist ein mäßig starker allosterischer Modulator ($pEC_{0,5 \text{ Diss}} = 6,46 \pm 0,04$), der die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation vollständig ($\text{Max} = 0,00 \pm 0,03$) zu hemmen vermag. Im Gegensatz zu Tacrin (3.3.8, S. 80) weist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von EHW21 eine von $n_H = -1$ ($-1,20 \pm 0,04$) nicht signifikant abweichende Steigung auf. Dies deutet auf eine „eins zu eins“ Interaktion von EHW21 mit dem M_2 -Rezeptor hin, die dem Massenwirkungsgesetz folgt.

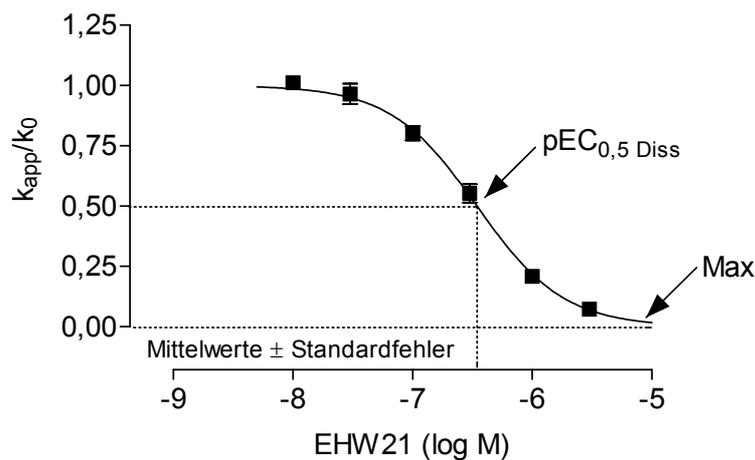


Abbildung 3: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von EHW21 für die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverzögerung. **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von EHW21. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von EHW21. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter** ($pEC_{0,5 \text{ Diss}}$, Max , n_H): Tabelle 8, S. 87, Index ^a. **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M_2)-Membransuspension.

3.2.1 Allosterische Wirksamkeit von W84

Der in dieser Arbeit ermittelte dissoziationsverzögernde Effekt ($pEC_{0,5 \text{ Diss}} = 7,74 \pm 0,07$) von W84, einem klassischen allosterischen Modulator der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation, stimmt gut mit Literaturbefunden (Tränkle et al., 1996) überein. Die in Abbildung 4, S. 59 dargestellte Konzentrations-Wirkungs-Kurve von W84 weist eine Steigung von $n_H = -1,29 \pm 0,20$ auf, die von $n_H = -1$ nicht signifikant verschieden ist. Die Dissoziationsverzögerung ist vollständig ($\text{Max} = 0,00 \pm 0,05$).

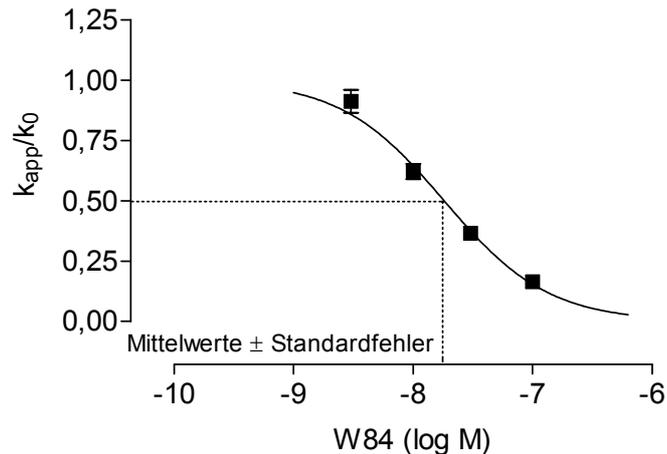


Abbildung 4: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von W84 für die [^3H]NMS-Dissoziationsverzögerung. **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von W84. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von W84. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^a. **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

3.3 Hexamethonium als allosterischer Modulator und als Antagonist der [^3H]NMS-Dissoziations-Verzögerung

Hexamethonium wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um den [^3H]NMS-dissoziationsverzögernden Effekt diverser allosterischer Modulatoren zu antagonisieren. Zunächst wurde der Eigeneffekt von Hexamethonium auf die [^3H]NMS-Dissoziation untersucht.

3.3.1 Eigeneffekt von Hexamethonium auf die [³H]NMS-Dissoziation

Hexamethonium vermag, wie in Abbildung 5 dargestellt, die [³H]NMS-Dissoziation vom M₂ Acetylcholin-Rezeptor zu verzögern. Die Dissoziationsverläufe waren in Ab- und in Anwesenheit von Hexamethonium monophasisch.

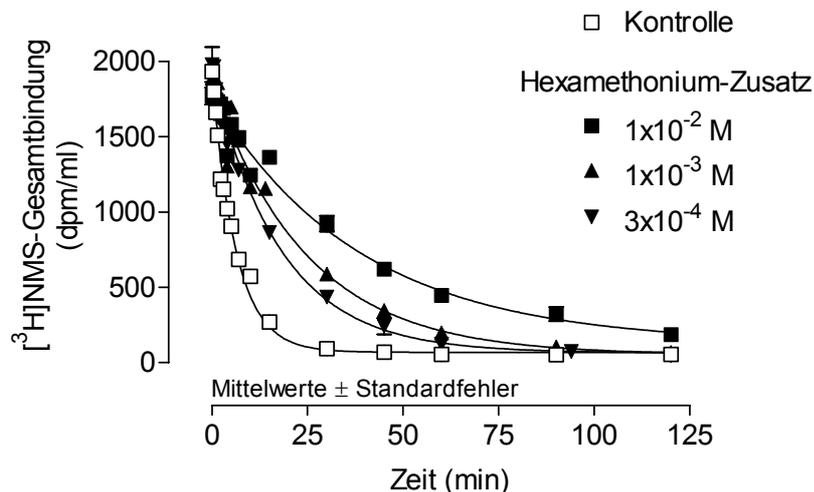


Abbildung 5: [³H]NMS-Dissoziationsverläufe in Ab- und Anwesenheit von Hexamethonium; repräsentatives Experiment. **Ordinate:** [³H]NMS-Gesamtbindung (dpm/ml). **Abszisse:** Zeit (min). **Kurvenanpassung:** Gleichung 18, S. 43. **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Hexamethonium kann die [³H]NMS-Dissoziation nur unvollständig hemmen (Max = $0,12 \pm 0,04$). Damit kann dieser allosterische Modulator mit submaximaler Wirkung im Hinblick auf den dissoziationsverzögernden Effekt als „partieller Agonist“ betrachtet werden, denn er kann die durch einen „Vollagonisten“ (z. B. WDuo3 und Tacrin) ausgelöste maximale Dissoziationsverzögerung teilweise wieder aufheben (antagonisieren). Da der Effekt eines Modulators mit maximaler Wirkung (z. B. WDuo3) durch Hexamethonium aufgehoben (antagonisiert) wird, wird Hexamethonium als Antagonist bezeichnet. Die Kurvenanpassung an die Datenpunkte (Abbildung 6, S. 61) ergibt eine sehr flache Konzentrations-Wirkungs-Kurve ($n_H = -0,57 \pm 0,06$).

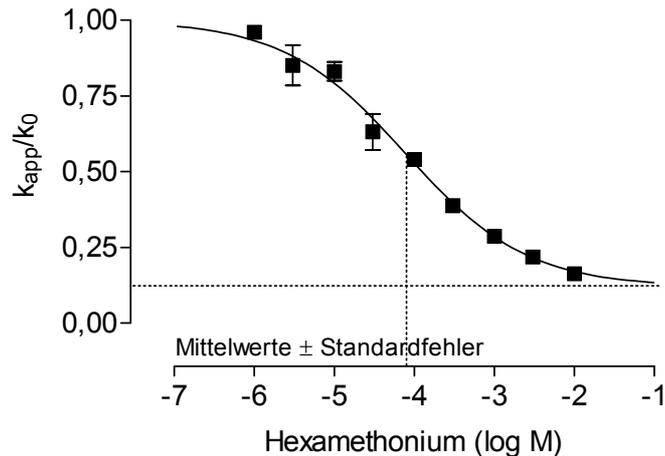


Abbildung 6: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Hexamethonium für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung. **Ordinate**: Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Hexamethonium. **Abszisse**: Logarithmus der molaren Konzentration von Hexamethonium. **Kurvenanpassung**: Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter**: Tabelle 6, S. 61. **Versuchscharakteristika**: Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Alloster	$pEC_{0,5\text{ Diss}}$	n_H	Max	N
Hexamethonium	$4,11 \pm 0,08$	$-0,57 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,04$	42

Tabelle 6: Kenngrößen \pm Standardfehler der Konzentrations-Wirkungs-Kurve des [³H]NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes von Hexamethonium ermittelt nach Gleichung 20, S. 44. **$pEC_{0,5\text{ Diss}}$** : negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von Hexamethonium, die die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. **n_H** : Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Hexamethonium. **Max**: maximaler Effekt (Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS) von Hexamethonium. **N**: Anzahl der unabhängigen Experimente.

Da die Interaktion von Hexamethonium ($n_H \neq -1$) mit dem [³H]NMS besetzten Acetylcholin-Rezeptor M₂ offensichtlich nicht dem Massenwirkungsgesetz folgt, wurde eine Kurvenanpassung unter der Annahme zweier Bindungsstellen für Hexamethonium (Abbildung 7, S. 62) vorgenommen. Entsprechend einem Modellvergleich (eine Bindungsstelle versus zwei Bindungsstellen; F-Test; $p = 0,0055$) sollte eine Anpassung unter der Annahme zweier Bindungsstellen bevorzugt werden.

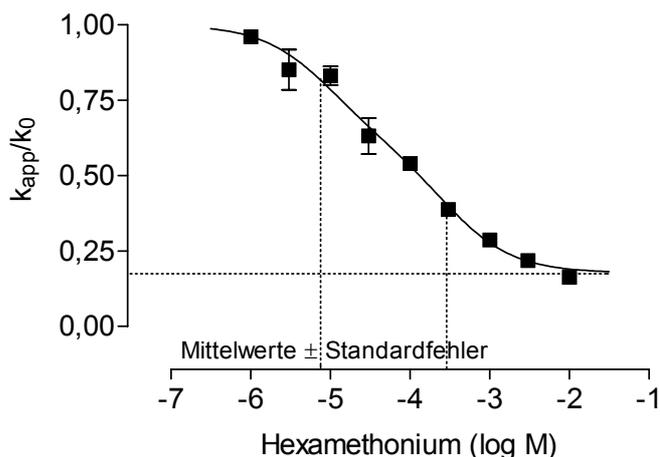


Abbildung 7: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Hexamethonium für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung unter der Annahme zweier Bindungsstellen für Hexamethonium am M₂ Acetylcholin-Rezeptor. **Ordinate**: Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Hexamethonium. **Abszisse**: Logarithmus der molaren Konzentration von Hexamethonium. **Kurvenanpassung**: Gleichung 21, S. 45. **Zielparameter**: Tabelle 7, S. 62. **Versuchscharakteristika**: Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Eine solche Kurvenanpassung liefert, unter der Annahme einer homogenen Rezeptorpopulation, jeweils einen Affinitätsparameter für eine hochaffine ($pEC_{0,5}^{Diss(1)}$) und eine niedrigaffine ($pEC_{0,5}^{Diss(2)}$) Bindungsstelle für Hexamethonium am [³H]NMS besetzten Rezeptor. Der dissoziationsverzögernde Effekt ist unvollständig.

Alloster	$pEC_{0,5}^{Diss(1)}$	$pEC_{0,5}^{Diss(2)}$	Max	Fraktion 1	N
Hexamethonium	$5,06 \pm 0,21$	$3,47 \pm 0,33$	$0,15 \pm 0,03$	$0,47 \pm 0,12$	42

Tabelle 7: Kenngrößen \pm Standardfehler der Konzentrations-Wirkungs-Kurve des [³H]NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes von Hexamethonium ermittelt nach Gleichung 21, S. 45. $pEC_{0,5}^{Diss(1)}$ und $pEC_{0,5}^{Diss(2)}$: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentrationen von Hexamethonium, die die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden für die hochaffine (1) und die niedrigaffine (2) Bindungsstelle für Hexamethonium innerhalb des jeweiligen Effektanteils halbmaximal reduzieren. **Max**: maximaler Effekt (Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS) von Hexamethonium. **Fraktion 1**: Effektanteil des maximal erreichbaren Effektes über die hochaffine Bindestelle; der Effektanteil der niedrigaffinen Bindestelle errechnet sich als 1-Fraktion 1. **N**: Anzahl der unabhängigen Experimente.

3.3.2 Antagonistischer Effekt von Hexamethonium gegenüber dem $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziations-Verzögerungs-Effekt allosterischer Modulatoren

Werden in Dissoziationsexperimenten Hexamethonium, ein „partieller Agonist“ (Antagonist), und ein weiterer allosterischer Modulator (Modulator) gemeinsam eingesetzt, so vermag Hexamethonium den dissoziationsverzögernden Effekt des Modulators abzuschwächen. In Abbildung 8 sind beispielhaft der jeweilige Eigeneffekt des Antagonisten Hexamethonium und des Modulators EHW21 anhand des $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverlaufs dargestellt. Am $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverlauf in der Kombination von Antagonist und Modulator wird deutlich, dass die Dissoziation schneller verläuft, als beim alleinigen Einsatz des Modulators.

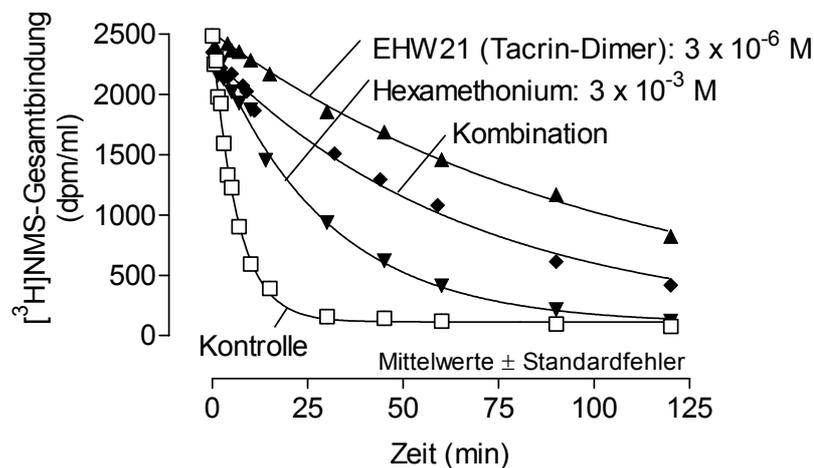


Abbildung 8: $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverläufe in Ab- und Anwesenheit von EHW21 und Hexamethonium; repräsentatives Experiment. **Ordinate:** $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gesamtbindung (dpm/ml). **Abszisse:** Zeit (min). **Kurvenanpassung:** Gleichung 18, S. 43. **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

3.3.3 Konzentrations-Effekt-Beziehungen eines allosterischen Modulators in Ab- und Anwesenheit eines Antagonisten

Im nachfolgenden Abschnitt werden simulierte Experimentalbefunde dargestellt, um ein besseres Verständnis vor allem der in den nachfolgenden Kapiteln gezeigten dreidimensionalen Abbildungen zu ermöglichen. Zunächst werden Dissoziationsexperimente mit dem allosterischen Modulator „Modell-Alloster“ (analog zu z. B. Duo3) simuliert. Es wird die apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit des „Modell-Allosters“ ermittelt

(Effekt = k_{app}/k_0 = Geschwindigkeit der [^3H]NMS-Dissoziation als Fraktion der Kontrollgeschwindigkeit). Die Auftragung des Effektes = k_{app}/k_0 des „Modell-Allosters“ in Abwesenheit des „Modell-Antagonisten“ (analog zu Hexamethonium) würde in einer nach unten strebenden Konzentrations-Wirkungskurve (Effekt nimmt ab) resultieren. (In der zweidimensionalen Darstellung (Abbildung 11, S. 67) ist dies auch der Fall, und die Kurve ist mit „**A**“ markiert.) In der dreidimensionalen Darstellung (Abbildung 9, S. 65 und Abbildung 10, S. 66) wird der Effekt jedoch „invertiert“ (1-Effekt). Die Invertierung bewirkt, dass die Dissoziationsverzögerung als zunehmender Effekt dargestellt wird (nach oben strebendes Netz). Aus rechen-technischen Gründen wird in der dreidimensionalen Darstellung der entsprechende Teil des Netzes (mit „**A**“ markiert), trotz Abwesenheit des „Modell-Antagonisten“ (log Konz. = minus unendlich) bei dem Konzentrationswert des „Modell-Antagonisten“ $\log M = -12$ aufgetragen. Anschließend werden Dissoziationsexperimente mit einer fixen Konzentration des „Modell-Allosters“ (1×10^{-9} M) und steigenden Konzentrationen des „Modell-Antagonisten“ simuliert (Teil „**B**“ des Netzes bzw. mit demselben Buchstaben markierte und durch eine senkrechte Linie verbundene Datenpunkte in der zweidimensionalen Darstellung). Außerdem wurden Dissoziationsexperimente mit zwei Kombinationen jeweils einer fixen Konzentrationen des „Modell-Antagonisten“ (3×10^{-4} M oder 1×10^{-2} M) und steigenden Konzentrationen des „Modell-Allosters“ simuliert (Teil „**C**“ und „**D**“ des Netzes bzw. mit denselben Buchstaben markierte Konzentrations-Wirkungskurven in der zweidimensionalen Darstellung). Der Eigeneffekt des „Modell-Antagonisten“ wurde herausgerechnet, indem die erhaltene apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit des „Modell-Allosters“ (für „**B**“, „**C**“ und „**D**“) auf den Eigeneffekt $k_{Antagonist}$ des „Modell-Antagonisten“ normalisiert wurde (Effekt = $(k_{app}/k_0)/k_{Antagonist}$). An die invertierten Effekt-Werte $(1-(k_{app}/k_0)/k_{Antagonist})$ aller Dissoziationsexperimente aufgetragen gegen den Logarithmus der Konzentrationen des „Modell-Allosters“ (Modulator) und des „Modell-Antagonisten“ (Antagonist) kann ein Datennetz (Abbildung 9, S. 65), beschrieben durch die Gleichung 24, S. 50, angepasst werden. In dieser dreidimensionalen Abbildung ist die räumliche Lage der Datenpunkte und des Regressions-Datennetzes nachvollziehbar. Die Achsenbeschriftung entspricht jedoch nicht den üblichen Konventionen, da die Konzentration sowohl auf der X- als auch auf der Y-Achse von rechts nach links steigt. Um diesem Umstand Abhilfe zu schaffen, wurde der Graph entsprechend gedreht, so dass die X- und Y-Achsen die

ansteigenden Konzentrationen in der sonst üblichen Weise von links nach rechts darstellen (Abbildung 10, S. 66). In weiteren dreidimensionalen Abbildungen wurde die letztgenannte Art der Darstellung gewählt.

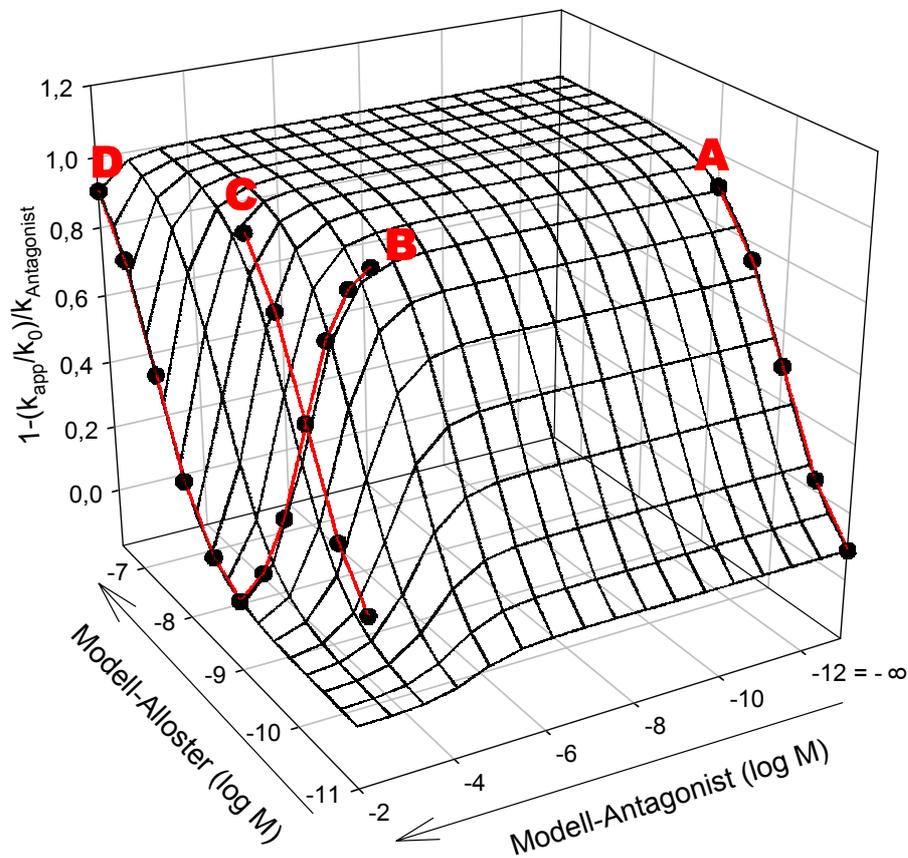


Abbildung 9: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Netz) für die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverzögerung des „Modell-Allosters“ alleine (**A** - rechter aufsteigender Teil des Netzes), der Kombination einer fixen Konzentration des „Modell Allosters“ (1×10^{-9} M) mit steigenden Konzentrationen des „Modell-Antagonisten“ (**B** - mittlerer absteigender Teil des Netzes) und zweier Kombinationen einer jeweils fixen Konzentration des „Modell-Antagonisten“ (3×10^{-4} M oder 1×10^{-2} M) und steigenden Konzentrationen des „Modell-Allosters“ (**C** - mittlerer und **D** - linker aufsteigender Teil des Netzes). **Z-Achse**: Effekt: Invertierte apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit des „Modell-Allosters“ und normalisiert auf den Eigeneffekt des „Modell-Antagonisten“ $k_{\text{Antagonist}}$. **X-Achse**: Logarithmus der molaren Konzentration des „Modell-Allosters“. **Y-Achse**: Logarithmus der molaren Konzentration des „Modell-Antagonisten“. **Kurvenanpassung**: Modell 1, Gleichung 24, S. 50. **Pfeile**: Die Pfeile zeigen in die Richtung steigender Konzentrationen.

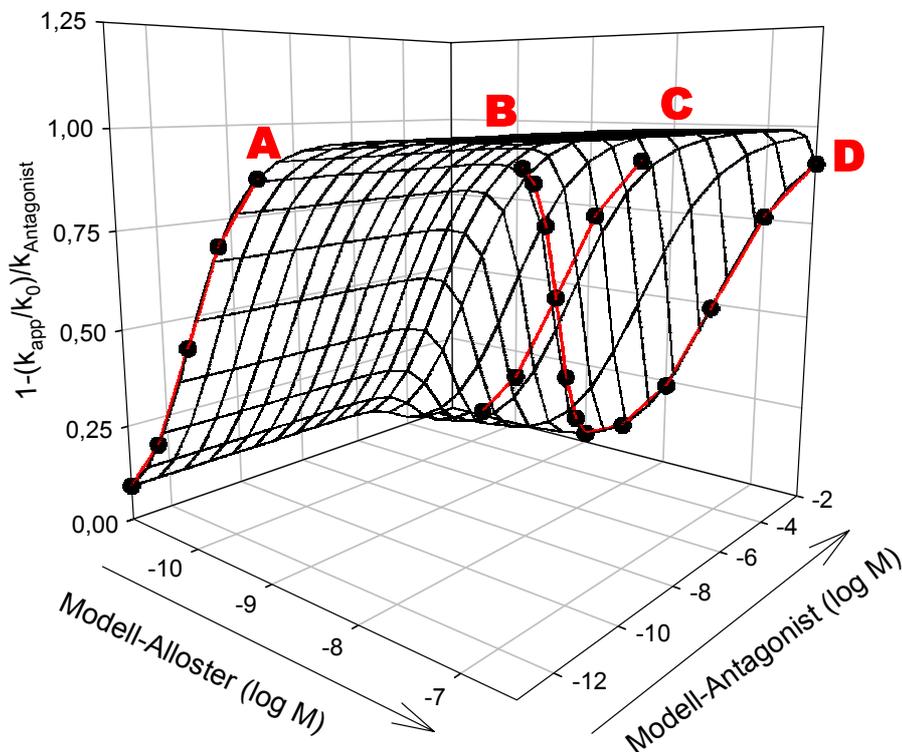


Abbildung 10: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Netz) für die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverzögerung des „Modell-Allosters“ alleine (**A** - linker aufsteigender Teil des Netzes), der Kombination einer fixen Konzentration des „Modell Allosters“ (1×10^{-9} M) mit steigenden Konzentrationen des „Modell-Antagonisten“ (**B** - mittlerer absteigender Teil des Netzes) und zweier Kombinationen einer jeweils fixen Konzentration des „Modell-Antagonisten“ (3×10^{-4} M oder 1×10^{-2} M) und steigenden Konzentrationen des „Modell-Allosters“ (**C** - mittlerer und **D** - rechter aufsteigender Teil des Netzes). **Achsenbeschriftung:** wie in Abbildung 9, S. 65

Eine solche simultane Datenanalyse liefert zum einen die Beschreibung des allosterischen Effektes des „Modell-Allosters“ auf die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation vom Acetylcholin-Rezeptor M_2 ($\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss}} = 10,00$; $n_H = 1$; $\text{Max} = 1,00$). Zum anderen kann die Antagonisierbarkeit des allosterischen Effektes des „Modell-Allosters“ durch den „Modell-Antagonisten“ charakterisiert werden ($s = 1$; $\text{pK}_{b, \text{Hex}} = 4,50$). Um die antagonistische Wechselwirkung des „Modell-Allosters“ und des „Modell-Antagonisten“ in einer Schild-Geraden darstellen zu können, wird zunächst der Effekt des „Modell-Allosters“ in Abwesenheit (k_{app}/k_0) und Anwesenheit steigender Konzentrationen des „Modell-Antagonisten“ ($k_{\text{app}}/k_0/k_{\text{Antagonist}}$) gegen den Logarithmus der Konzentration des „Modell-Allosters“ aufgetragen (Abbildung 11, S. 67). Die Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit steigenden Konzentrationen des „Modell-

Antagonisten“ gegenüber der Kontrollkurve ohne Zusatz des Antagonisten ist ein Maß für die antagonistische Wirksamkeit des „Modell-Antagonisten“. Das Ausmaß der Verschiebung wird durch Verschiebungsfaktoren ausgedrückt.

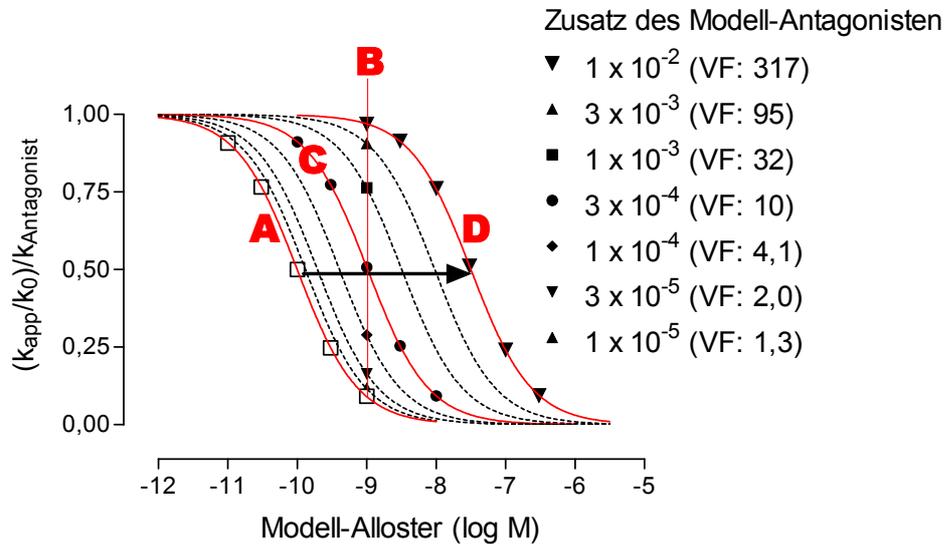


Abbildung 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) für die $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsverzögerung des „Modell-Allosters“ alleine (**A** - offene Symbole, durchgezogene Linie der KWK), der Kombination einer fixen Konzentration des „Modell-Allosters“ (1×10^{-9} M) mit steigenden Konzentrationen des „Modell-Antagonisten“ (**B** - geschlossene Symbole, gestrichelte Linien der KWKs verbunden durch eine senkrechte durchgezogene Linie) und zweier Kombinationen einer jeweils fixen Konzentration des „Modell-Antagonisten“ (3×10^{-4} M oder 1×10^{-2} M) und steigenden Konzentrationen des „Modell-Allosters“ (**C** und **D** - geschlossene Symbole, durchgezogene Linien der KWKs). **Ordinate**: Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit des „Modell-Allosters“ und normalisiert auf den Eigeneffekt des „Modell-Antagonisten“ $k_{Antagonist}$. **Abszisse**: Logarithmus der molaren Konzentration des „Modell-Allosters“. **Kurvenanpassung**: Gleichung 20, S. 44. **VF**: Verschiebungsfaktor berechnet aus dem Wendepunkt der Kontroll-KWK (offene Symbole, durchgezogene Linie) und dem Wendepunkt der simulierten KWKs (geschlossene Symbole, gestrichelte oder durchgezogene Linie) bei der jeweiligen Konzentration des „Modell-Antagonisten“ ($\text{VF} = \text{EC}_{0,5 \text{ Diss, Antagonist}} / \text{EC}_{0,5 \text{ Diss, Kontrolle}}$).

Durch Auftragung der errechneten Verschiebungsfaktoren gegen den Logarithmus der Konzentration des „Modell-Antagonisten“ in einem Schild-Plot (Abbildung 12, S. 68), wird der kompetitive Antagonismus des „Modell-Antagonisten“ gegenüber dem allosterischen Effekt des „Modell-Allosters“ in einer Geraden mit der Steigung $s = 1$ sichtbar gemacht.

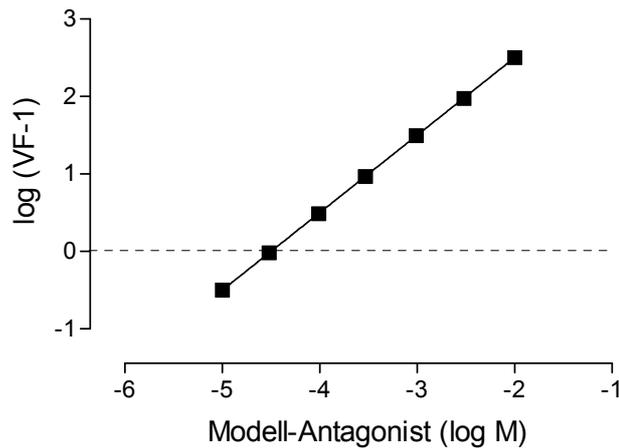


Abbildung 12: Darstellung des Effektes des „Modell-Antagonisten“ auf die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverzögerung durch das „Modell-Alloster“ nach Arunlakshana und Schild (1958). **Ordinate:** Logarithmus des (Verschiebungsfaktors – 1). **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration des „Modell-Antagonisten“. **Geradenanpassung:** Gleichung 26, S. 51 mit $s = 1$

3.3.4 Hexamethonium als Antagonist gegenüber Gallamin

Zunächst wurden Dissoziationsexperimente mit dem allosterischen Modulator Gallamin durchgeführt. Es wurde die apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Gallamin (Effekt = k_{app}/k_0) ermittelt. Anschließend wurden Dissoziationsexperimente mit einer fixen Konzentration von Gallamin (3×10^{-6} M) und steigenden Konzentrationen von Hexamethonium durchgeführt. Die erhaltene apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Gallamin wurde auf den Eigeneffekt k_{Hex} des Antagonisten normalisiert (Effekt = $(k_{\text{app}}/k_0)/k_{\text{Hex}}$). An die invertierten Effekt-Werte $(1 - (k_{\text{app}}/k_0)/k_{\text{Hex}})$ aller Dissoziationsexperimente aufgetragen gegen den Logarithmus der Konzentrationen von Gallamin (Modulator) und Hexamethonium (Antagonist) kann ein Datennetz (Abbildung 13, S. 69), beschrieben durch die Gleichung 24, S. 50, angepasst werden.

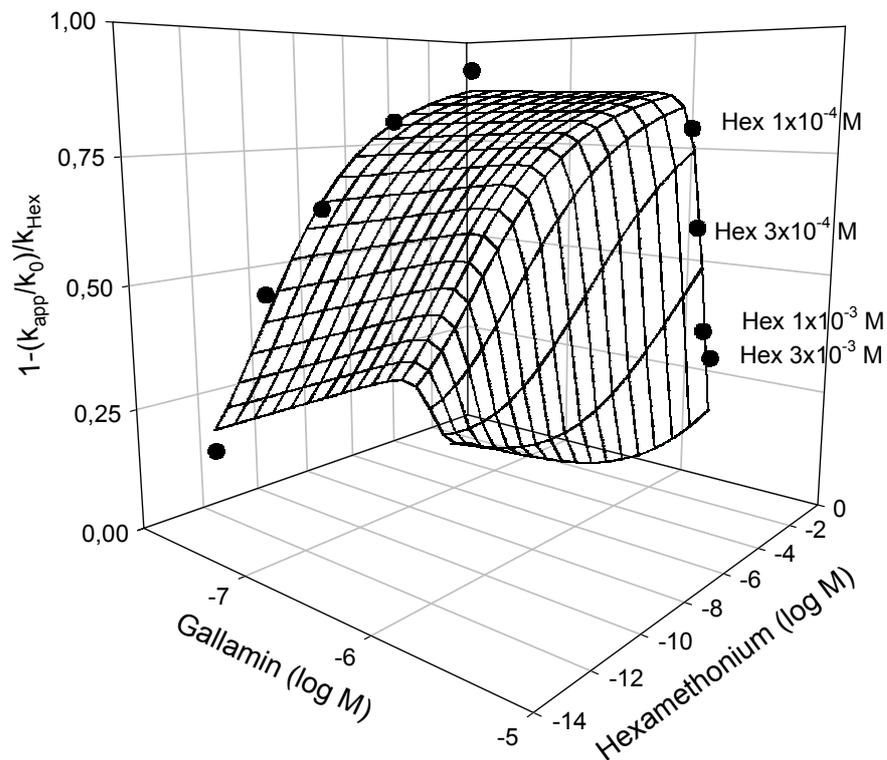


Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Netz) für die [^3H]NMS-Dissoziationsverzögerung von Gallamin alleine (linker aufsteigender Teil des Netzes) und der Kombination einer fixen Konzentration von Gallamin (3×10^{-6} M) mit steigenden Konzentrationen von Hexamethonium (rechter absteigender Teil des Netzes). **Z-Achse:** Effekt: Invertierte apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Gallamin und normalisiert auf den Eigeneffekt von Hexamethonium k_{Hex} . **X-Achse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Gallamin. **Y-Achse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Hexamethonium. **Kurvenanpassung:** Modell 1, Gleichung 24, S. 50. **Zielparameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^b. **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Eine solche simultane Datenanalyse liefert zum einen die Beschreibung des allosterischen Effektes von Gallamin auf die [^3H]NMS-Dissoziation vom Acetylcholin-Rezeptor M₂ ($\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss}} = 7,05 \pm 0,53$; $n_{\text{H}} = 1 (1,02 \pm 0,78)$; $\text{Max} = 0,90 \pm 0,14$). Zum anderen kann die Antagonisierbarkeit des allosterischen Effektes von Gallamin durch Hexamethonium charakterisiert werden ($s = 1 (0,70 \pm 0,24)$; $\text{pK}_{\text{b, Hex}} = 4,53 \pm 1,29$). Entsprechend einem Modellvergleich (Modell 1 versus Modell 2; F-Test; $p = 0,34456$) ist zur Beschreibung des Effektdatensatzes dem Modell 1 der Vorzug zu geben. Hexamethonium kann demnach den allosterischen Effekt von Gallamin kompetitiv

antagonisieren. Um die antagonistische Wechselwirkung von Gallamin und Hexamethonium in einer Schild-Geraden darstellen zu können, wurde zunächst der Effekt von Gallamin in Abwesenheit (k_{app}/k_0) und Anwesenheit steigender Konzentrationen von Hexamethonium ($k_{app}/k_0/k_{Hex}$) gegen den Logarithmus der Gallamin-Konzentration aufgetragen (Abbildung 14). Unter der Annahme einer Parallelverschiebung und der Festsetzung des Hill-Koeffizienten auf $n_H = -1$ und des Maximaleffektes auf $Max = 0,10$ kann aus den so konstruierbaren Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Wendepunkt ($pEC_{0,5 \text{ Diss}}$) derselben ermittelt werden. Die Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit steigenden Hexamethonium-Konzentrationen gegenüber der Kontrollkurve ohne Zusatz des Antagonisten ist ein Maß für die antagonistische Wirksamkeit von Hexamethonium. Das Ausmaß der Verschiebung wird durch Verschiebungsfaktoren ausgedrückt.

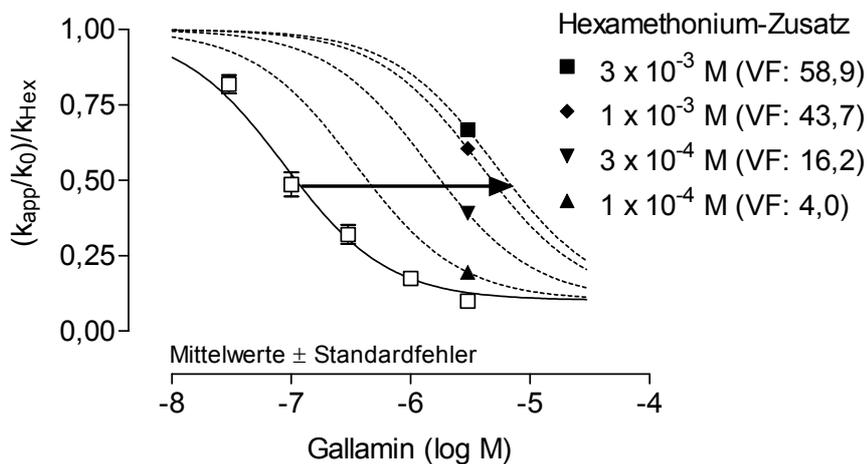


Abbildung 14: Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) für die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverzögerung von Gallamin alleine (offene Symbole) und der Kombination einer fixen Konzentration von Gallamin (3×10^{-6} M) mit steigenden Konzentrationen von Hexamethonium (geschlossene Symbole). **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Gallamin und normalisiert auf den Eigeneffekt von Hexamethonium k_{Hex} . **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Gallamin. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter und festgesetzte Parameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^a und Tabelle 9, S. 89. **VF:** Verschiebungsfaktor berechnet aus dem Wendepunkt der Kontroll-KWK (offene Symbole, durchgezogene Linie) und dem Wendepunkt einer simulierten KWK (geschlossene Symbole, gestrichelte Linie) bei der jeweiligen Konzentration von Hexamethonium ($VF = EC_{0,5 \text{ Diss, Hexamethonium}} / EC_{0,5 \text{ Diss, Kontrolle}}$). **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M_2)-Membransuspension.

Durch Auftragung der errechneten Verschiebungsfaktoren gegen den Logarithmus der Hexamethonium-Konzentration in einem Schild-Plot (Abbildung 15, S. 71), wird

der kompetitive Antagonismus von Hexamethonium gegenüber dem allosterischen Effekt von Gallamin in einer Geraden mit der Steigung $s = 1$ sichtbar gemacht. Zu Vergleichszwecken wurden Befunde einer früheren Arbeit (Tränkle und Mohr, 1996) in die Abbildung 15 integriert ($s = 1$; $pK_{b, \text{Hex}} = 4,38 \pm 0,15$). Diese Daten wurden aus vollständig ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Ab- und Anwesenheit von Hexamethonium ermittelt. Die gute Übereinstimmung der Daten kann als Hinweis auf die Validität der Vorgehensweise in dieser Arbeit gewertet werden.

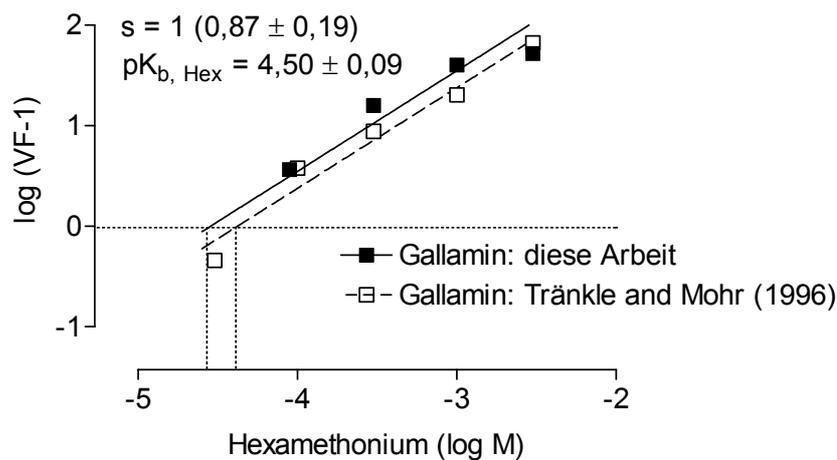


Abbildung 15: Darstellung des antagonistischen Effektes von Hexamethonium auf die $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsverzögerung durch Gallamin nach Arunlakshana und Schild (1958). Offene Symbole und gestrichelte Gerade: Befunde einer vorangehenden Arbeit (Tränkle und Mohr, 1996). **Ordinate:** Logarithmus des (Verschiebungsfaktors $- 1$) (VF: Tabelle 9, S. 89). **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Hexamethonium. **Geradenanpassung:** Gleichung 26, S. 51 mit $s = 1$ **Zielparameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^d.

3.3.5 Hexamethonium als Antagonist gegenüber WDuo3

WDuo3 wurde analog der Vorgehensweise für Gallamin (3.3.3, S. 63) in Dissoziationsexperimenten mit und ohne Hexamethonium untersucht. Die simultane Analyse des allosterischen Effektes von WDuo3 und der Antagonisierung dieses Effektes durch Hexamethonium sind in Abbildung 16, S. 72 dargestellt.

