

**Pharmakologische und Biochemische Untersuchungen zur
Allosterischen Modulation Agonist-induzierter Wirkungen an
muskarinischen Acetylcholinrezeptoren**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Niels Eckstein

aus

Stuttgart Bad-Canstadt

Bonn 2004

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

1. Referent: Prof. Dr. med. Klaus Mohr
2. Referent: Prof. Dr. med. Kurt Racké

Tag der Promotion:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1997 bis Dezember 2001 in der Pharmakologie & Toxikologie des Pharmazeutischen Institutes der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Klaus Mohr angefertigt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr, der mich lehrte, wissenschaftliche Dinge in ihrer gesamten Tiefe zu betrachten und mit Ausdauer und Scharfsinn, den Schein vom Sein zu trennen. Auch für die stete Unterstützung in der Lehre sei ihm gedankt - er wird didaktisch mein Vorbild bleiben. Nicht vergessen möchte ich sein Mitwirken an der Planung, Finanzierung und Betreuung in puncto Allosterie via Internet während meines Aufenthaltes an der University of California, San Francisco.

Desweiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Kurt Racké für die freundliche Übernahme des Koreferates danken.

Auch einen besonders herzlichen Dank möchte ich an den Betreuer meines USA Aufenthaltes richten, Herrn Wolfgang Sadèe, PhD, step eight full Professor of Pharmaceutical Chemistry and Biopharmaceutical Sciences.

Außerdem möchte ich Herrn PD Dr. Christian Tränkle und Herrn PD Dr. Matthias Kassack für die praktische und theoretische Hilfe danken.

Für die Zusammenarbeit möchte ich mich des weiteren bei den Mitarbeitern der Abteilung Pharmakologie/Toxikologie bedanken. Besonders erwähnen möchte ich Alexandra Raasch, Maren Großmüller, Andreas Dittmann, Iris Witten und Mechthild Kepe, denen ich besonderen Dank schulde.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meiner Frau Kirsten, die mit unermüdlicher Geduld, der Fähigkeit zum Zuhören und viel Verständnis den Verlauf der Arbeit „in guten und in schlechten Zeiten“ begleitet hat.

Gewidmet:
meinen Eltern, Schwestern, Freunden und
Kirsten

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	12
1.1	Allgemeines	12
1.2	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren.....	12
1.3	Aufbau G Protein-gekoppelter Rezeptoren am Beispiel der Muskarinrezeptoren	13
1.4	Signaltransduktionswege muskarinischer Acetylcholinrezeptoren.....	14
1.5	Die allosterische Modulation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren....	14
1.6	Fragestellung	16
2	Methoden und Materialien	17
2.1	Zellkultur	17
2.1.1	Zelllinien	17
2.1.2	Präparation der Plasmid DNA und Transfektion.....	17
2.1.3	Inkulturnahme von CHO-Zellen.....	18
2.1.4	Subklonierung von CHO-Zellen	19
2.2	Präparation von intakten Zellen und Membranen.....	20
2.2.1	Präparation intakter Zellen für Radioligand Bindungsexperimente.....	20
2.2.2	Präparation von Membranen aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe 21	
2.2.3	Membranpräparation aus CHO-M ₂ Zellen.....	22
2.2.4	Membranpräparation aus CHO-M ₂ Zellen für [³⁵ S]GTP-γ-S Experimente.....	23
2.2.5	Proteinkonzentrationen der Homogenate	24
2.3	Messung von Kalziumionen als intrazellulärer Botenstoff	25
2.3.1	Vorbereitung der Zellen.....	25
2.3.2	Einstellungen des Mikrotiterplatten-Lesegerätes.....	26
2.3.3	Ermittlung des Meßbereichs	26
2.3.4	Messung zytosolischer Ca ²⁺ -Konzentrationen in CHO-M ₁ Zellen	28
2.3.5	Datenanalyse	28
2.4	Radioligand-Bindungsuntersuchungen.....	29
2.4.1	Theorie der Radioligand-Bindungsuntersuchungen.....	29

Inhaltsverzeichnis

2.4.1.1	Theoretische Grundlagen homologer Konkurrenzexperimente	29
2.4.1.2	Theoretische Grundlagen nicht homologer Konkurrenzexperimente	33
2.4.1.3	Berechnung der Inkubationsdauer bis zur Gleichgewichtseinstellung	36
2.4.2	Versuchsdurchführung	36
2.4.2.1	Gleichgewichtsbindungsexperimente.....	36
2.4.2.2	Dissoziationsversuche (Ungleichgewichtsversuche)	38
2.5	[³⁵ S]GTPγS Bindungsexperimente	41
2.5.1	Theoretische Grundlagen	41
2.5.2	Versuchsdurchführung	41
2.5.3	Auswertung der Daten	43
2.5.4	Datenanalyse nach Arunlakshana und Schild.....	43
2.6	Verwendete Computerprogramme	45
2.7	Strukturformeln.....	46
2.8	Materialien	49
2.8.1	Reagenzien.....	49
2.8.2	Geräte	50
3	Ergebnisse	52
3.1	Charakterisierung der [³ H]NMS-Bindung an Membran- und Zellsuspensionen	52
3.1.1	Charakterisierung der [³ H]NMS-Bindung an Suspensionen aus CHO-hM ₁ -Zellen	52
3.1.2	Charakterisierung der [³ H]NMS-Bindung an Homogenaten aus dem Herzventrikel des Hausschweins	54
3.1.3	Charakterisierung der [³ H]NMS-Bindung an Homogenaten aus CHO-M ₂ -Zellen für [³⁵ S]GTPγS-Bindungsuntersuchungen	56
3.1.4	Vergleich der Kennwerte dieser Arbeit mit Literaturwerten	58
3.2	Messung der Ca ²⁺ -induzierten Fluoreszenz an M ₁ -transfizierten CHO-Zellen.....	60

Inhaltsverzeichnis

3.2.1	Effekt an Wildtyp Zellen (CHO-WT Zellen)	60
3.2.2	Effekt an CHO-M ₁ Zellen	61
3.2.3	Untersuchung der Wirkung von allosterischen Modulatoren auf die Ca ²⁺ -induzierte Fluoreszenz in CHO-M ₁ -Zellen.....	62
3.2.4	Messung der Konzentrations-Effekt-Beziehung von Carbachol	63
3.2.5	Messung des Carbachol-Effektes unter Einfluß von allosterischen Modulatoren.....	65
3.3	Ergebnisse der [³⁵ S]GTP γ S Bindungsexperimente.....	68
3.3.1	Methodenetablierung.....	68
3.3.1.1	Einführung	68
3.3.1.2	Kinetische Experimente mit [³⁵ S]GTP γ S	68
3.3.2	Allosterische Modulation der Agonist-induzierten G Protein-Aktivierung.....	76
3.3.2.1	Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung durch Alcuronium.....	76
3.3.2.2	Modulation der Oxotremorin M-induzierten G Protein-Aktivierung durch Alcuronium	80
3.4	Radioligand Bindungsexperimente an M ₂ Acetylcholinrezeptoren.....	84
3.4.1	Ergebnisse mit [³ H]N-Methyl-Scopolamin.....	84
3.4.2	Ergebnisse mit dem Radioliganden [³ H]Oxotremorin M.....	88
3.4.3	Dauer der Gleichgewichtseinstellung von [³ H]Oxotremorin M und Alcuronium	89
4	Diskussion.....	92
4.1	Erörterung der Meßsysteme hinsichtlich der Fragestellung.....	92
4.1.1	Theoretische Grundlagen der Calciumfreisetzungsexperimente	92
4.1.2	Theoretische Grundlagen der [³⁵ S]GTP γ S Bindungsexperimente...	94
4.2	Befunde am M ₁ Acetylcholinrezeptor	97
4.2.1	Interpretation der Ergebnisse aus Calciumfreisetzungsexperimenten	98
4.2.1.1	Einführung	98

Inhaltsverzeichnis

4.2.1.2	Etablierung der Methodik zur Messung der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz.....	98
4.2.1.3	Interpretation der Calciumfreisetzungsexperimente mit allosterischen Modulatoren.....	99
4.2.1.4	Interpretation von Calciumfreisetzungsexperimenten der Allosterie W84 und Methyl-W84 mit dem Agonisten Carbachol	100
4.3	Befunde am M_2 -Rezeptor	102
4.3.1	Erörterung der [^{35}S]GTP γ S Bindungsexperimente.....	103
4.3.1.1	Etablierung der Versuche	103
4.3.1.2	Kinetische Experimente	103
4.3.2	Allosterische Modulation Agonist-induzierter Effekte	108
4.3.2.1	Deutung der Befunde mit dem Partialagonisten Pilocarpin.....	108
4.3.2.2	Interpretation der Befunde mit dem Vollagonisten Oxotremorin M 109	
4.3.3	Interpretation der Radioligandbindungs-Befunde am M_2 -Acetylcholinrezeptor	111
4.3.3.1	Interpretation der [^3H]NMS-Befunde.....	111
4.3.3.2	Deutung der Befunde mit dem Radioliganden [^3H]Oxotremorin M 112	
4.4	Topologische Betrachtung des M_2 Rezeptors unter Berücksichtigung der Befunde	112
5	Zusammenfassung	116
6	Literaturverzeichnis	118

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Zellen in einem multizellulären Organismus können untereinander mittels chemischer Signale kommunizieren. Diese werden von der einen Zelle ausgesandt und kontrollieren die Aktivität der Zielzelle. Die Zielzelle kann diese Transmittermoleküle unterscheiden, indem sie Rezeptorproteine an ihrer Oberfläche exponiert, welche die eingehenden chemischen Signale nach ihrer Affinität zu bestimmten dieser Rezeptorproteine separiert. Dieses Detektionssystem wird ins Innere der Zelle (Zytoplasma) überführt. Im Zytoplasma kann die Bildung von weiteren intrazellulären Botenstoffen (second messenger) induziert oder unterbunden werden. Die Gesamtheit der durch Neurotransmitter (endogen) oder Xenobiotika (exogen) induzierten Kaskaden bezeichnet man als Signaltransduktion.

1.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

1914 entdeckte Sir Henry Dale zwei Arten der Reaktion eines Organs auf Reize, die durch den Neurotransmitter Acetylcholin ausgelöst werden können. Eine konnte durch das aus der Tabakpflanze (*Nicotiana tabaccum*, Familie: *Solanaceae*) stammende Alkaloid Nikotin, die andere durch das aus dem Fliegenpilz (*Amanita muscaria*, Familie: *Amanitaceae*) isolierte Muskarin nachgeahmt werden. Diese Untersuchung stellt noch heute die Basis für die Einteilung cholinergere Rezeptoren in nikotinische (n-Ach-Rezeptoren) und muskarinische (m-Ach-Rezeptoren) dar. Nikotinische Acetylcholinrezeptoren haben eine zentrale Ionenpore für Natrium- und Kaliumionen (Na^+ bzw. K^+), die innerhalb von wenigen Millisekunden geöffnet werden kann. Muskarinische Acetylcholinrezeptoren gehören zur Familie der sogenannten G Protein-gekoppelten Rezeptoren.

Einleitung

Im weiteren Verlauf der Forschung kristallisierte sich heraus, dass es sich nicht um einen einzigen m-Ach-Rezeptor handeln kann, der die Fülle muskarinischer Effekte auf den Organismus vermittelt.

Zunächst wurde versucht, die unterschiedlichen Muskarinrezeptoren auf pharmakologischem Weg mittels Subtyp-prävalenter Liganden zu differenzieren. So konnte beispielsweise für die Substanz Gallamin eine Kardioprävalenz gezeigt werden (Riker & Wescoe, 1951). Hexahydrosiladifenidol wies dagegen eine höhere Affinität an Muskarinrezeptoren der glatten Muskulatur auf, und eine Rezeptor-Subpopulation in neuronalem Gewebe wurde bevorzugt vom Antagonisten Pirenzepin erkannt (Hammer et al., 1980; Mutschler & Lambrecht, 1984). Pharmakologische und molekularbiologische Untersuchungen führten schließlich zur Unterteilung der Muskarinrezeptoren in 5 Subtypen, M_1 – M_5 (Kubo et al., 1986; Bonner et al., 1987; Peralta et al., 1987; Mitchelson, 1988; Mutschler et al., 1989; Übersichtsartikel von Wess, 1996).