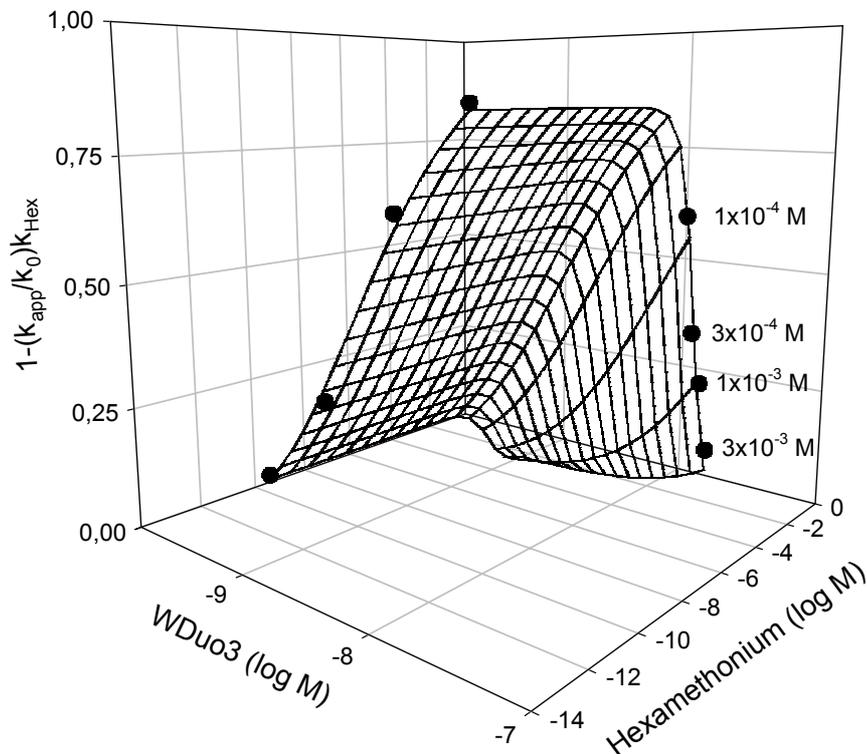


Abbildung 16: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Netz) für die [^3H]NMS-Dissoziationsverzögerung von WDuo3 alleine (linker aufsteigender Teil des Netzes) und der Kombination einer fixen Konzentration von WDuo3 (3×10^{-8} M) mit steigenden Konzentrationen von Hexamethonium (rechter absteigender Teil des Netzes). **Z-Achse:** Effekt: Invertierte apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von WDuo3 und normalisiert auf den Eigeneffekt von Hexamethonium k_{Hex} . **X-Achse:** Logarithmus der molaren Konzentration von WDuo3. **Y-Achse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Hexamethonium. **Kurvenanpassung:** Modell 1, Gleichung 24, S. 50. **Zielparameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^b. **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

WDuo3 hat eine recht hohe Affinität zum [^3H]NMS besetzten Rezeptor ($\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss}} = 8,30 \pm 0,30$). Der Modulator WDuo3 vermag die [^3H]NMS-Dissoziation vollständig zu hemmen ($\text{Max} = 0,99 \pm 0,32$) und die Interaktion mit dem Acetylcholin-Rezeptor folgt dem Massenwirkungsgesetz ($n_{\text{H}} = 1$ ($1,04 \pm 0,59$)). Entsprechend einem Modellvergleich (Modell 1 versus Modell 2; F-Test; $p = 0,27213$) ist zur Beschreibung des Effektdatensatzes von WDuo3 in Ab- und Anwesenheit von Hexamethonium dem Modell 1 der Vorzug zu geben. Demnach antagonisiert Hexamethonium kompetitiv ($s = 1$ ($0,73 \pm 0,18$); $\text{pK}_{\text{b, Hex}} = 4,31 \pm 1,35$) den allosterischen Effekt von WDuo3. In

Abbildung 17 sind die ermittelte und die simulierten Konzentrations-Wirkungs-Kurven von WDuo3 für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung dargestellt, die die Grundlage zur Berechnung von Verschiebungsfaktoren bilden.

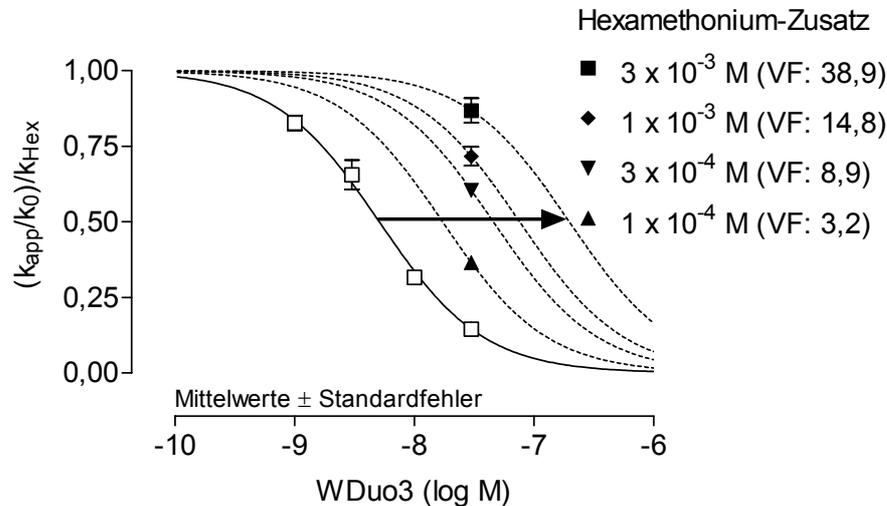


Abbildung 17: Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung von WDuo3 alleine (offene Symbole) und der Kombination einer fixen Konzentration von WDuo3 (3×10^{-8} M) mit steigenden Konzentrationen von Hexamethonium (geschlossene Symbole). **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von WDuo3 und normalisiert auf den Eigeneffekt von Hexamethonium k_{Hex} . **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von WDuo3. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter und festgesetzte Parameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^a und Tabelle 9, S. 89. **VF:** Verschiebungsfaktor berechnet aus dem Wendepunkt der Kontroll-KWK (offene Symbole, durchgezogene Linie) und dem Wendepunkt einer simulierten KWK (geschlossene Symbole, gestrichelte Linie) bei der jeweiligen Konzentration von Hexamethonium ($VF = EC_{0,5 \text{ Diss, Hexamethonium}} / EC_{0,5 \text{ Diss, Kontrolle}}$). **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Die Schild-Auftragung der Verschiebungsfaktoren gegen den Logarithmus der Hexamethonium-Konzentration (Abbildung 18, S. 74), zur Darstellung des Antagonismus gegenüber WDuo3, liefert eine Gerade mit der Steigung $s = 1$, was einer kompetitiven Interaktion entspricht.

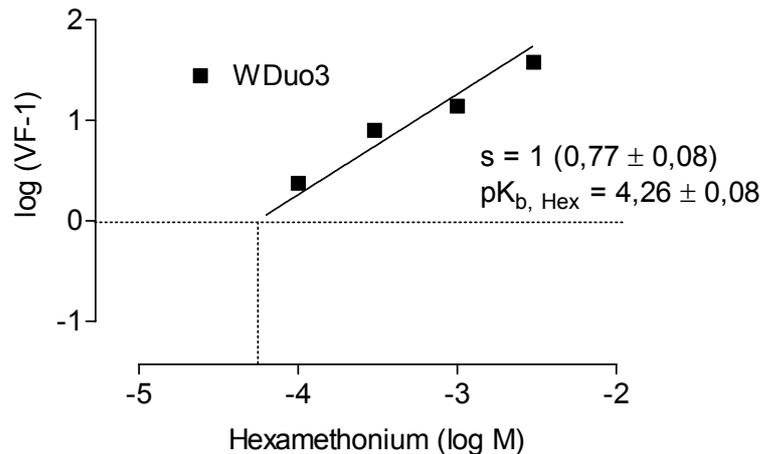


Abbildung 18: Darstellung des antagonistischen Effektes von Hexamethonium auf die [^3H]NMS-Dissoziationsverzögerung durch WDuo3 nach Arunlakshana und Schild (1958). **Ordinate:** Logarithmus des (Verschiebungsfaktors – 1) (VF: Tabelle 9, S. 89). **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Hexamethonium. **Geradenanpassung:** Gleichung 26, S. 51 mit $s = 1$ **Zielparameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^d.

3.3.6 Hexamethonium als Antagonist gegenüber EHW21

Das Tacrin-Dimer EHW21 wurde in Dissoziationsexperimenten auf seinen allosterischen Eigeneffekt und die Antagonisierbarkeit des Effektes durch Hexamethonium untersucht. Antagonismus-Untersuchungen nach Arunlakshana und Schild (1958) und nach Lanzafame et al. (1996) sind nur zulässig, wenn die Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit steigenden Konzentrationen eines Antagonisten parallel verschoben werden. Es wurden daher zusätzliche Dissoziationsexperimente mit einer fixen Konzentration von Hexamethonium (3×10^{-3} M) und steigenden Konzentrationen von EHW21 durchgeführt. Durch einen F-Test konnte die parallele Verschiebung der Kombinationskurve gegenüber der Kontrollkurve belegt werden (Abbildung 20, S. 76). Der gesamte Effektdatensatz der Dissoziationsexperimente mit EHW21 alleine und in Kombination mit Hexamethonium wurde einer simultanen Analyse (Abbildung 19, S. 75) entsprechend den Modellen 1 und 2 unterworfen. Dem Modell 1 ist der Vorzug gegeben zu geben (F-Test; $p = 0,17172$). Daraus kann ein kompetitiver Antagonismus zwischen EHW21 und Hexamethonium hinsichtlich des allosterischen Effektes abgeleitet werden ($s = 1$ ($0,78 \pm 0,14$); $pK_{b, \text{Hex}} = 3,53 \pm 0,54$). Die Affinität von EHW21 zum [^3H]NMS besetzten Rezeptor ist mit $pEC_{0,5 \text{ Diss}} = 6,56 \pm 0,08$ höher als die von Tacrin ($pEC_{0,5 \text{ Diss}} = 5,28 \pm 0,03$; 3.3.8, S. 80). Die Interaktion zwischen EHW21 und dem

Acetylcholin-Rezeptor folgt, im Gegensatz zu Tacrin ($n_H = 1,82 \pm 0,18$), dem Massenwirkungsgesetz ($n_H = 1 (1,14 \pm 0,15)$). Das Tacrin-Dimer EHW21 kann die [3 H]NMS-Dissoziation vollständig hemmen (Max = $0,98 \pm 0,05$).

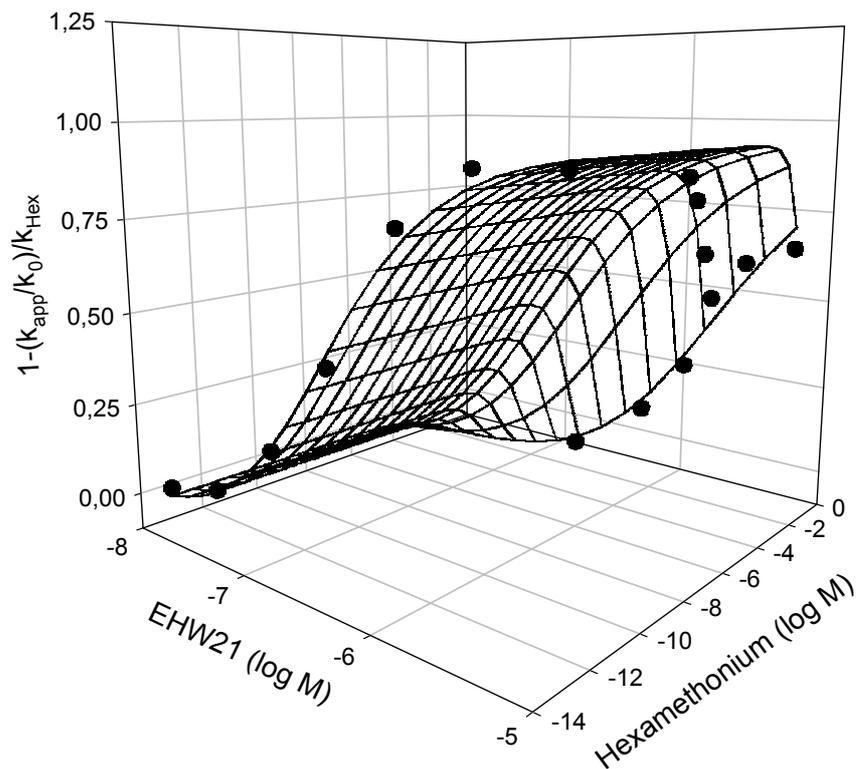


Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Netz) für die [3 H]NMS-Dissoziationsverzögerung von EHW21 alleine (linker aufsteigender Teil des Netzes), der Kombination einer fixen Konzentration von EHW21 (3×10^{-6} M) mit steigenden Konzentrationen von Hexamethonium (mittlerer absteigender Teil des Netzes) und der Kombination einer fixen Konzentration von Hexamethonium (3×10^{-3} M) und steigenden Konzentrationen von EHW21 (rechter aufsteigender Teil des Netzes). **Z-Achse:** Effekt: Invertierte apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von EHW21 und normalisiert auf den Eigeneffekt von Hexamethonium k_{Hex} . **X-Achse:** Logarithmus der molaren Konzentration von EHW21. **Y-Achse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Hexamethonium. **Kurvenanpassung:** Modell 1, Gleichung 24, S. 50. **Zielparameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^b. **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Der kompetitive antagonistische Effekt von Hexamethonium gegenüber dem allosterischen Effekt von EHW21 ist durch nach rechts verschobene Konzentrations-

Wirkungs-Kurven in Abbildung 20 und durch eine Schild-Auftragung in Abbildung 21, S. 77 dargestellt.

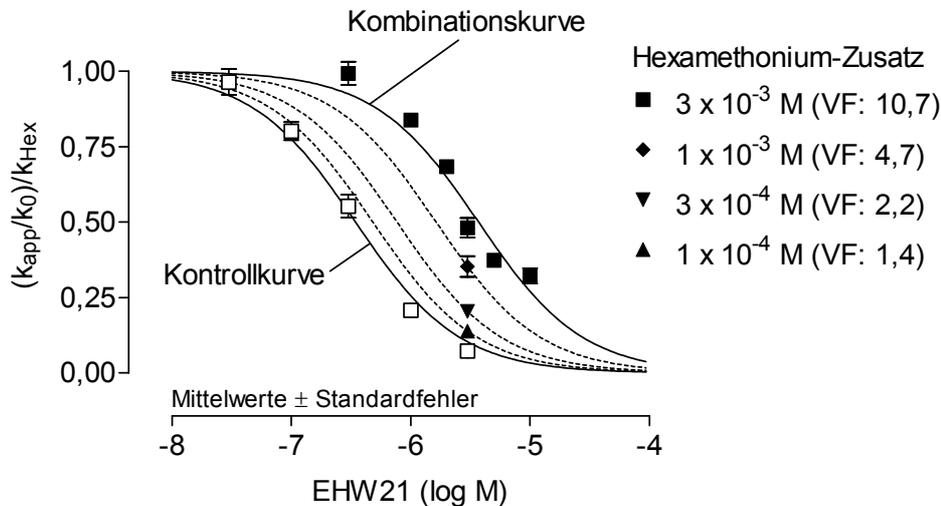


Abbildung 20: Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) für die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverzögerung von EHW21 alleine (offene Symbole, durchgezogene Linie), der Kombination einer fixen Konzentration von EHW21 (3×10^{-6} M) mit steigenden Konzentrationen von Hexamethonium (geschlossene Symbole, gestrichelte Linien) und der Kombination einer fixen Konzentration von Hexamethonium (3×10^{-3} M) und steigenden Konzentrationen von EHW21 (geschlossene Symbole, durchgezogene Linie). **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von EHW21 und normalisiert auf den Eigeneffekt von Hexamethonium k_{Hex} . **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von EHW21. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter und festgesetzte Parameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^a und Tabelle 9, S. 89. **VF:** Verschiebungsfaktor berechnet aus dem Wendepunkt der Kontroll-KWK (offene Symbole, durchgezogene Linie) und dem Wendepunkt parallel verschobener KWK (geschlossene Symbole) bei der jeweiligen Konzentration von Hexamethonium ($\text{VF} = \text{EC}_{0,5 \text{ Diss, Hexamethonium}} / \text{EC}_{0,5 \text{ Diss, Kontrolle}}$). **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

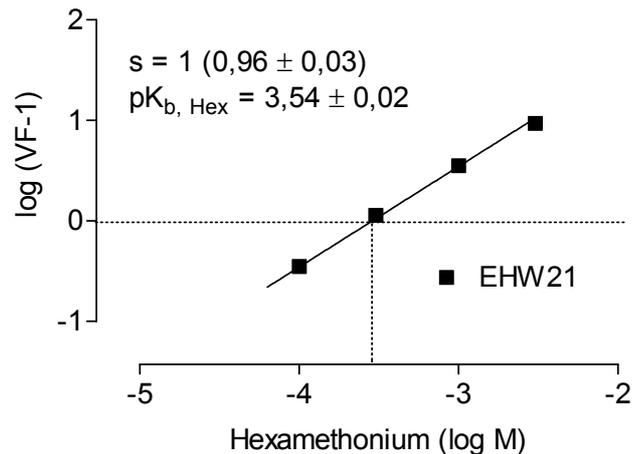


Abbildung 21: Darstellung des antagonistischen Effektes von Hexamethonium auf die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung durch EHW21 nach Arunlakshana und Schild (1958). **Ordinate**: Logarithmus des (Verschiebungsfaktors – 1) (VF: Tabelle 9, S. 89). **Abszisse**: Logarithmus der molaren Konzentration von Hexamethonium. **Geradenanpassung**: Gleichung 26, S. 51 mit $s = 1$ **Zielparameter**: Tabelle 8, S. 87, Index ^d.

3.3.7 Hexamethonium als Antagonist gegenüber Duo3

Die Untersuchung des allosterischen Modulators Duo3 in Dissoziationsexperimenten erfolgte wie für EHW21 (3.3.6, S. 74) beschrieben. Die Simultananalyse (Abbildung 22, S. 78) des gesamten Effektdatensatzes für Duo3 offenbart ein vom Massenwirkungsgesetz abweichendes Verhalten (Kurvensteilheit $n_H = 1,92 \pm 0,26$) des Modulators hinsichtlich seiner allosterischen Wirksamkeit, bei einer nur mäßigen Affinität ($pEC_{0,5 \text{ Diss}} = 6,08 \pm 0,04$) zum [³H]NMS besetzen Acetylcholin-Rezeptor M₂. Der dissoziationsverzögernde Effekt von Duo3 ist vollständig ($Max = 0,99 \pm 0,02$). Nach statistischer Prüfung (F-Test; $p = 0,003$) konnte festgestellt werden, dass dem Modell 2 (Gleichung 24, S. 50 mit $s = 0,68 \pm 0,06$ und $pK_{b, \text{Hex}} = 2,44 \pm 0,17$) zur Beschreibung des Effektdatensatzes von Duo3 der Vorzug zu geben ist.

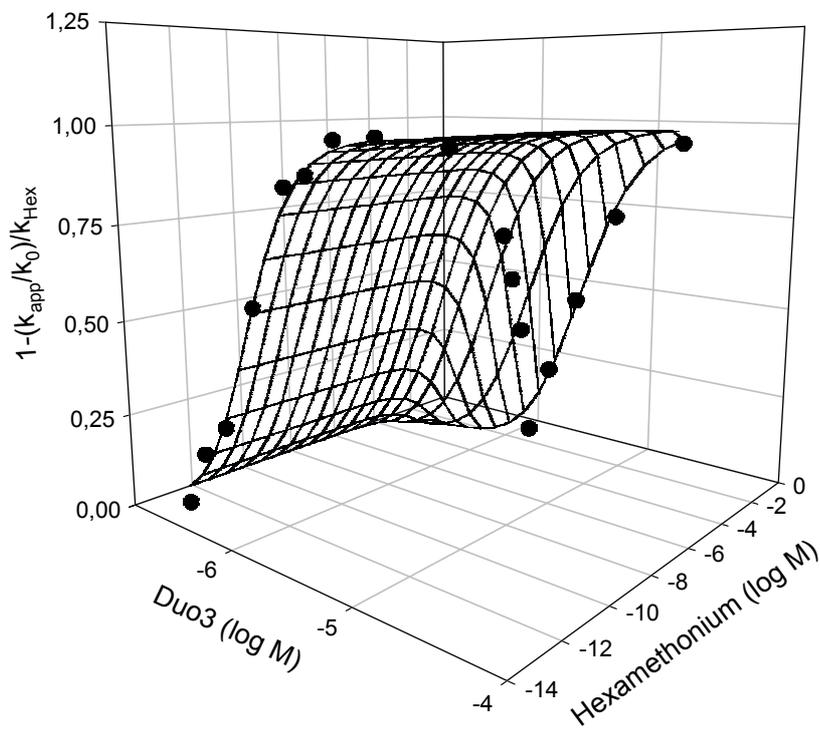


Abbildung 22: Konzentrations-Wirkungs- Beziehung (Netz) für die [^3H]NMS-Dissoziationsverzögerung von Duo3 alleine (linker aufsteigender Teil des Netzes), der Kombination einer fixen Konzentration von Duo3 (2×10^{-6} M) mit steigenden Konzentrationen von Hexamethonium (mittlerer absteigender Teil des Netzes) und der Kombination einer fixen Konzentration von Hexamethonium (3×10^{-3} M) und steigenden Konzentrationen von Duo3 (rechter aufsteigender Teil des Netzes). **Z-Achse:** Effekt: Invertierte apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Duo3 und normalisiert auf den Eigeneffekt von Hexamethonium k_{Hex} . **X-Achse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Duo3. **Y-Achse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Hexamethonium. **Kurvenanpassung:** Modell 2, Gleichung 24, S. 50. **Zielparameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^b. **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Diese nicht-kompetitive Interaktion ($s = 0,62 \pm 0,06$; $\text{p}K_{\text{b, Hex}} = 2,25 \pm 0,20$) von Hexamethonium und Duo3 am [^3H]NMS besetzten Rezeptor wird in der Abbildung 23, S. 79 und Abbildung 24, S. 80 dargestellt. Durch einen F-Test konnte die parallele Verschiebung der Kombinationskurve gegenüber der Kontrollkurve belegt werden.

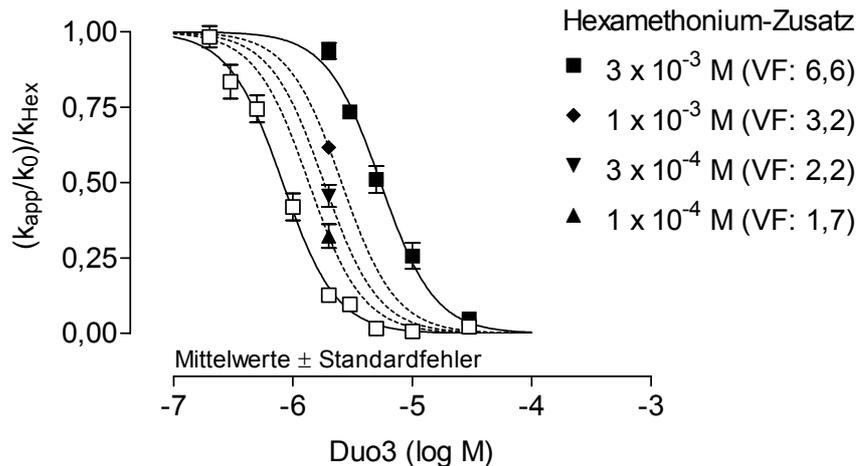


Abbildung 23: Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) für die [3 H]NMS-Dissoziationsverzögerung von Duo3 alleine (offene Symbole, durchgezogene Linie), der Kombination einer fixen Konzentration von Duo3 (2×10^{-6} M) mit steigenden Konzentrationen von Hexamethonium (geschlossene Symbole, gestrichelte Linien) und der Kombination einer fixen Konzentration von Hexamethonium (3×10^{-3} M) und steigenden Konzentrationen von Duo3 (geschlossene Symbole, durchgezogene Linie). **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Duo3 und normalisiert auf den Eigeneffekt von Hexamethonium k_{Hex} . **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Duo3. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter und festgesetzte Parameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^a und Tabelle 9, S. 89. **VF:** Verschiebungsfaktor berechnet aus dem Wendepunkt der Kontroll-KWK (offene Symbole, durchgezogene Linie) und dem Wendepunkt parallel verschobener KWK (geschlossene Symbole) bei der jeweiligen Konzentration von Hexamethonium ($VF = EC_{0,5 \text{ Diss, Hexamethonium}} / EC_{0,5 \text{ Diss, Kontrolle}}$). **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

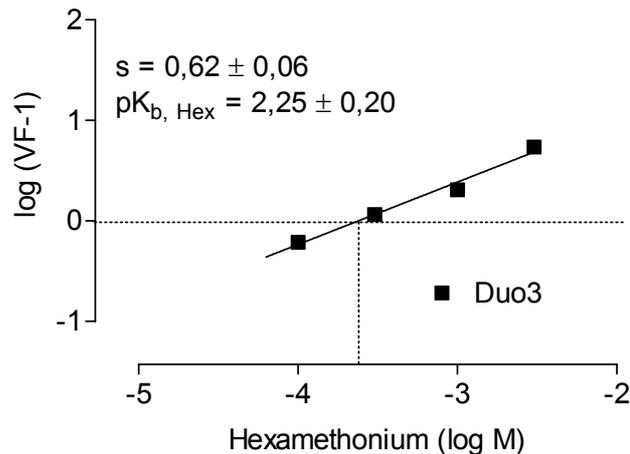


Abbildung 24: Darstellung des antagonistischen Effektes von Hexamethonium auf die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverzögerung durch Duo3 nach Arunlakshana und Schild (1958). **Ordinate:** Logarithmus des (Verschiebungsfaktors – 1) (VF: Tabelle 9, S. 89). **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Hexamethonium. **Geradenanpassung:** Gleichung 26, S. 51 mit $s = 0,62$ **Zielparameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^d.

3.3.8 Hexamethonium als Antagonist gegenüber Tacrin

Die Simultananalyse des gesamten Effektdatensatzes aus Dissoziationsexperimenten mit Tacrin ist in Abbildung 25, S. 81 gezeigt. Zur Beschreibung des Effektdatensatzes von Tacrin ist dem Modell 3 (Gleichung 25, S. 50) der Vorzug zu geben. Ein p-Wert kann hier nicht angegeben werden, da sowohl Modell 2 als auch Modell 3 mit der gleichen Anzahl an Variablen auskommen. Beim statistischen Vergleich wird lediglich die Summe der Fehlerquadrate (2.10.1, S. 51) miteinander verglichen. Das allosterische Verhalten von Tacrin ist in zweifacher Hinsicht ungewöhnlich. Zum einen ist die Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Eigeneffektes von Tacrin sehr steil ($n_H = 1,82 \pm 0,18$). Die Affinität von Tacrin zum $[^3\text{H}]\text{NMS}$ besetzen Rezeptor ist gering ($pEC_{0,5 \text{ Diss}} = 5,28 \pm 0,03$), Tacrin kann die Dissoziation des Radioliganden vollständig unterdrücken ($\text{Max} = 0,98 \pm 0,02$). Zum anderen kann die Interaktion von Tacrin und Hexamethonium gemäß dem Modell 3 als kooperativ ($\beta = 0,11 \pm 0,01$; $pK_{b, \text{Hex}} = 3,93$) beschrieben werden.

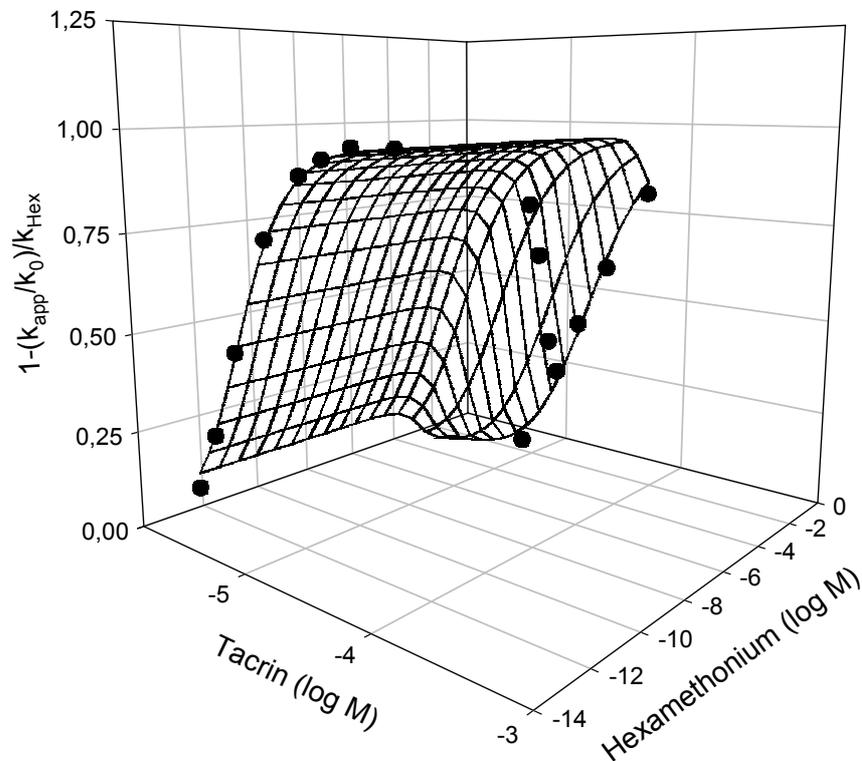


Abbildung 25: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Netz) für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung von Tacrin alleine (linker aufsteigender Teil des Netzes), der Kombination einer fixen Konzentration von Tacrin (2×10^{-5} M) mit steigenden Konzentrationen von Hexamethonium (mittlerer absteigender Teil des Netzes) und der Kombination einer fixen Konzentration von Hexamethonium (3×10^{-3} M) und steigenden Konzentrationen von Tacrin (rechter aufsteigender Teil des Netzes). **Z-Achse:** Effekt: Invertierte apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Tacrin und normalisiert auf den Eigeneffekt von Hexamethonium k_{Hex} . **X-Achse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Tacrin. **Y-Achse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Hexamethonium. **Kurvenanpassung:** Modell 3, Gleichung 25, S. 50. **Zielparameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^c. **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Wie oben für andere Modulatoren beschrieben, liefert auch hier die Auftragung des Effektdatensatzes gegen den Logarithmus der molaren Konzentration von Tacrin eine Kontroll- und eine parallel verschobene Kombinationskurve (F-Test), sowie simulierte Konzentrations-Wirkungs-Kurven (Abbildung 26, S. 82). Dies ermöglicht die Ermittlung von Verschiebungsfaktoren.

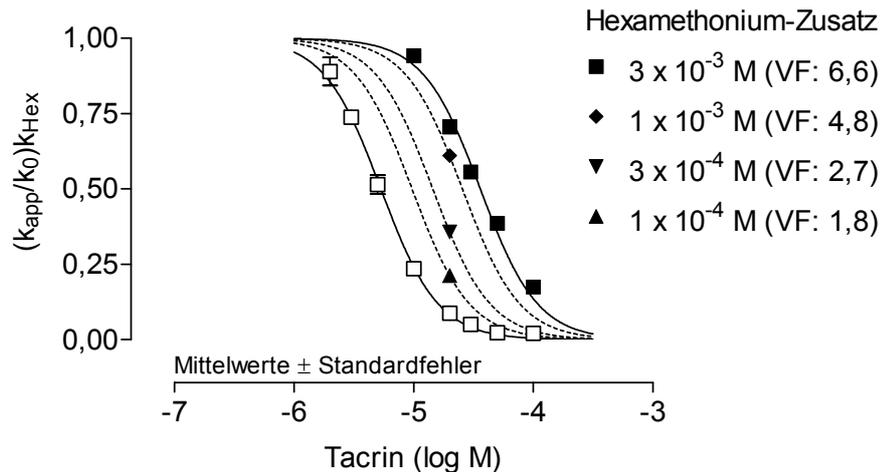


Abbildung 26: Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) für die [^3H]NMS-Dissoziationsverzögerung von Tacrin alleine (offene Symbole, durchgezogene Linie), der Kombination einer fixen Konzentration von Tacrin (2×10^{-6} M) mit steigenden Konzentrationen von Hexamethonium (geschlossene Symbole, gestrichelte Linien) und der Kombination einer fixen Konzentration von Hexamethonium (3×10^{-3} M) und steigenden Konzentrationen von Tacrin (geschlossene Symbole, durchgezogene Linie). **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Tacrin und normalisiert auf den Eigeneffekt von Hexamethonium k_{Hex} . **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Tacrin. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter und festgesetzte Parameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^a und Tabelle 9, S. 89. **VF:** Verschiebungsfaktor berechnet aus dem Wendepunkt der Kontroll-KWK (offene Symbole, durchgezogene Linie) und dem Wendepunkt parallel verschobener KWK (geschlossene Symbole) bei der jeweiligen Konzentration von Hexamethonium ($\text{VF} = \text{EC}_{0,5 \text{ Diss, Hexamethonium}} / \text{EC}_{0,5 \text{ Diss, Kontrolle}}$). **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Die Auftragung der Verschiebungsfaktoren nach Lanzafame et al. (1996) (Abbildung 27, S. 83) verdeutlicht den kooperativen Charakter ($\alpha = 8,09 \pm 0,79$; $\text{pK}_{\text{b, Hex}} = 3,98 \pm 0,04$) der Interaktion zwischen Tacrin und Hexamethonium.

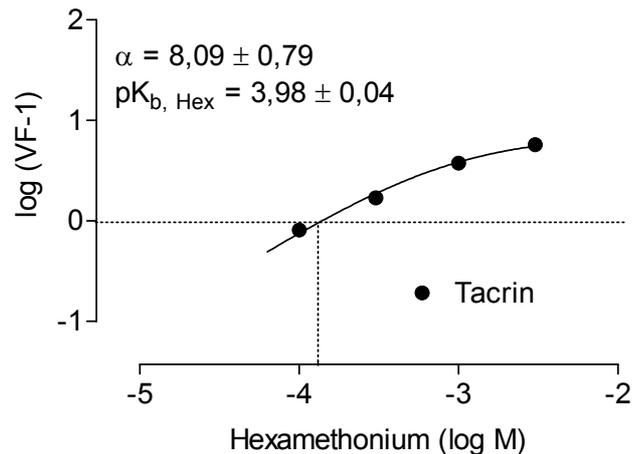


Abbildung 27: Darstellung des antagonistischen Effektes von Hexamethonium auf die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverzögerung durch Tacrin nach Lanzafame et al. (1996). **Ordinate:** Logarithmus des (Verschiebungsfaktors – 1) (VF: Tabelle 9, S. 89). **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Hexamethonium. **Kurvenanpassung:** Gleichung 27, S. 51. **Zielparameter:** Tabelle 8, S. 87, Index^e.

3.3.9 Hexamethonium als Antagonist gegenüber Eburnamonin

In Dissoziationsexperimenten mit und ohne Hexamethonium verhält sich Eburnamonin ähnlich wie Tacrin (3.3.8, S. 80). Zur Beschreibung des gesamten Effektdatensatzes von Eburnamonin (Abbildung 28, S. 84) sollte dem Modell 3 (Gleichung 25, S. 50) der Vorzug gegeben werden. Die kooperative Interaktion zwischen Hexamethonium und Eburnamonin lässt sich mit $\beta = 0,21 \pm 0,03$ und $pK_{b, \text{Hex}} = 3,73 \pm 0,29$ quantifizieren. Die Affinität von Eburnamonin zum $[^3\text{H}]\text{NMS}$ besetzten Rezeptor ist mit $pEC_{0,5 \text{ Diss}} = 5,39 \pm 0,04$ recht gering und die Interaktion zwischen Modulator und Rezeptor folgt nicht dem Massenwirkungsgesetz ($n_H = 1,63 \pm 0,21$). Die Dissoziation des Radioliganden wird von Eburnamonin vollständig gehemmt ($\text{Max} = 0,97 \pm 0,03$).

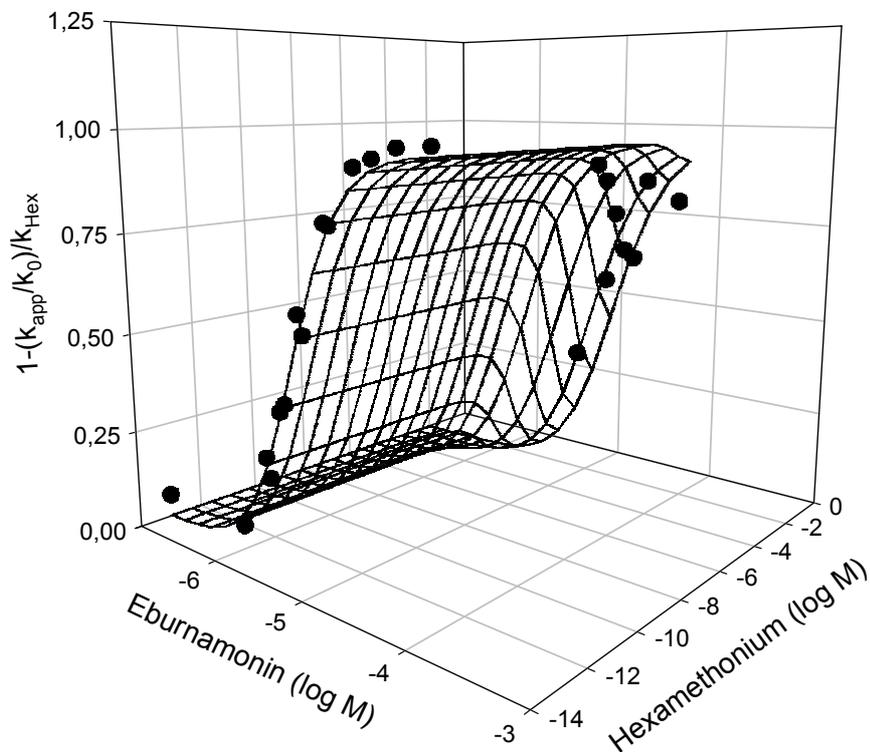


Abbildung 28: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Netz) für die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverzögerung von Eburnamonin alleine (linker aufsteigender Teil des Netzes), der Kombination einer fixen Konzentration von Eburnamonin (3×10^{-5} M) mit steigenden Konzentrationen von Hexamethonium (mittlerer absteigender Teil des Netzes) und der Kombination einer fixen Konzentration von Hexamethonium (3×10^{-3} M) und steigenden Konzentrationen von Eburnamonin (rechter aufsteigender Teil des Netzes). **Z-Achse:** Effekt: Invertierte apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Eburnamonin und normalisiert auf den Eigeneffekt von Hexamethonium k_{Hex} . **X-Achse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Eburnamonin. **Y-Achse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Hexamethonium. **Kurvenanpassung:** Modell 3, Gleichung 25, S. 50. **Zielparameter:** Tabelle 8, S. 87, Index c . **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Die zweidimensionale Auftragung des Effektdatensatzes gegen den Logarithmus der molaren Konzentration von Eburnamonin (Abbildung 29, S. 85) ermöglicht die Generierung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Ab- und Anwesenheit von Hexamethonium und die Ermittlung der entsprechenden Verschiebungsfaktoren.

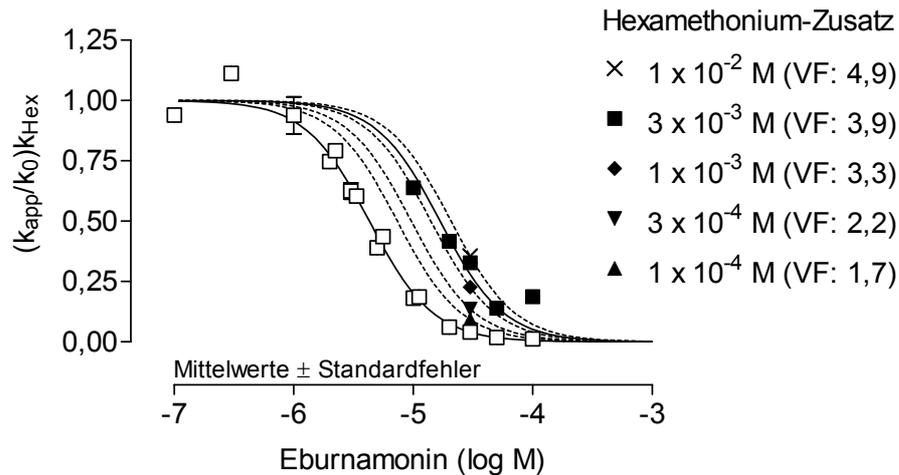


Abbildung 29: Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) für die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverzögerung von Eburnamonin alleine (offene Symbole, durchgezogene Linie), der Kombination einer fixen Konzentration von Eburnamonin (3×10^{-5} M) mit steigenden Konzentrationen von Hexamethonium (geschlossene Symbole, gestrichelte Linien) und der Kombination einer fixen Konzentration von Hexamethonium (3×10^{-3} M) und steigenden Konzentrationen von Eburnamonin (geschlossene Symbole, durchgezogene Linie). **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Eburnamonin und normalisiert auf den Eigeneffekt von Hexamethonium k_{Hex} . **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Eburnamonin. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter und festgesetzte Parameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^a und Tabelle 9, S. 89. **VF:** Verschiebungsfaktor berechnet aus dem Wendepunkt der Kontroll-KWK (offene Symbole, durchgezogene Linie) und dem Wendepunkt parallel verschobener KWK (geschlossene Symbole) bei der jeweiligen Konzentration von Hexamethonium ($\text{VF} = \text{EC}_{0,5 \text{ Diss, Hexamethonium}} / \text{EC}_{0,5 \text{ Diss, Kontrolle}}$). **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Der kooperative Charakter der Interaktion zwischen Eburnamonin und Hexamethonium lässt sich in der Auftragung der Verschiebungsfaktoren nach Lanzafame et al. (1996) (Abbildung 30, S. 86) darstellen.

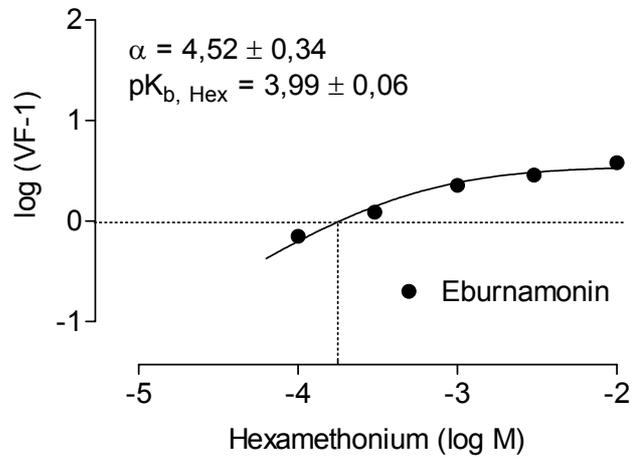


Abbildung 30: Darstellung des antagonistischen Effektes von Hexamethonium auf die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung durch Eburnamonin nach Lanzafame et al. (1996). **Ordinate:** Logarithmus des (Verschiebungsfaktors – 1) (VF: Tabelle 9, S. 89). **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Hexamethonium. **Kurvenanpassung:** Gleichung 27, S. 51. **Zielparameter:** Tabelle 8, S. 87, Index ^e.