1.3 Aufbau G Protein-gekoppelter Rezeptoren am Beispiel der Muskarinrezeptoren

Muskarinrezeptoren sind integraler Bestandteil der Zytoplasmamembran und gehören zur Familie der G Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese Art von Rezeptoren wandelt die Bindung eines Agonisten über ein Guaninnukleotid bindendes Protein (G Protein) in einen zytosolischen Effekt um (Birnbaumer et al., 1990). Die Mitglieder dieser Familie sind durch sieben hydrophobe transmembranäre α -Helixstrukturen charakterisiert, welche durch alternierende intra- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Desweiteren haben alle G Protein-gekoppelten Rezeptoren einen extrazellulären, aminoterminalen Anfang des Peptidstranges und ein zytosolisches, carboxyterminales Ende. Die dritte intrazelluläre Schleife ist besonders groß und scheint für die Interaktion des Rezeptors mit dem G-Protein wichtig zu sein (Wess, 1996).

Alle fünf Subtypen muskarinischer Rezeptoren enthalten in den transmembranären Domänen zwei gegenüberliegende Cysteinreste, welche im funktionsfähigen Protein zur Disulfidbrücke reduziert vorliegen. Der Sinn dieser Disulfidbrücken liegt

Einleitung

wahrscheinlich in einer Stabilisierung des Rezeptorproteins in der sich verändernden Umgebung der Phospholipiddoppelschicht (Hulme et al., 1990; Wess et al., 1993).

1.4 Signaltransduktionswege muskarinischer Acetylcholinrezeptoren

Bei den Subtypen M_1 , M_3 und M_5 werden durch einen aktivierten Rezeptor G Proteine aktiviert, welche vornehmlich der Klasse $G_{q/11}$ angehören. Nach dem GDP–GTP-Austausch an der α -Untereinheit des G Proteins dissoziieren α - und $\beta\gamma$ -Untereinheit des G Proteins. Die α -Untereinheit diffundiert innerhalb der Phospholipiddoppelschicht zu ihrer Zielstruktur. Dabei handelt es sich bei M_1 , M_3 - und M_5 -Rezeptoren um Phospholipase C (PLC). Das membranständige Enzym PLC vermag Membranbestandteile in Inositoltriphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) zu spalten. IP_3 aktiviert im nachfolgenden Schritt IP_3 -Rezeptoren, welche sich intrazellulär auf der Oberfläche des glatten endoplasmatischen Retikulum (gER) befinden. Dann wird aus dem gER als zytosolischem Kalziumspeicher der intrazelluläre Botenstoff Kalzium ausgeschüttet (Bootman & Berridge, 1995).

Anders stellt sich die Situation im Fall der mit geraden Suffixen belegten Muskarinrezeptoren dar. Durch stimulierte M_2 - und M_4 -Rezeptoren werden G Proteine der Klasse G_o aktiviert (Liebmann et al., 1992). G_o Proteine hemmen das membranständige Enzym Adenylatzyklase, es kommt zum Absinken der intrazellulären Konzentration des Botenstoffs cyclo-Adenosinmonophosphat. Zudem werden – vermittelt durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten – bestimmte K^+ -Kanäle geöffnet (Offermann, 2003).

1.5 Die allosterische Modulation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren

Das Alkan-bis-ammonium-Derivat W84 (Strukturformel S. 42) zeigte erstmals in Organbad-Untersuchungen von Kords et al. (1968), in Kombination mit dem kompetitiven Antagonisten Atropin appliziert, eine überadditiv antagonistische Wirkung, die mit einem kompetitiven Wirkungsmechanismus auf molekularer Ebene nicht in Übereinstimmung zu bringen war. Im Gegensatz zur Wirkung von

Einleitung

Atropin war die antagonistische Wirkung von W84 in hohen Konzentrationen sättigbar (Lüllmann et al., 1969). Diese Befunde stellten das erste Indiz für einen allosterischen Wirkmechanismus dar. Clark und Mitchelson berichteten 1976 über ein ähnliches Verhalten von Gallamin und postulierten ebenfalls einen allosterischen Mechanismus. Mittels Radioligandbindungs-Untersuchungen konnte die Vermutung eines allosterischen Wirkmechanismus auf molekularer Ebene verifiziert werden. Die Autoren postulierten eine zweite, allosterische Bindungsstelle neben der Neurotransmitterbindungsstelle, über die Gallamin die Affinität des orthosterischen Liganden zu modulieren vermag (Birdsall et al., 1983). Nachdem Jepsen und Mitarbeiter 1988 eine konzentrationsabhängige Hemmung der Dissoziation von [³H]NMS durch W84 fanden, bestand am allosterischen Mechanismus auch dieser Substanz kein Zweifel mehr.

Inzwischen konnte für eine Vielzahl von Verbindungen unterschiedlicher chemischer Strukturen und pharmakologischer Stoffklassen eine allosterische Wirkung an Muskarinrezeptoren nachgewiesen werden (Lee & El-Fakahany, 1991; Tränkle et al., 1996; Jakubík et al., 1997; Birdsall et al., 1999; Voigtländer et al., 2003).

1.6 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, ein biochemisches Meßsystem auszuwählen, mit dem funktionelle Untersuchungen mit allosterischen Liganden durchgeführt werden können. Die mittels dieses Meßsystems erhaltenen Daten sollten quantitativ analysiert werden können. Die Methode sollte auf verschiedene, im besten Fall alle, Subtypen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren anwendbar sein, unbeschadet der Tatsache, dass die verschiedenen Subtypen an unterschiedliche G Proteine und Signaltransduktionskaskaden koppeln.

Zahn beobachtete 1999 in funktionellen Experimenten am isolierten Meerschweinchenherzvorhof, dass der Partialagonist Pilocarpin unter dem Einfluss des allosterischen Modulators Alcuronium an intrinsischer Aktivität verliert. Der Verlust an intrinsischer Aktivität war abhängig von der Alcuroniumkonzentration. Die Frage, ob schon auf der Ebene der G Protein Aktivierung ein Nachlassen der intrinsischen Aktivität des Partialagonisten durch Alcuronium (oder andere allosterische Modulatoren) zu beobachten ist, sollte geklärt werden.

Die Auswahl eines Meßsystems, das sich zur Bearbeitung dieser Fragestellung eignet, ist auch deshalb nützlich, weil dadurch Versuche an isolierten Organen eingespart werden können.

Funktionelle Befunde, die in dieser Arbeit wie auch von Zahn (Dissertationsschrift, 1999) erhoben wurden, sollten mit Bindungsdaten, die in dieser Arbeit zusätzlich erhoben wurden, ergänzt werden. Die vorliegende Untersuchung sollte zeigen, ob die allosterische Modulation der Wirkung eines muskarinischen Partialagonisten im biochemischen Experiment in ähnlicher Weise vorzustellen ist wie am isolierten Organ.

2 Methoden und Materialien

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (engl.: Chinese Hamster Ovary Cells, im folgenden als CHO-Zellen abgekürzt) wurden subkloniert aus primären Zellen, die ursprünglich erwachsenen Tieren entnommen worden waren. Die Subklonierung dieses Zelltyps erfordert den Zusatz der Aminosäure Prolin zum Nährmedium, da diesen Zellen das Gen für die Prolinsynthese fehlt. CHO-Zellen sind epithelial wachsende Zellen, die morphologische Veränderungen in Anwesenheit von Cholera toxin erfahren. Cholera toxin (CTX) wird daher zu ihrer Identifizierung herangezogen (Guerrant et al., 1974; Peterson et al., 1991).

CHO-Zellen bieten für Experimente an Muskarinrezeptoren den Vorteil, dass sie keinen der fünf Subtypen endogen exprimieren (Akiba et al., 1988; Buckley et al., 1989; Dörje et al., 1991; Wess et al., 1991). Man kann daher, nach Transfektion mit entsprechenden Plasmiden, jeden Subtyp einzeln in dieser Zelllinie exprimieren und einheitliche Subtyp-Populationen untersuchen.

2.1.2 Präparation der Plasmid DNA und Transfektion

CHO-Zellen, die mit cDNA (codierender DNA) der einzelnen M-Rezeptorsubtypen stabil transfiziert waren, wurden dankenswerterweise von Herrn Professor Dr. G. Lambrecht (Abteilung Pharmakologie, Biocenter Niederursel, Universität Frankfurt am Main, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Die Methoden der Extraktion und Präparation von Plasmid DNA sowie Transfektion und Isolierung stabil transfizierter Klone der CHO-Zellen sind publiziert (Buckley et al., 1989) und sollen an dieser Stelle nur kurz dargestellt werden.

Die für den M₁ bis M₅ Rezeptor kodierenden cDNAs wurden in das Okayama/Berg pCD Expressions-Vektor-System eingeführt (Okayama und Berg, 1983). Die Transfektion der Wildtyp Zelllinie wurde mittels der Kalziumphosphat-

Präzipitationsmethode durchgeführt, wie beschrieben bei Chen und Okayama, 1987. Dabei wird ein pCDneo Vektor koexprimiert, wodurch erfolgreich transfizierte Zellen auf der Basis einer Neomycinresistenz selektiert werden können. Nach einer Selektionsphase mit einem Nährmedium, welches 400 µg/ml des Neomycinanalogons Geneticin (G 418) enthielt, wurden die transfizierten Zellen auf sterilen Petrischalen in hoher Verdünnung ausgesät, so dass einzelne Klone dieser Zellen isoliert werden konnten. Diese isolierten Kolonien wurden in separaten Schalen hochgezüchtet und mit dem Radioliganden [³H]N-Methyl-Scopolamin ([³H]NMS) hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften (K_D und B_{max}) charakterisiert (siehe 2.4.1.1).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien trugen das Gen für den M_1 bzw. M_2 Rezeptor und sollen im Folgenden CHO- M_1 oder CHO- M_2 genannt werden. In Experimenten, in denen auf Spezifität einer muskarinischen Vermittlung von Effekten geprüft werden sollte, wurden nicht transfizierte CHO-Zellen (der Wildtyp der Zelllinie) als Kontrolle verwendet. Diese sollen im Folgenden CHO-WT (für Wild Typ) genannt werden.

2.1.3 Inkulturnahme von CHO-Zellen

Beim Umgang mit lebenden Zellen wurde unter aseptischen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom gearbeitet. Dabei wird Luft von außen durch einen Filter mit einer Porengröße von $\leq 0,2 \mu\text{m}$ geleitet, bevor sie in den Arbeitsbereich der Sterilwerkbank gelangt. So wird die Luft von Schwebstoffen, die größer als $0,2 \mu\text{m}$ sind, befreit. Die Arbeitsfläche der Werkbank wurde vor der Benutzung mit 70%-igem Isopropylalkohol ausgesprüht, welcher nach einer Einwirkzeit von mindestens 5 Minuten abgewischt wurde. Bei Arbeiten unter aseptischen Bedingungen wurden Einmalhandschuhe aus Vinyl getragen. Diese wurden vor Beginn der Tätigkeit mit 70%-igem Isopropanol eingesprüht.

Zur Vorbereitung der Inkulturnahme wurde in der Sterilwerkbank eine Zellkulturflasche mit einer Bodenfläche von 175 cm^2 (Cat. No. 660175, Greiner Labortechnik, Frickenhausen) mit 30 ml des auf 37°C vortemperierten

Kulturmediums beschickt. Bei dem verwendeten Nährmedium handelte es sich um Nutrient Mixture Hams F 12 (Bestell-Nr.: N-4888) der Firma Sigma Aldrich Chemie (Taufkirchen). Diesem wurden 10% fetales Kälberserum (FKS), 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben sowie 2,5 ml einer 0,2 M L-Glutaminlösung, damit im fertigen Nährmedium eine Konzentration von 1 mM L-Glutamin resultierte.

Zur Inkulturnahme der Zellen wurde ein in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenes Aliquot der Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden die Zellen unter der Sterilwerkbank in die vorbereitete Kulturflasche überführt. Diese wurde anschließend für mehrere Tage in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre (96% relative Luftfeuchtigkeit) bei 37°C und einem Atmosphärengehalt von 5% CO₂ inkubiert (CO₂ Waterjacketed Incubator, Forma Scientific, Marjetta, USA). Die Zellen wurden täglich unter dem Inversmikroskop (Axiovert 25[®], Carl Zeiss, Jena, Germany) hinsichtlich Konfluenz, Morphologie und Vitalität untersucht. Nach 2 - 5 Tagen war der Zellrasen konfluent.

2.1.4 Subklonierung von CHO-Zellen

Bei einer Konfluenz von etwa 90% wurden die CHO-Zellen einer Kulturflasche aliquotiert und in 10 Kulturflaschen ausgesät.

Zu diesem Zweck wurde zunächst das Nährmedium aus der konfluenten Kulturflasche entfernt und der Zellrasen mit 5 ml einer Lösung von Trypsin (0,5 g/l) und Ethylendiamintetraessigsäure, (EDTA, 0,2 g/l) (Sigma Aldrich Chemie, Taufkirchen, Germany) behandelt.