Modulator	Effekt des allosterischen Modulators			Antagonismus durch Hexamethonium					N
	$pEC_{0,5 \text{ Diss}}$	n_H	Max	s	$\beta = (1/\alpha)$	$\alpha = (1/\beta)$	$pK_{b, \text{ Hex}}$	Modell	
W84	$7,74 \pm 0,07^a$	$-1^{a,f} (-1,29 \pm 0,20^a)$	$0,00 \pm 0,05^a$	n.b.					4
Gallamin	$7,05 \pm 0,53^b$	$1^{b,f} (1,02 \pm 0,78^b)$	$0,90 \pm 0,14^b$	$1^{b,f} (0,70 \pm 0,24^b)$	-	-	$4,53 \pm 1,29^b$	1	8
	$7,03 \pm 0,05^a$	$-1^{a,f} (-1,05 \pm 0,17^a)$	$0,08 \pm 0,02^a$	$1^{d,f} (0,87 \pm 0,19^d)$	-	-	$4,50 \pm 0,09^d$	1	8
WDuo3	$8,30 \pm 0,30^b$	$1^{b,f} (1,04 \pm 0,59^b)$	$0,99 \pm 0,32^b$	$1^{b,f} (0,73 \pm 0,18^b)$	-	-	$4,31 \pm 1,35^b$	1	9
	$8,29 \pm 0,02^a$	$-1^{a,f} (-1,04 \pm 0,13^a)$	$0,01 \pm 0,07^a$	$1^{d,f} (0,77 \pm 0,08^d)$	-	-	$4,26 \pm 0,08^d$	1	9
EHW21	$6,56 \pm 0,08^b$	$1^{b,f} (1,14 \pm 0,15^b)$	$0,98 \pm 0,05^b$	$1^{b,f} (0,78 \pm 0,14^b)$	-	-	$3,53 \pm 0,54^b$	1	18
	$6,46 \pm 0,04^a$	$-1^{a,f} (-1,20 \pm 0,04^a)$	$0,00 \pm 0,03^a$	$1^{d,f} (0,96 \pm 0,03^d)$	-	-	$3,54 \pm 0,02^d$	1	18
+ 3×10^{-3} M Hex	$5,48 \pm 0,17^a$	$-1^{a,f} (-1,14 \pm 0,20^a)$	$0,05 \pm 0,15^a$	n.z.					8
Duo3	$6,08 \pm 0,04^b$	$1,92 \pm 0,26^b$	$0,99 \pm 0,02^b$	$0,68 \pm 0,06^b$	-	-	$2,44 \pm 0,17^b$	2	16
	$6,08 \pm 0,02^a$	$-2,04 \pm 0,15^a$	$0,00 \pm 0,03^a$	$0,62 \pm 0,06^d$	-	-	$2,25 \pm 0,20^d$	2	16
+ 3×10^{-3} M Hex	$5,29 \pm 0,07^a$	$-2,10 \pm 0,31^a$	$0,04 \pm 0,05^a$	n.z.					8
Tacrin	$5,28 \pm 0,03^c$	$1,82 \pm 0,18^c$	$0,98 \pm 0,02^c$	-	$0,11 \pm 0,01^c$	(9,09)	$3,93 \pm 0,06^c$	3	16
	$5,29 \pm 0,01^a$	$-1,98 \pm 0,06^a$	$0,03 \pm 0,01^a$	-	(0,12)	$8,09 \pm 0,79^e$	$3,98 \pm 0,04^e$	3	16
+ 3×10^{-3} M Hex	$4,50 \pm 0,05^a$	$-1,89 \pm 0,29^a$	$0,09 \pm 0,07^a$	n.z.					8
Eburnamonin	$5,39 \pm 0,04^c$	$1,63 \pm 0,21^c$	$0,97 \pm 0,03^c$	-	$0,21 \pm 0,03^c$	(4,76)	$3,73 \pm 0,29^c$	3	18
	$5,37 \pm 0,02^a$	$-1,69 \pm 0,12^a$	$0,01 \pm 0,02^a$	-	(0,22)	$4,52 \pm 0,34^e$	$3,99 \pm 0,06^e$	3	18
+ 3×10^{-3} M Hex	$4,89 \pm 0,06^a$	$-1,64 \pm 0,47^a$	$0,12 \pm 0,07^a$	n.z.					8

Tabelle 8: Kenngrößen \pm Standardfehler der Kurvenanpassungen des [3 H]NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes allosterischer Modulatoren und der Antagonisierung dieses Effektes durch Hexamethonium. $pEC_{0,5 \text{ Diss}}$: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Modulators, in Abwesenheit des Antagonisten Hexamethonium, die die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. n_H : Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Modulators. **Max**: maximaler Effekt des allosterischen Modulators (Dissoziationsverzögerung von [3 H]NMS); bei

positivem Wert von n_H kann der maximale Effekt maximal den Wert 1,00, bei negativem Wert von n_H maximal den Wert 0,00 erreichen. **s**: Steigung der Schild-Geraden. **β / α** : Kooperativitätsfaktor; Maß für die kooperative Interaktion zwischen Antagonist und Modulator. **$pK_{b, Hex}$** : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Antagonisten Hexamethonium. **Modell**: Angabe eines Modells 1 bis 3, dem entsprechend einem F-Test der Vorzug gegeben werden sollte. **N**: Anzahl der unabhängigen Experimente. **n.b.**: nicht bestimmt. **n.z.**: nicht zutreffend. **Index^a**: Angabe der Zielparameter aus einer Anpassung der Datenpunkte an Gleichung 20, S. 44 (Hill). **Index^b**: Angabe der Zielparameter aus einer Anpassung der Datenpunkte an Gleichung 24, S. 50 (Waud). **Index^c**: Angabe der Zielparameter aus einer Anpassung der Datenpunkte an Gleichung 25, S. 50 (Waud, erweitert). **Index^d**: Angabe der Zielparameter aus einer Anpassung der Datenpunkte (berechnete Verschiebungsfaktoren (Tabelle 9, S. 89) gegen die Hexamethonium-Konzentration aufgetragen) an Gleichung 26, S. 51 (Schild). **Index^e**: Angabe der Zielparameter aus einer Anpassung der Datenpunkte (berechnete Verschiebungsfaktoren (Tabelle 9, S. 89) gegen die Hexamethonium-Konzentration aufgetragen) an Gleichung 27, S. 51 (Lanzafame). **Index^f**: auf 1 bzw. -1 festgesetzter Parameter (n_H , s), nach Feststellung, dass dieser nicht signifikant unterschiedlich von 1 bzw. -1 ist; in Klammern sind die Werte angegeben, wie sie erhalten werden, wenn der Parameter nicht festgesetzt ist.

Hexa- methonium- Konz.	Gallamin		WDuo3		EHW21		Duo3		Tacrin		Eburnamonin	
	$n_H = -1,00^f$ Max = 0,10 ^f		$n_H = -1,00^f$ Max = 0,00 ^f		$n_H = -1,00^f$ Max = 0,00 ^f		$n_H = -1,92^f$ Max = 0,00 ^f		$n_H = -1,82^f$ Max = 0,00 ^f		$n_H = -1,63^f$ Max = 0,00 ^f	
	pEC _{0,5 Diss}	VF	pEC _{0,5 Diss}	VF								
0 M (Kontrolle)	7,06 ± 0,04 ^a	1,0	8,29 ± 0,02 ^a	1,0	6,46 ± 0,04 ^a	1,0	6,09 ± 0,01 ^a	1,0	5,27 ± 0,01 ^a	1,0	5,37 ± 0,02 ^a	1,0
1 x 10 ⁻⁴ M	6,46 ± 0,00 ^b	4,0	7,79 ± 0,00 ^b	3,2	6,32 ± 0,00 ^b	1,4	5,87 ± 0,00 ^b	1,7	5,01 ± 0,00 ^b	1,8	5,13 ± 0,00 ^b	1,7
3 x 10 ⁻⁴ M	5,85 ± 0,00 ^b	16,2	7,34 ± 0,00 ^b	8,9	6,11 ± 0,00 ^b	2,2	5,74 ± 0,00 ^b	2,2	4,84 ± 0,00 ^b	2,7	5,02 ± 0,00 ^b	2,2
1 x 10 ⁻³ M	5,42 ± 0,00 ^b	43,7	7,12 ± 0,00 ^b	14,8	5,79 ± 0,00 ^b	4,7	5,59 ± 0,00 ^b	3,2	4,59 ± 0,00 ^b	4,8	4,85 ± 0,00 ^b	3,3
3 x 10 ⁻³ M	5,29 ± 0,00 ^b	58,9	6,70 ± 0,00 ^b	38,9	5,43 ± 0,06 ^a	10,7	5,27 ± 0,02 ^a	6,6	4,45 ± 0,02 ^a	6,6	4,78 ± 0,05 ^a	3,9
1 x 10 ⁻² M	n.b.	n.b.	4,68 ± 0,00 ^b	4,9								

Tabelle 9: Kenngrößen ± Standardfehler (pEC_{0,5 Diss}) der Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) mit festgesetzten Parametern (n_H , Max) des [³H]NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes allosterischer Modulatoren, sowie die daraus berechneten Verschiebungsfaktoren (VF= EC_{0,5 Diss, Hexamethonium} / EC_{0,5 Diss, Kontrolle}). **pEC_{0,5 Diss}**: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Modulators, in Abwesenheit des Antagonisten Hexamethonium, die die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. **n_H**: Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Modulators. **Max**: maximaler Effekt des allosterischen Modulators (Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS). **n.b.**: nicht bestimmt. **Index^a**: durch mehrere Datenpunkte erfasste KWK des allosterischen Modulators in Ab- und Anwesenheit des Antagonisten Hexamethonium. **Index^b**: durch einen erfassten Datenpunkt simulierte KWK des allosterischen Modulators in Anwesenheit des Antagonisten Hexamethonium (Standardfehler << 0). **Index^f**: auf den angegebenen Wert festgesetzter Parameter.

3.4 Mg²⁺ als allosterischer Modulator und als Antagonist der [³H]NMS-Dissoziations-Verzögerung

Ebenso wie Hexamethonium kann Mg²⁺ sowohl als allosterischer Modulator, sowie als Antagonist der [³H]NMS-Dissoziations-Verzögerung eingesetzt werden. Um die Reproduzierbarkeit der eigenen Vorgehensweise dokumentieren zu können, wurden die Ergebnisse aus Dissoziationsexperimenten mit Mg²⁺ alleine und der Kombination aus Mg²⁺ und Tacrin mit Befunden einer früheren Arbeit (Schulz, 1998) verglichen.

3.4.1 Eigeneffekt von Mg²⁺ auf die [³H]NMS-Dissoziation

Als „partieller Agonist“ (Max = 0,41 ± 0,03) verzögert Mg²⁺ alleine die [³H]NMS-Dissoziation vom Acetylcholin-Rezeptor (Abbildung 31).

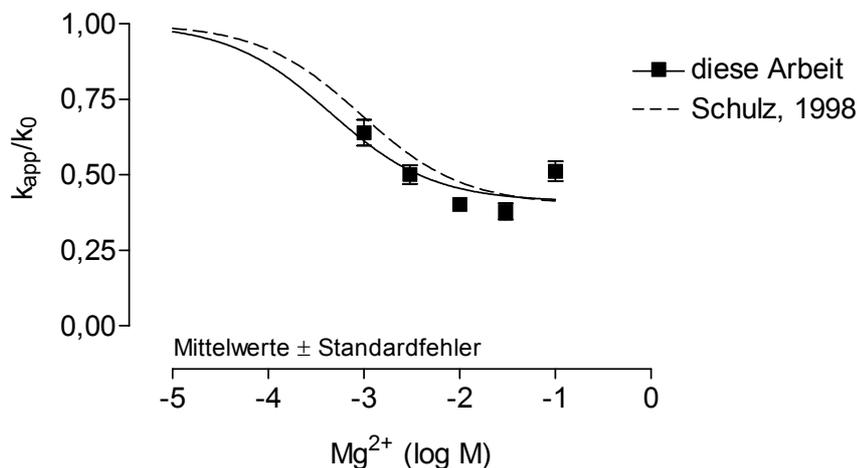


Abbildung 31: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Mg²⁺ für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung.

Ordinate: Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Mg²⁺. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Mg²⁺.

Kurvenanpassung: Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter:** Tabelle 10, S. 94, Index ^a, Index ^s.

Versuchscharakteristika: Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Die Daten von Schulz (1998) lassen sich besser anpassen, wenn man für Mg²⁺ zwei unterschiedliche Bindestellen annimmt. Schulz gibt die Zielparameter sowohl für die Anpassung unter der Annahme einer Bindestelle (Gleichung 20, S. 44) für Mg²⁺, als auch für die Anpassung unter der Annahme zweier Bindestellen (Gleichung 21, S. 45) an. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten lassen eine Unterscheidung nicht zu, ob eine Kurvenanpassung mittels Gleichung 20 oder mittels Gleichung 21 signifikant besser ist. Daher wurden die Effektdaten von Mg²⁺ an die allgemeine Hill-Gleichung angepasst. Die so gewonnenen Zielparameter stimmen gut mit den von Schulz

erhobenen Daten unter der Annahme einer Bindestelle für Mg^{2+} überein (Tabelle 10, S. 94).

3.4.2 Mg^{2+} als Antagonist gegenüber Tacrin

Wird Mg^{2+} in der Kombination mit einem allosterischen Modulator in $[^3H]NMS$ -Dissoziationsexperimenten eingesetzt, so verringert Mg^{2+} den dissoziationsverzögernden Effekt des Modulators. In Abbildung 32 ist der allosterische Effekt von Tacrin und der Effekt einer Kombination einer Konzentration von Tacrin und einer Konzentration von Mg^{2+} dargestellt. Es lässt sich eine gute Übereinstimmung mit den von Schulz (1998) erhobenen Daten dokumentieren.

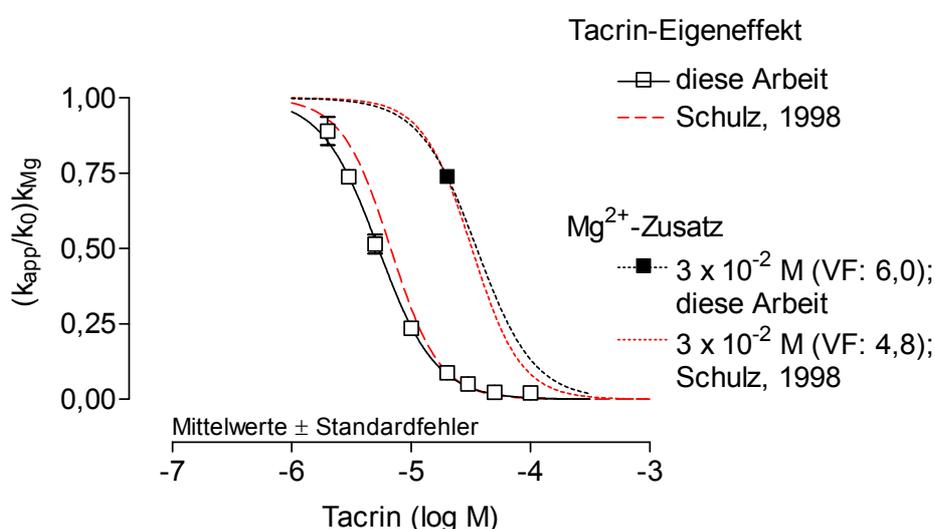


Abbildung 32: Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) für die $[^3H]NMS$ -Dissoziationsverzögerung von Tacrin alleine (offene Symbole, durchgezogene Linie) und der Kombination einer Konzentration von Tacrin ($3 \times 10^{-5} M$) mit einer Konzentration von Mg^{2+} ($3 \times 10^{-2} M$) (geschlossenes Symbol, gestrichelte Linie) und den analogen Befunden aus der Dissertation von Schulz (1998). **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Tacrin und normalisiert auf den Eigeneffekt von Mg^{2+} k_{Mg} . **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Tacrin. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter und festgesetzte Parameter:** Tabelle 10, S. 94, Index ^a, Index ^s und Tabelle 11, S. 95. **VF:** Verschiebungsfaktor berechnet aus dem Wendepunkt der Kontroll-KWK (offene Symbole, durchgezogene Linie) und dem Wendepunkt der parallel verschobenen KWK (geschlossenes Symbol) ($VF = EC_{0,5 \text{ Diss, } Mg^{2+}} / EC_{0,5 \text{ Diss, Kontrolle}}$). **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M_2)-Membransuspension.

3.4.3 Mg^{2+} als Antagonist gegenüber EHW21

Dissoziationsexperimente mit dem Tacrin-Dimer EHW21 alleine und der Kombination aus EHW21 und Mg^{2+} lassen sich mithilfe der Gleichung 24, S. 50 simultan

auswerten. Zur Beschreibung des gesamten Effektdatensatzes (Abbildung 33) von EHW21 sollte dem Modell 2 der Vorzug gegeben werden (F-Test; $p = 0,029$). Mg^{2+} vermag demnach den allosterischen Effekt von EHW21 ($pEC_{0,5 \text{ Diss}} = 6,48 \pm 0,03$; $n_H = 1,14 \pm 0,09$; $Max = 1,00 \pm 0,03$) nicht-kompetitiv ($s = 0,61 \pm 0,09$; $pK_{b, Mg} = 1,19 \pm 0,11$) zu antagonisieren.

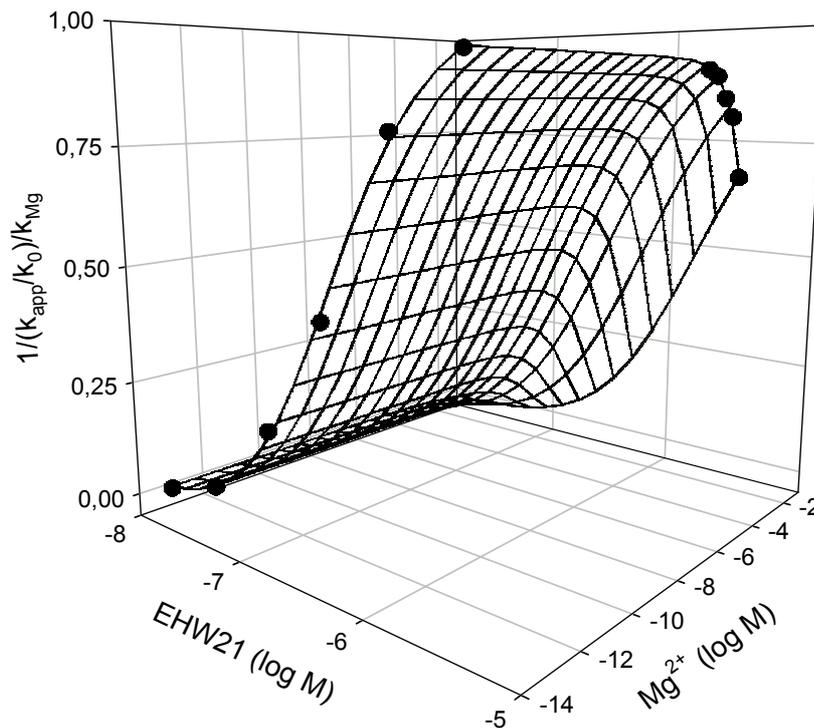


Abbildung 33: Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Netz) für die $[^3H]NMS$ -Dissoziationsverzögerung von EHW21 alleine (linker aufsteigender Teil des Netzes) und der Kombination einer fixen Konzentration von EHW21 ($3 \times 10^{-6} \text{ M}$) mit steigenden Konzentrationen von Mg^{2+} (rechter absteigender Teil des Netzes). **Z-Achse:** Effekt: Invertierte apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von EHW21 und normalisiert auf den Eigeneffekt von Mg^{2+} k_{Mg} . **X-Achse:** Logarithmus der molaren Konzentration von EHW21. **Y-Achse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Mg^{2+} . **Kurvenanpassung:** Modell 2, Gleichung 24, S. 50. **Zielparameter:** Tabelle 10, S. 94, Index ^b. **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M_2)-Membransuspension.

Die nicht-kompetitive Interaktion von EHW21 und Mg^{2+} ist in der Abbildung 34, S. 93 und Abbildung 35, S. 93 dargestellt.

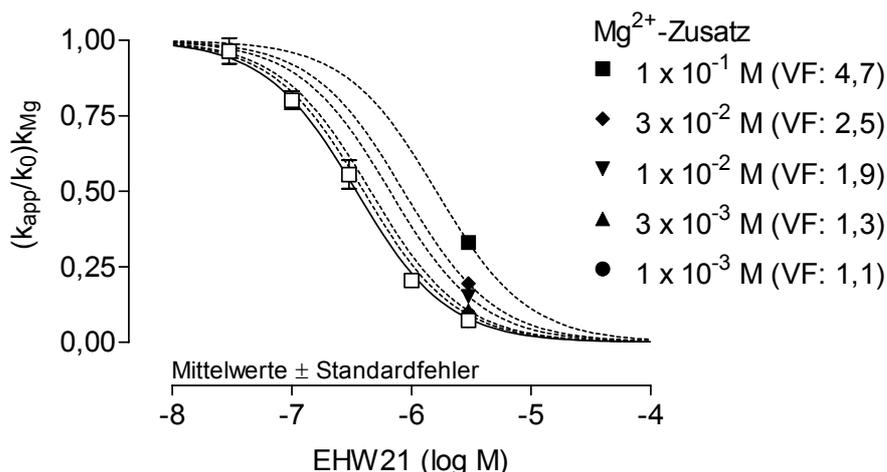


Abbildung 34: Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) für die $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsverzögerung von EHW21 alleine (offene Symbole, durchgezogene Linie) und der Kombination einer fixen Konzentration von EHW21 ($3 \times 10^{-6} \text{ M}$) mit steigenden Konzentrationen von Mg^{2+} (geschlossene Symbole, gestrichelte Linien). **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von EHW21 und normalisiert auf den Eigeneffekt von Mg^{2+} k_{Mg} . **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von EHW21. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter und festgesetzte Parameter:** Tabelle 10, S. 94, Index ^a, und Tabelle 11, S. 95. **VF:** Verschiebungsfaktor berechnet aus dem Wendepunkt der Kontroll-KWK (offene Symbole, durchgezogene Linie) und dem Wendepunkt parallel verschobener KWK (geschlossene Symbole) bei der jeweiligen Konzentration von Mg^{2+} ($\text{VF} = \text{EC}_{0,5 \text{ Diss, Mg}^{2+}} / \text{EC}_{0,5 \text{ Diss, Kontrolle}}$). **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, Mehrpunkterfassung, HSV-(M_2)-Membransuspension.

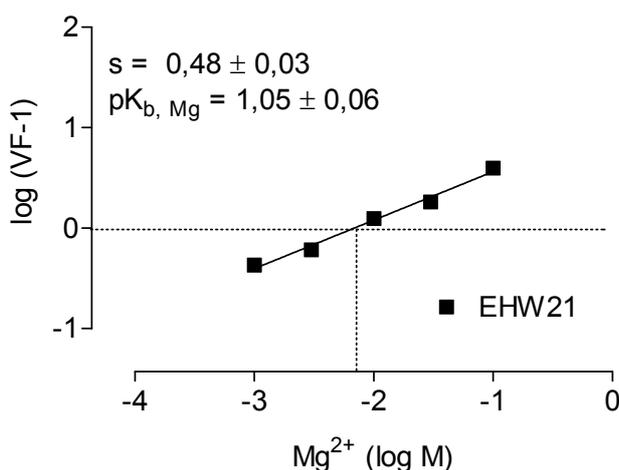


Abbildung 35: Darstellung des antagonistischen Effektes von Mg^{2+} auf die $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsverzögerung durch EHW21 nach Arunlakshana und Schild (1958). **Ordinate:** Logarithmus des (Verschiebungsfaktors – 1) (VF: Tabelle 11, S. 95). **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Mg^{2+} . **Geradenanpassung:** Gleichung 26, S. 51 mit $s = 0,48$ **Zielparameter:** Tabelle 10, S. 94, Index ^d.

Modulator	Effekt des allosterischen Modulators			Antagonismus durch Mg ²⁺					N
	pEC _{0,5 Diss}	n _H	Max	s	β = 1/α	α = 1/β	pK _{b, Mg}	Modell	
Tacrin	5,29 ± 0,01 ^a	-1,98 ± 0,06 ^a	0,03 ± 0,01 ^a	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	12
	5,17 ^{c,s}	-2,12 ^{c,s}	0,00 ^{c,s}	-	0,17 ^{c,s}	(5,96 ^{c,s})	2,64 ^{c,s}	3 ^{c,s}	-
EHW21	6,48 ± 0,03 ^b	1,14 ± 0,09 ^b	1,00 ± 0,03 ^b	0,61 ± 0,09 ^b	-	-	1,19 ± 0,11 ^b	2	14
	6,46 ± 0,04 ^a	-1 ^{a,f} (-1,20 ± 0,04 ^a)	0,00 ± 0,03 ^a	0,48 ± 0,03 ^d	-	-	1,05 ± 0,06 ^d	2	14
Mg ²⁺	3,35 ± 0,22 ^a	-0,81 ^{a,i,s}	0,41 ± 0,03 ^a	n.z.					1
	3,03 ^{a,s}	-0,81 ^{a,s}	0,40 ^{a,s}						-

Tabelle 10: Kenngrößen ± Standardfehler der Kurvenanpassungen des [³H]NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes allosterischer Modulatoren und der Antagonisierung dieses Effektes durch Mg²⁺. **pEC_{0,5 Diss}**: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Modulators, in Abwesenheit des Antagonisten Mg²⁺, die die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. **n_H**: Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurve des Modulators. **Max**: maximaler Effekt des allosterischen Modulators (Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS); bei positivem Wert von n_H kann der maximale Effekt maximal den Wert 1,00, bei negativem Wert von n_H maximal den Wert 0,00 erreichen. **s**: Steigung der Schild-Geraden. **β/α**: Kooperativitätsfaktor; Maß für die kooperative Interaktion zwischen Antagonist und Modulator. **pK_{b, Mg}**: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Antagonisten Mg²⁺. **Modell**: Angabe eines Modells 1 bis 3, dem entsprechend einem F-Test der Vorzug gegeben werden sollte. **N**: Anzahl der unabhängigen Experimente. **n.b.**: nicht bestimmt. **n.z.**: nicht zutreffend. **Index^a**: Angabe der Zielparameter aus einer Anpassung der Datenpunkte an Gleichung 20, S. 44 (Hill). **Index^b**: Angabe der Zielparameter aus einer Anpassung der Datenpunkte an Gleichung 24, S. 50 (Waud). **Index^c**: Angabe der Zielparameter aus einer Anpassung der Datenpunkte an Gleichung 25, S. 50 (Waud, erweitert). **Index^d**: Angabe der Zielparameter aus einer Anpassung der Datenpunkte (berechnete Verschiebungsfaktoren (Tabelle 11, S. 95) gegen die Mg²⁺-Konzentration aufgetragen) an Gleichung 26, S. 51 (Schild). **Index^f**: auf den angegebenen Wert festgesetzter Parameter (n_H); in Klammern sind die Werte angegeben, wie sie erhalten werden, wenn der Parameter nicht festgesetzt ist. **Index^s**: von Schulz (1998) erhobene Daten.

Mg²⁺ - Konzentration	EHW21 $n_H = -1,14^f$ $Max = 0,00^f$		Tacrin $n_H = -1,82^f$ $Max = 0,00^f$	
	pEC_{0,5 Diss}	VF	pEC_{0,5 Diss}	VF
0 M	6,46 ± 0,02 ^a	1,0	5,27 ± 0,01 ^a	1,0
1 x 10 ⁻³ M	6,40 ± 0,00 ^b	1,1	n.b.	n.b.
3 x 10 ⁻³ M	6,34 ± 0,00 ^b	1,3	n.b.	n.b.
1 x 10 ⁻² M	6,18 ± 0,00 ^b	1,9	n.b.	n.b.
3 x 10 ⁻² M	6,06 ± 0,00 ^b	2,5	4,49 ± 0,00 ^b	6,0
1 x 10 ⁻¹ M	5,79 ± 0,00 ^b	4,7	n.b.	n.b.

Tabelle 11: Kenngrößen ± Standardfehler (pEC_{0,5 Diss}) der Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWK) mit festgesetzten Parametern (n_H , Max) des [³H]NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes allosterischer Modulatoren, sowie die daraus berechneten Verschiebungsfaktoren ($VF = EC_{0,5 \text{ Diss, Hexamethonium}} / EC_{0,5 \text{ Diss, Kontrolle}}$). **pEC_{0,5 Diss}**: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Modulators, in Abwesenheit des Antagonisten Mg²⁺, die die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. **n_H**: Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Modulators. **Max**: maximaler Effekt des allosterischen Modulators (Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS). **n.b.**: nicht bestimmt. **Index^a**: durch mehrere Datenpunkte erfasste KWK des allosterischen Modulators in Abwesenheit des Antagonisten Mg²⁺. **Index^b**: durch einen erfassten Datenpunkt simulierte KWK des allosterischen Modulators in Anwesenheit des Antagonisten Mg²⁺ (Standardfehler << 0). **Index^f**: auf den angegebenen Wert festgesetzter Parameter.

3.5 Einfluss des Lösungsvermittlers DMSO

Die allosterischen Modulatoren WDuo3, Duo3 und EHW21 konnten in den benötigten Konzentrationen nur in wässrige Lösung gebracht werden, wenn der Lösungsvermittler Dimethylsulfoxid (DMSO) zum Einsatz kam. Um den Einfluss von DMSO auf die Ergebnisse aus Dissoziationsexperimenten abschätzen zu können, wurde zunächst der Eigeneffekt von DMSO auf die [³H]NMS-Dissoziation untersucht. Anschließend wurde beispielhaft der Einfluss von DMSO auf die allosterische Wirksamkeit von W84 genauer analysiert. Der Modulator W84 lässt sich sonst ohne Weiteres in den benötigten Konzentrationen in Wasser lösen. Die Verdünnungsreihen der allosterischen Modulatoren wurden so hergestellt, dass die Konzentration von DMSO im Reaktionsansatz während des Experimentes maximal 25% betrug.

3.5.1 Eigeneffekt von DMSO auf die [³H]NMS-Dissoziation

An COS7-hM₂-Membransuspensionen konnte eine Konzentration von 2,5% DMSO im Reaktionsansatz eine gerade messbare [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung auslösen. 25% DMSO im Reaktionsansatz vermochten die Dissoziationsgeschwindigkeit an COS7-hM₂ um mehr als die Hälfte reduzieren. Die COS7-hM₅-Membransuspension war in bezug auf den dissoziationsverzögernden Eigeneffekt von DMSO der COS7-hM₂-Membransuspension vergleichbar, jedoch etwas empfindlicher. Eine gerade messbare Dissoziationsverzögerung konnte schon bei einer Konzentration von 0,25% DMSO, ein deutlicher Eigeneffekt jedoch erst bei einer Konzentration von 25% DMSO ermittelt werden.

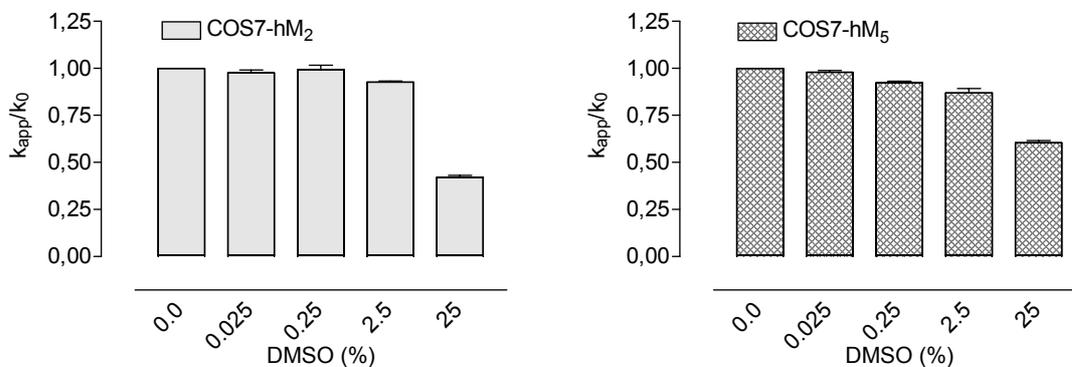


Abbildung 36: [³H]NMS Dissoziationsverzögerung durch DMSO an COS7-hM₂ und COS7-hM₅
Ordinate: Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von DMSO. **Abszisse:** Prozentuale Konzentration von DMSO im Reaktionsansatz. **Zielparameter:** Tabelle 12, S. 96. **Versuchscharakteristika:** Brandel Cell Harvester, Zweipunkt-erfassung, COS7-Membransuspensionen.

DMSO (%)	COS7-hM ₂	N	COS7-hM ₅	N
Endkonz.	k_{app}/k_0		k_{app}/k_0	
0,000	1,00 ± 0,00	2	1,00 ± 0,00	2
0,025	0,98 ± 0,02	2	0,98 ± 0,01	2
0,250	0,99 ± 0,02	2	0,92 ± 0,01	2
2,500	0,93 ± 0,01	2	0,87 ± 0,02	2
25,000	0,42 ± 0,01	2	0,61 ± 0,01	2

Tabelle 12: Kenngrößen ± Standardfehler der [³H]NMS Dissoziationsverzögerung durch DMSO an COS7-hM₂ und COS7-hM₅. k_{app}/k_0 : Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von DMSO. **N:** Anzahl der unabhängigen Experimente.

3.5.2 Einfluss von DMSO auf die allosterische Wirksamkeit von W84

Bis zu einer Konzentration von 2,5% DMSO im Reaktionsansatz konnten Konzentrations-Wirkungs-Kurven von W84 für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung an COS7-hM₂- und COS7-hM₅-Membransuspensionen ermittelt werden, die in Form (n_H , Max) und Lage ($pEC_{0,5 \text{ Diss}}$) im Wesentlichen den Kurven entsprachen, wenn diese unter Ausschluss von DMSO bestimmt wurden (Abbildung 37). Die Ergebnisse aus Experimenten mit 25% DMSO im Reaktionsansatz spiegeln den Eigeneffekt des Dimethylsulfoxids wieder. Eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve lässt sich nicht ermitteln. Vielmehr liefern die Datenpunkte jeweils eine Gerade parallel zur X-Achse. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich ausmachen, dass der allosterische Effekt eines Modulators nicht vom Eigeneffekt des DMSO unterscheidbar ist, wenn der Reaktionsansatz mit 25% DMSO „belastet“ ist. Daher lässt sich vermuten, dass eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve eines Modulators nicht bis auf null geht, wenn bei höheren Konzentrationen des Modulators 25% DMSO zugegen sind. Die so ermittelte unvollständige Dissoziationsverzögerung des allosterischen Modulators wäre dann ein Artefakt, verursacht durch den Lösungsvermittler DMSO. Daher wurden in Abbildungen mit in Dissoziationsexperimenten ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Kurven die Datenpunkte durch Einrahmung mit einem Rechteck markiert, die mit einer Konzentration von 25% DMSO belastet waren.

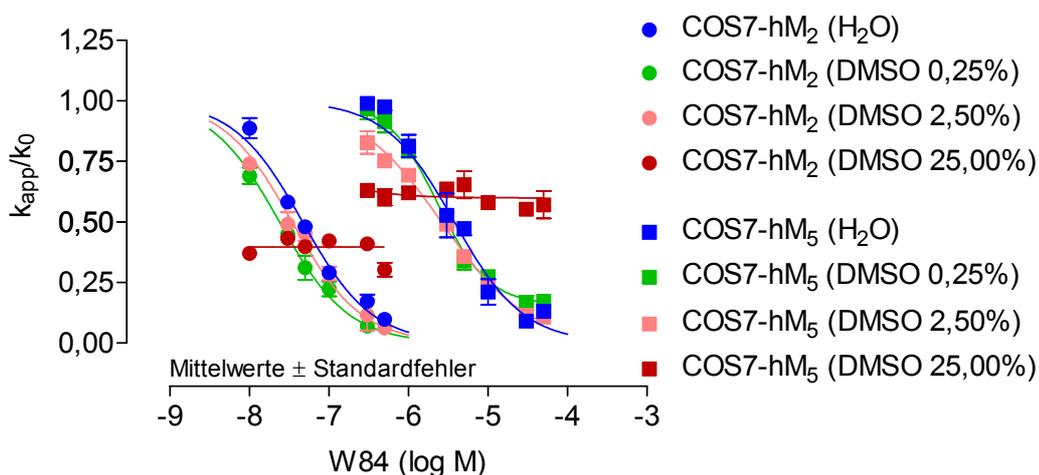


Abbildung 37: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung von W84 mit unterschiedlichen Konzentrationen von DMSO an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von W84. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von W84. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter:** Tabelle 13, S. 98. **Versuchscharakteristika:** Brandel Cell Harvester, Zweipunkterfassung.

DMSO (%) Endkonz.	COS7-hM₂ pEC_{0,5 Diss}	COS7-hM₂ n_H	COS7-hM₂ Max	N
0,00	7,33 ± 0,03	-1 [†] (-1,35 ± 0,15)	0 [†] (0,10 ± 0,04)	3
0,25	7,62 ± 0,03	-1 [†] (-0,80 ± 0,11)	0 [†] (0,00 ± 0,07)	2
2,50	7,46 ± 0,03	-1 [†] (-0,78 ± 0,12)	0 [†] (0,00 ± 0,09)	2
25,00	n.bs.	n.bs.	n.bs.	3
	COS7-hM₅ pEC_{0,5 Diss}	COS7-hM₅ n_H	COS7-hM₅ Max	
0,00	5,42 ± 0,05	-1 [†] (-1,40 ± 0,22)	0 [†] (0,08 ± 0,05)	3
0,25	5,63 ± 0,03	-1,36 ± 0,12	0,16 ± 0,02	4
2,50	5,58 ± 0,02	-0,80 ± 0,04	0 [†] (0,01 ± 0,04)	4
25,00	n.bs.	n.bs.	n.bs.	3

Tabelle 13: Kenngrößen ± Standardfehler der Konzentrations-Wirkungs-Kurven des [³H]NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes von W84 mit unterschiedlichen Konzentrationen von DMSO an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. **pEC_{0,5 Diss}**: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von W84, die die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. **n_H**: Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. **Max**: maximaler Effekt des allosterischen Modulators W84. **N**: Anzahl der unabhängigen Experimente. **n.bs.**: nicht bestimmbar. **Index[†]**: auf den angegebenen Wert festgesetzter Parameter, ohne statistisch signifikante Abweichung.

3.6 Dissoziationsexperimente an Membransuspensionen aus COS7-Zellen zur Identifizierung der verantwortlichen Epitope für die M₂/M₅-Selektivität allosterischer Modulatoren

Die allosterischen Modulatoren W84, Alcuronium, CARALL, WDuo3, Duo3, Tacrin und EHW21 wurden in Dissoziationsexperimenten mit Zweipunkterfassung (1.1.1, S. 47) an Membransuspensionen aus COS7-Zellen untersucht. Die COS7-Membransuspensionen enthielten entweder den humanen M₂- oder M₅-Rezeptor, chimäre M₂/M₅-Rezeptoren oder Punktmutanten des hM₂-Rezeptors. Die ermittelten pEC_{0,5 Diss}-Werte dienen als Affinitätsparameter zu den [³H]NMS besetzten Rezeptoren. Alle untersuchten Modulatoren weisen eine höhere Affinität zu [³H]NMS besetzten M₂- als zu M₅-Rezeptoren auf. Untersuchungen an M₂/M₅-chimären Rezeptoren ermöglichen die Identifizierung der für die M₂/M₅-Selektivität verantwortlichen Rezeptorepitope. Die genaue Aminosäurefrequenz der chimären Rezeptoren kann der Tabelle 1, S. 27 entnommen werden. Zunächst sollte die eigene Arbeitsweise anhand von Dissoziationsexperimenten mit den Modulatoren W84, Alcuronium und CARALL an

den Membransuspensionen COS7-hM₂, COS7-hM₅, COS7-CR3 und COS7-CR6 validiert werden. Für alle drei Modulatoren konnte das gleiche Affinitätsmuster gefunden werden, wie es von Stefan Buller (Buller, 2002) berichtet wird.

Die Modulatoren WDuo3, Duo3, Tacrin und EHW21 wurden hinsichtlich ihres Affinitätsmusters für CR1, CR2, CR3 und CR6 getestet. Diese vier Modulatoren wurden außerdem in Dissoziationsexperimenten mit den Membransuspensionen COS7-U (hM₂⁴²³Thr→His) und COS7-BG (hM₂¹⁷⁷Tyr→Gln, ⁴²³Thr→His) untersucht. Für den allosterischen Modulator W84 ist bekannt (Voigtländer et al., 2003), dass die beiden Aminosäuren ¹⁷⁷Tyrosin und ⁴²³Threonin in hM₂ vollständig für die Affinitätsdifferenz zu hM₅ verantwortlich sind. Es sollte untersucht werden, ob die Modulatoren WDuo3, Duo3, Tacrin und EHW21 die gleichen Epitope wie der Prototyp Modulator W84 nutzen, die für das M₂/M₅-Affinitätsverhältnis am [³H]NMS besetzten Rezeptor verantwortlich sind. Sollte dies der Fall sein, sollte auch der Frage nachgegangen werden, ob sich die M₂/M₅-Affinitätsdifferenz durch Austausch der beiden Aminosäuren ¹⁷⁷Tyrosin und ⁴²³Threonin aufheben lässt.

3.6.1 W84

Der allosterische Modulator W84 weist gegenüber dem in COS7-Zellen exprimierten, [³H]NMS besetzten hM₂-Rezeptor eine ca. 80 fach höhere Affinität auf als zu dem hM₅-Rezeptor. Die Lage der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von W84 für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung in Abbildung 38, S. 100 verdeutlicht das gefundene Affinitätsmuster M₂ > CR3 > CR6 > M₅. Dieses Affinitätsmuster lässt sich gut mit den Daten von Buller (2002) in Einklang bringen.

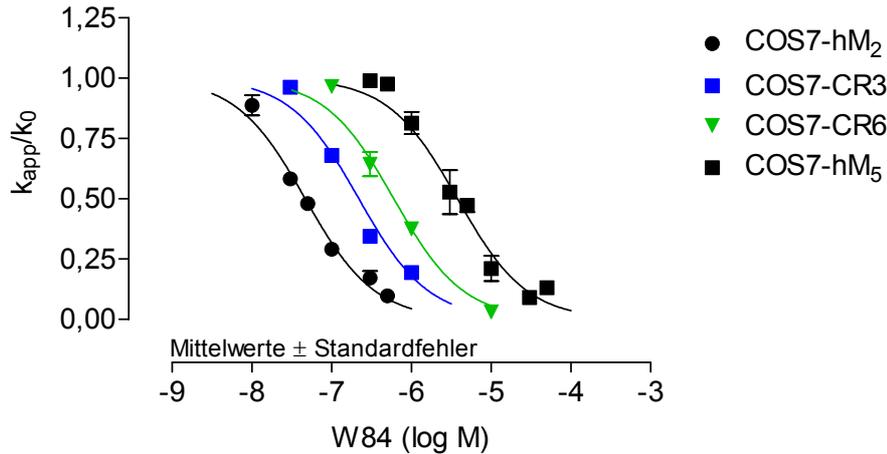


Abbildung 38: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung von W84 an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von W84. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von W84. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter:** Tabelle 14, S. 100. **Versuchscharakteristika:** Brandel Cell Harvester, Zweipunkterfassung.

Membran-suspension	$pEC_{0,5\text{ Diss}}$	$pEC_{0,5\text{ Diss}}^b$	n_H	Max	N
COS7-hM ₂	7,33 ± 0,03	(7,62 ± 0,03)	-1 ^f (-1,35 ± 0,15)	0 ^f (0,10 ± 0,04)	3
COS7-CR3	6,66 ± 0,05	(7,00 ± 0,07)	-1 ^f (-1,82 ± 0,13)	0 ^f (0,18 ± 0,02)	1
COS7-CR6	6,22 ± 0,05	(6,43 ± 0,03)	-1 ^f (-1,14 ± 0,24)	0 ^f (0,00 ± 0,07)	1
COS7-hM ₅	5,42 ± 0,05	(5,79 ± 0,06)	-1 ^f (-1,40 ± 0,22)	0 ^f (0,08 ± 0,05)	3

Tabelle 14: Kenngrößen ± Standardfehler der Konzentrations-Wirkungs-Kurven des [³H]NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes von W84 an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. $pEC_{0,5\text{ Diss}}$: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von W84, die die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. n_H : Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. **Max:** maximaler Effekt des allosterischen Modulators W84. **N:** Anzahl der unabhängigen Experimente. **Index**^b: von Buller (2002) erhobene Daten. **Index**^f: auf den angegebenen Wert festgesetzter Parameter, ohne statistisch signifikante Abweichung.