Diese Behandlung dient der Ablösung der Zellen von der Unterseite der Kulturflasche. In der Kombination ist dem Trypsin die Aufgabe zugeordnet, interzelluläre Proteinbindungen zu spalten, während EDTA (ein Komplexbildner) interzelluläre Ca²⁺-Brücken zu lösen vermag.

Die Zellen wurden durch vorsichtiges Schwenken der Kulturflasche vollständig mit Trypsin-EDTA-Lösung benetzt. Anschließend wurde die Trypsin-EDTA-Lösung aus der Zellkulturflasche entfernt. Dann wurde etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur

inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vom Flaschenboden abgeschlagen und in 10 ml Nährmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde gleichmäßig auf 10 Kulturflaschen verteilt, die zuvor mit je 20 ml Nährmedium beschickt worden waren.

2.2 Präparation von intakten Zellen und Membranen

2.2.1 Präparation intakter Zellen für Radioligand-Bindungsexperimente

CHO-Zellen wurden in T-175 Zellkulturflaschen bis zur vollständigen Konfluenz gezüchtet. Die Vitalität der Zellen wurde anhand ihrer Morphologie vor den Experimenten im Inversmikroskop überprüft. In Experimenten mit dem Radioliganden [³H]NMS entsprach einer konfluenten T-175 Kulturflasche eine Menge von 30 Meßpunkten.

Zeigten die Zellen normale Morphologie (spindelartige Zellform), wurde das Nährmedium abgesaugt. Dies geschah unter aseptischen Bedingungen. Anschließend wurden ca. 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung auf den Zellrasen gegeben. Im Invertmikroskop wurde die Morphologie der Zellen während der Trypsinisierung beobachtet. Nahmen die Zellen unter Einwirkung von Trypsin-EDTA-Lösung eine kugelförmige Morphologie an (im Gegensatz zur spindelartigen Form), wurde die überstehende Flüssigkeit abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen abgeschlagen und mit 10 ml des Inkubationspuffers quantitativ vom Boden der Kulturflasche heruntergespült. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Polypropylen(PP)-Röhrchen (Cat. No. 188271, Greiner Labortechnik, Frickenhausen) überführt und bei 185 x g (\approx 1000 Upm) 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Avanti™ J 25, Rotor JS-7.5, Beckman, Palo Alto, USA). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml Puffer resuspendiert. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen. Um noch verbliebene Reste Nährmedium oder Trypsin-EDTA-Lösung zu entfernen, wurde nochmals der Überstand abgesaugt (insgesamt wurde das Zellpellet zweimal mit 10 ml Puffer gewaschen). Das nach der zweiten Zentrifugation erhaltene Pellet wurde mit 5,0 ml Inkubationspuffer versetzt und resuspendiert (K MS 1 Minishaker, IKA® Works, INC., Wilmington, NC 28405, USA).

2.2.2 Präparation von Membranen aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe

Vom Schlachthof Köln wurden die Herzen frisch geschlachteter Hausschweine zur Verfügung gestellt. Diese wurden unmittelbar nach Entnahme zum Transport auf Eis gekühlt. Alle nachfolgenden Schritte wurden in einer auf 4°C vortemperierten Kühlkammer durchgeführt.

Die Herzen wurden zunächst von anhaftendem Blut gereinigt und anschließend in Herzkammern (Ventrikel), Scheidewand (Septum) und Vorhöfe (Atria) zerlegt. Hierbei wurden Fett-, Sehnen- sowie Herzklappengewebe möglichst vollständig entfernt. Die Gewebestücke wurden nach Wägung in Polyethylen-(PE)-Gefrierbeutel verpackt und bei -80°C tiefgefroren bis zu ihrer Verwendung als Ausgangsmaterial zur Herstellung von Membransuspensionen.

Zur Herstellung einer Membransuspension (Homogenat) wurde ein etwa 40 g schweres Stück Ventrikelgewebe angetaut und mit einem Wiegemesser möglichst fein zerteilt. Danach wurde das Produkt zweimal mit je 20 ml einer auf 4°C temperierten, 0,32 M Saccharoselösung gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe mit 400 ml derselben Saccharoselösung (10 ml pro 1 g Gewebe) in einen Homogenisator (Warring Blendor Homogenisator[®], New Hartford, USA) überführt und mit 5 Hüben zu je 10 Sekunden bei maximaler Umdrehungsgeschwindigkeit zerkleinert. Zwischen den Hüben wurde jeweils 30 Sekunden lang pausiert, um ein Erwärmen der Suspension zu vermeiden.

Eine Erwärmung des Ansatzes sollte vermieden werden, um einem proteolytischen Abbau der Rezeptorproteine vorzubeugen.

Die so erhaltene Suspension wurde mit weiteren 400 ml Saccharoselösung ergänzt (insgesamt 20 ml pro 1 g Gewebe). Anschließend wurde durch Anwendung eines Potter Elvehjem Glashomogenisators (Janke und Kunkel, IKA[®] Labortechnik, Staufen, Germany) bei 1750 U/min homogenisiert (5 Hübe, 1 Hub pro min).

Das Rotor-Stator-Prinzip dieses Homogenisators öffnet die Zellen durch Scherkräfte zwischen Gefäßwand und Stößel. Durch die sich anschließende

Methoden und Materialien

fraktionierte Zentrifugation werden Zellorganellen und biologische Makromoleküle in Fraktionen aufgeteilt.

Die fraktionierte Zentrifugation wurde in einer Ultrazentrifuge des Typs Beckman L7-35 durchgeführt. Im ersten Schritt, 11 Minuten bei 2000 U/min ($\approx 300 \times g$), werden die schweren Zellorganellen (Kern und Mitochondrien) zur Sedimentation gebracht. In diesem Schritt enthält der Überstand die Rezeptorproteine. Im zweiten Schritt der fraktionierten Zentrifugation, 41 Minuten bei 32000 U/min ($\approx 80000 \times g$), scheiden sich die Rezeptoren als Vesikel im Bodensatz ab. Dieser Bodensatz wurde in 160 ml Krebs-HEPES-Puffer [118,6 mM NaCl; 4,7 mM KCl; 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; 1,2 mM KH_2PO_4 ; 4,2 mM NaHCO_3 ; 11,7 mM D-Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$); 1,3 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 10,0 mM HEPES ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$); pH=7,4] oder 160 ml Wasser z.A. resuspendiert (4 ml pro g Gewebe) und ein weiteres Mal mit dem Potter Elvehjem Glashomogenisator bei 1500 U/min homogenisiert (5 Hübe, 1 Hub pro min).

Das so entstandene Homogenat wurde unter ständigem Rühren in 1,5 ml (PP)-Eppendorf-Reaktions-Gefäße zu je 1,0 ml aliquotiert und in flüssigem Stickstoff ($\text{N}_{2(\text{liq.})}$; -196°C) schockgefroren.

Die Reaktionsgefäße wurden bis zum Tag der Verwendung in Radioligand-Bindungsuntersuchungen oder Proteinbestimmungen bei -80°C gelagert, um biochemische Reaktionen zu unterbinden.

2.2.3 Membranpräparation aus CHO-M₂ Zellen

Etwa 24 Stunden vor Beginn der Präparation waren die CHO-Zellen zu 70 - 90% konfluent. In diesem Zeitfenster wurden 9 Zellkulturflaschen (175 cm²) mit 19 ml frischem Nährmedium versetzt. Die Nährlösung wurde mit 1 ml einer 100 mM Natriumbutyratlösung ergänzt, so dass die Endkonzentration an Butyrat im Medium 5 mM betrug. Die Butyratzugabe erfolgte, um das Ausmaß der Expression des M₂-Rezeptorproteins anzuheben.

24 Stunden später wurde die butyrathaltige Nährlösung abgesaugt und der Zellrasen mit je 10 ml Homogenisationspuffer (10 mM HEPES, 10 mM EDTA,

Methoden und Materialien

10 mM Natriumfluorid, 10 mM Natriumpyrophosphat; pH 7,4) pro Zellkulturflasche versetzt. Anschließend wurden die am Flaschenboden anhaftenden CHO-Zellen mit Hilfe eines Zellschabers (Cell-Scraper 32 cm, Nunc GmbH und Co., Wiesbaden, Germany) abgelöst. Die Zellsuspensionen der 9 Kulturflaschen wurden gleichmäßig auf zwei 50 ml-PP-Röhrchen aufgeteilt (45 ml Suspension pro 50 ml-PP-Röhrchen). Dann wurde die Aufschwemmung bei 185 x g (\approx 1000 Upm) 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die pelletierten Zellen in 60 ml Homogenisationspuffer (30 ml pro Röhrchen) aufgenommen. Um die Zellen von Nährmediumsresten reinzuwaschen, wurde ein weiteres Mal unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und resuspendiert. Nachfolgend wurden die resuspendierten Zellen in einem Polytron-Homogenisator (PT 10-35, Kinematica AG, Littau, Schweiz) mit 6 Schlägen a 5 Sekunden auf Stärke 7 der Geräteskala aufgebrochen. Zwischen den Schlägen wurde die Flüssigkeit 30 Sekunden lang auf Eis gekühlt. Dann wurde die Membransuspension auf zwei Ultrazentrifugationsgefäße (50 ml-Centrifuge Bottles Polycarbonate, Cat. No. 357002, Beckman, Palo Alto, USA) verteilt und 17 Minuten bei 4°C und 40000 x g (ca 20000 Upm) zentrifugiert (Avanti™ J 25, Rotortyp JA 25.50, Beckman, Palo Alto, USA). Die Pellets wurden im gleichen Inkubationspuffer aufgenommen, in dem das Experiment stattfinden sollte. Nach einer weiteren Zentrifugation (Waschen der Membranen) wurden die Pellets in 45,0 ml Inkubationspuffer (5,0 ml Puffer pro Zellkulturflasche) aufgenommen. Aliquota zu 1,0 ml wurden in 1,5 ml-PP-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Verwendung im Experiment wurden die Membranen bei -80°C gelagert.

2.2.4 Membranpräparation aus CHO-M₂ Zellen für [³⁵S]GTP- γ -S Experimente

Pro Membranpräparation wurden 9 konfluente T-175 Zellkulturflaschen zu einem Endvolumen von 4,0 ml Membransuspension zusammengefasst.

Vor Beginn der Präparation wurden die verwendeten Puffer und die Zentrifuge auf 4°C vortemperiert.

Methoden und Materialien

24 Stunden vor Beginn der Präparation waren die Zellen zu 70 - 90% konfluent. Zu diesem Zeitpunkt wurden 9 Zellkulturflaschen mit 20 ml butyrathaltigem Nährmedium versetzt (Konz._(Butyrat)=5 mM).

Einen Tag später wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml Ablösepuffer (10 mM HEPES, 0,9% [m/V] NaCl, 0,02% [m/V] EDTA; pH 7,4) pro Kulturflasche versetzt. Durch Abschlagen wurden die CHO-Zellen von der Unterseite der Kulturflasche gelöst. Diese Suspension wurde auf zwei 50 ml PP-Röhrchen (je 45 ml) verteilt und bei 185 x g 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 60 ml (30 ml je Röhrchen) Homogenisationspuffer (10 mM HEPES, 10 mM EDTA, 10 mM Natriumfluorid, 10 mM Natriumpyrophosphat; pH 7,4) resuspendiert. Um die Zellen von Nährmediumsresten zu befreien, wurde die Zentrifugation wiederholt (Waschen der Zellen). Dann wurden die CHO-Zellen mit 6 Schlägen a 5 Sekunden auf Stärke 7 des Gerätes mit einem Polytron Homogenisator (PT 10-35, Kinematica AG, Littau, Schweiz) aufgebrochen. Zwischen den Schlägen wurde je 30 Sekunden auf Eis gekühlt. Die Suspension wurde in 50 ml Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und in einer auf 4°C vortemperierten Ultrazentrifuge bei 40.000 x g 17 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 30 ml Lagerungspuffer (10 mM HEPES, 0,1 mM EDTA; pH 7,4) aufgenommen und resuspendiert. Dann wurde die Ultrazentrifugation unter gleichen Bedingungen wiederholt, um die Membranen zu waschen. Das Pellet wurde in 4,0 ml Lagerungspuffer aufgenommen und resuspendiert. 1 ml Aliquota der Membransuspension wurden auf 1,5 ml PP-Reaktionsgefäße verteilt und diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur Verwendung im Experiment wurden die Membranen bei -80°C gelagert.

2.2.5 Proteinkonzentrationen der Homogenate

Die Proteinkonzentrationen [mg Protein/ml Membransuspension] wurden bestimmt nach der Methode von Lowry et al. (1951). Als externer Standard diente hierbei humanes Serumalbumin (Sigma Chemicals, München). Die Proteinkonzentration von Homogenaten aus nativem Gewebe variierte zwischen 4,5 und 8,9 mg/ml

Membransuspension, diejenige von Homogenaten aus CHO-Zellen für Radioligandbindungsexperimente zwischen 1,2 und 4,3 mg/ml (n=4-6).