3.6.2 Alcuronium

Das Affinitätsverhältnis zwischen COS7-hM₂- und COS7-hM₅-Rezeptoren beträgt für Alcuronium 1349. Der Einsatz des chimären Rezeptors CR6 bringt keinen nennenswerten Affinitätsgewinn. COS7-CR3 nimmt demgegenüber eine Mittelstellung zwischen hM₂ und hM₅ ein (Abbildung 39, S. 101). Das mit den Daten von Buller (2002) übereinstimmende Muster kann folgendermaßen formuliert werden: M₂ > CR3 >> CR6 ≈ M₅.

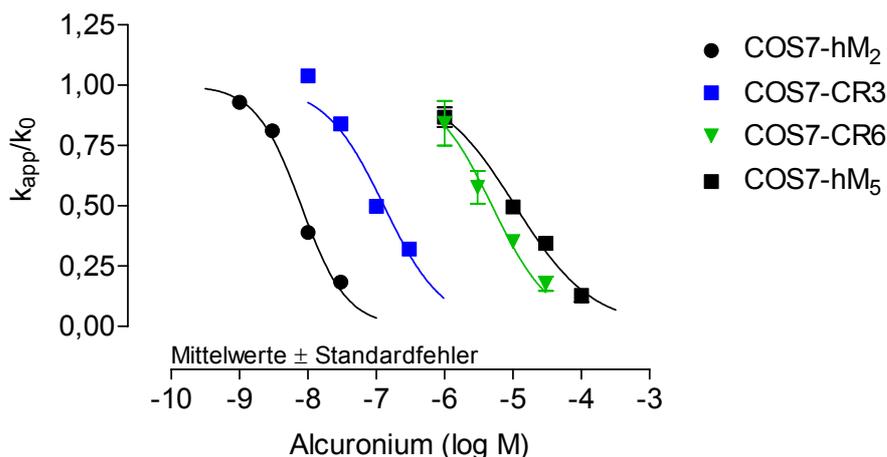


Abbildung 39: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverzögerung von Alcuronium an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Alcuronium. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Alcuronium. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter:** Tabelle 15, S. 101. **Versuchscharakteristika:** Brandel Cell Harvester, Zweipunkterfassung.

Membransuspension	$\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss}}$	$\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss}}^b$	n_H	Max	N
COS7-hM ₂	$8,10 \pm 0,03$	$(8,57 \pm 0,05)$	$-1,31 \pm 0,10$	$0^f (0,12 \pm 0,03)$	1
COS7-CR3	$6,89 \pm 0,06$	$(7,47 \pm 0,07)$	$-1^f (-1,97 \pm 0,36)$	$0^f (0,30 \pm 0,05)$	1
COS7-CR6	$5,31 \pm 0,06$	$(5,70 \pm 0,03)$	$-1^f (-1,08 \pm 0,36)$	$0^f (0,10 \pm 0,14)$	1
COS7-hM ₅	$4,97 \pm 0,04$	$(5,32 \pm 0,04)$	$-0,77 \pm 0,06$	$0^f (0,00 \pm 0,13)$	1

Tabelle 15: Kenngrößen \pm Standardfehler der Konzentrations-Wirkungs-Kurven des $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverzögerungs-Effektes von Alcuronium an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. $\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss}}$: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von Alcuronium, die die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. n_H : Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. **Max:** maximaler Effekt des allosterischen Modulators Alcuronium. **N:** Anzahl der unabhängigen Experimente. **Index**^b: von Buller (2002) erhobene Daten. **Index**^f: auf den angegebenen Wert festgesetzter Parameter, ohne statistisch signifikante Abweichung.

3.6.3 CARALL

Bei einem M_2/M_5 -Affinitätsverhältnis von 324 für CARALL bringt der Einsatz der chimären Rezeptoren CR3 und CR6 einen ähnlichen, deutlichen Affinitätsgewinn (Abbildung 40). Auch hier stimmt das Affinitätsmuster $M_2 > CR3 \approx CR6 > M_5$ mit dem von Buller (2002) gefundenem Muster recht gut überein.

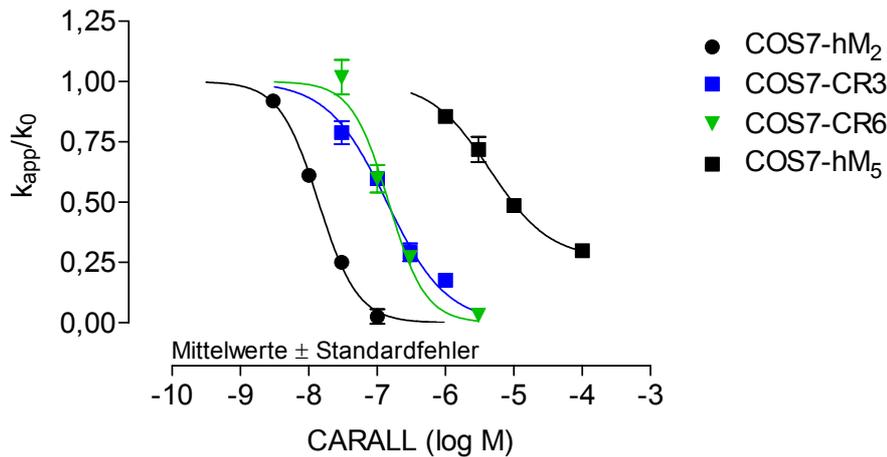


Abbildung 40: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsverzögerung von CARALL an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von CARALL. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von CARALL. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter:** Tabelle 16, S. 102. **Versuchscharakteristika:** Brandel Cell Harvester, Zweipunkterfassung.

Membran-suspension	$pEC_{0,5 \text{ Diss}}$	$pEC_{0,5 \text{ Diss}}^b$	n_H	Max	N
COS7-hM ₂	$7,86 \pm 0,02$	$(8,00 \pm 0,06)$	$-1,52 \pm 0,09$	$0^\dagger (0,00 \pm 0,04)$	1
COS7-CR3	$6,86 \pm 0,04$	$(7,01 \pm 0,07)$	$-1^\dagger (-1,03 \pm 0,21)$	$0^\dagger (0,08 \pm 0,09)$	1
COS7-CR6	$6,83 \pm 0,05$	$(6,91 \pm 0,03)$	$-1,61 \pm 0,31$	$0^\dagger (0,05 \pm 0,07)$	1
COS7-hM ₅	$5,35 \pm 0,06$	$(5,59 \pm 0,08)$	$-1^\dagger (0,99 \pm 0,16)$	$0,27 \pm 0,03$	1

Tabelle 16: Kenngrößen \pm Standardfehler der Konzentrations-Wirkungs-Kurven des $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes von CARALL an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. **$pEC_{0,5 \text{ Diss}}$:** negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von CARALL, die die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. **n_H :** Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. **Max:** maximaler Effekt des allosterischen Modulators CARALL. **N:** Anzahl der unabhängigen Experimente. **Index^b:** von Buller (2002) erhobene Daten. **Index[†]:** auf den angegebenen Wert festgesetzter Parameter, ohne statistisch signifikante Abweichung.

3.6.4 *WDuo3*

Gegenüber *W84* weist *WDuo3* mit $M_2 > CR3 > CR6 \approx M_5 (\approx CR1 \approx CR2)$ ein geringfügig abweichendes Affinitätsmuster auf (Abbildung 41). Der Aminosäureaustausch hM_2 $^{177}\text{Tyr} \rightarrow \text{Gln}$, $^{423}\text{Thr} \rightarrow \text{His}$ (*COS7-BG*) bewirkt für *WDuo3* einen Affinitätsverlust bis unter das hM_5 -Niveau. Obwohl *WDuo3* an *CR6* gegenüber hM_5 keine höhere Affinität zeigt, bewirkt der alleinige Aminosäureaustausch hM_2 $^{423}\text{Thr} \rightarrow \text{His}$ (*COS7-U*) einen, wenn auch geringen, Affinitätsverlust gegenüber hM_2 . Die M_2/M_5 -Affinitätsdifferenz für *WDuo3* scheint also vollständig von den beiden Aminosäuren $^{177}\text{Tyrosin}$ und $^{423}\text{Threonin}$ abhängig zu sein.

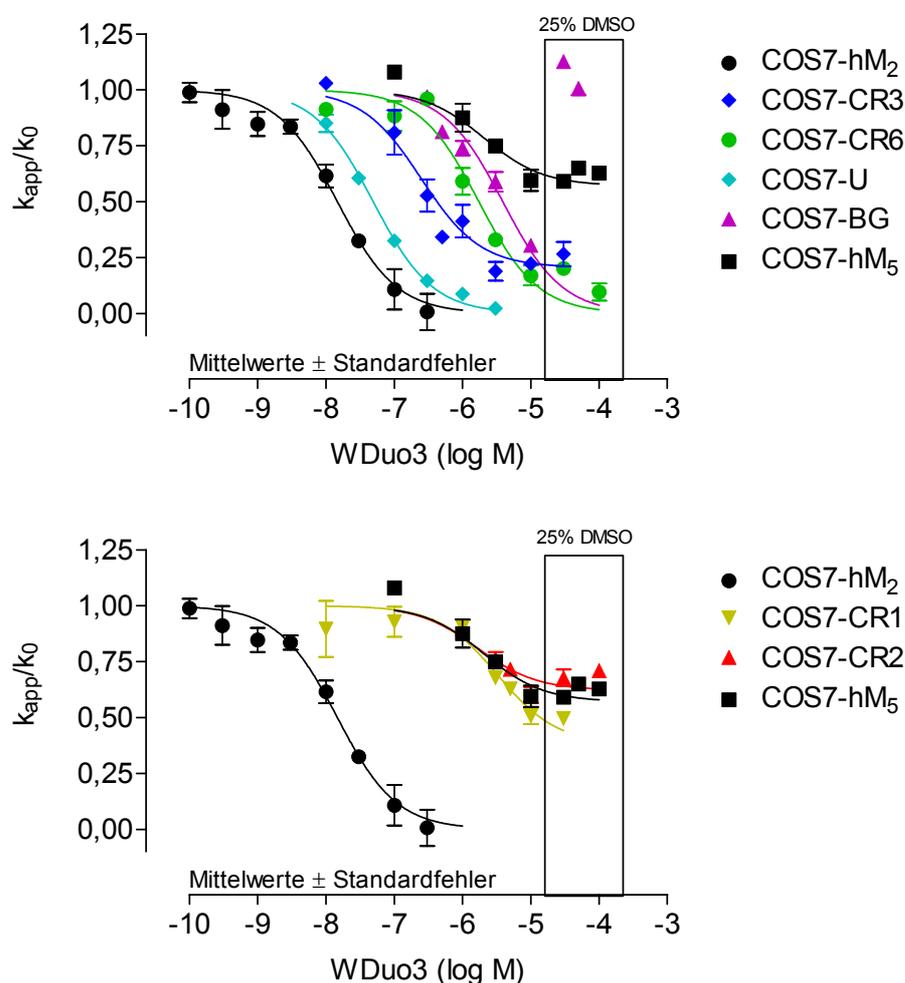


Abbildung 41: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsverzögerung von *WDuo3* an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von *WDuo3*. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von *WDuo3*. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter:** Tabelle 17, S. 104. **Versuchscharakteristika:** Brandel Cell Harvester, Zweipunkt-erfassung. **25% DMSO:** Einrahmung der Datenpunkte, die in Gegenwart einer Konzentration von 25% Dimethylsulfoxid ermittelt wurden (3.5, S. 95).

Zu den chimären Rezeptoren CR1 und CR2 hat WDuo3 eine ähnlich niedrige Affinität wie zu hM₅. Die in CR1 und CR2 eingeführten homologen Segmente des hochaffinen M₂-Rezeptors bewirken also für WDuo3 am Radioligand besetzten Rezeptor keinen Affinitätsgewinn.

Membran-suspension	pEC _{0,5 Diss}	n _H	Max	N
COS7-hM ₂	7,83 ± 0,06	-1 ^f (-0,79 ± 0,18)	0 ^f (0,00 ± 0,14)	4
COS7-CR1	5,49 ± 0,12	-1 ^f (-1,71 ± 0,43)	0,38 ± 0,06	4
COS7-CR2	5,78 ± 0,17	-1 ^f (-1,84 ± 0,65)	0,62 ± 0,03	3
COS7-CR3	6,61 ± 0,13	-1 ^f (-1,10 ± 0,35)	0,21 ± 0,04	5
COS7-CR6	5,76 ± 0,06	-1 ^f (-1,61 ± 0,32)	0 ^f (0,16 ± 0,03)	4
COS7-U	7,31 ± 0,03	-1 ^f (-1,07 ± 0,09)	0 ^f (0,03 ± 0,03)	3
COS7-BG	5,41 ± 0,04	-1 ^f (-0,75 ± 0,25)	0 ^f (0,00 ± 0,62)	3
COS7-hM ₅	5,69 ± 0,15	-1 ^f (-1,48 ± 0,58)	0,57 ± 0,03	7

Tabelle 17: Kenngrößen ± Standardfehler der Konzentrations-Wirkungs-Kurven des [³H]NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes von WDuo3 an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. **pEC_{0,5 Diss}**: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von WDuo3, die die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. **n_H**: Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. **Max**: maximaler Effekt des allosterischen Modulators WDuo3. **N**: Anzahl der unabhängigen Experimente. **Index^f**: auf den angegebenen Wert festgesetzter Parameter, ohne statistisch signifikante Abweichung.

3.6.5 Duo3

Für den allosterischen Modulator Duo3 nehmen die chimären Rezeptoren CR1, CR2, CR3 und CR6 bezogen auf das kleine M₂/M₅-Affinitätsmeßfenster (Affinitätsverhältnis = 14) eine mittlere Position ein (Affinitätsmuster: M₂ > CR1 ≈ CR2 ≈ CR3 ≈ CR6 > M₅, Abbildung 42, S. 105). Die für die M₂/M₅-Affinitätsdifferenz verantwortlichen Epitope bzw. Aminosäuren können anhand dieser Ergebnisse nicht näher eingegrenzt werden, da die eingesetzten chimären Rezeptoren fast den gesamten Bereich der homologen Segmente des hoch-affinen M₂-Rezeptors abdecken, und für sich alleine jeweils einen Affinitätsgewinn gegenüber hM₅ bewirken. Der Aminosäureaustausch hM₂⁴²³Thr→His (COS7-U) bewirkt so gut wie keinen Affinitätsverlust. Die Doppelmutation hM₂¹⁷⁷Tyr→Gln, ⁴²³Thr→His (COS7-BG) verursacht einen deutlich messbaren Affinitätsrückgang. Neben den vielen möglichen

Epitopen scheint die Aminosäure ^{177}Tyr für die Bindung von Duo3 am Radioligand besetzten hM_2 -Rezeptor wichtig zu sein.

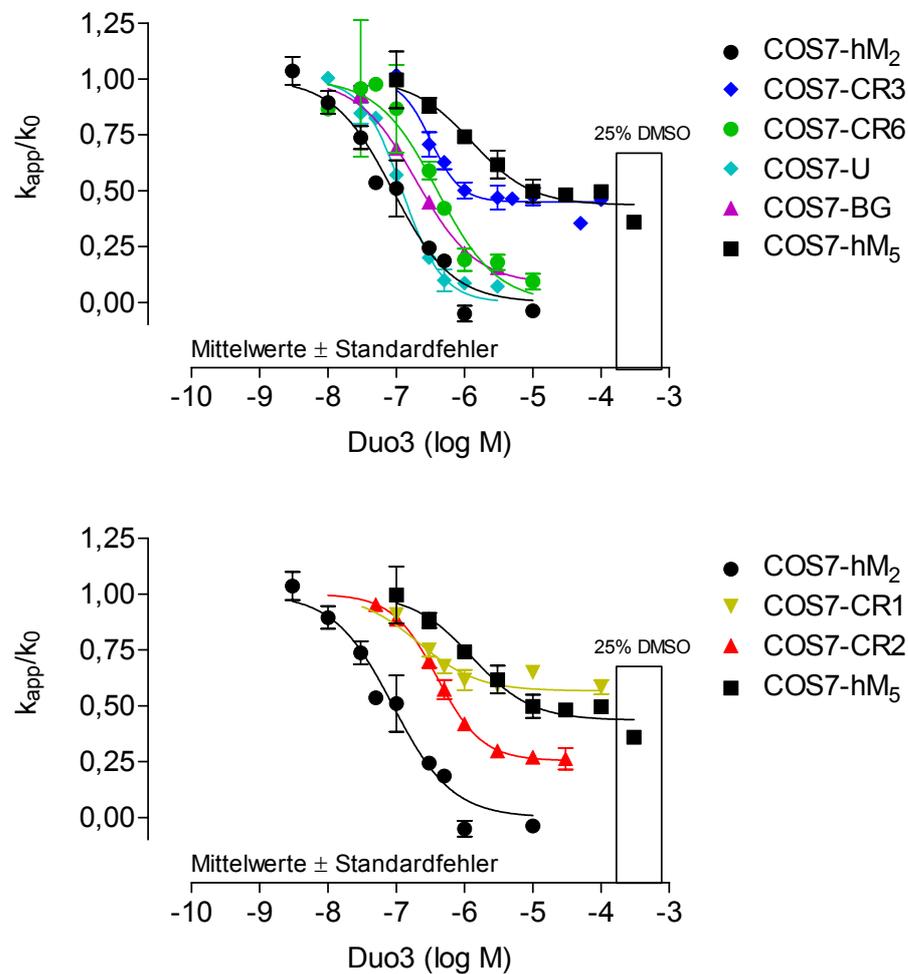


Abbildung 42: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die $[\text{}^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverzögerung von Duo3 an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Duo3. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Duo3. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter:** Tabelle 18, S. 106. **Versuchscharakteristika:** Brandel Cell Harvester, Zweipunkterfassung. **25% DMSO:** Einrahmung der Datenpunkte, die in Gegenwart einer Konzentration von 25% Dimethylsulfoxid ermittelt wurden (3.5, S. 95).

Membran-suspension	$pEC_{0,5\text{ Diss}}$	n_H	Max	N
COS7-hM ₂	7,05 ± 0,09	-1 [†] (-0,90 ± 0,24)	0 [†] (0,00 ± 0,12)	3
COS7-CR1	6,68 ± 0,19	-1 [†] (-1,71 ± 0,51)	0,57 ± 0,03	4
COS7-CR2	6,40 ± 0,04	-1,32 ± 0,13	0,25 ± 0,02	3
COS7-CR3	6,50 ± 0,05	-1,98 ± 0,53	0,45 ± 0,02	4
COS7-CR6	6,40 ± 0,10	-1 [†] (-1,59 ± 0,61)	0 [†] (0,10 ± 0,11)	3
COS7-U	6,93 ± 0,04	-1 [†] (-1,68 ± 0,14)	0 [†] (0,05 ± 0,02)	3
COS7-BG	6,70 ± 0,04	-1 [†] (-1,13 ± 0,11)	0,08 ± 0,02	3
COS7-hM ₅	5,89 ± 0,12	-1 [†] (-0,94 ± 0,24)	0,44 ± 0,03	6

Tabelle 18: Kenngrößen ± Standardfehler der Konzentrations-Wirkungs-Kurven des [³H]NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes von Duo3 an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. $pEC_{0,5\text{ Diss}}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von Duo3, die die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. n_H : Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. **Max**: maximaler Effekt des allosterischen Modulators Duo3. **N**: Anzahl der unabhängigen Experimente. **Index[†]**: auf den angegebenen Wert festgesetzter Parameter, ohne statistisch signifikante Abweichung.

3.6.6 Tacrin

Bei einem deutlich kleineren M_2/M_5 -Affinitätsmeßfenster (Verhältnis = 13) weist Tacrin im Vergleich zu CARALL ein ähnliches Affinitätsmuster $M_2 > CR3 \approx CR6 > M_5$ ($\approx CR1 \approx CR2$) auf (Abbildung 43). An die Radioligand besetzten Rezeptoren CR1 und CR2 bindet Tacrin mit der gleichen Affinität wie an den hM_5 -Rezeptor. Betrachtet man das Affinitätsverhalten von Tacrin im Hinblick auf die Membransuspensionen COS7-U (hM_2 $^{423}\text{Thr} \rightarrow \text{His}$) und COS7-BG (hM_2 $^{177}\text{Tyr} \rightarrow \text{Gln}$, $^{423}\text{Thr} \rightarrow \text{His}$), so kann gefolgert werden, dass außer den Aminosäuren $^{177}\text{Tyrosin}$ und $^{423}\text{Threonin}$ noch weitere nicht identifizierte Haftpunkte für die M_2/M_5 -Affinitätsdifferenz verantwortlich sein müssen.

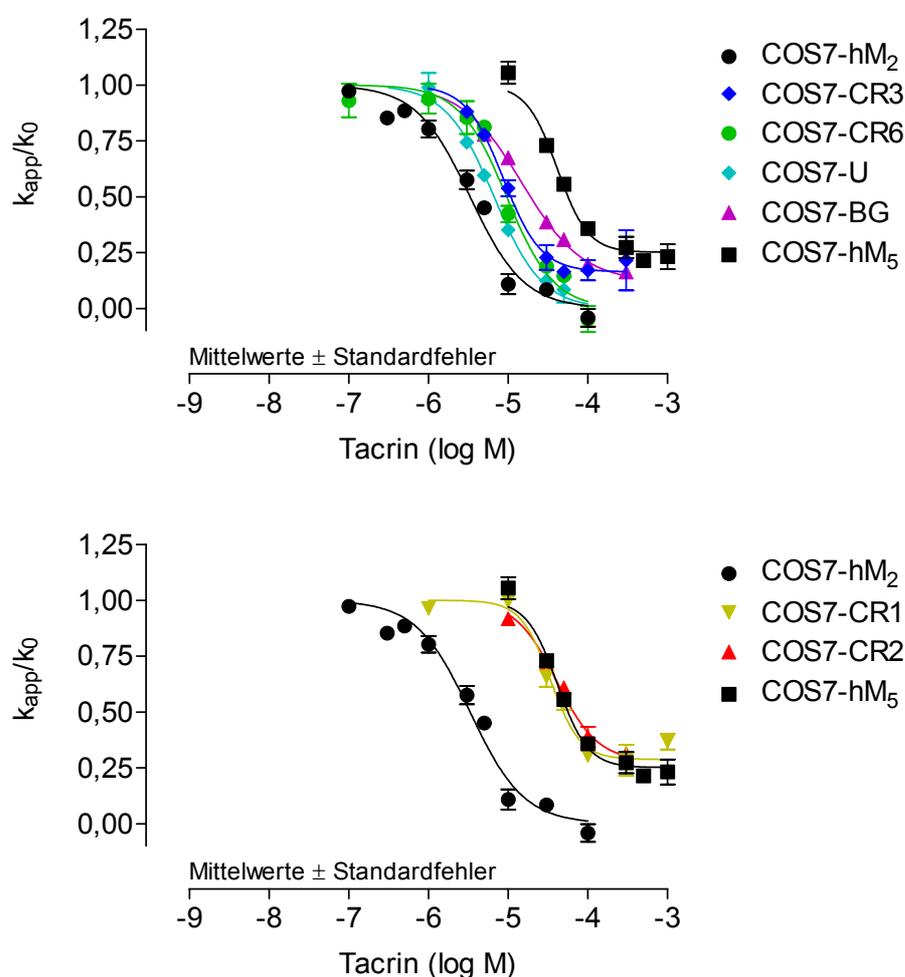


Abbildung 43: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverzögerung von Tacrin an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Tacrin. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Tacrin. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter:** Tabelle 19, S. 108. **Versuchscharakteristika:** Brandel Cell Harvester, Zweipunkterfassung.

Membran-suspension	$pEC_{0,5 \text{ Diss}}$	n_H	Max	N
COS7-hM ₂	5,48 ± 0,04	-1,29 ± 0,14	0 [†] (0,00 ± 0,06)	3
COS7-CR1	4,47 ± 0,04	-2,32 ± 0,56	0,29 ± 0,04	4
COS7-CR2	4,39 ± 0,05	-1,67 ± 0,31	0,28 ± 0,04	3
COS7-CR3	5,06 ± 0,04	-1,84 ± 0,35	0,16 ± 0,03	4
COS7-CR6	5,02 ± 0,04	-1,46 ± 0,19	0 [†] (0,00 ± 0,08)	3
COS7-U	5,18 ± 0,03	-1,43 ± 0,13	0 [†] (0,06 ± 0,05)	3
COS7-BG	4,82 ± 0,02	-1,15 ± 0,05	0,12 ± 0,02	3
COS7-hM ₅	4,38 ± 0,03	-2,26 ± 0,41	0,25 ± 0,03	6

Tabelle 19: Kenngrößen ± Standardfehler der Konzentrations-Wirkungs-Kurven des [³H]NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes von Tacrin an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. $pEC_{0,5 \text{ Diss}}$: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von Tacrin, die die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. n_H : Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. **Max**: maximaler Effekt des allosterischen Modulators Tacrin. **N**: Anzahl der unabhängigen Experimente. **Index[†]**: auf den angegebenen Wert festgesetzter Parameter, ohne statistisch signifikante Abweichung.

3.6.7 EHW21

Das Tacrin Dimer EHW21 ist nur schlecht wasserlöslich und wurde deshalb bei höheren Konzentrationen in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Wie in 3.5, S. 95 ausgeführt, hat DMSO selbst eine dissoziationsverzögernde Wirkung für [³H]NMS und kann die allosterische Wirksamkeit anderer Modulatoren bei einer Konzentration von 25% deutlich beeinflussen. Die Bestimmung der Plateaus und damit auch der Wendepunkte der Konzentrations-Wirkungskurven für die [³H]NMS-Dissoziation von EHW21 (Abbildung 44, S. 109) sind darum mit einem gewissen Unsicherheitsfaktor behaftet. Dennoch können für EHW21 deutliche Affinitätsmuster an den einzelnen Rezeptorpräparationen beobachtet werden. Ebenso wie Tacrin hat auch das Tacrin-Dimer nur eine geringe M₂/M₅-Selektivität (Affinitätsverhältnis = 16). Die Affinität zu CR3 liegt für EHW21 in der gleichen Größenordnung wie zu hM₂. Die chimären Rezeptoren CR2 und CR6 bedeuten für das Tacrin-Dimer EHW21 zwar einen Affinitätsgewinn gegenüber hM₅, erreichen aber nicht das hM₂-Niveau. An CR1 bindet EHW21 mit der gleichen Affinität wie an hM₅. Für EHW21 kann folgendes Affinitätsmuster definiert werden: M₂ ≈ CR3 > CR2 ≈ CR6 > M₅ (≈ CR1). Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von EHW21 an COS7-U legt nahe, dass hM₂

⁴²³Threonin keine Rolle für die M₂/M₅-Selektivität spielt. Nimmt man die Befunde aus den Versuchen an COS7-BG (hM₂ ¹⁷⁷Tyr→Gln, ⁴²³Thr→His) hinzu, kann vermutet werden, dass die Aminosäure hM₂ ¹⁷⁷Tyrosin, neben weiteren Bindungsepitopen, wichtig für den Affinitätsgewinn gegenüber hM₅ ist.

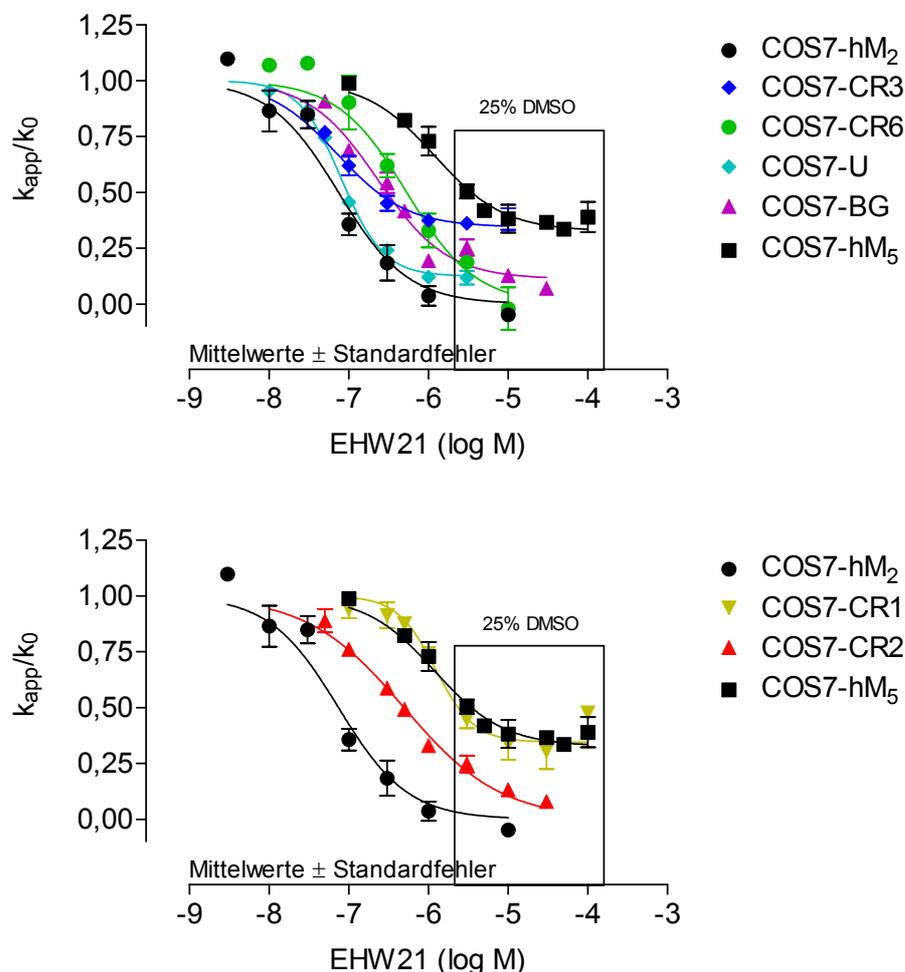


Abbildung 44: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung von EHW21 an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von EHW21. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von EHW21. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter:** Tabelle 20, S. 110. **Versuchscharakteristika:** Brandel Cell Harvester, Zweipunkt-erfassung. **25% DMSO:** Einrahmung der Datenpunkte, die in Gegenwart einer Konzentration von 25% Dimethylsulfoxid ermittelt wurden (3.5, S. 95).

Membran-suspension	$pEC_{0,5\text{ Diss}}$	n_H	Max	N
COS7-hM ₂	7,13 ± 0,08	-1 [†] (-1,37 ± 0,32)	0 [†] (0,00 ± 0,08)	3
COS7-CR1	5,91 ± 0,07	-1,79 ± 0,52	0,35 ± 0,04	4
COS7-CR2	6,31 ± 0,03	-0,71 ± 0,05	0 [†] (0,08 ± 0,03)	3
COS7-CR3	7,15 ± 0,09	-1 [†] (-1,38 ± 0,38)	0,34 ± 0,02	4
COS7-CR6	6,27 ± 0,09	-1 [†] (-1,15 ± 0,32)	0 [†] (0,00 ± 0,11)	3
COS7-U	7,09 ± 0,03	-1,63 ± 0,15	0,12 ± 0,02	3
COS7-BG	6,63 ± 0,06	-1 [†] (-1,02 ± 0,15)	0,11 ± 0,03	3
COS7-hM ₅	5,92 ± 0,11	-1 [†] (-1,40 ± 0,37)	0,33 ± 0,03	6

Tabelle 20: Kenngrößen ± Standardfehler der Konzentrations-Wirkungs-Kurven des [³H]NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes von EHW21 an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. $pEC_{0,5\text{ Diss}}$: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von EHW21, die die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. n_H : Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. **Max**: maximaler Effekt des allosterischen Modulators EHW21. **N**: Anzahl der unabhängigen Experimente. **Index[†]**: auf den angegebenen Wert festgesetzter Parameter, ohne statistisch signifikante Abweichung.

3.7 Abhängigkeit der allosterischen Wirkung von der Art der Membransuspension und den Versuchscharakteristika

Ausgangspunkt für die nachfolgenden Untersuchungen war diese Beobachtung: Vergleicht man die Ergebnisse aus Dissoziationsexperimenten mit Duo3, die zum einen an einer Einzelfilteranlage mit Mehrpunkterfassung des Dissoziationsverlaufs des Radioliganden an HSV-(M₂)-Membransuspensionen, und zum anderen am Brandel Cell Harvester mit Zweipunkterfassung des Dissoziationsverlaufs an COS7-hM₂-Membransuspensionen durchgeführt werden, so werden deutlich von einander abweichende Ergebnisse erhalten (Abbildung 46, S. 112). Die Differenz der $pEC_{0,5\text{ Diss}}$ -Werte liegt bei ca. einer Dekade. Ein offensichtlicher Unterschied zwischen der COS7-hM₂- und der HSV-(M₂)- Membransuspension ist die jeweilige Herkunft des M₂-Rezeptors. Es wurde davon ausgegangen, dass die HSV-(M₂)-Membransuspension im wesentlichen den (porcinen) M₂-Rezeptor enthält (Krejci und Tucek, 2002). Bei der COS7-hM₂-Membransuspension kann unterstellt werden, dass nur humaner M₂-Rezeptor enthalten ist. Die Aminosäuresequenz des porcinen M₂-Rezeptors ist zu 97,4% mit der des humanen Rezeptors identisch:

	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101	111													
ACM2-HUMAN	MNNSTNSSNS	LALTS	SPYKTFE	VVFLV	VAGSLSL	VTIIG	NILVM	VSIRV	NHRLQ	TVMNY	FLFSL	LACADLI	IGVFS	MNLYT	LYTVI	GYWPL	GPVVCDL	WLWALD	YVVSNA	SVMNLLI	SFD				
ACM2-PIG	MNNSTNSSN	SGLALTS	SPYKTFE	VVFLV	VAGSLSL	VTIIG	NILVM	VSIRV	NHRLQ	TVMNY	FLFSL	LACADLI	IGVFS	MNLYT	LYTVI	GYWPL	GPVVCDL	WLWALD	YVVSNA	SVMNLLI	SFD				
Consensus	mnnstnssn	laltspyk	tfefv	vlv	vagsls	slvtiig	nilvm	vsikv	nrhlq	tvmny	flfsl	acadii	igv	fsmny	lytly	tvigw	plgp	vvcdl	wlaldy	vvsnas	vmnllis	fd			
	121	131	141	151	161	171	181	191	201	211	221	231													
ACM2-HUMAN	RYFCVTK	PLTYPV	KRTTK	MAGMMIA	AAVLS	FILWAP	AILFW	QFIVG	VRTVED	GECYIQ	FFSNA	AVTFG	TAAAF	YLPVI	IMTVL	YWHISR	AKSR	RIKDK	KEPVANQ	DPVSP	SLVQ	GRI			
ACM2-PIG	RYFCVTK	PLTYPV	KRTTK	MAGMMIA	AAVLS	FILWAP	AILFW	QFIVG	VRTVED	GECYIQ	FFSNA	AVTFG	TAAAF	YLPVI	IMTVL	YWHISR	AKSR	RIKDK	KEPVANQ	DPVSP	SLVQ	GRI			
Consensus	ryfcv	tkplty	pvkrttk	magmmia	aaavl	silwap	ailfw	qfivg	rvrtved	gecyiq	ffsna	avtfg	taafyl	pviim	tvlywh	isrask	srikkdk	kepv	anq	pvsp	slvq	gri			
	241	251	261	271	281	291	301	311	321	331	341	351													
ACM2-HUMAN	VKPNMNM	PSDD	GLEHN	KIQNG	KAPR	PVTENC	VQGE	EKSSND	STSVS	AVAS	MMRDE	ITQDENT	VSTSL	LGHSK	DENSK	QTCIRI	GTKT	PKSD	SCTP	ANTT	VEV	VGSS	GQNG	DEKQNI	
ACM2-PIG	VKPNMNM	PSDE	LEHN	KIQNG	KAPR	PVTENC	VQGE	EKSSND	STSVS	AVAS	MMRDE	ITQDENT	VSTSL	LGHSK	DENSK	QTCIKI	VTKT	QKSD	SCTP	ANTT	VEV	VGSS	GQNG	DEKQNI	
Consensus	vkpnmnm	psdlehn	kinqng	kapr	pvtenc	vqgeek	ssndst	svsava	smmrde	itqdent	vstslg	hskdens	ktc	i	tk	kdsctp	nttve	vgss	gngdek	qni					
	361	371	381	391	401	411	421	431	441	451	461	471													
ACM2-HUMAN	VARKIVK	MTKQ	PAKKK	PPSRE	KVTR	TILAIL	LAFIIT	WAPY	NVNL	INTF	CAP	IPNT	VWTIG	YWL	CYIN	STIN	PAC	YAL	CNAT	FKK	TFK	HLLM	CHYK	NI	GATR
ACM2-PIG	VARKIVK	MTKQ	PAKKK	PPSRE	KVTR	TILAIL	LAFIIT	WAPY	NVNL	INTF	CAP	IPNT	VWTIG	YWL	CYIN	STIN	PAC	YAL	CNAT	FKK	TFK	HLLM	CHYK	NI	GATR
Consensus	varkivk	mtkqp	akkkpp	srekkv	trtila	ilailaf	iiwapy	nvnlint	fcap	ipntv	wtigy	wlcyin	stinp	ac	yalcn	atfkk	tfkhl	mch	ykni	gatr					

Abbildung 45: Vergleich (alignment) der Aminosäuren des humanen (ACM2-HUMAN) und porcinen (ACM2-PIG) muskarinischen Acetylcholin-Rezeptors M₂. Identische Aminosäuren sind gelb unterlegt.

Allosterische Modulatoren binden in den extrazellulären Regionen des Muskarin-Rezeptors (Proska und Tucek, 1994; Burgmer et al., 1998). Bezogen auf diese extrazellulär liegenden Bereiche gibt es nur zwei Aminosäuren in Position 10 und 11, die im humanen und porcinen M₂-Rezeptor unterschiedlich sind (human: ¹⁰Asparagin, ¹¹Serin; porcine: ¹⁰Serin, ¹¹Glycin). Alle weiteren Aminosäurenunterschiede beziehen sich auf intrazelluläre Regionen des Rezeptors und spielen für die Bindung der Modulatoren wohl keine Rolle. Um den Aminosäurenunterschied in Position 10 und 11 auszugleichen, wurde ausgehend vom humanen hM₂-Rezeptor der mutierte Rezeptor hM₂ ¹⁰Asn→Ser, ¹¹Ser→Gly (COS7-BJ) entwickelt und in COS7-Zellen transient transfiziert. Es wurde erwartet, dass sich die COS7-BJ-Membransuspension in Dissoziationsexperimenten mit allosterischen Modulatoren wie die HSV-(M₂)-Membransuspension verhalten sollte. Dies konnte nicht bestätigt werden. Stattdessen wurde beobachtet, dass die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Duo3 (3.7.1, S. 112), WDuo3 (3.7.2, S. 113), Tacrin (3.7.3, S. 115) und EHW21 (3.7.4, S. 116) auf die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung nahezu identisch sind, wenn sie mit der COS7-hM₂- oder der COS7-BJ-Membransuspension ermittelt werden. Insgesamt wurden Dissoziationsexperimente am Brandel Cell Harvester mit Zweipunkterfassung mit den allosterischen Modulatoren Duo3, WDuo3, Tacrin und EHW21 an Membransuspensionen mit humanem M₂- und M₅-Rezeptor aus COS7-Zellen und CHO-Zellen, an Membransuspensionen aus Herzventrikeln des Hauschweins (HSV-(M₂)) und Membransuspensionen aus COS7-Zellen mit dem mutierten Rezeptor hM₂ ¹⁰Asn→Ser, ¹¹Ser→Gly (COS7-BJ) durchgeführt. Die Membransuspensionen aus CHO-Zellen wurden in die Experimente einbezogen, um die Frage zu beantworten, ob bei identischer Aminosäuresequenz des Rezeptors

(hM₂ bzw. hM₅), aber unterschiedlichen Expressionssystemen (transiente Transfektion in COS7-Zellen oder stabil transfizierte CHO-Zellen) unterschiedliche Affinitäten für allosterische Modulatoren am Radioligand besetzten Rezeptor gefunden werden. Die Dissoziationsexperimente an CHO-hM₅- und COS7-hM₅-Membransuspensionen liefern Konzentrations-Wirkungs-Kurven, die sowohl in Lage (pEC_{0,5 Diss}) als auch in Form (n_H und Max) nahezu identisch sind. Für die Modulatoren Duo3, WDuo3, Tacrin und EHW21 werden die Ergebnisse aus Dissoziationsexperimenten für den M₂-Rezeptor (aus COS7-Zellen, CHO-Zellen oder HSV) im Einzelnen besprochen.

3.7.1 Duo3

An den Membransuspensionen COS7-hM₂ und COS7-BJ liefert Duo3 Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit der Steigung n_H = -1 und identischen pEC_{0,5 Diss}-Werten (Abbildung 46). Die KWK an den Membransuspensionen CHO-hM₂ und HSV-(M₂) sind dagegen steil, und liegen verglichen mit der Kurve für COS7-hM₂ deutlich weiter rechts. Die Ergebnisse aus Experimenten mit HSV-(M₂) an der Einzelfilteranlage (gestrichelte Linie) und am Brandel Cell Harvester liefern nur marginale Unterschiede.

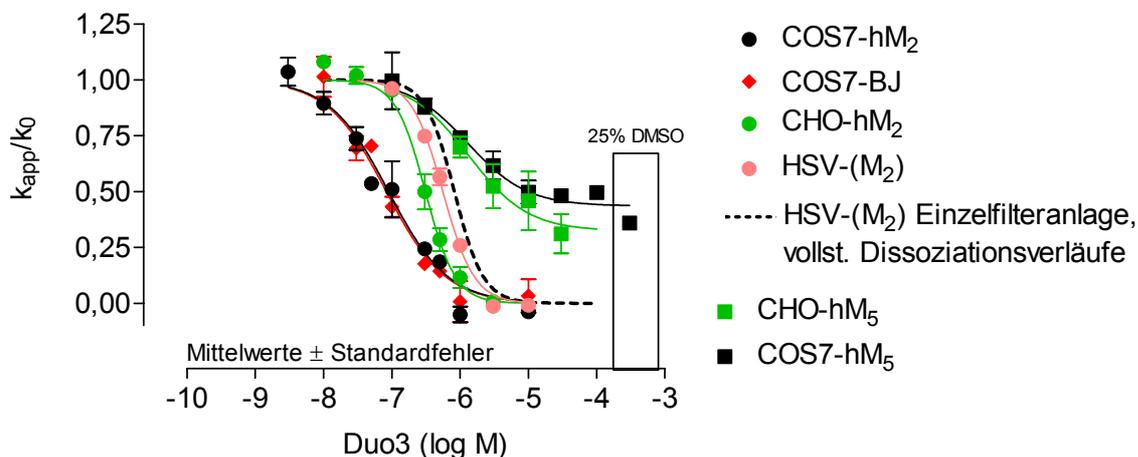


Abbildung 46: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung von Duo3 an diversen Membransuspensionen. **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Duo3. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Duo3. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter:** Tabelle 21, S. 113. **Versuchscharakteristika:** Brandel Cell Harvester, Zweipunkterfassung (gestrichelte Linie: Einzelfilteranlage und Mehrpunkterfassung), Membransuspensionen aus COS7-Zellen, CHO-Zellen und Herzventrikeln des Hausschweins (HSV-(M₂)). **25% DMSO:** Einrahmung der Datenpunkte, die in Gegenwart einer Konzentration von 25% Dimethylsulfoxid ermittelt wurden (3.5, S. 95).