2.3 Messung von Kalziumionen als intrazellulärer Botenstoff

Die Methode der Messung von Kalzium als intrazellulärem Botenstoff wurde durchgeführt analog der Methode von Lin et al., 1999.

2.3.1 Vorbereitung der Zellen

CHO-M₁-Zellen wurden wie oben beschrieben bis zur Konfluenz in einer Zellkulturflasche (T 175) gezüchtet. Am Tag des Versuches wurde das Nährmedium abgesaugt. Dann wurden die Zellen mit 5,0 ml Trypsin-EDTA-Lösung versetzt und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Trypsin-EDTA-Lösung wurde abgesaugt und der Zellrasen mit 15 ml frischem Nährmedium vom Boden der Kulturflasche gespült. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Polypropylen-Röhrchen überführt und bei 185 x g 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und die Zellen in 20 ml frischem Nährmedium resuspendiert.

Die Zellen wurden anschließend eine Stunde lang zur Erholung im Inkubator (37°C, 5% CO₂, 96% Luftfeuchtigkeit) belassen. Während dieser Zeit wurde die Zellsuspension in 15-minütigem Abstand geschüttelt, um erneutes Anheften der Zellen zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen nochmals unter den gleichen Bedingungen pelletiert, der Überstand entfernt und die Zellen zweimal mit je 800 µl Krebs-HEPES-Puffer (Zusammensetzung siehe 2.2.2) gewaschen.

Nach dem Entfernen des Nährmediums wurden die Zellen in 500 µl desselben Puffers bei Raumtemperatur resuspendiert und in ein 2,0 ml PP-Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde mit 3 µl einer 0,5 mM Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes Oregon Green™ 488 BAPTA-1/AM (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) und 3 µl einer 1%-igen Lösung des Emulgators Pluronic F-127 (Sigma Chemicals) versetzt.

Methoden und Materialien

Das Tensid Pluronic F-127 dient dazu, die Phospholipid-Doppelschicht der CHO-Zellen durchlässiger zu machen, damit der Fluoreszenzfarbstoff leichter ins Zytosol diffundieren kann (Markierung der Zellen).

Die Zellsuspension wurde 60 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt (1-2 Upm, KS 1 Minishaker). Während dieser Zeit nehmen die Zellen den Fluoreszenzfarbstoff ins Zytosol auf.

Der extrazellulär befindliche Fluoreszenzfarbstoff wurde aus der Suspension entfernt, indem die Zellen vor der Messung dreimal im Inkubationspuffer gewaschen wurden. Das Zellpellet wurde schließlich in 1,0 ml Krebs-HEPES-Puffer resuspendiert. Die Aufschwemmung wurde in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt und mit 19,0 ml Inkubationspuffer auf 20,0 ml ergänzt.

Es wurden 160 µl Zellsuspension in jede Vertiefung einer Polypropylen-Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen gegeben. Die Verteilung der Zellsuspension auf die Vertiefungen der Platte geschah unter kontinuierlichem Schütteln (1 Upm, KS 1 Minishaker).

2.3.2 Einstellungen des Mikrotiterplatten-Lesegerätes

Die Ca^{2+} Fluoreszenzmessungen wurden durchgeführt mittels eines Mikrotiterplatten Lesegerätes (FLUOstar[®] microplate reader, BMG LabTechnologies, Offenburg, Germany). Für die Experimente dieser Arbeit wurde ein Gerät verwendet, welches mit zwei Injektoren ausgestattet war. Die Injektoren wurden durch einen Computer gesteuert, um simultan oder nacheinander ein Volumen von 20 µl in die einzelnen Vertiefungen der Platte zu injizieren.

Vor Beginn eines Versuches wurden 5 zufällig ausgewählte Bohrungen der Platte fluorimetrisch vermessen. So wird der Basalwert der Fluoreszenzintensität bestimmt.

2.3.3 Ermittlung des Meßbereichs

Nach jedem Experiment wurden je 3 Maximal- und Minimalwerte der Fluoreszenzintensität ermittelt. Die Differenz der Mittelwerte sind Ober- bzw.

Methoden und Materialien

Untergrenze des Meßfensters. Hierzu wurden in drei Vertiefungen der Mikrotiterplatte 20 µl einer einprozentigen Lösung des Tensides Triton X-100® (Sigma Chemicals) injiziert, um die CHO-Zellen zu lysieren. Die Platte wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Triton X-100® inkubiert und die Fluoreszenzintensität vermessen.

Durch die Lyse der CHO-Zellen wird der Farbstoff freigesetzt und kann an die Kalziumionen des Puffers binden: das Maximum der Fluoreszenzintensität wird gemessen (F_{\max}).

Zur Bestimmung des Intensitätsminimums (F_{\min}) wurden drei weitere Vertiefungen der Behandlung mit Triton X-100® unterzogen. Diese wurden außerdem mit 20 µl einer 100 mM EGTA-Lösung (Sigma Chemicals) behandelt. EGTA (Ethylen-Di-Glycol-Tetra-Essigsäure) ist ein Komplexbildner für zweiwertige Kationen.

EGTA bewirkt die Dissoziation von Kalziumionen und dem Fluoreszenzfarbstoff. Die Kalziumionen werden durch EGTA aus dem Bindungsgleichgewicht entfernt. Die Vermessung dieser Bohrungen zeigt das Minimum der Fluoreszenzintensität an (F_{\min}).

Aus den Werten F_{\max} und F_{\min} können bei Kenntnis der Dissoziationskonstante K_D von Oregon Green 488 BAPTA-1/AM die im Experiment gemessenen Fluoreszenzintensitäten (F) mittels Gleichung (1) in intrazelluläre Kalziumkonzentrationen ($[Ca^{2+}]_i$) umgerechnet werden.

$$[Ca^{2+}]_i = K_D(F - F_{\min}) / (F_{\max} - F_{\min}) \quad (1)$$

K_D : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Fluoreszenzfarbstoffs Oregon Green 488 BAPTA-1/AM (≈ 170 nM gemäß Herstellerangaben)

F : Fluoreszenzintensität einer Meßprobe

F_{\max} siehe Text

F_{\min} siehe Text

Wichtig zur Bestimmung von F_{\min} und F_{\max} ist, dass sich bei der Bindung von Ca^{2+} -Ionen an den Fluoreszenzfarbstoff nur das Maximum der Fluoreszenzintensität verschiebt. Die Wellenlänge λ bleibt unbeeinflusst. Eine Verschiebung der

Wellenlänge findet beispielsweise bei dem Fluoreszenzfarbstoff Fura 2 statt (Danthuluri et al., 1988).