Membran-suspension	$pEC_{0,5 \text{ Diss}}$	n_H	Max	N
COS7-hM ₂ ^a	7,05 ± 0,09	-1 ^f (-0,90 ± 0,24)	0 ^f (0,00 ± 0,12)	3
COS7-BJ ^a	7,08 ± 0,06	-1 ^f (-1,36 ± 0,27)	0 ^f (0,03 ± 0,06)	3
CHO-hM ₂ ^a	6,51 ± 0,03	-1,97 ± 0,38	0 ^f (0,02 ± 0,06)	3
HSV-(M ₂) ^a	6,25 ± 0,02	-1,89 ± 0,15	0 ^f (0,00 ± 0,03)	3
HSV-(M ₂) ^b	6,08 ± 0,02	-2,04 ± 0,15	0,00 ± 0,03	16
CHO-hM ₅ ^a	5,88 ± 0,25	-1 ^f (-0,52 ± 0,76)	0,32 ± 0,09	2
COS7-hM ₅ ^a	5,89 ± 0,12	-1 ^f (-0,94 ± 0,24)	0,44 ± 0,03	6

Tabelle 21: Kenngrößen ± Standardfehler der Konzentrations-Wirkungs-Kurven des [³H]NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes von Duo3 an diversen Membransuspensionen. $pEC_{0,5 \text{ Diss}}$: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von Duo3, die die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. n_H : Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. **Max**: maximaler Effekt des allosterischen Modulators Duo3. **N**: Anzahl der unabhängigen Experimente. **Index**^a: Brandel Cell Harvester, Dissoziationsverlauf: Zweipunkterfassung. **Index**^b: Einzelfilteranlage, Dissoziationsverlauf: Mehrpunkterfassung. **Index**^f: auf den angegebenen Wert festgesetzter Parameter, ohne statistisch signifikante Abweichung.

3.7.2 *WDuo3*

An allen Membransuspensionen mit dem M₂-Rezeptor liefert der Modulator *WDuo3* Konzentrations-Wirkungs-Kurven, die eine von $n_H = -1$ nicht signifikant unterschiedliche Steilheit aufweisen (Abbildung 47, S. 114). Bezogen auf COS7-hM₂ werden mit CHO-hM₂ und HSV-(M₂) deutlich unterschiedliche $pEC_{0,5 \text{ Diss}}$ -Werte erhalten. Der Unterschied zu COS7-BJ ist nur ganz schwach ausgeprägt. Bemerkenswert ist die recht große Divergenz der Ergebnisse für die HSV-(M₂)-Membransuspension, wie sie erhalten wird, wenn einmal an der Einzelfilteranlage mit Mehrpunkterfassung des Dissoziationsverlaufs und ein anderes Mal am Brandel Cell Harvester mit Zweipunkterfassung des Dissoziationsverlaufs gearbeitet wird.

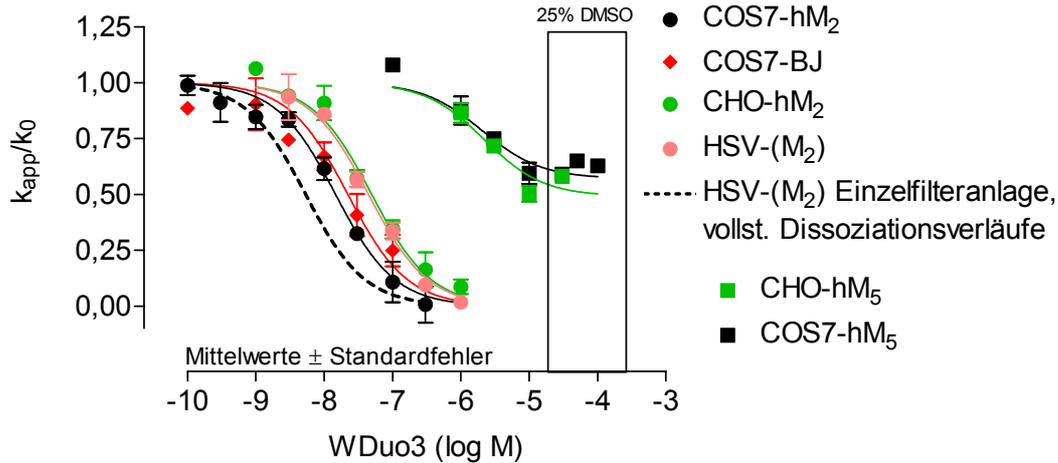


Abbildung 47: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsverzögerung von WDuo3 an diversen Membransuspensionen. **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von WDuo3. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von WDuo3. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter:** Tabelle 22, S. 114. **Versuchscharakteristika:** Brandel Cell Harvester, Zweipunkterfassung (nur gestrichelte Linie: Einzelfilteranlage und Mehrpunkterfassung), Membransuspensionen aus COS7-Zellen, CHO-Zellen und Herzventrikeln des Hausschweins (HSV-(M₂)). **25% DMSO:** Einrahmung der Datenpunkte, die in Gegenwart einer Konzentration von 25% Dimethylsulfoxid ermittelt wurden (3.5, S. 95).

Membransuspension	$pEC_{0,5 \text{ Diss}}$	n_H	Max	N
COS7-hM ₂ ^a	$7,83 \pm 0,06$	$-1^{\dagger} (-0,79 \pm 0,18)$	$0^{\dagger} (0,00 \pm 0,14)$	4
COS7-BJ ^a	$7,65 \pm 0,08$	$-1^{\dagger} (-0,68 \pm 0,27)$	$0^{\dagger} (0,00 \pm 0,28)$	3
CHO-hM ₂ ^a	$7,31 \pm 0,06$	$-1^{\dagger} (-1,28 \pm 0,29)$	$0^{\dagger} (0,11 \pm 0,07)$	3
HSV-(M ₂) ^a	$7,35 \pm 0,04$	$-1^{\dagger} (-0,97 \pm 0,16)$	$0^{\dagger} (0,00 \pm 0,09)$	3
HSV-(M ₂) ^b	$8,29 \pm 0,02$	$-1^{\dagger} (-1,04 \pm 0,13)$	$0,01 \pm 0,07$	9
CHO-hM ₅ ^a	$5,66 \pm 0,14$	$-1^{\dagger} (-1,62 \pm 0,51)$	$0,49 \pm 0,04$	2
COS7-hM ₅ ^a	$5,69 \pm 0,15$	$-1^{\dagger} (-1,48 \pm 0,58)$	$0,57 \pm 0,03$	7

Tabelle 22: Kenngrößen \pm Standardfehler der Konzentrations-Wirkungs-Kurven des $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes von WDuo3 an diversen Membransuspensionen. $pEC_{0,5 \text{ Diss}}$: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von Duo3, die die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. n_H : Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. **Max:** maximaler Effekt des allosterischen Modulators WDuo3. **N:** Anzahl der unabhängigen Experimente. **Index^a:** Brandel Cell Harvester, Dissoziationsverlauf: Zweipunkterfassung. **Index^b:** Einzelfilteranlage, Dissoziationsverlauf: Mehrpunkterfassung. **Index[†]:** auf den angegebenen Wert festgesetzter Parameter, ohne statistisch signifikante Abweichung.

3.7.3 Tacrin

Für den allosterischen Modulator Tacrin konnten in Dissoziationsexperimenten im Wesentlichen gleiche Ergebnisse erzielt werden, wenn die Membransuspensionen COS7-hM₂, COS7-BJ, CHO-hM₂ und HSV-(M₂) eingesetzt wurden (Abbildung 48). Ein Einfluss der Filtrationsanlage oder der Versuchscharakteristika konnte bei Tacrin nicht beobachtet werden.

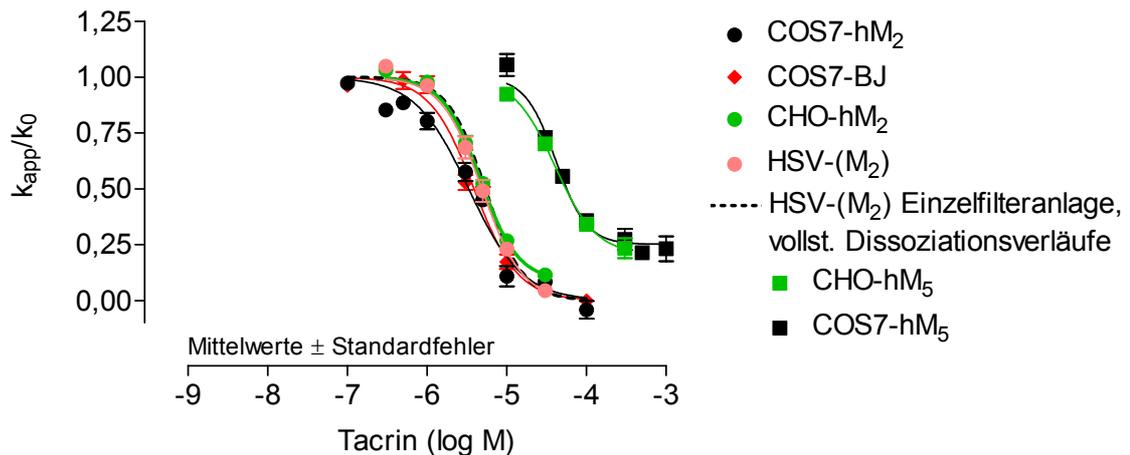


Abbildung 48: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung von Tacrin an diversen Membransuspensionen. **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von Tacrin. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Tacrin. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter:** Tabelle 23, S. 116. **Versuchscharakteristika:** Brandel Cell Harvester, Zweipunkterfassung (nur gestrichelte Linie: Einzelfilteranlage und Mehrpunkterfassung), Membransuspensionen aus COS7-Zellen, CHO-Zellen und Herzventrikeln des Hausschweins (HSV-(M₂)).

Membran-suspension	$pEC_{0,5 \text{ Diss}}$	n_H	Max	N
COS7-hM ₂	5,48 ± 0,04	-1,29 ± 0,14	0 ^f (0,00 ± 0,06)	3
COS7-BJ	5,41 ± 0,03	-1,57 ± 0,18	0 ^f (0,08 ± 0,04)	3
CHO-hM ₂	5,33 ± 0,03	-1,84 ± 0,20	0,09 ± 0,04	3
HSV-(M ₂) ^a	5,31 ± 0,02	-1,70 ± 0,17	0 ^f (0,01 ± 0,06)	3
HSV-(M ₂) ^b	5,29 ± 0,01	-1,98 ± 0,06	0,03 ± 0,01	16
CHO-hM ₅	4,40 ± 0,05	-1,69 ± 0,27	0,21 ± 0,04	2
COS7-hM ₅	4,38 ± 0,03	-2,26 ± 0,41	0,25 ± 0,03	6

Tabelle 23: Kenngrößen ± Standardfehler der Konzentrations-Wirkungs-Kurven des [³H]NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes von Tacrin an diversen Membransuspensionen. $pEC_{0,5 \text{ Diss}}$: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von Tacrin, die die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. n_H : Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. **Max**: maximaler Effekt des allosterischen Modulators Tacrin. **N**: Anzahl der unabhängigen Experimente. **Index**^a: Brandel Cell Harvester, Dissoziationsverlauf: Zweipunkterfassung. **Index**^b: Einzelfilteranlage, Dissoziationsverlauf: Mehrpunkterfassung. **Index**^f: auf den angegebenen Wert festgesetzter Parameter, ohne statistisch signifikante Abweichung.

3.7.4 EHW21

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus Dissoziationsexperimenten mit [³H]NMS an COS7-hM₂- und COS7-BJ-Membransuspensionen sind nahezu deckungsgleich (Abbildung 49, S. 117). Bezogen auf den $pEC_{0,5 \text{ Diss}}$ -Wert ermittelt an der COS7-hM₂-Membransuspension weichen die $pEC_{0,5 \text{ Diss}}$ -Werte bestimmt an den CHO-hM₂- und HSV-(M₂)-Membransuspensionen deutlich von einander ab. Je nachdem, ob an der Einzelfilteranlage mit Mehrpunkterfassung des [³H]NMS-Dissoziationsverlaufs oder am Brandel Cell Harvester mit Zweipunkterfassung des Dissoziationsverlaufs des Radioliganden gearbeitet wurde, ergaben sich Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die HSV-(M₂)-Membransuspension, die zwar ähnliche $pEC_{0,5 \text{ Diss}}$ -Werte, aber deutlich unterschiedliche Kurvensteilheiten aufweisen. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für CHO-hM₂ ist ebenfalls ungewöhnlich steil.

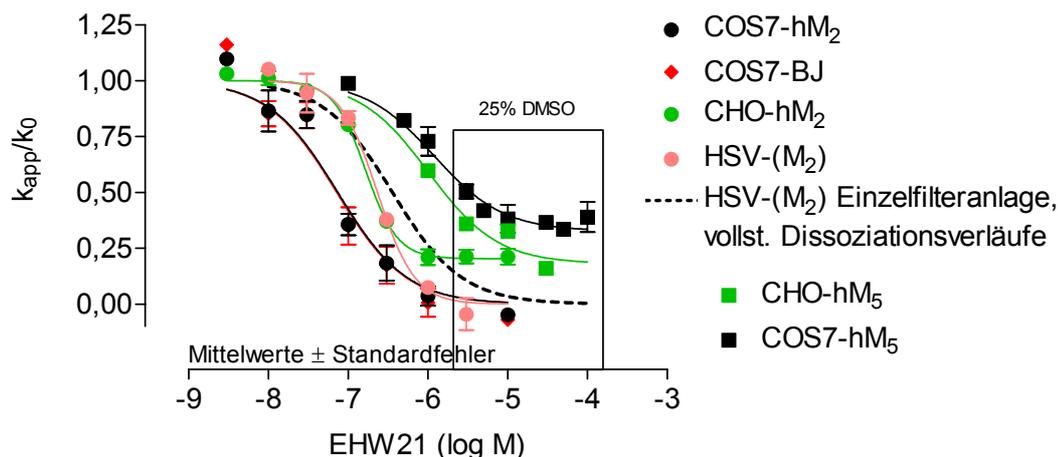


Abbildung 49: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsverzögerung von EHW21 an diversen Membransuspensionen. **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit von EHW21. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von EHW21. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Zielparameter:** Tabelle 24, S. 117. **Versuchscharakteristika:** Brandel Cell Harvester, Zweipunkterfassung (nur gestrichelte Linie: Einzelfilteranlage und Mehrpunkterfassung), Membransuspensionen aus COS7-Zellen, CHO-Zellen und Herzventrikeln des Hausschweins (HSV-(M₂)). **25% DMSO:** Einrahmung der Datenpunkte, die in Gegenwart einer Konzentration von 25% Dimethylsulfoxid ermittelt wurden (3.5, S. 95).

Membran-suspension	$\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss}}$	n_H	Max	N
COS7-hM ₂	$7,13 \pm 0,08$	$-1^{\dagger} (-1,37 \pm 0,32)$	$0^{\dagger} (0,00 \pm 0,08)$	3
COS7-BJ	$7,14 \pm 0,08$	$-1^{\dagger} (-1,33 \pm 0,32)$	$0^{\dagger} (0,00 \pm 0,08)$	3
CHO-hM ₂	$6,78 \pm 0,03$	$-2,17 \pm 0,21$	$0,20 \pm 0,02$	3
HSV-(M ₂) ^a	$6,63 \pm 0,03$	$-1,85 \pm 0,23$	$0^{\dagger} (0,00 \pm 0,06)$	3
HSV-(M ₂) ^b	$6,46 \pm 0,04$	$-1 (-1,20 \pm 0,04)$	$0,00 \pm 0,03$	18
CHO-hM ₅	$5,99 \pm 0,11$	$-1^{\dagger} (-0,69 \pm 0,24)$	$0,18 \pm 0,03$	2
COS7-hM ₅	$5,92 \pm 0,11$	$-1^{\dagger} (-1,40 \pm 0,37)$	$0,33 \pm 0,03$	6

Tabelle 24: Kenngrößen \pm Standardfehler der Konzentrations-Wirkungs-Kurven des $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsverzögerungs-Effektes von EHW21 an diversen Membransuspensionen. $\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss}}$: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration von EHW21, die die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des Radioliganden halbmaximal reduziert. n_H : Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. **Max:** maximaler Effekt des allosterischen Modulators EHW21. **N:** Anzahl der unabhängigen Experimente. **Index**^a: Brandel Cell Harvester, Dissoziationsverlauf: Zweipunkterfassung. **Index**^b: Einzelfilteranlage, Dissoziationsverlauf: Mehrpunkterfassung. **Index**[†]: auf den angegebenen Wert festgesetzter Parameter, ohne statistisch signifikante Abweichung.

3.8 Einfluss allosterischer Modulatoren auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS

In Experimenten unter Gleichgewichtsbedingungen (2.7.2, S. 40) wurde der Einfluss der Substanzen Gallamin, Duo3, Tacrin, EHW21, WDuo3 und Eburnamonin auf die Bindung von [³H]NMS untersucht. Es wurden jeweils zwei unterschiedliche [³H]NMS-Konzentrationen eingesetzt, um bei negativer Kooperativität durch Erhöhung der Radioligandkonzentration und bei positiver Kooperativität durch Erniedrigung der Konzentration von [³H]NMS, den kooperativen Charakter der jeweiligen Interaktion besser sichtbar zu machen. Außer der Beschreibung der kooperativen Interaktion durch den Kooperativitätsfaktor α , lieferten diese Experimente auch einen Affinitätsparameter K_A der allosterischen Modulatoren zum freien Acetylcholin-Rezeptor M_2 (Tabelle 25, S. 120). Gallamin, Duo3, Tacrin und EHW21 verringerten die Gleichgewichtsbindung des Radioliganden. Entsprechend diesen Untersuchungen interagieren [³H]NMS und die allosterischen Liganden Gallamin und Duo3 negativ kooperativ miteinander (Abbildung 50).

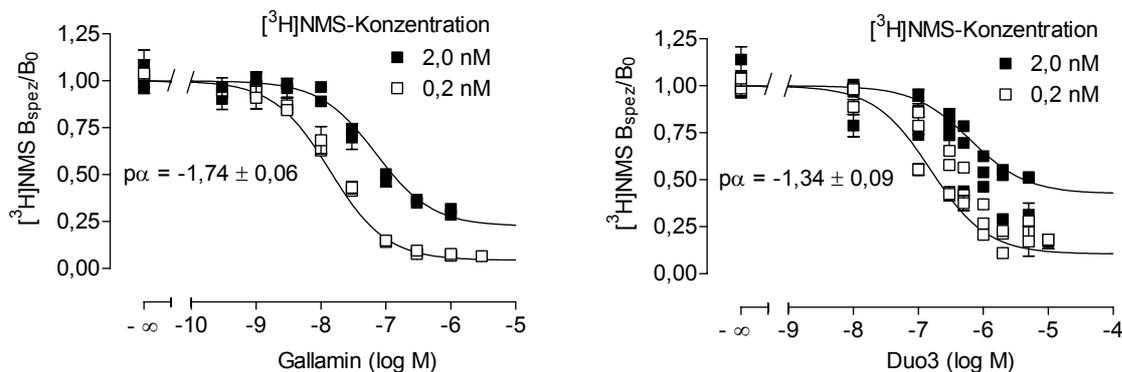


Abbildung 50: Heterologe allosterische Interaktion zwischen [³H]NMS und Gallamin / Duo3. **Ordinate:** spezifische [³H]NMS-Bindung B_{spez} bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des allosterischen Liganden B_0 . **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Liganden Gallamin / Duo3. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus einer Dreifachbestimmung einzelner Experimente. **Kurvenanpassung:** aus den Zielparametern nach Gleichung 13, S. 40 simulierte Kurve. **Zielparameter:** Tabelle 25, S. 120. **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, HSV-(M_2)-Membransuspension.

Bei der Interaktion von Tacrin und dem Tacrin-Dimer EHW21 kann formal nicht unterschieden werden, ob es sich um eine allosterische Interaktion oder um eine kompetitive Interaktion handelt (Abbildung 51, S. 119). Dies wird anhand der Kooperativitätsfaktoren ($\alpha \gg 100$) und der parallelen Rechtsverschiebung der Bindungskurve bei der höheren Radioligandkonzentration (2,0 nM) gegenüber der

Bindungskurve mit der niedrigeren Konzentration (0,2 nM) von [³H]NMS deutlich. Bei Tacrin ist außerdem augenfällig, dass die Kurvenanpassung nach Gleichung 13, S. 40 (Ehler-Modell) die Bindungsdaten nur unzureichend beschreibt. Eine bessere Kurvenanpassung müsste eine höhere Steilheit aufweisen.

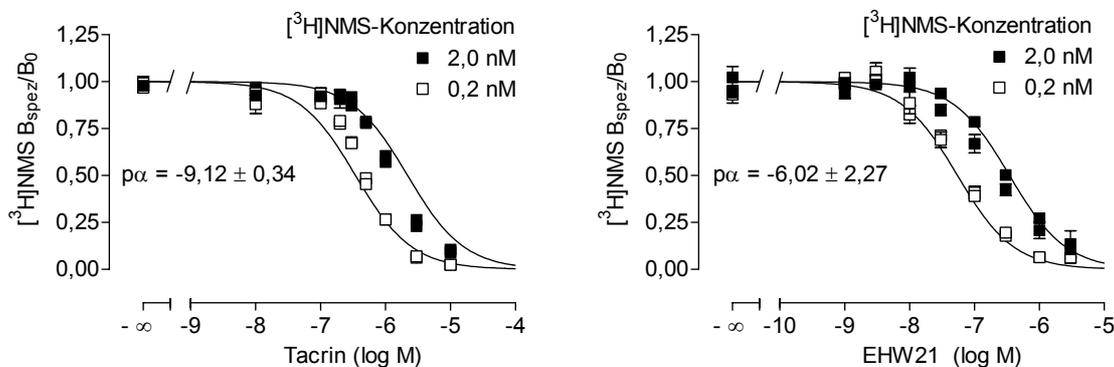


Abbildung 51: Heterologe allosterische Interaktion zwischen [³H]NMS und Tacrin / EHW21. **Ordinate:** spezifische [³H]NMS-Bindung B_{spez} bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des allosterischen Liganden B_0 . **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Liganden Tacrin / EHW21. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus einer Dreifachbestimmung einzelner Experimente. **Kurvenanpassung:** aus den Zielparametern nach Gleichung 13, S. 40 simulierte Kurve. **Zielparameter:** Tabelle 25, S. 120. **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Die allosterischen Modulatoren WDuo3 und Eburnamonin vermochten die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS zu erhöhen (Abbildung 52, S. 120). Die allosterische Interaktion zwischen dem Radioliganden und diesen beiden Modulatoren kann demnach als positiv kooperativ beschrieben werden. Die Messung einer Bindungsförderung im Falle einer positiven Kooperativität zwischen [³H]NMS und allosterischem Modulator erfordert eine Einstellung der fraktionellen Rezeptorbesetzung mittels Auswahl einer geeigneten Radioligand-Konzentration, die gewährleistet, dass bei maximaler Bindungsförderung die Anzahl der mit dem Radioliganden besetzten Rezeptoren unterhalb der Gesamtanzahl der Rezeptoren (B_{max}) bleibt. Die fraktionelle Rezeptorbesetzung (B/B_{max}) betrug 0,42 (42%) bei einer [³H]NMS-Konzentration von 0,1 nM und 0,59 (59%) bei 0,2 nM in Abwesenheit des Allostere. Für die Untersuchungen mit Eburnamonin bedeutet dies, dass bei den beiden eingesetzten Radioligandkonzentrationen der allosterische Modulator in der entsprechenden Konzentration die Bindung derart fördern kann, dass die Rezeptoren im Reaktionsgleichgewicht zu ca. 100% mit [³H]NMS besetzt sind.

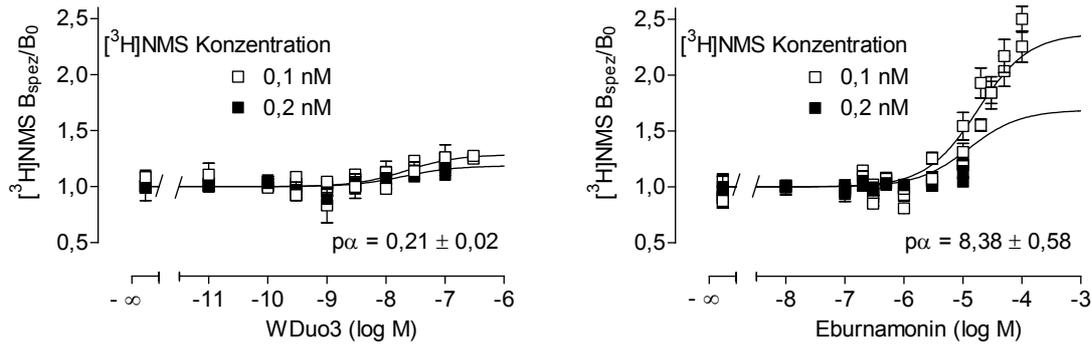


Abbildung 52: Heterologe allosterische Interaktion zwischen $[^3\text{H}]\text{NMS}$ und WDuo3 / Eburnamonin. **Ordinate:** spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung B_{spez} bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des allosterischen Liganden B_0 . **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Liganden WDuo3 / Eburnamonin. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus einer Dreifachbestimmung einzelner Experimente. **Kurvenanpassung:** aus den Zielparametern nach Gleichung 13, S. 40 simulierte Kurve. **Zielparameter:** Tabelle 25, S. 120. **Versuchscharakteristika:** Einzelfilteranlage, HSV-(M₂)-Membransuspension.

Alloster	pK_A	$\text{p}\alpha$	α	t (h)	N	$\text{p}(\alpha\text{K}_A)$	$\text{pEC}_{0,5}$ Diss
Gallamin	$8,24 \pm 0,07$	$-1,74 \pm 0,06$	54	12,5	4	6,50	7,03
Duo3	$7,17 \pm 0,13$	$-1,34 \pm 0,09$	22	47,5	6	5,83	6,08
Tacrin	$6,85 \pm 0,10$	$-9,12 \pm 0,34$	$\gg 100$	1,0	4	-	5,29
EHW21	$7,65 \pm 0,07$	$-6,02 \pm 2,27$	$\gg 100$	3,5	4	-	6,46
WDuo3	$7,55 \pm 0,15$	$0,21 \pm 0,02$	0,615	21,5	6	7,76	8,29
EBR	$3,25 \pm 0,52$	$8,38 \pm 0,58$	$\ll 0,001$	8,75	2 (6) ^a	-	5,37

Tabelle 25 : Kenngrößen \pm Standardfehler der heterologen allosterischen Interaktion zwischen $[^3\text{H}]\text{NMS}$ und den gelisteten allosterischen Liganden, berechnet als Mittelwerte aus Zielparametern unabhängiger Experimente. **pK_A :** negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_A des allosterischen Liganden. **$\text{p}\alpha$:** negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α ($\alpha > 1$: negative Kooperativität; $\alpha = 1$: neutrale Kooperativität; $0 < \alpha < 1$: positive Kooperativität). **t :** maximale Inkubationszeit (h) berechnet nach Gleichung 15, S. 42. **N:** Anzahl der unabhängigen Experimente. **Index^a:** zur Bestimmung der Zielparameter wurden 2 von 6 unabhängigen Experimenten herangezogen.

4. Diskussion

4.1 Einfluss der Methodik der Dissoziationsexperimente auf die Messergebnisse

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Protokolle für die Durchführung von Dissoziationsexperimenten mit [³H]NMS eingesetzt (2.8, S. 42). Diese Experimente führten teilweise zu nicht identischen Ergebnissen. Bei Experimenten an HSV-(M₂)-Membransuspensionen (Haus-Schwein-Ventrikel) für Duo3, WDuo3 und EHW21 wurden Unterschiede in der Affinität und/oder der Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurven (3.7, S. 110 ff) festgestellt, je nachdem, ob am Brandel Cell Harvester mit Zweipunkterfassung des Dissoziationsverlaufs oder an der Einzelfilteranlage mit Mehrpunkterfassung des Dissoziationsverlaufs gearbeitet wurde. Die Konzentrations-Wirkungskurve (KWK) für die Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation an HSV-(M₂) durch WDuo3 lag um etwa eine Dekade weiter rechts, wenn sie im Zweipunkt-Experiment am Brandel Cell Harvester anstatt im Mehrpunkt-Experiment an der Einzelfilteranlage ermittelt wurde. Die KWK von Duo3 war geringfügig nach links verschoben. Für Tacrin und EHW21 spielte es hinsichtlich des ermittelten pEC_{0,5 Diss}-Wertes keine Rolle, nach welchem Versuchsprotokoll verfahren wurde. Die Kurvensteilheit jedoch war für EHW21 unterschiedlich. Im Folgenden wird dargelegt, worauf die gefundenen Unterschiede in Abhängigkeit von der Methode mutmaßlich zurückgeführt werden können, und weshalb die erhaltenen Experimentalbefunde dennoch zur Beantwortung der Fragestellungen geeignet waren. Die Unterschiede zwischen beiden Methoden sind in Tabelle 26 aufgelistet.

	Zweipunkt-Erfassung	Mehrpunkt-Erfassung
[³ H]NMS-Konzentration	1 nM	0,2 nM
Filter	Filtermatte (Stanzlinge)	Einzelne Rundfilter
Zubereitung der Startlösung	Borsilikatglas	Polyethylengefäß

Tabelle 26: Methodische Unterschiede in der Durchführung von Dissoziationsexperimenten

Aus methodischen Überlegungen heraus sollte es keine Rolle spielen, ob der Dissoziationsverlauf eines Radioliganden zu mehrfachen oder lediglich zu zwei geeigneten Zeitpunkten erfasst wird. Die Erfassung lediglich zweier Zeitpunkte des Dissoziationsverlaufs entspricht einer etablierten Methode (Kostenis und Mohr, 1996) und ist einer Mehrpunkterfassung gleichwertig. Es erscheint auch nicht plausibel, die

Ursache der beobachteten Abweichungen in der unterschiedlichen [^3H]NMS-Konzentration zu suchen. Da die Zielgröße die Verzögerung der Dissoziation des Radioliganden ist, sollte es prinzipiell keine Rolle spielen, von welchem absoluten Niveau an besetzten Rezeptoren ausgegangen wird. Theoretisch ist vorstellbar, dass verschiedene Filter die an die Membransuspension gebundene Radioaktivität im unterschiedlichen Ausmaß zurückzuhalten vermögen. Wäre dies der Fall, müsste für alle vier untersuchten Modulatoren ein vergleichbarer „Filtereffekt“ zu beobachten sein. Dem war nicht so. Jedoch konnte U. Burgmer (1997) durch UV-spektroskopische Messungen nachweisen, dass allosterische Modulatoren an der Oberfläche eines Reagenzglases in nicht unerheblichem Ausmaß adsorbiert werden können. Der relative Verlust durch Adsorption an das Glas war umso größer, je niedriger die Modulator-Konzentration war. Die Bindung an die Röhrenwand ist also sättigbar. So kann neben einer geringeren Wirksamkeit des allosterischen Modulators auch eine steilere KWK beobachtet werden. In Zweipunkt-Experimenten am Brandel Cell Harvester wurden in dieser Arbeit alle Lösungen und auch die Startlösung, die den Modulator enthielt, in einem Reagenzglas aus Borsilikat zubereitet. Es liegt nahe anzunehmen, dass auch hier eine Adsorption der Modulatoren an die Oberfläche des Reagenzglases stattfand. Dafür spricht, dass ein großer Messfehler bei WDuo3 auftrat, wo die eingesetzte Modulator-Konzentration aufgrund der hohen Affinität gering war. Auch die steilere KWK von EHW21 unter Zweipunkt-Messbedingungen lässt sich mit dem Unterschied erklären, dass die Startlösungen in Borsilikat-Gläsern anstelle von Polyethylengefäßen gemischt wurden. Die Affinitätsunterschiede für Duo3 ($\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss}} = 6,25 \pm 0,02$ und $6,08 \pm 0,02$) sind, obwohl statistisch signifikant (7, S. 168), nominell gering. Es kann daher vermutet werden kann, dass diese Unterschiede biologisch nicht relevant sind. In den nachfolgenden Kapiteln werden immer Ergebnisse untereinander verglichen, die mit der jeweils gleichen Methode ermittelt wurden. Im Falle von Antagonismus-Untersuchungen waren dies Mehrpunkt-Experimente an der Einzelfilteranlage. Die mutmaßlich durch Adsorptionseffekte beeinflussten Zweipunkt-Experimente am Brandel Cell Harvester waren Versuche an Rezeptormutanten, und hier wurden Vergleiche immer nur für eine gegebene Substanz bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Mutationen angestellt. Der vermutete Adsorptionseffekt an Glas spielt für die Diskussion der Ergebnisse daher keine Rolle.

4.2 Abhängigkeit der allosterischen Wirkung von der Aminosäuresequenz, der Glykosylierung und dem Expressionssystem des Rezeptors

In dieser Arbeit wurde beobachtet, dass sowohl die Affinität der allosterischen Modulatoren Duo3 und EHW21 als auch die Steilheit ihrer Konzentrations-Wirkungskurven für die Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation unterschiedlich sein können, je nachdem ob an COS7-hM₂⁻, CHO-hM₂⁻ oder an HSV-(M₂)-Membransuspensionen gemessen wurde. Mit W Duo3 wurde das Phänomen in geringerer Ausprägung und mit Tacrin nicht beobachtet. Dies ist in Abbildung 53 illustriert.

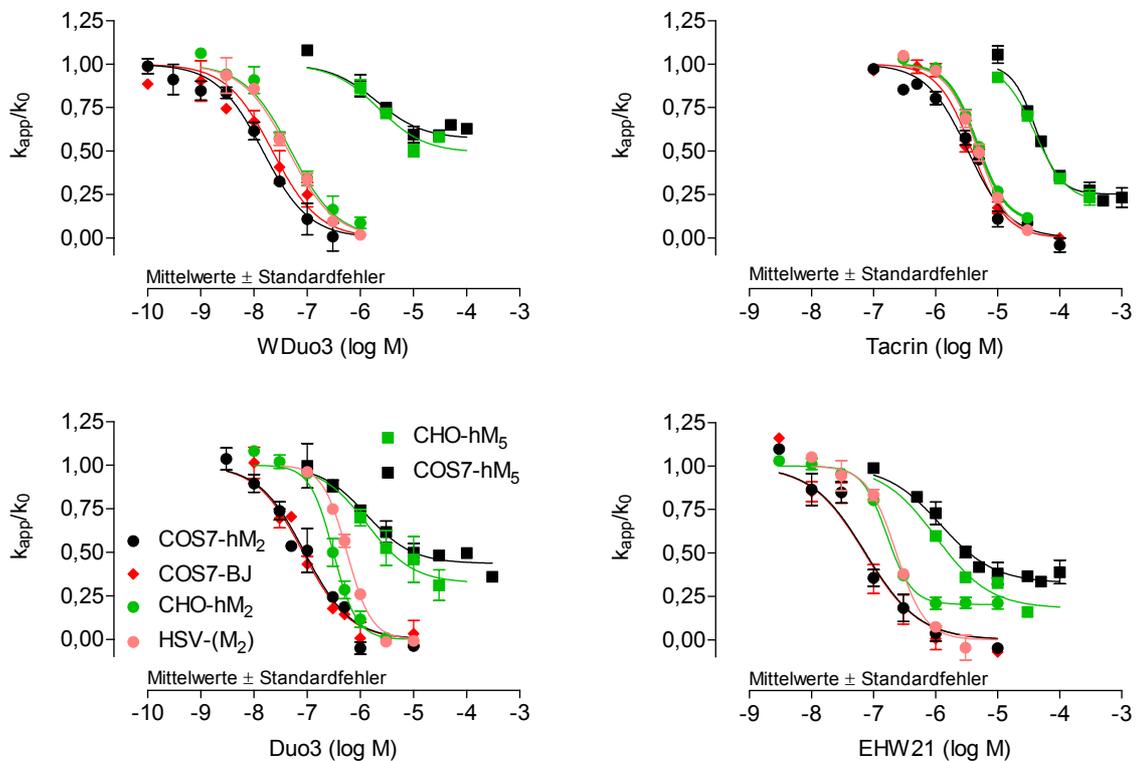


Abbildung 53: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung der allosterischen Modulatoren W Duo3, Duo3, Tacrin und EHW21 an den genannten Membransuspensionen (2.4, S. 22; COS7-BJ: hM₂¹⁰Asn→Ser¹¹Ser→Gly). **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit des allosterischen Modulators. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators. **Kurvenanpassung:** Gleichung 20, S. 44. **Versuchscharakteristika:** Brandel Cell Harvester, Zweipunkterfassung.

Im Folgenden werden Vergleiche zwischen jeweils zwei Rezeptorpräparaten angestellt.

COS7-hM₂ im Vergleich zu HSV-(M₂)

Der Unterschied der jeweils an COS7-hM₂ (schwarze Kreise in Abbildung 53, S. 123) und HSV-(M₂) (rosa Kreise) gemessenen Affinitäten ist für die allosterischen Modulatoren Duo3, WDuo3, EHW21 und Tacrin statistisch signifikant (7, S. 168). Der Unterschied für Tacrin ($pEC_{0,5 \text{ Diss}} = 5,48 \pm 0,04$ und $5,31 \pm 0,02$) ist jedoch so gering, dass er mutmaßlich biologisch nicht relevant ist. Bei Duo3 und EHW21 sind die Affinitätsunterschiede am größten und außerdem die Steilheiten der jeweiligen KWK unterschiedlich. An COS7-hM₂ ($n_H = -1$) interagiert Duo3 entsprechend dem Massenwirkungsgesetz im Gegensatz zur Interaktion an HSV-(M₂) ($n_H = -1,89$). Bei EHW21 ist es genau umgekehrt. An COS7-hM₂ wird eine hohe Kurvensteilheit beobachtet ($n_H = -1,85$) und an HSV-(M₂) ist die Kurvensteilheit normal ($n_H = -1$). HSV-(M₂) wird aus nativem Gewebe des Herzventrikels des Hausschweins gewonnen, während COS7-hM₂ aus transient transfizierten COS7-Zellen gewonnen wird. Für COS7-hM₂ kann aufgrund des Herstellungsverfahrens davon ausgegangen werden, dass nur humaner M₂-Rezeptor enthalten ist. Für HSV-(M₂) ist das Bild komplexer. Lange Zeit war man davon ausgegangen, dass die Herzfunktionen lediglich durch den M₂-Rezeptor moduliert werden und nur dieser Subtyp im Myokard enthalten ist (Bonner et al., 1987; Peralta et al., 1987a; Dorje et al., 1991). Es gibt zahlreiche neuere Hinweise, dass das Herz von Menschen, Hühnern, Ratten, Meerschweinchen, Kaninchen und Hunden außer dem M₂-Rezeptor auch andere M-Subtypen enthält (Jaiswal et al., 1989; Akahane et al., 1990; Tietje und Nathanson, 1991; Ford et al., 1992; Yang et al., 1992; Gadbut und Galper, 1994; Kan et al., 1996; Sharma et al., 1996; Sun et al., 1996; Sharma et al., 1997; Brodde und Michel, 1999; Shi et al., 1999; Wang et al., 2001). An Herzventrikeln der Ratte jedoch konnte gezeigt werden, dass der M₂-Rezeptor mit über 90% zahlenmäßig die M₁-, M₃- und M₄-Rezeptoren weit überwiegt (Krejci und Tucek, 2002). Unter der Annahme, dass auch HSV-(M₂) überwiegend den M₂-Rezeptor enthält, könnten die Unterschiede der KWK auf unterschiedlichen Aminosäuresequenzen des humanen (Bonner et al., 1987; Peralta et al., 1987a) und des porcinen (Kubo et al., 1986; Peralta et al., 1987b) M₂-Rezeptors beruhen. Da die „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ extrazellulär gelegen ist (Voigtländer et al., 2003), wurden nur die beiden Aminosäurenunterschiede (human: ¹⁰Asp, ¹¹Ser; porcine: ¹⁰Ser, ¹¹Gly) in extrazellulär

gelegenen Bereichen berücksichtigt (3.7, S. 110). Die im extrazellulären Bereich porcin gestaltete hM₂-Rezeptor-Mutante (COS7-BJ, rote Rauten in Abbildung 53, S. 123) lieferte die gleichen Ergebnisse wie der M₂-Wildtyp (COS7-hM₂). Der Unterschied der Aminosäuren in Position 9 und 10 des humanen und porcinen M₂-Rezeptors kann also den Unterschied der Ergebnisse aus Dissoziationsexperimenten an COS7-hM₂ und HSV-(M₂) nicht erklären.

Ein weiterer möglicher Unterschied zwischen dem humanen und porcinen M₂-Rezeptor ist eine unterschiedliche N-Glykosylierung, die im Zusammenhang mit der Aufklärung der jeweiligen Aminosäuresequenz postuliert wurde (Kubo et al., 1986; Bonner et al., 1987; Peralta et al., 1987a; Peralta et al., 1987b). Entsprechende Informationen können aus einschlägigen Gendatenbanken (z. B.: www.expasy.ch) bezogen werden. Der porcine M₂-Rezeptor kann an drei Stellen (²Asn, ³Asn, ⁶Asn) glykosyliert werden, der humane M₂-Rezeptor jedoch an vier Positionen (²Asn, ³Asn, ⁶Asn und ⁹Asn, Abbildung 58, S. 141 und Abbildung 59, S. 142). Der M₂-Rezeptor aus dem Schwein enthält in Position 9 zwar ebenfalls ein Asparagin, ein Zuckerrest kann hier aber nicht angeknüpft werden, weil dieses Asparagin nicht in die notwendige Aminosäureumgebung eingebettet ist. Damit eine N-Glykosylierung stattfinden kann, muss ein sogenanntes Glykosylierungs-Sequon, auch Konsensus-Sequenz genannt, vorhanden sein, das folgende Aminosäuresequenz aufweist: Asn-X-Ser/Thr (Kasturi et al., 1995; Shakin-Eshleman et al., 1996; Helenius und Aebi, 2001). Das X steht für eine beliebige Aminosäure außer Prolin und Aspartat. Die erwähnten Asparagin-Reste stellen potentielle Glykosylierungsstellen dar und können je nach Spezies mit unterschiedlicher Effizienz glykosyliert werden. Je nach Spezies können die angehängten Zuckerreste unterschiedlich in ihrer Zusammensetzung und auch unterschiedlich verzweigt sein (Helenius und Aebi, 2001). Von Hormonen, z.B. LH, FSH und TSH (Green und Baenziger, 1988), sowie dem Antikörper IgG (Raju et al., 2000), weiß man, dass die N-Glykane dieser Glykoproteine essentiell für deren biologische Wirkung sind. Für den Einsatz gentechnisch hergestellten IgGs in der Humantherapie ist daher die Forderung aufgestellt worden, in der Herstellung „geeignete“ Zell-Linien zu verwenden. Eine Zell-Linie wäre in diesem Zusammenhang „geeignet“, wenn die N-Glykosylierung der gentechnisch hergestellten Antikörper in diesen Zellen der Glykosylierung durch menschliche Zellen möglichst nahe kommt. Insgesamt scheint die Zuckerkomponente in Glykoproteinen eine größere Rolle zu spielen, als bislang

angenommen, denn Defekte in der Glykosylierung können unter Umständen auch Krankheitswert haben (Aebi et al., 1999). Zielgerichtete Mutagenesestudien am in CHO-Zellen exprimierten hM₂-Rezeptor haben gezeigt, dass die N-Glykosylierung für die Expression, die Lokalisation (in der Zellmembran) und Stabilität des M₂-Rezeptors sowie für die Bindung von orthosterischen Liganden und die Kopplung des Rezeptors an die Adenylatzyklase keine Rolle spielt (van Koppen und Nathanson, 1990). Das schließt die Möglichkeit jedoch nicht aus, dass die Zuckerreste am M₂-Rezeptor für allosterische Liganden eine Rolle spielen, zumal diese weiter extrazellulär als die orthosterischen Liganden binden, und die Zuckerreste an der Oberfläche des Rezeptorproteins lokalisiert sind. Bemerkenswert ist auch, dass angeknüpfte Glykane sulfatierte Zuckerreste enthalten können. Mannose, ein Zucker mit einer freien Carboxylgruppe, ist immer enthalten. Eine Interaktion dieser negativ geladenen Zucker mit den häufig positiv geladenen Allosteren ist durchaus vorstellbar. Mit größter Wahrscheinlichkeit weist der M₂-Rezeptor ein unterschiedliches N-Glykosylierungsmuster auf, je nachdem, ob er aus CHO-Zellen, COS7-Zellen oder nativem Gewebe des Hausschweins stammt. Postuliert man, dass allosterische Modulatoren zum Teil mit den Zuckerresten des M₂-Rezeptors interagieren, oder dass unterschiedliche Zuckerreste eine unterschiedliche Konformation der extrazellulären Anteile des Rezeptors bedingen können, so vermag eine divergierende N-Glykosylierung unterschiedliche Interaktionen hinsichtlich der Affinität ($pEC_{0,5 \text{ Diss}}$) und der Steilheit der Konzentrations-Wirkungskurve (n_H) von allosterischen Liganden mit dem M₂-Glykoprotein zu erklären. Nimmt man an, dass die N-Glykosylierung Einfluss auf die Konformation der extrazellulären Anteile des Rezeptors hat, kann man sich vorstellen, dass auch die Form der Bindungsstelle für allosterische Modulatoren in Abhängigkeit der N-Glykosylierung verändert werden kann. Dies hätte Einfluss auf die optimale Lage eines Modulators und auf seine potentiellen Haftpunkte am Muskarin-Rezeptor. Für die vorliegende Arbeit erscheint wichtig, dass Duo3 und EHW21 von den postulierten Unterschieden im Glykosylierungsmuster besonders empfindlich betroffen wären.

COS7-hM₂ im Vergleich zu CHO-hM₂

Die unterschiedlichen Ergebnisse aus Dissoziationsversuchen (3.7, S. 110) mit COS7-hM₂ (schwarze Kreise in Abbildung 53, S. 123) und CHO-hM₂ (grüne Kreise) waren zunächst überraschend, da beide Membransuspensionen den humanen M₂-Rezeptor enthalten. Es wurden größere Unterschiede bei Duo3 und EHW21

gefunden. Bei Tacrin und WDuo3 waren die Unterschiede zwar klein, jedoch statistisch signifikant. Bei identischer Aminosäuresequenz (COS7-hM₂, CHO-hM₂) kann das Glykosylierungsmuster variieren, wenn es sich um unterschiedliche Zell-Linien handelt. Hier entstammen die Zell-Linien verschiedenen Spezies (afrikanische Meerkatze, chinesischer Hamster).

CHO-hM₂ im Vergleich zu HSV-(M₂)

Die pEC_{0,5 Diss}-Werte, an CHO-hM₂ (grüne Kreise in Abbildung 53, S. 123) oder HSV-(M₂) (rosa Kreise) ermittelt, weisen für Duo3 und EHW21 nur geringe Unterschiede auf. Für WDuo3 und Tacrin sind keine statistisch signifikanten Unterschiede vorhanden. Demnach könnte das Glykosylierungsmuster bei diesen Rezeptorpräparationen ähnlich sein.

COS7-hM₅ im Vergleich zu CHO-hM₅

Da das Ausmaß der N-Glykosylierung (bei gleicher Anzahl an potentiellen Glykosylierungsstellen) und die Zusammensetzung der Zuckerkomponente Spezies-abhängig variieren, könnte erwartet werden, dass Unterschiede auch an COS7-hM₅ (schwarze Rechtecke in Abbildung 53, S. 123) und CHO-hM₅ (grüne Rechtecke) gefunden werden. Dies war nicht der Fall. Die Affinitäten der Liganden zu den jeweiligen Rezeptoren und die Steilheiten der Konzentrations-Wirkungskurven waren nahezu identisch. Der humane M₅-Rezeptor (Bonner et al., 1988) hat aber nur in Position 8 (⁸Asn) ein potentielles Glykosylierungs-Sequon. Die Variabilität des Zuckeranteils ist darum selbst bei unterschiedlichen Spezies für den hM₅-Rezeptor vermutlich sehr viel geringer als für den hM₂-Rezeptor. Dies könnte die im Wesentlichen gleichen Ergebnisse an COS7-hM₅ und CHO-hM₅ erklären.

Abhängigkeit der atypischen und typischen allosterischen Modulation von der N-Glykosylierung des Muskarin-Rezeptors

Die beiden allosterischen Modulatoren Duo3 und EHW21 weisen die größten Affinitätsunterschiede auf, wenn man die Befunde an COS7-hM₂ mit Ergebnissen an CHO-hM₂ bzw. HSV-(M₂) vergleicht. Beide zeigen ein für die Liganden der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ ungewöhnliches Affinitätsmuster an chimären bzw. punktmutierten Rezeptoren auf, worauf weiter unten noch näher eingegangen wird (4.4, S. 134). Duo3 weist einen Affinitätsgewinn gegenüber M₅ an CR1 und CR2 und EHW21 an CR2 auf. Der Unterschied in der N-Glykosylierung zwischen hM₂ (vier potentielle Glykosylierungsstellen, Abbildung 59, S. 142) und hM₅

(eine potentielle Glykosylierungsstelle) sollte beträchtlich sein. Auf die vermutlich unterschiedliche Glykosylierung der M_2 -Rezeptoren in COS7-h M_2 und CHO-h M_2 bzw. HSV-(M_2) wurde schon eingegangen. Die beiden chimären Rezeptoren CR1 und CR2 enthalten Aminosäuresequenzen des h M_2 -Rezeptors, eingebettet in den h M_5 -Rezeptor, die das N-terminale Ende und die o1-Region des M_2 -Rezeptors abdecken. Einen starken konformativen Einfluss auf das N-terminale Ende durch eine entsprechende N-Glykosylierung anzunehmen, liegt nahe. Aufgrund der ringförmigen Anordnung der transmembranalen Helices (TM1 bis TM7) ist ein, wenn auch geringerer, Einfluss auf die Konformation der unmittelbar benachbarten o1- und o3-Regionen jedoch nicht auszuschließen. Für die „Duo3-Bindungsstelle“ und in einem geringeren Ausmaß auch für die „EHW21-Bindungsstelle“ wird deshalb angenommen, dass die N-Glykosylierung des M_2 -Rezeptors von Bedeutung ist. Ob die Glykane selbst an der Bindung mit den Allosteren beteiligt sind, oder nur einen Einfluss auf die Konformation des M_2 -Rezeptors haben, kann aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Befunde nicht beurteilt werden. Wie später ausgeführt wird (4.8, S. 149), sind WDuo3 und mit größter Wahrscheinlichkeit auch Tacrin Liganden der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“. Duo3 und EHW21 sind dagegen atypische allosterische Modulatoren, die nicht an der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ interagieren (4.8, S. 149). Aufgrund der Befunde mit WDuo3 und Tacrin (3.7, S. 110) an COS7-h M_2 , CHO-h M_2 bzw. HSV-(M_2) kann vermutet werden, dass die N-Glykosylierung für die „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ nur eine marginale Rolle spielt.

4.3 Antagonismus-Untersuchungen zur Beschreibung der Interaktion atypischer allosterischer Modulatoren mit dem M₂-Rezeptor

Untersuchungen mit dem typischen allosterischen Modulator Gallamin und dem Antagonisten Obidoxim am [³H]NMS besetzten M₂-Rezeptor führten zu dem Konzept einer „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ (Ellis und Seidenberg, 1992). Mit dem Einsatz der antagonistischen Werkzeuge Obidoxim und Magnesium-Ionen wurde in der Vergangenheit versucht, atypische allosterische Modulatoren zu identifizieren. In dieser Arbeit wurde Hexamethonium als antagonistisches Werkzeug verwandt. Die Abbildung 54, S. 131 ermöglicht einen direkten Vergleich der Befunde, wie sie mit den drei antagonistischen Werkzeugen Obidoxim, Magnesium-Ionen und Hexamethonium erhalten werden.

4.3.1 Obidoxim und Magnesium-Ionen als bekannte antagonistische Werkzeuge

Die typischen allosterischen Modulatoren W84 und WDuo3 konnten sowohl mit Obidoxim als auch mit Magnesium-Ionen als Liganden der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ identifiziert werden, weil sie mit dem jeweiligen Antagonisten kompetitiv interagieren. Dies wird durch Schild-Geraden mit der Steigung $s = 1$ in der Abbildung 54 A und B, S. 131 dargestellt. Die Antagonismusuntersuchungen mit Obidoxim und Magnesium-Ionen lieferten für die allosterischen Modulatoren Tacrin und Duo3 kein einheitliches Bild. Die Interaktion von Obidoxim und Tacrin wurde als nicht-kompetitiv beschrieben (Schulz, 1998). Als Schätzwert für die Affinität von Obidoxim bei dieser Interaktion kann der $pA_{2, \text{Obidoxim}}$ -Wert, der Schnittpunkt der Schild-Geraden mit der X-Achse, herangezogen werden. Der $pA_{2, \text{Obidoxim}}$ -Wert gegenüber Tacrin (3,88) kommt den $pK_{b, \text{Obidoxim}}$ -Werten gegenüber W84 (4,61) und WDuo3 (4,16) recht nahe. Es fiel Schulz (1998) somit schwer, anhand dieser Befunde Tacrin eindeutig von den anderen typischen allosterischen Modulatoren wie Gallamin, W84, WDuo3 und Alcuronium abzugrenzen. Nachfolgende Untersuchungen mit Magnesium-Ionen als antagonistisches Prinzip (Schulz, 1998) offenbarten dann aber einen klaren Unterschied bezüglich Tacrin und W84 sowie WDuo3. Erstens war die antagonistische Wirksamkeit (pA_2) von Mg^{2+} gegenüber Tacrin deutlich geringer, und zweitens war der Mechanismus der

Interaktion negativ kooperativ. Damit schienen Magnesium-Ionen trennschärfer zwischen typischen und atypischen allosterischen Modulatoren unterscheiden zu können. Für den atypischen allosterischen Modulator Duo3 konnte gefunden werden, dass er mit Obidoxim nicht-kompetitiv interagiert (Tränkle und Mohr, 1997). Mit Magnesium-Ionen wurde dagegen zwar ein kompetitives Interaktionsverhalten von Duo3 beobachtet, sie hatten gegenüber Duo3 aber nur eine sehr geringe antagonistische Wirksamkeit (Schulz, 1998). Ein Nachteil der Magnesium-Ionen beim Einsatz als antagonistisches Werkzeug ist aber ihre niedrige Affinität zum M₂-Rezeptor und damit einhergehend der notwendige Einsatz sehr hoher Konzentrationen dieses Antagonisten.

4.3.2 Hexamethonium als neues antagonistisches Werkzeug zur weiteren Charakterisierung atypischer allosterischer Modulatoren

Hexamethonium wurde in dieser Arbeit als neues antagonistisches Werkzeug eingesetzt, in der Hoffnung auf eine höhere Affinität verglichen mit Magnesium-Ionen bei eventuell erhaltener großer Trennschärfe zwischen typischen und atypischen allosterischen Modulatoren. Hexamethonium weist eine ähnliche Affinität zum M₂-Rezeptor auf wie Obidoxim. Obidoxim und Hexamethonium können als Grundstruktur des mittleren Molekülteils einer Reihe von allosterischen Modulatoren (Bispyridinium- bzw. Alkan-bisammonium-Derivate) aufgefasst werden (Tränkle et al., 1996). Daher stellte die Einführung von Hexamethonium als antagonistisches Werkzeug (Tränkle und Mohr, 1996) eine sinnvolle Ergänzung zu Obidoxim dar.

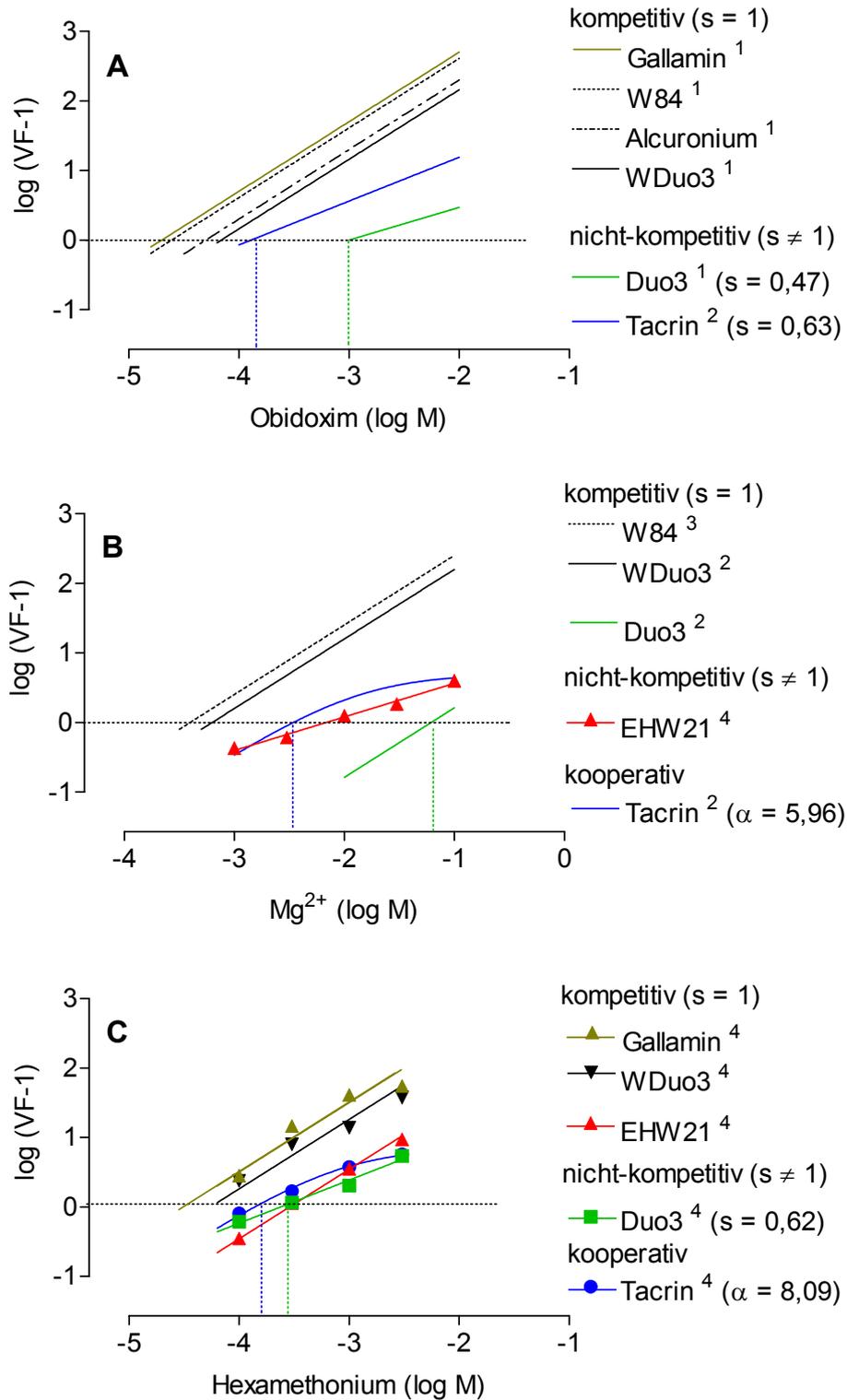


Abbildung 54: Darstellung des antagonistischen Effektes von Obidoxim, Mg²⁺ und Hexamethonium auf die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung durch allosterische Modulatoren nach Arunlakshana und Schild (1958). **Ordinate:** Logarithmus des (Verschiebungsfaktors – 1). **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration des Antagonisten. **Geradenanpassung:** Gleichung 26, S. 51. **Kurvenanpassung:** Gleichung 27, S. 51. **Indices:** 1: Daten von Tränkle und Mohr (1997); 2: Daten von Schulz (1998); 3: Daten von Burgmer et al. (1998); 4: Daten aus dieser Arbeit.

Die [^3H]NMS-Dissoziationsverzögerung durch die Modulatoren Gallamin, WDuo3 und EHW21 ließ sich mittels Hexamethonium formal kompetitiv antagonisieren (Abbildung 54 C, S. 131). Die Schild-Gerade für EHW21 hingegen liegt deutlich abseits der beiden Schild-Geraden für Gallamin und WDuo3. Dies kommt in der niedrigen Affinitätskonstante für Hexamethonium bei der Interaktion mit EHW21 am M_2 -Rezeptor zum Ausdruck. Sie liegt mit $\text{pK}_{\text{b, Hex (EHW21)}} = 3,54 \pm 0,02$ deutlich in einer anderen Größenordnung als die Affinitätskonstanten, die für die Interaktion von Hexamethonium mit Gallamin und WDuo3 ($\text{pK}_{\text{b, Hex (Gallamin)}} = 4,50 \pm 0,09$; $\text{pK}_{\text{b, Hex (WDuo3)}} = 4,26 \pm 0,08$) gefunden wurden. Eine nicht-kompetitive Interaktion zwischen Duo3 und Hexamethonium wird durch eine Schild-Gerade mit einer flachen Steigung ($s = 0,62 \pm 0,06$) erkennbar. Sowohl die flache Steigung als auch die geringe Wirksamkeit ($\text{pA}_{2, \text{Hex (Duo3)}} = 3,62$) verdeutlichen den atypischen Wirkcharakter von Duo3. Mit Tacrin ($\alpha = 8,09 \pm 0,79$) und Eburnamonin ($\alpha = 4,52 \pm 0,34$) tritt Hexamethonium am [^3H]NMS besetzten Rezeptor offenbar in eine kooperative Wechselwirkung ein. Abbildung 55, S. 132 zeigt, dass mit steigender Konzentration von Hexamethonium die antagonistische Wirksamkeit gegenüber Tacrin und Eburnamonin einer oberen Grenze zustrebt.

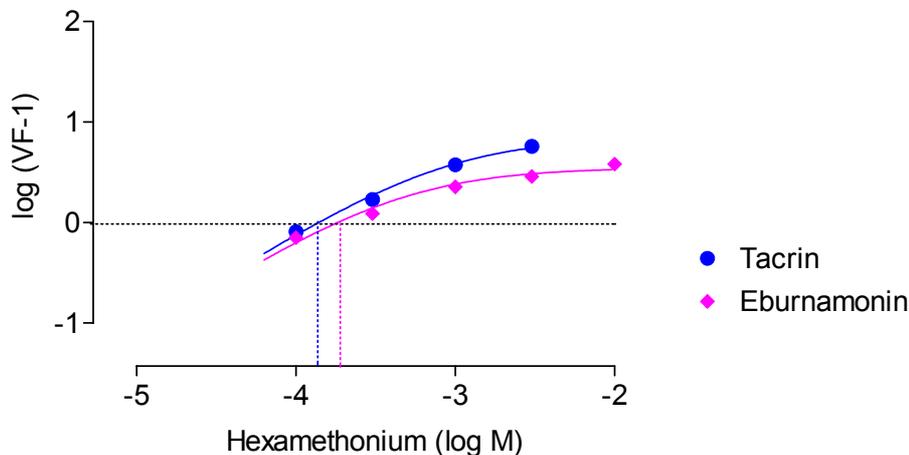


Abbildung 55: Darstellung des antagonistischen Effektes von Hexamethonium auf die [^3H]NMS-Dissoziationsverzögerung durch Tacrin und Eburnamonin. **Ordinate:** Logarithmus des (Verschiebungsfaktors - 1) (VF: Tabelle 9, S. 89). **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration von Hexamethonium. **Kurvenanpassung:** Gleichung 27, S. 51. **Zielparameter:** Tabelle 8, S. 87, Index e .

4.3.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede der drei antagonistischen Werkzeuge Hexamethonium, Obidoxim und Magnesium-Ionen

WDuo3 und Gallamin interagieren kompetitiv mit den antagonistischen Werkzeugen, Obidoxim (Ellis und Seidenberg, 1992; Tränkle und Mohr, 1997), Magnesium-Ionen (Schulz, 1998) und Hexamethonium (Tränkle und Mohr, 1996) (Tabelle 8, S. 87). Somit kann angenommen werden, dass diese drei Antagonisten die „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ in gleicher Weise markieren. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den Eigeneffekt ($[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziationsverzögerung) der Antagonisten können besser beschrieben werden, wenn zwei unterschiedliche Bindungsstellen anstatt einer angenommen werden (Obidoxim: $\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss (1)}} = 4,64$; $\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss (2)}} = 3,02$ (Tränkle und Mohr, 1997); Magnesium-Ionen: $\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss (1)}} = 3,85$; $\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss (2)}} = 2,76$ (Schulz, 1998); Hexamethonium: $\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss (1)}} = 5,06 \pm 0,21$; $\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss (2)}} = 3,47 \pm 0,33$ (diese Arbeit)). Unter der Annahme, dass Hexamethonium am $[^3\text{H}]\text{NMS}$ besetzten Rezeptor zwei Bindungsstellen erkennt, sollten in Antagonismus-Untersuchungen mit Hexamethonium theoretisch zwei unterschiedliche Gruppen von Modulatoren mit einer jeweils kompetitiven Interaktion identifizierbar sein. Tatsächlich interagiert Hexamethonium mit Gallamin, WDuo3 und EHW21 kompetitiv. Sowohl die $\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss}}$ -Werte für den allosterischen Eigeneffekt von Hexamethonium als auch die $\text{pK}_{\text{b, Hex}}$ -Werte für seinen antagonistischen Effekt gegenüber allosterischen Modulatoren stellen Affinitätsparameter für Hexamethonium am $[^3\text{H}]\text{NMS}$ besetzten Rezeptor dar. Die $\text{pK}_{\text{b, Hex}}$ -Werte aus antagonistischen Experimenten mit Gallamin ($4,50 \pm 0,09$) und WDuo3 ($4,26 \pm 0,08$) liegen in der Nähe des $\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss (1)}}$ -Wert für die hochaffine Bindestelle von Hexamethonium ($5,06 \pm 0,21$). Der in Antagonismus-Untersuchungen gegenüber dem Tacrin-Dimer EHW21 ermittelte $\text{pK}_{\text{b, Hex}} = 3,54 \pm 0,02$ steht in guter zahlenmäßiger Übereinstimmung mit dem $\text{pEC}_{0,5 \text{ Diss (2)}} = 3,47 \pm 0,33$, dem Affinitätsparameter für die niedrigaffine Bindungsstelle von Hexamethonium. Dies könnte so interpretiert werden, dass EHW21 an die niedrigaffine Bindungsstelle für Hexamethonium am M_2 -Rezeptor und Gallamin und WDuo3 an die hochaffine Bindungsstelle für Hexamethonium binden. Im Sinne einer Abgrenzung zu typischen Modulatoren wie Gallamin, W84 und WDuo3 kann das Bindungsverhalten von EHW21 schon in dieser Hinsicht als atypisch bezeichnet werden. Der Einsatz von Mg^{2+} offenbart das atypische Interaktionsverhalten von EHW21 in noch stärkerem Ausmaß (Abbildung 54 B, S. 131). Magnesium-Ionen und EHW21 interagieren

nämlich nicht-kompetitiv ($s = 0,48 \pm 0,03$; $pK_{b, Mg} = 1,05 \pm 0,06$) miteinander. Entsprechend dem Konzept des „multiplen Bindungsmodus“ (Kostenis et al., 1996) gibt es zwei mögliche Erklärungen für das Verhalten von Hexamethonium. Zum einen ist es möglich, dass Hexamethonium sich unterschiedlich innerhalb der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ orientieren kann. Zum anderen kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass am Muskarin-Rezeptor zwei topographisch unterschiedliche Bindungsstellen existieren, über die Hexamethonium seinen allosterischen Effekt vermittelt. Der gleiche Erklärungsansatz könnte auch für das Verhalten der antagonistischen Werkzeuge Obidoxim und Magnesium-Ionen herangezogen werden. Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass typische Modulatoren unabhängig davon, welches der drei antagonistischen Werkzeuge eingesetzt wurde, als Liganden der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ identifiziert werden können. Atypische allosterische Modulatoren wie Tacrin, Duo3 und EHW21 liefern ein heterogenes Bild in Abhängigkeit vom eingesetzten antagonistischen Werkzeug. Zwar liefert jeder der Antagonisten einen Hinweis auf atypisches Verhalten der Modulatoren, aber die Interaktion mit dem jeweiligen Antagonisten kann entweder als kooperativ, nicht-kompetitiv oder als kompetitiv mit einem $pK_{b, Antagonist}$ – Wert, der sich deutlich von den Werten unterscheidet, wie sich mit typischen Modulatoren erhalten werden, charakterisiert werden. Demnach erlauben es die Antagonisten nicht, zwischen einem atypischen Verhalten eines Modulators an der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ und einer Interaktion mit einer anderen Bindungsstelle zu unterscheiden.

4.4 Zielgerichtete Mutagenese zur Beschreibung der Topologie der Rezeptorinteraktion atypischer allosterischer Modulatoren

Anhand der Untersuchungen der M_2/M_5 -Selektivität an chimären und punktmutierten Rezeptoren können Aussagen darüber getroffen werden, welche Rezeptorareale (Epitope) für die M_2 -Selektivität von allosterischen Modulatoren essentiell sind. Hier sollte dieser Ansatz der näheren Charakterisierung der Topologie der Interaktion atypischer Modulatoren dienen. Der typische Modulator WDuo3, ein Ligand der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“, diente dem Vergleich zu den atypischen Modulatoren Duo3, Tacrin und EHW21. Die Konzentrations-Wirkungskurven von WDuo3, Duo3, Tacrin und EHW21 für die [3 H]NMS-Dissoziationsverzögerung an den chimären und punktmutierten Rezeptoren sind in Abbildung 56, S.

136 dargestellt. Die zusammenfassende Darstellung der ermittelten $pEC_{0,5 \text{ Diss}}$ -Werte für diese Modulatoren in Abbildung 57, S. 137 ermöglicht eine schnelle Einordnung dieser Affinitätsparameter im zwischen M_2 und M_5 aufgeschlagenen Affinitätsfenster (Höhe des farbigen Rechtecks). Es wurde gefunden, dass die M_2/M_5 -Selektivität des typischen Modulators WDuo3 vollständig auf die Aminosäuren ^{177}Tyr und ^{423}Thr (Abbildung 57, S. 137, Kreis 9) zurückgeführt werden kann. Damit interagiert WDuo3 hinsichtlich der M_2 -Selektivität genauso wie der Prototyp-Modulator W84 (Buller et al., 2002; Voigtländer et al., 2003), ein typischer Ligand für die „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“. Die atypische Epitopabhängigkeit ist bei Duo3 in der Affinität zu CR1 (Kreis 4) und CR2 (Kreis 5) und bei EHW21 in der Affinität zu CR2 augenscheinlich. Diese Mutanten führen bei WDuo3 nicht zu einem Affinitätsgewinn gegenüber M_5 . Der Affinitätsgewinn an CR3 gegenüber M_5 (Kreis 6) entspricht bei WDuo3, Duo3 und Tacrin etwa der Hälfte des M_2/M_5 -Fensters. Bei EHW21 hingegen ist die Affinität zu CR3 so hoch wie zu M_2 . Bezüglich der Affinität zu CR6 (Kreis 7) kann zwischen einem „Alcuronium-Typ“ mit geringem Affinitätsgewinn und einem „W84-Typ“ mit einem deutlichen Affinitätsgewinn gegenüber M_5 (Buller et al., 2002) unterschieden werden. W84 und Alcuronium (Tränkle und Mohr, 1997) können beide den typischen Modulatoren zugeordnet werden. Für Duo3, EHW21 und Tacrin aber nicht für WDuo3 kann ein Affinitätsgewinn an CR6 (Kreis 7) beobachtet werden. Hinsichtlich einer Klassifizierung nach typisch oder atypisch scheint CR6 (Kreis 7) somit nicht hilfreich zu sein. Ein Affinitätsverlust an COS7-U (hM_2 $^{423}\text{Thr} \rightarrow \text{His}$, Kreis 8) gegenüber M_2 spricht dafür, dass ^{423}Thr an der Bindung zum Modulator beteiligt ist. Dies ist der Fall bei WDuo3 und bei Tacrin, während ein Affinitätsverlust bei Duo3 marginal und bei EHW21 gar nicht vorhanden ist. Betrachtet man COS7-U (hM_2 $^{423}\text{Thr} \rightarrow \text{His}$, Kreis 8) und COS7-BG (hM_2 $^{177}\text{Tyr} \rightarrow \text{Gln}$, $^{423}\text{Thr} \rightarrow \text{His}$ Kreis 9) gemeinsam, kann durch einen „Subtraktions-Gedankengang“ auf die Beteiligung von ^{177}Tyr geschlossen werden. Weist COS7-BG (Kreis 9) einen Affinitätsverlust gegenüber COS7-U (Kreis 8) auf, kann vermutet werden, dass ^{177}Tyr an der Bindung des Modulators beteiligt ist. Die Aminosäure ^{177}Tyr des M_2 -Rezeptors wäre demnach für alle vier Modulatoren (WDuo3, Duo3, Tacrin und EHW21) von Bedeutung. Da diese Aminosäure ein charakteristisches Epitop der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ ist, dürfte demzufolge spekuliert werden, dass das Anlagerungsfeld von Duo3 beziehungsweise EHW21 mit der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ in Beziehung steht, eventuell partiell überlappt.

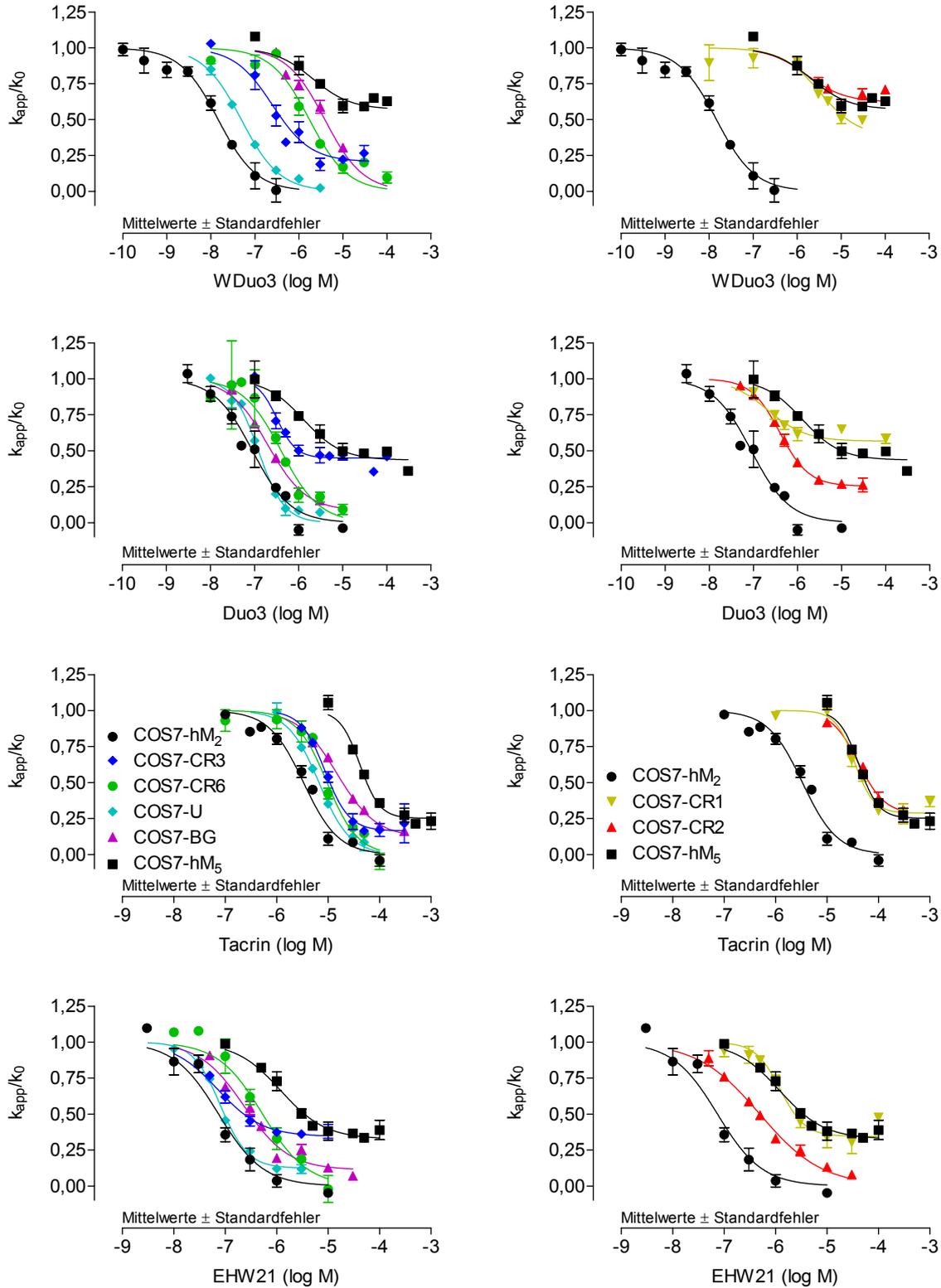


Abbildung 56: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziationsverzögerung von W Duo3, Duo3, Tacrin und EHW21 an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. **Ordinate:** Apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{app} bezogen auf den Kontrollwert k_0 in Abwesenheit des Modulators. **Abszisse:** Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators.

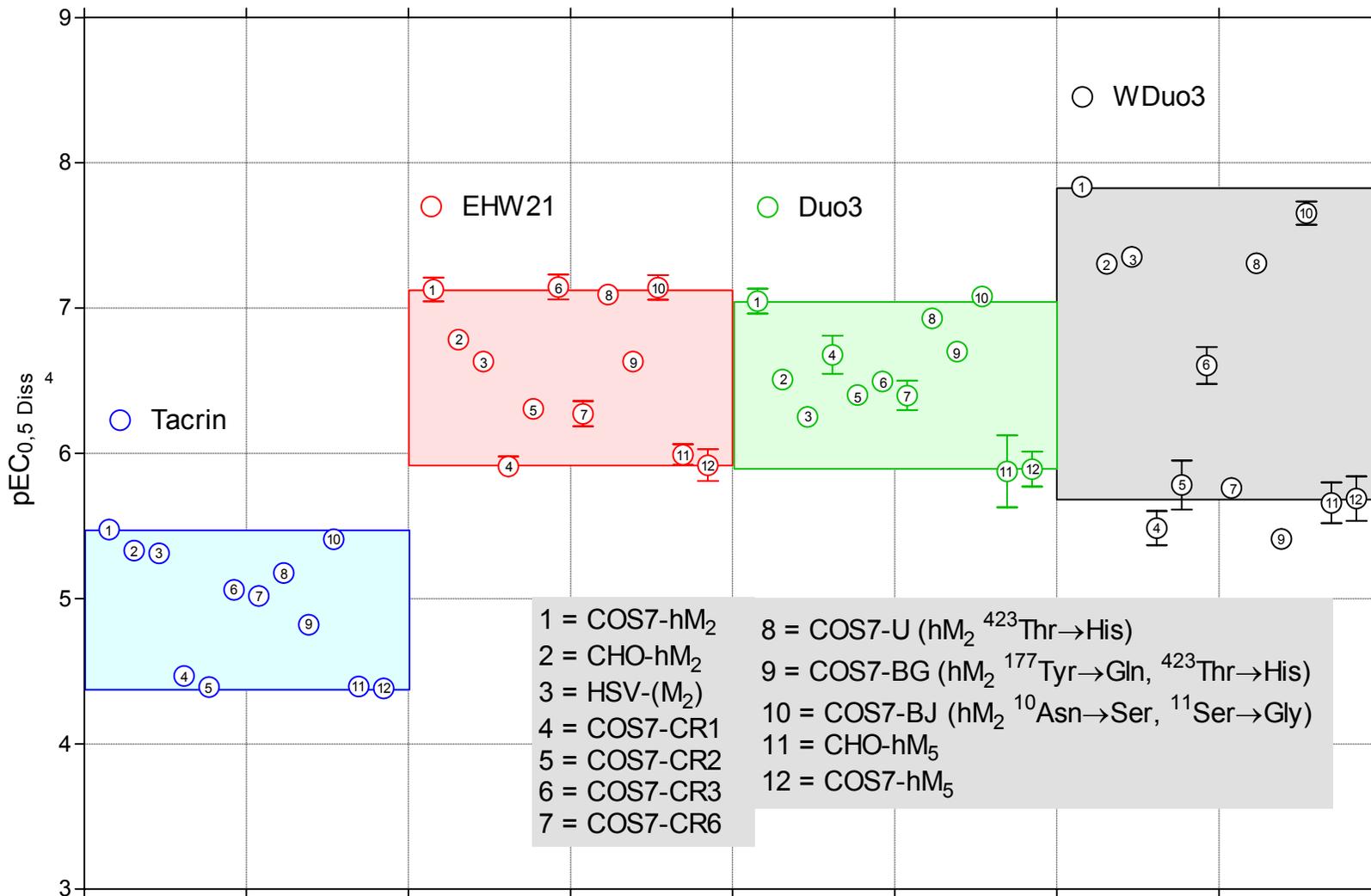


Abbildung 57: Zusammenfassende Darstellung (Boxplot) der in Dissoziationsexperimenten an den genannten Membransuspensionen ermittelten $pEC_{0,5}^{Diss}$ -Werte für die allosterischen Modulatoren Tacrin, EHW21, Duo3 und WDuo3. **Versuchscharakteristika:** Brandel Cell Harvester, Dissoziationsverlauf: Zweipunkterfassung.

4.5 Literaturbefunde zur Topologie der allosterischen Bindungsstellen unter Berücksichtigung eigener Ergebnisse

4.5.1 Die „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“

Charakterisierung der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ durch Antagonismus-Untersuchungen

In den Anfängen der Erforschung der allosterischen Modulation von Muskarin-Rezeptoren musste geklärt werden, ob die Modulation auf unspezifische Effekte oder auf eine Interaktion der Modulatoren mit einer definierten Bindungsstelle am Rezeptor zurückgeführt werden kann. Funktionelle Untersuchungen mit dem Muskelrelaxans Gallamin führten zum Postulat einer „Gallamin-Bindungsstelle“ (Clark und Mitchelson, 1976). Hierbei handelte es sich um die Charakterisierung des Gallamineffektes auf die negativ inotrope Wirkung von Acetylcholin und Carbachol am Herzen. Weitere Untersuchungen mit Gallamin und einer Reihe verschiedener Agonisten und Antagonisten waren mit dem ternären allosterischen Kooperativitätsmodell vereinbar (Stockton et al., 1983). Untersuchungen an [³H]NMS besetzten Membransuspensionen aus dem Herz-Ventrikelgewebe von Ratten mit Obidoxim offenbarten einen kompetitiven Antagonismus gegenüber Gallamin. Dieser Befund führte zur Definition einer „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ („common allosteric site“) (Ellis und Seidenberg, 1992). Versuche mit Obidoxim an Membransuspensionen aus Herzventrikeln des Hausschweins gaben deutliche Hinweise darauf, dass strukturell ganz unterschiedliche Substanzen wie Gallamin, W84, Alcuronium und WDuo3, eine Obidoxim-empfindliche „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ benutzen, um ihren allosterischen Effekt, nämlich die Verlangsamung der [³H]NMS-Dissoziation, auszulösen (Tränkle und Mohr, 1997). Die Interaktion von Duo3 und Obidoxim war jedoch nicht mit einem kompetitiven Antagonismus vereinbar, was zum Vorschlag einer „weiteren allosterischen Bindungsstelle“ führte. Experimente, bei denen Magnesium-Ionen (Mg²⁺) als ein antagonistisches Werkzeug Verwendung fanden, offenbarten einen kompetitiven Antagonismus gegenüber W84 (Burgmer et al., 1998), WDuo3 und Obidoxim (Schulz, 1998). Die Befunde mit Mg²⁺ stützen zusätzlich das Konzept der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“. Die Ergebnisse anderer Untersuchungen am M₂-Rezeptor konnten mit dem ternären Kooperativitätsmodell beschrieben werden, das eine Wirkung der Alkanbisammonium-Verbindung C7/3-

phth, Alcuronium und Gallamin an der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ annimmt (Lanzafame et al., 1997). Wie oben ausgeführt, kann Gallamin als der Prototyp eines Liganden für die „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ betrachtet werden. Durch die kompetitive Interaktion von Gallamin mit Hexamethonium (Tabelle 8, S. 87) konnte demnach hier gezeigt werden, dass Hexamethonium an die „common allosteric site“ bindet. Damit hatte man für diese Arbeit ein antagonistisches „Werkzeug“ zur Verfügung, mit dem geprüft werden konnte, ob zu untersuchende Allosterie (WDuo3, Duo3, Tacrin, EHW21 und Eburnamonin) ebenfalls an der „gemeinsamen allosterischen Stelle“ binden. Nur das Interaktionsverhalten von WDuo3 mit Hexamethonium erwies sich als mit dem Konzept einer „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ vereinbar.

Charakterisierung der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ durch zielgerichtete Mutagenese

Neben der Charakterisierung einer Bindungsstelle durch Antagonisten (Ellis und Seidenberg, 1992; Tränkle und Mohr, 1997) ist es wünschenswert, die Topologie der Bindungsstelle hinsichtlich der Bindungspartner der allosterischen Modulatoren am Rezeptor auf molekularer Ebene näher zu beschreiben. Im Falle von Rezeptoren sind das einzelne Aminosäuren (Abbildung 58, S. 141) eines bestimmten Rezeptorareals, die durch physikochemische Wechselwirkungen mit dem Liganden für die zustande kommende Bindung wichtig sind. Die Identifikation solcher Aminosäuren ist jedoch schwierig. Falls die dreidimensionale Kristallstruktur des Zielproteins bekannt ist, kann Computer-gestützt ein dreidimensionales Rezeptormodell erstellt und eine Ligand-Bindung simuliert werden. Im Falle der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren ist eine solche Kristallstruktur nicht verfügbar. Die Zusammenführung der Kenntnisse der Kristallstruktur des Rhodopsins (Palczewski et al., 2000), einem G-Protein gekoppelten Rezeptor, und der Aminosäuresequenz der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren (Bonner et al., 1987; Bonner et al., 1988; Bonner, 1989), ermöglichen dennoch die Konstruktion von Computermodellen der M-Rezeptoren (Hulme et al., 2001; Voigtländer et al., 2003). Eine - die Entwicklung von Computermodellen begleitende - Möglichkeit, wichtige Aminosäuren als Reaktionspartner von Liganden zu identifizieren, ist die zielgerichtete Mutagenese. Im Falle der Muskarin-Rezeptoren sind zwei unterschiedliche Wege eingeschlagen worden, um die „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ auf Aminosäure-Ebene zu beschreiben (Birdsall et al., 2001). Dabei wurde in den allermeisten Fällen Gallamin

als allosterische Substanz eingesetzt. Der erste Weg besteht in der Suche nach konservierten Aminosäuren in den fünf muskarinischen Subtypen, die für die Affinität allosterischer Liganden wichtig sind (Lee et al., 1992; Matsui et al., 1995). Diese Aminosäuren könnten für eine sogenannte „Basisaffinität“ der Modulatoren verantwortlich sein, die an allen muskarinischen Rezeptorsubtypen vorhanden ist. Der zweite Weg besteht in der Identifikation von nicht konservierten Aminosäuren, die die Subtypselektivität der Modulatoren verursachen (Ellis et al., 1993; Leppik et al., 1994; Gnagey et al., 1999; Buller et al., 2002). Hinsichtlich der konservierten Aminosäuren sind zwei Tryptophane (hM_1 ¹⁰¹Trp, ⁴⁰⁰Trp entspricht hM_2 ⁹⁹Trp, ⁴²²Trp) als wichtig für die Bindung von Gallamin identifiziert worden (Matsui et al., 1995). Die EDGE-Sequenz (hM_2 ¹⁷²Glu, ¹⁷³Asp, ¹⁷⁴Gly, ¹⁷⁵Glu) in o2 (Leppik et al., 1994; Gnagey et al., 1999) und hM_2 ⁴¹⁹Asn in o3 wurden für die M_2/M_5 -Selektivität von Gallamin verantwortlich gemacht.

Neueste Untersuchungen konnten die M_2/M_5 -Selektivität von Gallamin jedoch auf zwei Aminosäuren (hM_2 ¹⁷⁷Tyr, ⁴²³Thr) zurückführen. An der Mutante hM_2 ¹⁷⁷Tyr→Gln, ⁴²³Thr→His wies Gallamin nämlich die gleiche Affinität zum [³H]NMS besetzten Rezeptor auf, wie zu COS7- hM_5 (Stefanie Prilla, persönliche Mitteilung). Dies scheint zu dem vorher gesagten widersprüchlich zu sein. Es sollte jedoch bedacht werden, dass die für die Affinität wichtigen Aminosäuren entweder für die dreidimensionale Struktur des Rezeptorproteins essentiell sein können, oder als Haftpunkte für potentielle Liganden fungieren. Wenn die Mutation also von zwei Aminosäuren die M_2 -Selektivität vollständig aufhebt, schließt das nicht aus, dass weitere Aminosäuren für die Affinität von Gallamin zum M_2 -Rezeptor wichtig sind. Eine scharfe Trennung zwischen Aminosäuren, die einerseits die Basisaffinität und andererseits die M_2 -Selektivität verleihen, ist wohl nicht möglich. Es scheint als gesichert, dass die „common allosteric site“ extrazellulär (Ellis, 1997) am Eingang zur orthosterischen Bindungstasche liegt (Hulme et al., 1990; Voigtländer et al., 2003). Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde mit WDuo3 an der Doppelmutante hM_2 ¹⁷⁷Tyr→Gln, ⁴²³Thr→His zeigen für WDuo3 eine Epitopabhängigkeit wie für andere Liganden der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“.

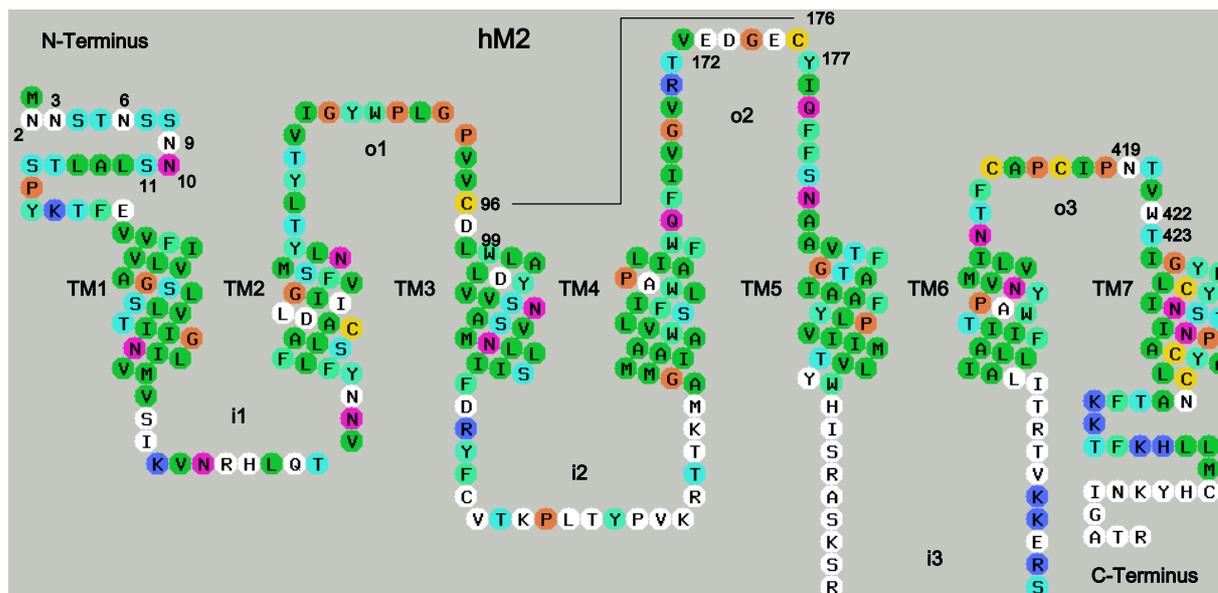


Abbildung 58: Schematische Darstellung des humanen M_2 -Rezeptors (GPCRDB-Snake) nach (Bonner et al., 1987; Peralta et al., 1987a) aus <http://www.gpcr.org/7tm/seq/vis/swac/P08172.html> (Copyright 1994,1995,1996 Fabien Campagne, All Rights Reserved F. Campagne, J.M. Bernassau, B. Maigret). Die Aminosäuren sind im Einbuchstaben-Code repräsentiert. Wichtige und im Text erwähnte Aminosäuren sind nummeriert. **TM1-TM7**: transmembranäre Domänen. **i1-i3**: intrazelluläre Schleifen. Die dritte intrazelluläre Schleife (i3) ist nur teilweise dargestellt. **o1-o3**: extrazelluläre Schleifen. **96 – 176**: Disulfid-Brücke.

In einem Computermodell (Voigtländer et al., 2003) wurde am [3 H]NMS besetzten Rezeptor die Lage von W84 und Diallylcaracurin V (CARALL) am M_2 -Rezeptor simuliert. Hiernach kommt der allosterische Modulator in einer oberflächlichen „Spalte“ zu liegen, die durch einen „Korridor“ mit der durch NMS besetzten orthosterischen Bindungsstelle verbunden ist. Die im Experiment gefundene Abhängigkeit der M_2/M_5 -Selektivität von W84 und Diallylcaracurin V von den beiden Aminosäuren hM_2 177 Tyr, 423 Thr ist im Computermodell enthalten. Hinsichtlich der an allen Subtypen gefundenen Basisaffinität („core binding region“) werden zwei „lipophile Taschen“ mit polaren Aminosäuren (1. Tasche: hM_2 13 Ala, 23 Val, 22 Glu, 26 Ile, 85 Val und 2. Tasche: hM_2 1 Met, 6 Asn, 170 Thr, 171 Val, 417 Ile) vermutet. Wie in 1.1, S. 123 ausgeführt wurde, kann Asparagin in Position 6 sowohl im humanen wie im porcinen Rezeptor glykosyliert werden. Die Anknüpfung eines Zuckerrestes, der aus mindestens fünf Zuckern besteht (Helenius und Aebi, 2001), würde die Polarität der zweiten „lipophilen Tasche“ zusätzlich erhöhen.

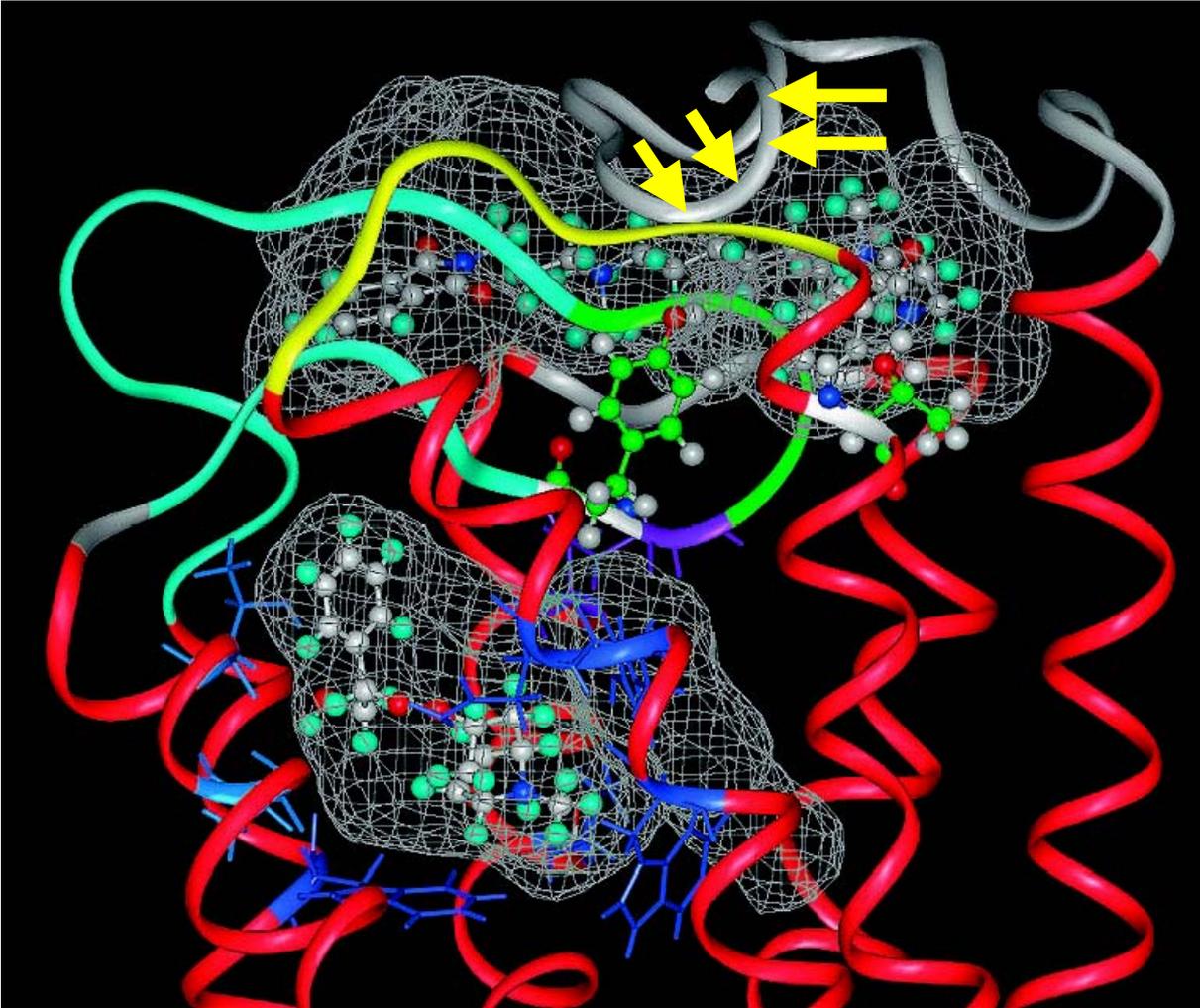


Abbildung 59: Lage des orthosterischen Liganden NMS und des Liganden der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ W84 am humanen M₂-Rezeptor im Blick von der Seite nach Voigtländer et al. (2003). **Protein**: Helices in Rot; o1 und N-terminales Ende in Grau; o2 in Zyan; EDGE-Sequenz in Grün; o3 in Gelb; Disulfidbrücke in Magenta; orthosterische Bindungsstelle in Blau; freie Volumina als graues Netz dargestellt. **N-Glykosylierung**: Die Positionen der potentiellen N-Glykosylierung an ²Asn, ³Asn, ⁶Asn und ⁹Asn sind durch gelbe Pfeile markiert. **Tyr¹⁷⁷/Thr⁴²³**: Kohlenstoffatome in Grün; Stickstoffatome in Dunkelblau; Sauerstoffatome in Rot; Wasserstoffatome in Weiß. **NMS/W84**: Kohlenstoffatome in Weiß; Stickstoffatome in Dunkelblau; Sauerstoffatome in Rot; Wasserstoffatome in Zyan.

4.5.2 Von der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ unterschiedliche Bindungsstellen

Zusätzliche allosterische Bindungsstellen wurden postuliert (Leppik et al., 1994) im Zusammenhang mit Heparin (Gerstin et al., 1992) und mit Protamin (Hu et al., 1992). Es wurde vermutet, dass diese Substanzen an der intrazellulären Seite des muskarinischen Acetylcholin-Rezeptors binden. Eine weitere allosterische Bindungsstelle wurde für Kationen wie Na⁺ gefunden, die die Bindung von Liganden am

Muskarin-Rezeptor modulieren (Rosenberger et al., 1980; Hulme et al., 1981; Gerstin et al., 1992). Untersuchungen mit Staurosporin und anderen Indolocarbazolen an den Rezeptoren M_1 bis M_4 haben die Existenz einer anderen allosterischen Bindungsstelle auf diesen Rezeptoren offenbart (Lazareno et al., 2000; Birdsall et al., 2001), die von den Autoren als „zweite allosterische Bindungsstelle“ benannt wurde. Das Staurosporin-Derivat KT5720, ein Inhibitor der Protein-Kinase A (PKA-Inhibitor), vermag die [^3H]NMS-Bindung an den M_1 und M_2 Rezeptoren über eine allosterische Interaktion zu erhöhen. Am M_1 Rezeptor vermag dieselbe Substanz die Bindung von Acetylcholin zu fördern. Die gleichzeitige Anwesenheit von Gallamin oder Brucin, Liganden der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“, vermochte die KT5720-induzierte Verzögerung der [^3H]NMS-Dissoziation am M_1 Rezeptor nicht zu beeinflussen. Daraus folgerten die Autoren, dass die Bindungsstelle, über die KT5720 seine allosterischen Effekte vermittelt, eine andere sein muss, als die durch Gallamin markierte „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“. Im Weiteren konnte diese „zweite allosterische Bindungsstelle“ am M_3 Rezeptor durch die Substanzen Staurosporin, KT5720, WIN 51,708 und PG987 – die beiden letztgenannten sind Steroid-Derivate – näher charakterisiert werden (Lazareno et al., 2002). Zur Lokalisation dieser „zweiten“ allosterischen Bindungsstelle gibt es noch keine Vorstellungen.

4.6 Tacrin und Eburnamonin als Liganden der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ am M_2 Acetylcholin-Rezeptor

Die Interaktion von Hexamethonium mit Tacrin und Eburnamonin am [^3H]NMS besetzten M_2 Rezeptor kann als negativ kooperativ beschrieben werden (Tabelle 8, S. 87). Entsprechend dem Kooperativitätsmodell kann für die Interaktion von Hexamethonium mit Tacrin beziehungsweise Eburnamonin eine gleichzeitige Bindung am [^3H]NMS besetzten M_2 -Rezeptor angenommen werden. Dieses kommt einem quaternären Komplex aus Rezeptor, [^3H]NMS, Hexamethonium und einem weiteren Modulator (Tacrin bzw. Eburnamonin) gleich. Demnach würden sich Hexamethonium und Tacrin beziehungsweise Eburnamonin an zwei topographisch unterschiedlichen Stellen des M_2 -Rezeptors binden. Dieses spräche für das Vorliegen einer „weiteren allosterischen Bindungsstelle“. Zum anderen ist nicht auszuschließen, dass die „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ Hexamethonium und Tacrin beziehungsweise Eburnamonin gleichzeitig zu beherbergen

im Stande ist. Experimentelle Daten (Holzgrabe et al., 2000; Muth et al., 2003) weisen ein unsymmetrisch substituiertes Hexan-bisammonium-Derivat mit einem Naphthalimido- und einem Phthalimido-Rest (Naphmethonium) als ein optimales, hoch wirksames Alloster am [³H]NMS besetzten Rezeptor aus. Angesichts der Größe des Naphmethonium und von WDuo3 kann spekuliert werden, dass die „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ Liganden von der (geringeren) Größe des Hexamethonium und des Tacrin beziehungsweise Eburnamonin gleichzeitig zu binden vermag. Ein Größenvergleich der allosterischen Modulatoren Naphmethonium, EHW21, Eburnamonin, Hexamethonium, Tacrin und WDuo3 ist in Abbildung 60, S. 145 möglich. Die allosterischen Modulatoren sind in einer durch MM2-Kraftfeld-Berechnung (Mausser, 1999) Energie-minimierten Konformation mit Hilfe des Computerprogramms SymApps[®] dargestellt.

Untersuchungen der Epitopabhängigkeit der M₂/M₅-Selektivität von Tacrin stützen die Hypothese des gleichzeitigen Bindens zweier kleiner Tacrin-Moleküle an der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“. Die beiden Aminosäuren hM₂¹⁷⁷Tyr, ⁴²³Thr vermögen zwar nicht vollständig die M₂/M₅-Selektivität von Tacrin zu erklären, das Affinitätsmuster von Tacrin ähnelt jedoch hinsichtlich der Lage der Konzentrations-Wirkungskurven von CR1, CR2 (beide auf M₅-Affinitätsniveau) und CR3 relativ zu denen von M₂ und M₅ aus Untersuchungen an [³H]NMS besetzten chimären Rezeptoren (Abbildung 56, S. 136) dem des WDuo3, einem typischen Modulator der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle. Das deutet darauf hin, dass Tacrin am ehesten an der „common allosteric site“ bindet. Die steile Konzentrations-Wirkungskurve von Tacrin ließe sich demnach durch die Bindung zweier Tacrin-Moleküle an der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ erklären.

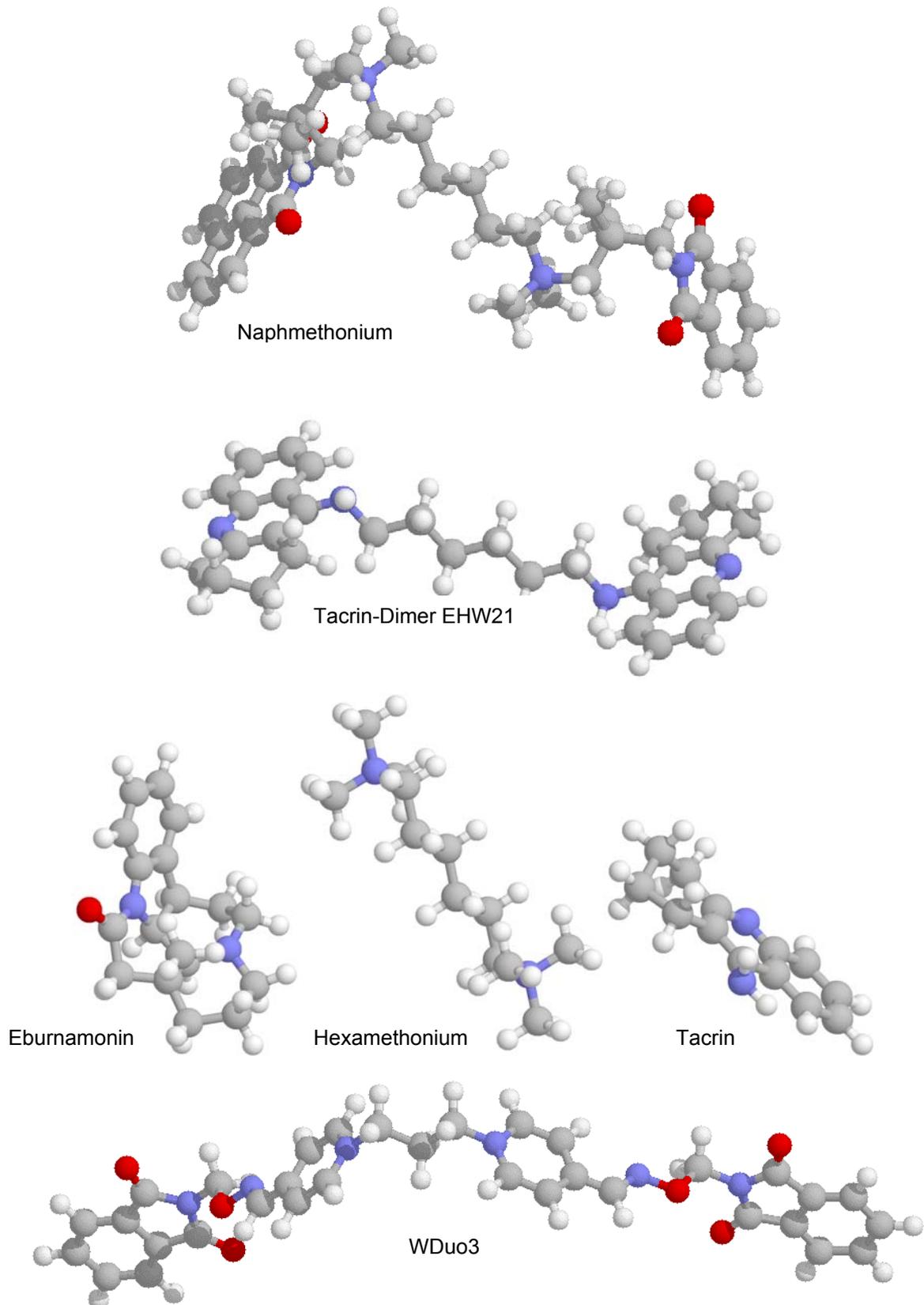


Abbildung 60: Mittels MM2-Krauffeld-Berechnung Energie-minimierte Konformationen (Kugel-Stabmodell) der allosterischen Modulatoren Naphmethonium, Tacrin-Dimer EHW21, Eburnamonin, Hexamethonium, Tacrin und WDuo3. Kohlenstoffatome in Grau, Wasserstoffatome in Weiß, Stickstoffatome in Blau, Sauerstoffatome in Rot.

4.7 Duo3 und EHW21 als Liganden an „weiteren allosterischen Bindungsstellen“ am M₂ Acetylcholin-Rezeptor

Antagonismus-Untersuchungen legen nahe, dass Duo3 (Tränkle und Mohr, 1997; Schulz, 1998) und EHW21 (4.3.3, S. 133) nicht an der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ interagieren. Hier soll erörtert werden, wo diese atypischen allosterischen Modulatoren am M₂-Rezeptor interagieren könnten.

4.7.1 EHW21 in Abgrenzung zu Tacrin

Hinsichtlich des Effektes auf die [³H]NMS-Dissoziation verhält sich das Tacrin-Dimer EHW21 wie ein typischer allosterischer Modulator, denn die Interaktion lässt sich mit dem Massenwirkungsgesetz vereinbaren (Kurvensteilheit: $n_H = 1,14 \pm 0,15$). EHW21 und Hexamethonium interagieren kompetitiv antagonistisch miteinander. Demnach binden EHW21 und Hexamethonium an einer definierten allosterischen Bindungsstelle, die aber aufgrund des atypischen pK_b-Wertes von Hexamethonium gegenüber EHW21 nicht mit der „common allosteric site“ identisch zu sein scheint (4.3.3, S. 133). EHW21 interagiert möglicherweise an einer „weiteren allosterischen Bindungsstelle“. Zieht man nämlich die Untersuchungen an den chimären Rezeptoren (Abbildung 56, S. 136) hinzu, so spricht vor allem der Affinitätsgewinn an CR2 dafür, dass ein Molekül des Tacrin-Dimers nicht einfach das Bindungsverhalten von zwei Tacrin Molekülen imitiert. Vielmehr scheint es so zu sein, dass sich das Tacrin-Dimer am Rezeptor anders orientiert als Tacrin. Eine im Gegensatz zu Tacrin andersartige Orientierung des EHW21 am M₂-Rezeptor lässt sich zwanglos durch die Fixierung der beiden Tacrin-Reste an der Hexyl-Zwischenkette erklären. Würde das Tacrin-Dimer in der gleichen Weise wie Tacrin am Acetylcholin-Rezeptor binden, sollte für EHW21 das gleiche Epitopmuster wie für Tacrin gefunden werden. Jedoch erbringt CR2 für EHW21 einen Affinitätsgewinn gegenüber M₅ und die Aminosäure hM₂⁴²³Thr spielt für die M₂/M₅-Selektivität von EHW21 keine Rolle. Die Tatsache, dass für WDuo3 und EHW21 die Aminosäure ¹⁷⁷Tyr ein wichtiges Epitop am M₂-Rezeptor ist, könnte darauf hindeuten, dass die „weitere allosterische Bindungsstelle“, die von EHW21 erkannt wird, mit der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ überlappt.

4.7.2 Duo3 in Abgrenzung zu W84, WDuo3 und Gallamin

Die für die COS7-hM₂/hM₅-Selektivität von Duo3 verantwortlichen Aminosäuren könnten im Prinzip fast im gesamten extrazellulär zugänglichen Bereich des

Rezeptors liegen (3.6.5, S. 104), denn zu allen untersuchten chimären Rezeptoren (CR1, CR2, CR3 und CR6) weist Duo3 eine höhere Affinität auf als zu M₅. Die Affinitäten zu CR6 und CR1 sind fast identisch. Da in CR6 das N-terminale und das C-terminale Ende des M₂-Rezeptors und in CR1 nur das N-terminale Ende von M₂ vorhanden sind, kann vermutet werden, dass das Carboxy-terminale Ende des Rezeptors für Duo3 keinen Beitrag zur M₂-Selektivität liefert. Dies wird durch die Tatsache gestützt, dass der Aminosäureaustausch hM₂⁴²³Thr→His (COS7-U) so gut wie keinen Affinitätsverlust für Duo3 bewirkt. Die Einführung des M₂-homologen N-terminalen Endes (CR1) oder der ersten extrazellulären Schleife (CR2) in den M₅-Rezeptor bewirken demgegenüber für Duo3 einen Affinitätsgewinn. Dieses zusammengenommen ist im Vergleich zu analog untersuchten Liganden der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ atypisch. Denn Gallamin weist zu CR1 und CR2 die gleiche Affinität auf wie zu M₅ (Ellis et al., 1993). Weiterhin ist gezeigt worden, dass WDuo3 (diese Arbeit), W84 (Voigtländer et al., 2003) und Gallamin (Stefanie Prilla, persönliche Mitteilung) ihre M₂/M₅-Selektivität vollständig aus den zwei Aminosäuren hM₂¹⁷⁷Tyr und hM₂⁴²³Thr beziehen.

Zusammengenommen ist die „Duo3-Bindungsstelle“ am M₂-Rezeptor mindestens in dreifacher Hinsicht anders beschaffen, als die „common allosteric site“. Erstens spielt die Aminosäure hM₂⁴²³Thr für die Bindung von Duo3 keine Rolle, zweitens sind weitere Aminosäuren im N-terminalen Ende (CR1) und drittens in der ersten extrazellulären Schleife des Rezeptors (o1) (CR2) für die Bindung wichtig. Es scheint also gerechtfertigt zu sein, im Zusammenhang mit der Bindungsstelle für Duo3 am M₂-Rezeptor von einer „weiteren allosterischen Bindungsstelle“ zu sprechen. Es müsste jedoch berücksichtigt werden, dass die Aminosäure hM₂¹⁷⁷Tyr in dieser Bindungsstelle und in der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ vorhanden sein könnte, was aus den Ergebnissen mit COS7-BG (hM₂¹⁷⁷Tyr→Gln, ⁴²³Thr→His) und COS7-U (hM₂⁴²³Thr→His) zu folgern ist (4.4, S. 134). Diese mögliche partielle Überlappung der beiden allosterischen Bindungsstellen könnte erklären, dass Hexamethonium den allosterischen Effekt von Duo3 zwar zu antagonisieren vermag, die Interaktion jedoch als nicht-kompetitiv in Erscheinung tritt. Diesem Erklärungsansatz liegt die Annahme zu Grunde, dass Hexamethonium als ein antagonistisches Werkzeug an der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ wie W84, WDuo3 und Gallamin mit ¹⁷⁷Tyr in Wechselwirkung treten sollte. Die CR1-Sensitivität von Duo3 scheint ein weiteres unerwartetes Phänomen erklären zu können:

Interessanterweise wurde in Messungen an COS7-hM₂ eine Hill-Steigung ermittelt, die nicht unterschiedlich von $n_H = -1$ ist (Abbildung 53, S. 123). Experimente mit gleicher Methodik lieferten an CHO-hM₂ und HSV-(M₂) jedoch, wie für Duo3 in der Literatur beschrieben, steile Konzentrations-Wirkungskurven. CR1 enthält die N-terminale Sequenz des M₂-Rezeptors, die mit vier potentiellen N-Glykosylierungsstellen (Abbildung 59, S. 142) in Abhängigkeit des Expressionssystems (unterschiedliche Spezies) eine vermutlich deutlich divergierende Glykan-Komponente trägt. Möglicherweise ist es die unterschiedliche Glykosylierung des M₂-Rezeptors in den drei Membransuspensionen, die zu den Unterschieden in den Kurvensteilheiten führt.

4.7.3 Duo3 und EHW21 binden an unterschiedlichen „weiteren allosterischen Bindungsstellen“

Es stellt sich die Frage, ob die jeweilige „weitere allosterische Bindungsstelle“, die hier zum einen für Duo3 und zum anderen für EHW21 postuliert wurde, identisch sind. Dieses erscheint unwahrscheinlich, denn ansonsten müsste man für Duo3 mit Hexamethonium, wie für EHW21, eine kompetitiv antagonistische Interaktion finden. Weiterhin sind die an chimären Rezeptoren gefundenen Affinitätsmuster für Duo3 und EHW21 hinsichtlich CR1 und CR3 unterschiedlich. Das legt nahe, dass die atypischen Modulatoren EHW21 und Duo3 bezüglich der M₂/M₅-Selektivität unterschiedliche Haftpunkte am M₂-Rezeptor benutzen. Es konnte also insgesamt gezeigt werden, dass atypische allosterische Modulatoren an „weiteren allosterischen Bindungsstellen“ interagieren, die zwar Haftpunkte mit der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ teilen, die aber nicht mit dieser identisch sind. Solange keine weiteren Liganden gefunden werden, die am M₂-Rezeptor genauso interagieren wie Duo3 beziehungsweise EHW21, scheint es jedoch sinnvoller zu sein, von einer „Duo3-Bindungsstelle“ und einer „EHW21-Bindungsstelle“ zu sprechen.

4.8 Affinitätssteigerung am [³H]NMS besetzten M₂-Rezeptor und Änderung der allosterischen Modulation der Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS durch strukturelle Veränderungen an Duo3 und durch Dimerisierung des Tacrin

4.8.1 Duo3 in Abgrenzung zu WDuo3

Die allosterischen Modulatoren WDuo3 und Duo3 sind Bispyridinium-Derivate mit unterschiedlichen Ringsubstituenten. Aus Struktur-Wirkungs-Untersuchungen an Bispyridinium-Derivaten (Kostenis et al., 1996) ist bekannt, dass die lateralen Ringsubstituenten, Phthalimidomethyl- oder Dichlorobenzyl-Reste, eine wichtigere Rolle für die Affinität (potency) zum NMS besetzten M₂-Rezeptor und für die Wirksamkeit (efficacy) zur [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung der allosterischen Modulatoren spielen als die Bispyridinium-Zwischenkette. Der Austausch der Dichlorobenzyl-Reste in Duo3 zu Phthalimidomethyl-Resten in WDuo3 bewirkt eine Affinitätszunahme am [³H]NMS besetzten M₂-Rezeptor und eine Vergrößerung der M₂/M₅-Selektivität.

Affinitätssteigerung am [³H]NMS besetzten M₂-Rezeptor

Die Affinität von WDuo3 ist im Vergleich zu Duo3 zum [³H]NMS besetzten M₂-Rezeptor in HSV-(M₂)-Membransuspensionen um mehr als zwei Dekaden gesteigert ($pEC_{0,5 \text{ Diss (Duo3)}} = 6,08 \pm 0,04 \rightarrow pEC_{0,5 \text{ Diss (WDuo3)}} = 8,30 \pm 0,30$). In Membransuspensionen aus COS7-Zellen fällt dieser Affinitäts-Zuwachs deutlich geringer aus. Die entsprechenden $pEC_{0,5 \text{ Diss}}$ -Werte sind in Tabelle 27, S. 150 wiedergegeben. Vollständigkeitshalber ist in dieser Tabelle für jeden an Membransuspensionen aus COS7-Zellen untersuchten allosterischen Modulator auch das M₂/M₅-Affinitätsverhältnis, ausgedrückt als $\Delta pEC_{0,5 \text{ Diss}}$ -Wert, gelistet. Es ist auffällig, dass die atypischen Modulatoren Duo3, Tacrin und EHW21 eine besonders kleine M₂/M₅-Selektivität aufweisen.

Modulator	COS7-hM ₂ pEC _{0,5 Diss}	COS7-hM ₅ pEC _{0,5 Diss}	COS7-hM ₂ /hM ₅ Affinitätsverhältnis Δ pEC _{0,5 Diss}
W84	7,33 ± 0,03	5,42 ± 0,05	1,91
Alcuronium	8,10 ± 0,03	4,97 ± 0,04	3,13
CARALL	7,86 ± 0,02	5,35 ± 0,06	2,51
WDuo3	7,83 ± 0,06	5,69 ± 0,15	2,14
Duo3	7,05 ± 0,09	5,89 ± 0,12	1,16
Tacrin	5,48 ± 0,04	4,38 ± 0,03	1,10
EHW21	7,13 ± 0,08	5,92 ± 0,11	1,21

Tabelle 27: hM₂/hM₅-Affinitätsverhältnis allosterischer Modulatoren als Δ pEC_{0,5 Diss}-Wert ermittelt an Membransuspensionen aus COS7-Zellen. Der Quantifizierung der Affinität des allosterischen Modulators zum [³H]NMS besetzten Rezeptor wurde der jeweils ermittelte pEC_{0,5 Diss}-Wert (Kenngröße ± Standardfehler) aus Dissoziationsexperimenten zugrunde gelegt. Einzelheiten zur Ermittlung der Kenngrößen können den Abschnitten entnommen werden, die den einzelnen allosterischen Modulatoren (3.6, S. 98) gewidmet sind.

Allosterische Modulation der Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS am M₂-Rezeptor

In Gleichgewichtsbindungsexperimenten an Membransuspensionen aus Herzventrikeln des Hausschweins (HSV-(M₂)) wird die Bindung von [³H]NMS durch Duo3 verringert (negativ kooperativ) und durch WDuo3 leicht erhöht (positiv kooperativ), und die Interaktion entspricht jeweils annähernd dem allosterischen ternären Kooperativitätsmodell (Tabelle 25, S. 120). Ein positive bzw. negative Kooperativität kommt zustande, wenn Allosterie unterschiedliche Affinitäten zum freien und zum Ligand-besetzten Rezeptor aufweisen. Dadurch werden die Assoziation und die Dissoziation des orthosterischen Liganden unterschiedlich stark beeinflusst. Aus der Summe der Effekte ergibt sich entweder eine Bindungsförderung oder eine Bindungshemmung oder ein unverändertes Bindungsgleichgewicht. Duo3 hat eine höhere Affinität zum freien (pK_A = 7,17 ± 0,13) als zum [³H]NMS besetzten (pEC_{0,5 Diss} = 6,08 ± 0,02) M₂-Rezeptor und interferiert deswegen stärker mit der Assoziation von [³H]NMS als mit seiner Dissoziation. Bei WDuo3 ist es unter gleichen Pufferbedingungen umgekehrt (pK_A = 7,55 ± 0,15; pEC_{0,5 Diss} = 8,29 ± 0,02). Dieser Sachverhalt ist Literatur-bekannt (Schröter et al., 2000) und konnte in dieser Arbeit reproduziert werden. Im Sinne eines strukturellen Vergleichs ist es also der Ringsubstituent (Phthalimidomethyl- versus Dichlorobenzyl-Rest), der darüber

entscheiden kann, ob die Bindung eines orthosterischen Liganden gefördert oder gehemmt wird. Im Vergleich der Modulatoren untereinander sind die Affinitäten (pK_A) von Duo3 und WDuo3 zum freien Rezeptor statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,0846$). Am freien Rezeptor spielt der Ringsubstituent für die Affinität also eine untergeordnete Rolle. Aus der Literatur ist bekannt, dass wesentlich geringfügigere strukturelle Veränderungen, wie zum Beispiel die Einführung von Methyl-Resten, darüber entscheiden können, ob positive oder negative Kooperativität mit dem jeweiligen orthosterischen Liganden beobachtet wird (Raasch et al., 2002; Muth et al., 2003). Da der Effekt eines allosterischen Modulators auf die Bindung des orthosterischen Modulators vom eingesetzten orthosterischen Liganden abhängt (Lee und El Fakahany, 1988), können die Befunde aus den hier diskutierten Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen nicht auf andere Orthostere, wie z. B. das Acetylcholin, übertragen werden.

4.8.2 EHW21 in Abgrenzung zu Tacrin

Affinitätssteigerung am [3 H]NMS besetzten M_2 -Rezeptor

Mit der Dimerisierung des Tacrin (EHW21) konnte die Affinität am [3 H]NMS besetzten M_2 -Rezeptor in HSV-(M_2)-Membransuspensionen deutlich erhöht werden ($pEC_{0,5 \text{ Diss}}(\text{Tacrin}) = 5,28 \pm 0,03 \rightarrow pEC_{0,5 \text{ Diss}}(\text{EHW21}) = 6,56 \pm 0,08$). In Membransuspensionen aus COS7-Zellen fällt dieser Affinitäts-Zuwachs deutlich stärker (Tabelle 27, S. 150) aus. Die an beiden Membransuspensionen (HSV-(M_2), COS7) beobachtete Erhöhung der Affinität entspricht dem Konzept des „bivalent ligand approach“, wonach durch Dimerisierung von Liganden sowohl die Affinität als auch die Selektivität der Liganden gesteigert werden kann (Portoghese, 1989). Hinsichtlich der M_2/M_5 -Selektivität besteht jedoch zwischen Tacrin ($\Delta pEC_{0,5 \text{ Diss}} = 1,10$) und EHW21 ($\Delta pEC_{0,5 \text{ Diss}} = 1,21$) kein nennenswerter Unterschied.

Allosterische Modulation der Gleichgewichtsbindung von [3 H]NMS am M_2 -Rezeptor

Der Einfluss der allosterischen Modulatoren Tacrin und EHW21 auf die Gleichgewichtsbindung von [3 H]NMS läßt sich formal nicht von einer kompetitiven Interaktion unterscheiden. Selbst bei Erhöhung der [3 H]NMS-Konzentration von 0,2 nM auf 2,0 nM ließ sich der kooperative Interaktions-Charakter mit dieser Methodik nicht zeigen. Statt einer Abschwächung der maximalen Bindungshemmung (Erhöhung des unteren Bindungsniveaus) konnte lediglich eine Verschiebung der Bindungskurve nach rechts beobachtet werden (3.8, S. 118). Die ermittelten Kooperativitätsfaktoren

sind sehr viel größer als 100. Dennoch besteht kein Zweifel, dass Tacrin und EHW21 allosterische Liganden sind, denn sie würden ansonsten nicht die Fähigkeit besitzen, die [³H]NMS-Dissoziation zu verzögern. In Analogie zu den Hill-Steigungen, die in Dissoziationsexperimenten ermittelt wurden, lässt sich im Interaktionsexperiment mit [³H]NMS für Tacrin eine steile, für EHW21 dagegen eine normale (Steigung = -1) Beziehung beobachten (3.8, S. 118). Der atypische Bindungscharakter von Tacrin lässt sich also durch Dimerisierung (EHW21) sowohl am freien als auch am [³H]NMS besetzten M₂-Rezeptor eliminieren.

4.9 Zusammenstellung der Merkmale atypischer allosterischer Modulatoren Duo3, Tacrin und EHW21 im Vergleich zum typischen allosterischen Modulator WDuo3

Wie in den vorangehenden Kapiteln im Einzelnen beschrieben und erörtert, kann im Vergleich zum typischen allosterischen Modulator WDuo3 die atypische allosterische Modulation durch Duo3, Tacrin und EHW21 in vielen verschiedenen Experimenten beobachtet werden. In der Tabelle 28, S. 154 sind die Merkmale dieser Modulatoren - erarbeitet auf der Grundlage Literatur-bekannter und in dieser Arbeit erhobenen Werte - unter Berücksichtigung von (A) Dissoziationsexperimenten mit [³H]NMS (B) von Antagonismus-Untersuchungen mit Obidoxim, Magnesium-Ionen und Hexamethonium sowie (C) von heterologen allosterischen Interaktionsexperimenten unter Gleichgewichtsbedingungen zusammengefasst. Die vom Wirkbild des Modulators WDuo3 abweichenden Wirkformen der anderen Modulatoren sind rot markiert, um den atypischen Charakter hervorzuheben. Folgende Messparameter werden in dieser Tabelle berücksichtigt:

(a) Der Hill-Koeffizient n_H der Konzentrations-Wirkungskurven für die [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung an drei verschiedenen Membransuspensionen wird angegeben (COS7-hM₂, CHO-hM₂, HSV-(M₂); Index ^a: Zweipunkterfassung, Brandel Cell Harvester; Index ^b: Mehrpunkterfassung, Einzelfilteranlage). Mit „normal“ wird ein von $n_H = -1$ statistisch nicht signifikant verschiedener Wert bezeichnet. Hill-Koeffizienten, die deutlich kleiner als -1 sind, werden als „steil“ apostrophiert.

(b) Das Affinitätsverhältnis zwischen COS7-hM₂ und COS7-hM₅ sowie das Affinitätsverhältnis zwischen COS7-hM₂ und CHO-hM₂, zwischen COS7-hM₂ und HSV-(M₂) ^a und zwischen CHO-hM₂ und HSV-(M₂) ^a wird als $\Delta pEC_{0,5 \text{ Diss}}$ -Wert ausgedrückt. Da ein großes Affinitätsfenster größere Schwankungen des $pEC_{0,5 \text{ Diss}}$ -Wertes toleriert,

ohne dass ein Unterschied als biologisch relevant (wenngleich auch statistisch signifikant) interpretiert wird, sind in Klammern auf das COS7-hM₂/hM₅-Affinitätsverhältnis normierte Werte angegeben. Mit diesem Verfahren werden nominell kleine Abweichungen bei atypischen Modulatoren im Verhältnis zum COS7-hM₂/hM₅-Affinitätsfenster als relativ deutliche Schwankungen detektiert.

(c) Im Zusammenhang mit der Epitop-Abhängigkeit der COS7-hM₂/hM₅-Selektivität wird ein Affinitätsgewinn gegenüber hM₅ im Fall von CR1, CR2, CR3 und CR6 als „sensitiv“ bezeichnet. Für ¹⁷⁷Tyr und ⁴²³Thr bedeutet „Sensitivität“ einen Affinitätsverlust gegenüber COS7-hM₂. W84 weist an CR6 eine höhere Affinität auf als am hM₅-Rezeptor. Für Alcuronium jedoch wird kein Affinitätsgewinn verzeichnet. Alcuronium und W84 sind beide Liganden der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“. Hinsichtlich der Affinität an CR6 kann also zwischen einem „W84-Typ“ und einem „Alcuronium-Typ“ unterschieden werden.

(d) Für Antagonismus-Untersuchungen mit Obidoxim, Magnesium-Ionen und Hexamethonium ist die Art der kompetitiven Interaktion genannt. Als Affinitätsparameter dienen der pK_b-Wert und der pA₂-Wert (Schätzwert). Es werden Werte dieser Arbeit und Parameter aus der Literatur berücksichtigt (Index ¹: (Tränkle und Mohr, 1997), Index ²: (Schulz, 1998)).

(e) Für die heterologe allosterische Interaktion der Modulatoren mit [³H]NMS unter Gleichgewichtsbedingungen wird mit dem Schlagwort „Ehlert-konform“ angegeben, ob die erhaltene Inhibitionskurve eine normale Kurvensteilheit aufweist und der Datensatz somit nach dem ternären allosterischen Modell (Ehlert, 1988) auswertbar ist.

	WDuo3	Duo3	Tacrin	EHW21
A – Dissoziationsexperimente mit [³H]NMS				
COS7-hM ₂ : n _H	normal	normal	steil	normal
CHO-hM ₂ : n _H	normal	steil	steil	steil
HSV-(M ₂) ^a : n _H	normal	steil	steil	steil
HSV-(M ₂) ^b : n _H	normal	steil	steil	normal
$\Delta pEC_{0,5 \text{ Diss}}$ (Werte in Klammern: $\Delta pEC_{0,5 \text{ Diss}}$ bezogen auf das COS7-hM ₂ /hM ₅ -Affinitätsverhältnis)				
COS7-hM ₂ / COS7-hM ₅	2,14	1,16	1,10	1,21
COS7-hM ₂ / CHO-hM ₂	0,52 (0,24)	0,54 (0,47)	0,15 (0,14)	0,5 (0,29)
COS7-hM ₂ / HSV-(M ₂) ^a	0,48 (0,22)	0,80 (0,69)	0,17 (0,15)	0,50 (0,41)
CHO-hM ₂ / HSV-(M ₂) ^a	0,04 (0,02)	0,26 (0,22)	0,02 (0,02)	0,15 (0,12)
Epitop-Abhängigkeit der COS7-hM₂/hM₅-Selektivität				
CR1 (Kreis 4)	nicht-sensitiv	sensitiv	nicht-sensitiv	nicht-sensitiv
CR2 (Kreis 5)	nicht-sensitiv	sensitiv	nicht-sensitiv	sensitiv
CR3 (Kreis 6)	sensitiv	sensitiv	sensitiv	sensitiv
¹⁷⁷ Tyr	sensitiv	sensitiv	sensitiv	sensitiv
CR6 (Kreis 7)	nicht-sensitiv Alcuronium-Typ	sensitiv (W84-Typ)	sensitiv (W84-Typ)	sensitiv (W84-Typ)
⁴²³ Thr (Kreis 8)	sensitiv	nicht-sensitiv	sensitiv	nicht-sensitiv
B – Antagonismus-Untersuchungen an HSV-(M₂)				
Obidoxim	kompetitiv (pK _b = 4,16) ¹	nicht-kompetitiv (pA ₂ = 3,00) ¹	nicht-kompetitiv (pA ₂ = 3,91) ²	n.b.
Mg ²⁺	kompetitiv (pK _b = 3,20) ²	kompetitiv (pK _b = 1,21) ²	kooperativ (pA ₂ = 2,46) ²	nicht-kompetitiv (pA ₂ = 2,16)
Hexamethonium	kompetitiv (pK _b = 4,26)	nicht-kompetitiv (pA ₂ = 3,62)	kooperativ (pA ₂ = 3,86)	kompetitiv (pK _b = 3,54)
C – Heterologe allosterische Interaktion (Gleichgewicht) an HSV-(M₂)				
HSV-(M ₂) ^b : n _H	Ehlert-konform	Ehlert-konform	steil	Ehlert-konform

Tabelle 28: Zusammenstellung der Merkmale atypischer allosterischer Modulatoren Duo3, Tacrin und EHW21 im Vergleich zum typischen allosterischen Modulator WDuo3 (Erläuterungen im Text). *n.b.*: nicht bestimmt.

In der tabellarischen Übersicht wird deutlich, dass **Duo3** die [³H]NMS-Dissoziation atypisch moduliert, empfindlich auf die Auswahl des Expressionssystems für den M₂-Rezeptor (COS7- oder CHO-Zellen oder Herzventrikel des Hausschweins) reagiert und dass dessen Epitop-Abhängigkeit der COS7-hM₂/hM₅-Selektivität atypisch ist. Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass Duo3 den M₂-Rezeptor an einer von der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ unterschiedlichen Bindungsstelle atypisch allosterisch moduliert.

Die Epitopabhängigkeit der COS7-hM₂/hM₅-Selektivität von **Tacrin** kann als typisch gelten. Daher kann für Tacrin angenommen werden, dass die atypische allosterische Modulation des M₂-Rezeptors in Dissoziationsexperimenten und Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen mit [³H]NMS sowie in Antagonismus-Untersuchungen durch Interaktion zweier Tacrin-Moleküle an der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ zustande kommt.

Mit der *Dimerisierung des Tacrins* konnten einige Aspekte der atypischen allosterischen Modulation in typische Merkmale umgewandelt werden. Die allosterische Modulation des M₂-Rezeptors in Gleichgewichtsbindungsexperimenten ist als typisch einzustufen. Die Dissoziation von [³H]NMS vom M₂-Rezeptor wird in Abhängigkeit vom Expressionssystem des Rezeptors sowohl typisch als auch untypisch allosterisch moduliert. Die Epitopabhängigkeit der COS7-hM₂/hM₅-Selektivität von **EHW21** ist anders als die von Tacrin. Beschränkt man den Blick bei den Dissoziations-Experimenten auf Membransuspensionen, die aus Herzventrikeln des Hausschweins (Index ^b) und aus mit dem humanen M₂-Gen transient transfizierten COS7-Zellen gewonnen wurden, was aufgrund der deutlich höheren Anzahl an Versuchen gerechtfertigt erscheint, legt dieses nahe, dass EHW21, in einer eins zu eins Interaktion an einer „weiteren allosterischen Bindungsstelle“ des M₂-Rezeptors interagiert. EHW21 vereint in sich demnach Merkmale der atypischen und typischen allosterischen Modulatoren.

5. Zusammenfassung

Die muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren können durch eine Vielzahl strukturell heterogener Substanzen allosterisch moduliert werden. *Typische* allosterische Modulatoren wie *W84* (Hexan-1,6-bis(dimethyl-3'-phthalimidopropyl-ammoniumbromid)) und *WDuo3* (1,3-bis[4(phthalimidomethoxyimino-methyl)-pyridinium-1yl]-propan-dibromid), verzögern die Dissoziation von [³H]N-Methyl-Scopolamin ([³H]NMS), einem orthosterischen Liganden der Muskarin-Rezeptoren, in einer „eins zu eins Reaktion“ von Modulator und [³H]NMS besetzten Rezeptor. Die allosterische Modulation des M₂-Rezeptors durch *Duo3* (4,4'-bis[(2,6-dichloro-benzyloxy-imino)-methyl]-1,1'-propan-1,3-diyl-bis-pyridinium-dibromid), (-)-*Eburnamonin* und *Tacrin* (9-amino-1,2,3,4-tetra-hydroacridin-hydrochlorid) ist aufgrund steiler Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen am [³H]NMS besetzten M₂-Rezeptor *atypisch*. Für *Duo3* wurde aufgrund der Befunde verschiedener experimenteller Ansätze angenommen, dass es an einer von der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ unterschiedlichen Stelle am M₂-Rezeptor interagiert. Der atypische allosterische Wirkcharakter des *Tacrin* wurde dagegen durch die Vorstellung erklärt, dass zwei Tacrin-Moleküle möglicherweise gleichzeitig an der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ interagieren. Um mehr Einblick in die Möglichkeit einer solchen „zwei zu eins“ Interaktion von M₂-Rezeptor und Tacrin zu erhalten, wurde ein neues **Tacrin-Dimer** mit der Arbeitsbezeichnung **EHW21** (1,6-bis(amino-1,2,3,4-tetrahydroacridinyl)-hexan) erstmalig auf seine Fähigkeit, den M₂-Rezeptor allosterisch zu modulieren, untersucht. Die aus Dissoziations-Experimenten mit [³H]NMS erhaltenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven von EHW21 weisen eine normale Kurvensteilheit auf, wenn die Untersuchungen an Membransuspensionen aus Herzventrikeln des Hausschweins und aus mit dem humanen M₂-Gen transient transfizierten COS7-Zellen durchgeführt werden.

In der Vergangenheit wurde durch **Antagonismus-Studien** mit *Obidoxim* und *Magnesium-Ionen* nachgewiesen, dass eine Vielzahl typischer Modulatoren an einer „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ des M₂-Rezeptors interagiert. Für atypische Modulatoren waren die Ergebnisse jedoch nicht einheitlich. Um diese Literatur-bekanntesten Untersuchungen hinsichtlich der Antagonisierbarkeit des Effektes der atypischen allosterischen Modulatoren zu ergänzen, wurde das

antagonistische Werkzeug **Hexamethonium** eingeführt. Der atypische Wirkcharakter von *Duo3* und *Tacrin* sowie *Eburnamonin* konnte mit dem antagonistischen Werkzeug Hexamethonium bestätigt werden. Die Interaktion von Hexamethonium gegenüber *Gallamin*, *WDuo3* und *EHW21* konnte als kompetitiv antagonistisch charakterisiert werden. Der Affinitätsparameter pK_b für Hexamethonium in der Interaktion gegenüber EHW21 am [3H]NMS besetzten M_2 -Rezeptor unterschied sich jedoch deutlich vom pK_b -Wert, wie er in der Interaktion von Hexamethonium gegenüber *WDuo3* und *Gallamin*, typischen Modulatoren der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“, erhalten wird. Mit Magnesium-Ionen wurde eine nicht-kompetitive Interaktion gegenüber EHW21 beobachtet. Dieses legt nahe, dass das Tacrin-Dimer EHW21 nicht an der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ interagiert.

Mit Untersuchungen an [3H]NMS besetzten M_2/M_5 -chimären Rezeptoren eröffnete sich die Möglichkeit, die **Epitopabhängigkeit der M_2 -Selektivität atypischer** allosterischer Modulatoren zu untersuchen.

Für die *typischen* allosterischen Modulatoren W84 und Diallylcaracurin V war gefunden worden, dass die M_2 -Selektivität am [3H]NMS besetzten Rezeptor vollständig auf die Aminosäuren 177 Tyrosin und 423 Threonin zurückgeführt werden kann (Voigtländer et al., 2003). Hier konnte für **WDuo3**, wie für einen mit W84 eng verwandten typischen allosterischen Modulator erwartet, erstmalig gezeigt werden, dass seine M_2 -Selektivität ebenfalls vollständig von den Aminosäuren 177 Tyrosin und 423 Threonin abhängt.

Die hier gefundene zwar nicht vollständige Abhängigkeit der M_2/M_5 -Selektivität des **Tacrin** von 177 Tyrosin und 423 Threonin, sowie die typische Epitopabhängigkeit der M_2 -Selektivität, wie sie auch von W84 gezeigt wird, stützen die in der Literatur zu findende Hypothese, dass Tacrin an der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ interagiert und sein atypischer allosterischer Wirkcharakter lediglich durch eine gleichzeitige Interaktion zweier Tacrin-Moleküle an dieser Bindungsstelle des M_2 -Rezeptors zustande kommt.

Typische allosterische Modulatoren weisen am chimären humanen Rezeptor CR2 (hM₅ 1-76, hM₂ 70-155, hM₅ 163-532) im Vergleich zum M_5 -Rezeptor keine erhöhte Affinität auf. Das Tacrin-Dimer **EHW21** jedoch hat zu CR2 eine höhere Affinität als zum M_5 -Rezeptor. Das stützt die Befunde aus den Antagonismus-Untersuchungen

hinsichtlich der Vermutung, dass EHW21 an einer „weiteren allosterischen Bindungsstelle“ am M₂-Rezeptor interagiert.

Die atypische allosterische Modulation des M₂-Rezeptors durch **Duo3** konnte in verschiedenen experimentellen Ansätzen dieser Arbeit bestätigt werden. Doch vor allem die Abhängigkeit der M₂/M₅-Selektivität von CR1 (hM₂ 1-69, hM₅ 77-532) und CR2 (hM₅ 1-76, hM₂ 70-155, hM₅ 163-532) ergab Hinweise, dass Duo3 an einer „weiteren allosterischen Bindungsstelle“ des M₂-Rezeptors interagiert.

Untersuchungen an verschiedenen *Membransuspensionen* aus *Herzventrikeln* des *Hausschweins* sowie aus *COS7*- und *CHO-Zellen* führten zu der Vermutung, dass die an vier Positionen mögliche **N-Glykosylierung** des extrazellulären Amino-terminalen Endes des M₂-Rezeptors die Interaktion des atypischen allosterischen Modulators *Duo3* beeinflusst.

6. Literaturverzeichnis

Aebi M, Helenius A, Schenk B, Barone R, Fiumara A, Berger EG, Hennet T, Imbach T, Stutz A, Bjursell C, Uller A, Wahlstrom JG, Briones P, Cardo E, Clayton P, Winchester B, Cormier-Dalre V, de Lonlay P, Cuer M, Dupre T, Seta N, de Koning T, Dorland L, de Loos F, and Kupers L (1999) Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndromes Become Congenital Disorders of Glycosylation: an Updated Nomenclature for CDG. First International Workshop on CDGS. *Glycoconj J* **16**:669-671.

Akahane K, Furukawa Y, Karasawa Y, and Chiba S (1990) Muscarinic Receptor Subtypes Mediating Negative Chrono- and Inotropic Responses in Isolated, Blood-Perfused Dog Right Atria. *J Auton Pharmacol* **10**:39-48.

Arunlakshana O and Schild HO (1958) Some Quantitative Uses of Drug Antagonists. 1958. *Br J Pharmacol* **120**:151-161.

Barlow R and Blake JF (1989) Hill Coefficients and the Logistic Equation. *Trends Pharmacol Sci* **10**:440-441.

Bennet J and Yamamura H (1985) Neurotransmitter, Hormone, or Drug Receptor Binding Methods, in *Neurotransmitter receptor binding* Raven Press, New York.

Birdsall NJ, Farries T, Gharagozloo P, Kobayashi S, Lazareno S, and Sugimoto M (1999) Subtype-Selective Positive Cooperative Interactions Between Brucine Analogs and Acetylcholine at Muscarinic Receptors: Functional Studies. *Mol Pharmacol* **55**:778-786.

Birdsall NJ, Lazareno S, Popham A, and Saldanha J (2001) Multiple Allosteric Sites on Muscarinic Receptors. *Life Sci* **68**:2517-2524.

Bonner TI (1989) The Molecular Basis of Muscarinic Receptor Diversity. *Trends Neurosci* **12**:148-151.

Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, and Brann MR (1987) Identification of a Family of Muscarinic Acetylcholine Receptor Genes. *Science* **237**:527-532.

Bonner TI, Young AC, Brann MR, and Buckley NJ (1988) Cloning and Expression of the Human and Rat M5 Muscarinic Acetylcholine Receptor Genes. *Neuron* **1**:403-410.

Broadley K and Kelly D (2001) Muscarinic Receptor Agonists and Antagonists. *Molecules* **6**:142-193.

Brodde OE and Michel MC (1999) Adrenergic and Muscarinic Receptors in the Human Heart. *Pharmacol Rev* **51**:651-690.

Brown BR, Jr. and Crout JR (1970) The Sympathomimetic Effect of Gallamine on the Heart. *J Pharmacol Exp Ther* **172**:266-273.

Brown TA (1999) *Gentechnologie für Einsteiger*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

Buller S, Zlotos DP, Mohr K, and Ellis J (2002) Allosteric Site on Muscarinic Acetylcholine Receptors: a Single Amino Acid in Transmembrane Region 7 Is Critical to the Subtype Selectivities of Caracurine V Derivatives and Alkane-Bisammonium Ligands. *Mol Pharmacol* **61**:160-168.

Buller, S. M. (2002) Identifizierung von Rezeptorepitopen für die Subtyp-selektive Interaktion allosterischer Modulatoren mit muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren anhand von Mutagenese-Untersuchungen.

Dissertationsschrift: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Burgmer U, Schulz U, Tränkle C, and Mohr K (1998) Interaction of Mg²⁺ With the Allosteric Site of Muscarinic M2 Receptors.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **357**:363-370.

Burgmer, Ulrike (1997) Effekte kationischer Pufferkomponenten auf die Wirkung allosterischer Modulatoren an kardialen Muscarinrezeptoren.

Dissertationsschrift: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Caulfield MP and Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of Muscarinic Acetylcholine Receptors.

Pharmacol Rev **50**:279-290.

Chen CA and Okayama H (1988) Calcium Phosphate-Mediated Gene Transfer: a Highly Efficient Transfection System for Stably Transforming Cells With Plasmid DNA.

Biotechniques **6**:632-638.

Cheng Y and Prusoff WH (1973) Relationship Between the Inhibition Constant (K₁) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 Per Cent Inhibition (I₅₀) of an Enzymatic Reaction.

Biochem Pharmacol **22**:3099-3108.

Christopoulos A, Lanzafame A, and Mitchelson F (1998) Allosteric Interactions at Muscarinic Cholinoceptors.

Clin Exp Pharmacol Physiol **25**:185-194.

Clark AL and Mitchelson F (1976) The Inhibitory Effect of Gallamine on Muscarinic Receptors.

Br J Pharmacol **58**:323-331.

DeBlasi A, O'Reilly K, and Motulsky HJ (1989) Calculating Receptor Number From Binding Experiments Using Same Compound As Radioligand and Competitor.

Trends Pharmacol Sci **10**:227-229.

Dorje F, Wess J, Lambrecht G, Tacke R, Mutschler E, and Brann MR (1991) Antagonist Binding Profiles of Five Cloned Human Muscarinic Receptor Subtypes.

J Pharmacol Exp Ther **256**:727-733.

Ehlert FJ (1988) Estimation of the Affinities of Allosteric Ligands Using Radioligand Binding and Pharmacological Null Methods.

Mol Pharmacol **33**:187-194.

Ellis J (1997) Allosteric Binding Sites on Muscarinic Receptors.

Drug Development Research **40**:193-204.

Ellis J and Seidenberg M (1992) Two Allosteric Modulators Interact at a Common Site on Cardiac Muscarinic Receptors.

Mol Pharmacol **42**:638-641.

Ellis J, Seidenberg M, and Brann MR (1993) Use of Chimeric Muscarinic Receptors to Investigate Epitopes Involved in Allosteric Interactions.

Mol Pharmacol **44**:583-588.

Felder CC (1995) Muscarinic Acetylcholine Receptors: Signal Transduction Through Multiple Effectors.

FASEB J **9**:619-625.

- Ferretti PG, Bia A, Bufalino L, Cavrini P, and Cucinotta D (1982) Effects of Acute and Chronic Treatment With (-)Eburnamonine on the Tissue Supply of Oxygen.
Pharmatherapeutica **3**:119-126.
- Ford AP, Eglén RM, and Whiting RL (1992) Analysis of Muscarinic Cholinoceptors Mediating Phosphoinositide Hydrolysis in Guinea Pig Cardiac Muscle.
Eur J Pharmacol **225**:105-112.
- Forth W, Henschler D, Rummel W, and Starke K (1998) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Freeman SE and Dawson RM (1991) Tacrine: a Pharmacological Review.
Prog Neurobiol **36**:257-277.
- Fujii T and Kawashima K (2001) An Independent Non-Neuronal Cholinergic System in Lymphocytes.
Jpn J Pharmacol **85**:11-15.
- Gadbut AP and Galper JB (1994) A Novel M3 Muscarinic Acetylcholine Receptor Is Expressed in Chick Atrium and Ventricle.
J Biol Chem **269**:25823-25829.
- Gerstin EH, Luong T, and Ehlert FJ (1992) Heparin, Dextran and Trypan Blue Allosterically Modulate M2 Muscarinic Receptor Binding Properties and Interfere With Receptor-Mediated Inhibition of Adenylate Cyclase.
J Pharmacol Exp Ther **263**:910-917.
- Gluzman Y (1981) SV40-Transformed Simian Cells Support the Replication of Early SV40 Mutants.
Cell **23**:175-182.
- Gnagey AL, Seidenberg M, and Ellis J (1999) Site-Directed Mutagenesis Reveals Two Epitopes Involved in the Subtype Selectivity of the Allosteric Interactions of Gallamine at Muscarinic Acetylcholine Receptors.
Mol Pharmacol **56**:1245-1253.
- Grando SA, Kawashima K, and Wessler I (2003) Introduction: the Non-Neuronal Cholinergic System in Humans.
Life Sci **72**:2009-2012.
- Green ED and Baenziger JU (1988) Asparagine-Linked Oligosaccharides on Lutropin, Follitropin, and Thyrotropin. II. Distributions of Sulfated and Sialylated Oligosaccharides on Bovine, Ovine, and Human Pituitary Glycoprotein Hormones.
J Biol Chem **263**:36-44.
- Haberberger RV, Pfeil U, Lips KS, and Kummer W (2002) Expression of the High-Affinity Choline Transporter, CHT1, in the Neuronal and Non-Neuronal Cholinergic System of Human and Rat Skin.
J Invest Dermatol **119**:943-948.
- Helenius A and Aebi M (2001) Intracellular Functions of N-Linked Glycans.
Science **291**:2364-2369.
- Hill AV (1910) The Possible Effects of the Aggregation of the Molecules of Haemoglobin on Its Dissociation Curves.
J Physiol (Proc) **40**:iv-vii.
- Holzgrabe U and Mohr K (1998) Allosteric Modulators of Ligand Binding to Muscarinic Acetylcholine Receptors.
Drug Discovery Today **3**:214-222.

Holzgrabe U, Bender W, Cid HM, Staudt M, Pick R, Pfletschinger C, Balatkova E, Tränkle C, and Mohr K (2000) Ligands for the Common Allosteric Site of Acetylcholine M2-Receptors: Development and Application.

Pharm Acta Helv **74**:149-155.

Hu J, Wang SZ, Forray C, and El Fakahany EE (1992) Complex Allosteric Modulation of Cardiac Muscarinic Receptors by Protamine: Potential Model for Putative Endogenous Ligands.

Mol Pharmacol **42**:311-321.

Hu MK, Wu LJ, Hsiao G, and Yen MH (2002) Homodimeric Tacrine Congeners As Acetylcholinesterase Inhibitors.

J Med Chem **45**:2277-2282.

Hulme EC, Berrie CP, Birdsall NJ, and Burgen AS (1981) Two Populations of Binding Sites for Muscarinic Antagonists in the Rat Heart.

Eur J Pharmacol **73**:137-142.

Hulme EC, Birdsall NJ, and Buckley NJ (1990) Muscarinic Receptor Subtypes.

Annu Rev Pharmacol Toxicol **30**:633-673.

Hulme EC, Lu ZL, Bee M, Curtis CA, and Saldanha J (2001) The Conformational Switch in Muscarinic Acetylcholine Receptors.

Life Sci **68**:2495-2500.

Hutchison CA, Phillips S, Edgell MH, Gillam S, Jahnke P, and Smith M (1978) Mutagenesis at a Specific Position in a DNA Sequence.

J Biol Chem **253**:6551-6560.

Jaiswal N, Lambrecht G, Mutschler E, and Malik KU (1989) Effect of M2 Muscarinic Receptor Antagonist 4-DAMP, on Prostaglandin Synthesis and Mechanical Function in the Isolated Rabbit Heart.

Gen Pharmacol **20**:497-502.

Jakubik J, Bacakova L, El Fakahany EE, and Tucek S (1997) Positive Cooperativity of Acetylcholine and Other Agonists With Allosteric Ligands on Muscarinic Acetylcholine Receptors.

Mol Pharmacol **52**:172-179.

Kan H, Ruan Y, and Malik KU (1996) Localization and Characterization of the Subtypes(s) of Muscarinic Receptor Involved in Prostacyclin Synthesis in Rabbit Heart.

J Pharmacol Exp Ther **276**:934-941.

Kasturi L, Eshleman JR, Wunner WH, and Shakin-Eshleman SH (1995) The Hydroxy Amino Acid in an Asn-X-Ser/Thr Sequon Can Influence N-Linked Core Glycosylation Efficiency and the Level of Expression of a Cell Surface Glycoprotein.

J Biol Chem **270**:14756-14761.

Katz RL and Eakins KE (1966) The Effects of Succinylcholine, Decamethonium, Hexacarbacholine, Gallamine and Dimethyl Tubocurarine on the Twitch and Tonic Neuromuscular Systems of the Cat.

J Pharmacol Exp Ther **154**:303-309.

Kim J, Isokawa M, Ledent C, and Alger BE (2002) Activation of Muscarinic Acetylcholine Receptors Enhances the Release of Endogenous Cannabinoids in the Hippocampus.

J Neurosci **22**:10182-10191.

Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Unger RE, Kriegsmann J, Kilbinger H, and Wessler I (2001) The Non-Neuronal Cholinergic System in the Endothelium: Evidence and Possible Pathobiological Significance.

Jpn J Pharmacol **85**:24-28.

Kords H, Lüllmann H, Ohnesorge FK, and Wassermann O (1968) Action of Atropine and Some Hexane-1.6-Bis-Ammonium Derivatives Upon the Toxicity of DFP Im Mice.

Eur J Pharmacol **3**:341-346.

Kostenis E, Botero Cid HM, Holzgrabe Y, and Mohr K (1996) Evidence for a Multiple Binding Mode of Bispyridinium-Type Allosteric Modulators of Muscarinic Receptors.
Eur J Pharmacol **314**:385-392.

Kostenis E and Mohr K (1996) Two-Point Kinetic Experiments to Quantify Allosteric Effects on Radioligand Dissociation.
Trends Pharmacol Sci **17**:280-283.

Krejci A and Tucek S (2002) Quantitation of MRNAs for M(1) to M(5) Subtypes of Muscarinic Receptors in Rat Heart and Brain Cortex.
Mol Pharmacol **61**:1267-1272.

Kubo T, Maeda A, Sugimoto K, Akiba I, Mikami A, Takahashi H, Haga T, Haga K, Ichiyama A, and Kangawa K (1986) Primary Structure of Porcine Cardiac Muscarinic Acetylcholine Receptor Deduced From the cDNA Sequence.
FEBS Lett **209**:367-372.

Lanzafame A, Christopoulos A, and Mitchelson F (1996) Interactions of Agonists With an Allosteric Antagonist at Muscarinic Acetylcholine M2 Receptors.
Eur J Pharmacol **316**:27-32.

Lanzafame A, Christopoulos A, and Mitchelson F (1997) Three Allosteric Modulators Act at a Common Site, Distinct From That of Competitive Antagonists, at Muscarinic Acetylcholine M2 Receptors.
J Pharmacol Exp Ther **282**:278-285.

Lazareno S and Birdsall N (1996) Quantitation of Allosteric Interactions.
Trends Pharmacol Sci **17**:443-444.

Lazareno S and Birdsall NJ (1993) Estimation of Competitive Antagonist Affinity From Functional Inhibition Curves Using the Gaddum, Schild and Cheng-Prusoff Equations.
Br J Pharmacol **109**:1110-1119.

Lazareno S and Birdsall NJ (1995) Detection, Quantitation, and Verification of Allosteric Interactions of Agents With Labeled and Unlabeled Ligands at G Protein-Coupled Receptors: Interactions of Strychnine and Acetylcholine at Muscarinic Receptors.
Mol Pharmacol **48**:362-378.

Lazareno S, Gharagozloo P, Kuonen D, Popham A, and Birdsall NJ (1998) Subtype-Selective Positive Cooperative Interactions Between Brucine Analogues and Acetylcholine at Muscarinic Receptors: Radioligand Binding Studies.
Mol Pharmacol **53**:573-589.

Lazareno S, Popham A, and Birdsall NJ (2000) Allosteric Interactions of Staurosporine and Other Indolocarbazoles With N-[Methyl-(3)H]Scopolamine and Acetylcholine at Muscarinic Receptor Subtypes: Identification of a Second Allosteric Site.
Mol Pharmacol **58**:194-207.

Lazareno S, Popham A, and Birdsall NJ (2002) Analogs of WIN 62,577 Define a Second Allosteric Site on Muscarinic Receptors.
Mol Pharmacol **62**:1492-1505.

Lee NH and El Fakahany EE (1988) Influence of Ligand Choice on the Apparent Binding Profile of Gallamine to Cardiac Muscarinic Receptors. Identification of Three Main Types of Gallamine-Muscarinic Receptor Interactions.
J Pharmacol Exp Ther **246**:829-838.

Lee NH, Hu J, and El Fakahany EE (1992) Modulation by Certain Conserved Aspartate Residues of the Allosteric Interaction of Gallamine at the M1 Muscarinic Receptor.
J Pharmacol Exp Ther **262**:312-316.

- Leppik RA, Miller RC, Eck M, and Paquet JL (1994) Role of Acidic Amino Acids in the Allosteric Modulation by Gallamine of Antagonist Binding at the M2 Muscarinic Acetylcholine Receptor. *Mol Pharmacol* **45**:983-990.
- Lindl T (2000) *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Linee P, Hollands MA, Quiniou P, Gueguen M, and Le Polles JB (1981) Experimental Approach of Activity and Mechanism(s) of Action of Drugs Used in Cerebral Metabolic Insufficiency. Application to 1-Eburnamonine. *Eur Neurol* **20**:253-257.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951) Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.
- Marolda M, Fragassi N, and Buscaino GA (1978) Clinical Evaluation of (-)Eburnamonine in Comparison With Nicergoline in Patients Suffering From Chronic Brain Ischemia. *Eur Neurol* **17 Suppl 1**:159-166.
- Matsui H, Lazareno S, and Birdsall NJ (1995) Probing of the Location of the Allosteric Site on M1 Muscarinic Receptors by Site-Directed Mutagenesis. *Mol Pharmacol* **47**:88-98.
- Mauser, Harald (1999) Endohedrale und Exohedrale Reaktivität des [60]Fullerens: Computerchemische und experimentelle Untersuchungen. *Dissertationsschrift*.
- Mohr K and Tränkle C (1994) Allosteric Effects of the Alkane-Bis-Ammonium Compound W84 and of Tacrine on [3H]Pirenzepine Binding at M1-Receptors in Rat Cerebral Cortex. *Pharmacol Toxicol* **75**:391-394.
- Motulsky H (1996a) *The GraphPad guide to analyzing radioligand binding data*. San Diego.
- Motulsky H (1996b) *The GraphPad guide to nonlinear regression*. San Diego.
- Mullis KB and Faloona FA (1987) Specific Synthesis of DNA in Vitro Via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods Enzymol* **155**:335-350.
- Muth M, Bender W, Scharfenstein O, Holzgrabe U, Balatkova E, Tränkle C, and Mohr K (2003) Systematic Development of High Affinity Bis(Ammonio)Alkane-Type Allosteric Enhancers of Muscarinic Ligand Binding. *J Med Chem* **46**:1031-1040.
- Okayama H and Berg P (1983) A cDNA Cloning Vector That Permits Expression of cDNA Inserts in Mammalian Cells. *Mol Cell Biol* **3**:280-289.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le T, I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, and Miyano M (2000) Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* **289**:739-745.
- Pauca AL (1988) Upper Limb Blood Flow During Hexamethonium-Induced Hypotension. Studies in Patients Anaesthetized With Halothane. *Br J Anaesth* **60**:151-156.

- Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Smith DH, Ramachandran J, and Capon DJ (1987a) Distinct Primary Structures, Ligand-Binding Properties and Tissue-Specific Expression of Four Human Muscarinic Acetylcholine Receptors.
EMBO J **6**:3923-3929.
- Peralta EG, Winslow JW, Peterson GL, Smith DH, Ashkenazi A, Ramachandran J, Schimerlik MI, and Capon DJ (1987b) Primary Structure and Biochemical Properties of an M2 Muscarinic Receptor.
Science **236**:600-605.
- Pogozheva ID, Lomize AL, and Mosberg HI (1997) The Transmembrane 7-Alpha-Bundle of Rhodopsin: Distance Geometry Calculations With Hydrogen Bonding Constraints.
Biophys J **72**:1963-1985.
- Portoghese PS (1989) Bivalent Ligands and the Message-Address Concept in the Design of Selective Opioid Receptor Antagonists.
Trends Pharmacol Sci **10**:230-235.
- Potter LT, Ferrendelli CA, Hanchett HE, Hollifield MA, and Lorenzi MV (1989) Tetrahydroaminoacridine and Other Allosteric Antagonists of Hippocampal M1 Muscarinic Receptors.
Mol Pharmacol **35**:652-660.
- Proska J and Tucek S (1994) Mechanisms of Steric and Cooperative Actions of Alcuronium on Cardiac Muscarinic Acetylcholine Receptors.
Mol Pharmacol **45**:709-717.
- Proska J and Tucek S (1996) Positive Allosteric Action of Eburnamonine on Cardiac Muscarinic Acetylcholine Receptors.
Eur J Pharmacol **305**:201-205.
- Raasch A, Scharfenstein O, Tränkle C, Holzgrabe U, and Mohr K (2002) Elevation of Ligand Binding to Muscarinic M(2) Acetylcholine Receptors by Bis(Ammonio)Alkane-Type Allosteric Modulators.
J Med Chem **45**:3809-3812.
- Raju TS, Briggs JB, Borge SM, and Jones AJ (2000) Species-Specific Variation in Glycosylation of IgG: Evidence for the Species-Specific Sialylation and Branch-Specific Galactosylation and Importance for Engineering Recombinant Glycoprotein Therapeutics.
Glycobiology **10**:477-486.
- Richards MH (1991) Pharmacology and Second Messenger Interactions of Cloned Muscarinic Receptors.
Biochem Pharmacol **42**:1645-1653.
- Rosenberger LB, Yamamura HI, and Roeske WR (1980) Cardiac Muscarinic Cholinergic Receptor Binding Is Regulated by Na⁺ and Guanyl Nucleotides.
J Biol Chem **255**:820-823.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, and Erlich HA (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA With a Thermostable DNA Polymerase.
Science **239**:487-491.
- Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR (1977) DNA Sequencing With Chain-Terminating Inhibitors.
Proc Natl Acad Sci U S A **74**:5463-5467.
- Savulescu J and Spriggs M (2002) The Hexamethonium Asthma Study and the Death of a Normal Volunteer in Research.
J Med Ethics **28**:3-4.
- Schröter A, Tränkle C, and Mohr K (2000) Modes of Allosteric Interactions With Free and [3H]N-Methylscopolamine-Occupied Muscarinic M2 Receptors As Deduced From Buffer-Dependent Potency Shifts.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**:512-519.

Schulz, U. (1998) Antagonismus-Untersuchungen zur Topographie der Bindung allosterischer Modulatoren an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren des Subtyps M₂.
Dissertationsschrift: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Shakin-Eshleman SH, Spitalnik SL, and Kasturi L (1996) The Amino Acid at the X Position of an Asn-X-Ser Sequon Is an Important Determinant of N-Linked Core-Glycosylation Efficiency.
J Biol Chem **271**:6363-6366.

Sharma VK, Colecraft HM, Rubin LE, and Sheu SS (1997) Does Mammalian Heart Contain Only the M₂ Muscarinic Receptor Subtype?
Life Sci **60**:1023-1029.

Sharma VK, Colecraft HM, Wang DX, Levey AI, Grigorenko EV, Yeh HH, and Sheu SS (1996) Molecular and Functional Identification of M₁ Muscarinic Acetylcholine Receptors in Rat Ventricular Myocytes.
Circ Res **79**:86-93.

Shi H, Wang H, and Wang Z (1999) Identification and Characterization of Multiple Subtypes of Muscarinic Acetylcholine Receptors and Their Physiological Functions in Canine Hearts.
Mol Pharmacol **55**:497.

Spalding TA, Birdsall NJ, Curtis CA, and Hulme EC (1994) Acetylcholine Mustard Labels the Binding Site Aspartate in Muscarinic Acetylcholine Receptors.
J Biol Chem **269**:4092-4097.

Stockton JM, Birdsall NJ, Burgen AS, and Hulme EC (1983) Modification of the Binding Properties of Muscarinic Receptors by Gallamine.
Mol Pharmacol **23**:551-557.

Sun LS, Huber F, Robinson RB, Bilezikian JP, Steinberg SF, and Vulliemoz Y (1996) Muscarinic Receptor Heterogeneity in Neonatal Rat Ventricular Myocytes in Culture.
J Cardiovasc Pharmacol **27**:455-461.

Tietje KM and Nathanson NM (1991) Embryonic Chick Heart Expresses Multiple Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtypes. Isolation and Characterization of a Gene Encoding a Novel M₂ Muscarinic Acetylcholine Receptor With High Affinity for Pirenzepine.
J Biol Chem **266**:17382-17387.

Toyama T, Yokoyama I, and Nishi K (1975) Effects of Hexamethonium and Other Ganglionic Blocking Agents on Electrical Activity of the Esophagus Induced by Vagal Stimulation in the Dog.
Eur J Pharmacol **31**:63-71.

Tränkle C, Kostenis E, Burgmer U, and Mohr K (1996) Search for Lead Structures to Develop New Allosteric Modulators of Muscarinic Receptors.
J Pharmacol Exp Ther **279**:926-933.

Tränkle C, Mies-Klomfass E, Cid MH, Holzgrabe U, and Mohr K (1998) Identification of a [3H]Ligand for the Common Allosteric Site of Muscarinic Acetylcholine M₂ Receptors.
Mol Pharmacol **54**:139-145.

Tränkle C and Mohr K (1996) Kompetitiver Antagonismus Von Hexamethonium Gegenüber Der Allosterischen Wirkung Von Gallamin an Kardialen M₂-Rezeptoren.
Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **353 (Suppl.)**.

Tränkle C and Mohr K (1997) Divergent Modes of Action Among Cationic Allosteric Modulators of Muscarinic M₂ Receptors.
Mol Pharmacol **51**:674-682.

- Tränkle C, Weyand O, Voigtländer U, Mynett A, Lazareno S, Birdsall NJM, and Mohr K (2003) Interactions of Orthosteric and Allosteric Ligands With [3H]Dimethyl-W84 at the Common Allosteric Site of Muscarinic M2 Receptors.
Mol Pharmacol **64**:180-190.
- Tucek S and Proška J (1995) Allosteric Modulation of Muscarinic Acetylcholine Receptors.
Trends Pharmacol Sci **16**:205-212.
- van Koppen CJ and Nathanson NM (1990) Site-Directed Mutagenesis of the M2 Muscarinic Acetylcholine Receptor. Analysis of the Role of N-Glycosylation in Receptor Expression and Function.
J Biol Chem **265**:20887-20892.
- Voigtländer U, Jöhren K, Mohr M, Raasch A, Tränkle C, Buller S, Ellis J, Höltje H-D, and Mohr K (2003) Allosteric Site on Muscarinic Acetylcholine Receptors: Identification of Two Amino Acids in the Muscarinic M2 Receptor That Account Entirely for the M2/M5 Subtype Selectivities of Some Structurally Diverse Allosteric Ligands in N-Methylscopolamine-Occupied Receptors.
Mol Pharmacol **64**:21.
- Wang H, Han H, Zhang L, Shi H, Schram G, Nattel S, and Wang Z (2001) Expression of Multiple Subtypes of Muscarinic Receptors and Cellular Distribution in the Human Heart.
Mol Pharmacol **59**:1029-1036.
- Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, and Lewis KW (1994) Hepatotoxic Effects of Tacrine Administration in Patients With Alzheimer's Disease.
JAMA **271**:992-998.
- Waud DR (1975) Analysis of Dose-Response Curves, in *Methods in Pharmacology* (Daniel EE and Paton DM eds) pp 471-506, Plenum Press, New York.
- Wess J, Bonner TI, and Brann MR (1990) Chimeric M2/M3 Muscarinic Receptors: Role of Carboxyl Terminal Receptor Domains in Selectivity of Ligand Binding and Coupling to Phosphoinositide Hydrolysis.
Mol Pharmacol **38**:872-877.
- Wess J, Gdula D, and Brann MR (1992) Structural Basis of the Subtype Selectivity of Muscarinic Antagonists: a Study With Chimeric M2/M5 Muscarinic Receptors.
Mol Pharmacol **41**:369-374.
- Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, and Kirkpatrick CJ (2003) The Non-Neuronal Cholinergic System in Humans: Expression, Function and Pathophysiology.
Life Sci **72**:2055-2061.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, and Racke K (1998) Non-Neuronal Acetylcholine, a Locally Acting Molecule, Widely Distributed in Biological Systems: Expression and Function in Humans.
Pharmacol Ther **77**:59-79.
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, and Racke K (1999) The Cholinergic 'Pitfall': Acetylcholine, a Universal Cell Molecule in Biological Systems, Including Humans.
Clin Exp Pharmacol Physiol **26**:198-205.
- Yang CM, Yeh HM, Sung TC, Chen FF, and Wang YY (1992) Characterization of Muscarinic Receptor Subtypes in Canine Left Ventricular Membranes.
J Recept Res **12**:427-449.

7. Statistik

Vergleich der $pEC_{0,5 \text{ Diss}}$ -Werte mittels eines zweiseitigen Zweistichproben t-Testes unter Angabe des p-Wertes (s. = signifikant; n.s. = nicht signifikant):

Tabelle 21, S. 113 (Duo3)

COS7-hM ₂	COS7-BJ	n.s.	0,7953
COS7-hM ₂	CHO-hM ₂	s.	0,0047
COS7-hM ₂	HSV-(M ₂) ^a	s.	0,0010
CHO-hM ₂	HSV-(M ₂) ^a	s.	0,0020
HSV-(M ₂) ^a	HSV-(M ₂) ^b	s.	0,0025
COS7-hM ₅	CHO-hM ₅	n.s.	0,9692

Tabelle 22, S. 114 (WDuo3)

COS7-hM ₂	COS7-BJ	n.s.	0,1244
COS7-hM ₂	CHO-hM ₂	s.	0,0019
COS7-hM ₂	HSV-(M ₂) ^a	s.	0,0017
CHO-hM ₂	HSV-(M ₂) ^a	n.s.	0,6087
HSV-(M ₂) ^a	HSV-(M ₂) ^b	s.	<0,001
COS7-hM ₅	CHO-hM ₅	n.s.	0,9233

Tabelle 23, S. 116 (Tacin)

COS7-hM ₂	COS7-BJ	n.s.	0,2341
COS7-hM ₂	CHO-hM ₂	s.	0,0399
COS7-hM ₂	HSV-(M ₂) ^a	s.	0,0191
CHO-hM ₂	HSV-(M ₂) ^a	n.s.	0,6087
HSV-(M ₂) ^a	HSV-(M ₂) ^b	s.	0,4310
COS7-hM ₅	CHO-hM ₅	n.s.	0,7487

Tabelle 24, S. 117 (EHW21)

COS7-hM ₂	COS7-BJ	n.s.	0,9338
COS7-hM ₂	CHO-hM ₂	s.	0,0149
COS7-hM ₂	HSV-(M ₂) ^a	s.	0,0043
CHO-hM ₂	HSV-(M ₂) ^a	s.	0,0241
HSV-(M ₂) ^a	HSV-(M ₂) ^b	n.s.	0,1076
COS7-hM ₅	CHO-hM ₅	n.s.	0,7472

8. Publikationsliste

8.1 Abstrakta / Kongressmitteilungen

Dittmann A, Weyand O, Holzgrabe U, Mohr K and Tränkle C (2001)

Allosteric Actions of the Atypical Allosteric Agent Tacrine and of a Novel "Tacrine Dimer" in Muscarinic M₂ Receptors.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **363** (Suppl.):R26, 89.

Tränkle C, Dittmann A, Buller S, Ellis J and Mohr K (2002)

Atypical Versus Typical Bispyridinium Type Muscarinic Allosteric Agents: Studies in Mutant M₂/M₅ Receptors.

Arch Pharm Pharm Med Chem **335** (Suppl. 1):134, P:P35.