2.3.4 Messung zytosolischer Ca^{2+} -Konzentrationen in CHO-M₁ Zellen

Zur Messung zytosolischer Ca^{2+} -Konzentrationen wurden in die Vertiefungen der Platte je 20 μl Krebs-HEPES-Puffer ohne und mit steigenden Konzentrationen eines Agonisten injiziert. Die Dauer einer Messung (in einer Vertiefung) betrug 50 Sekunden, wobei ein Wert pro Sekunde gemessen wurde. Vor der Injektion wurde 5 Sekunden lang die Basislinie aufgenommen. Die Exzitationswellenlänge (Anregungswellenlänge) betrug 485 nm, die Emissionswellenlänge (Abstrahlungswellenlänge) 538 nm.

Das Gerät wurde so programmiert, dass jeweils ein Volumen von 20 μl durch einen der beiden Injektoren eingespritzt wurde. Bei Messungen, für die beide Injektoren benötigt wurden, wurden simultan je 10 μl Volumen pro Injektor appliziert. Das Endvolumen betrug stets 200 μl .

2.3.5 Datenanalyse

Die aufgenommenen Daten wurden als Excel-Tabelle ausgegeben. Microsoft-Excel[®] erlaubt auch eine graphische Darstellung der Werte.

Kinetiken wurden dargestellt indem die Fluoreszenzintensität gegen die Zeit in Sekunden aufgetragen wurde. Für die Kurvenerstellung wurde eine Punkt zu Punkt Verbindung gewählt.

In diesem ersten Schritt der Datenanalyse wurden die Rohdaten der Versuche gegen die Zeit aufgetragen.

Im zweiten Schritt sollten die Rohdaten auf ein einheitliches Ausgangsniveau normiert werden. Das Ergebnis von Messungen ohne Agonist wurde als Ausgangsniveau definiert. Der Mittelwert dieser Kurven wurde von denjenigen mit Agonistzusatz subtrahiert.

Es resultieren bei Messungen mit Agonistzusatz Kurvenscharen, die bei Null beginnen und nach fünf Sekunden (Meßpunkten) einen Anstieg der

Fluoreszenzintensität zeigen. Bei Messungen in Abwesenheit von Agonisten ergibt sich eine Nulllinie.

Anschließend wurden die Maximalwerte der Fluoreszenzkinetiken computerunterstützt ermittelt. Diese Maxima zeigen die höchste intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration an.

Dann wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt. Hierzu wurden die Maximalwerte gegen den dekadischen Logarithmus der Agonistkonzentration aufgetragen. Anschließend wurde eine Kurvenanpassung an die allgemeine Hill-Gleichung (Hill, 1910) vorgenommen.

2.4 Radioligand-Bindungsuntersuchungen

2.4.1 Theorie der Radioligand-Bindungsuntersuchungen

2.4.1.1 Theoretische Grundlagen homologer Konkurrenzexperimente

Um zu prüfen, ob Homogenate für eine Verwendung in Radioligand-Bindungsexperimenten (siehe 2.2.1 und 2.2.2) geeignet waren, wurde die Zahl spezifischer Bindungsstellen (B_{\max}) für den Radioliganden [^3H]N-Methyl-Scopolamin ([^3H]NMS) und dessen Affinität (K_D) zu diesen Bindungsstellen ermittelt.

Die Herleitung dieser Parameter aus dem Massenwirkungsgesetz ist anderswo ausführlich dargestellt (bsp. Schulz, 1998). Es soll daher an dieser Stelle darauf verzichtet werden. Im folgenden sind jeweils diejenigen Gleichungen aufgeführt, mit deren Hilfe Berechnungen und Datenanalysen durchgeführt wurden.

Das Bindungsgleichgewicht zwischen Radioligand und Rezeptor ist erreicht, wenn Assoziationsvorgänge (Bindung an den Rezeptor) und Dissoziationsvorgänge (Lösen der Rezeptor-Ligand Bindung) mit gleicher Geschwindigkeit ablaufen. Ist dies der Fall, lässt sich die Affinität eines Liganden beschreiben durch:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{R \cdot L}{RL} \quad (2)$$

Methoden und Materialien

- K_D : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Radioliganden
 k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation
 k_{+1} : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
R: Konzentration an Rezeptoren im Gleichgewicht
L: Radioligandkonzentration im Gleichgewicht
RL: Konzentration an Rezeptor-Ligand-Komplexen im Gleichgewicht

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D wird im Zusammenhang mit Radioligandbindungsuntersuchungen als Maßzahl für die Affinität eines Liganden angegeben: je größer der K_D -Wert des Radioliganden, desto geringer ist seine Affinität zum Rezeptor. Der K_D -Wert ist die freie Ligandkonzentration, bei der 50% der Rezeptoren als Rezeptor-Ligand-Komplexe vorliegen.

Zur Ermittlung von K_D und B_{max} wurden homologe Konkurrenzexperimente durchgeführt. Die homologe Konkurrenz ist der Sonderfall eines Inhibitionsexperimentes, bei dem Kompetitor und Radioligand strukturidentisch sind. Bei solchen Experimenten müssen nach Bennett und Yamamura (1985) folgende Voraussetzungen gelten:

- das Bindungsverhalten folgt dem Massenwirkungsgesetz
- das Gleichgewicht zwischen Ligand und Rezeptor ist erreicht
- es liegt eine einheitliche Population nicht-interagierender Bindungsstellen vor
- die Rezeptorkonzentration beträgt maximal $0,1 \times K_D$ des Liganden
- maximal 10% des Liganden liegen als Rezeptor-Ligand-Komplexe vor, damit die eingesetzte Ligandkonzentration (näherungsweise) mit der freien Ligandkonzentration gleichgesetzt werden kann.

Desweiteren müssen der Radioligand und seine nicht markierte Form

- gleiche Affinität zu einer gemeinsamen Bindungsstelle besitzen und
- kompetitiv an einer Bindungsstelle interagieren.

Wird zur Durchführung eines homologen Konkurrenzexperimentes die Membransuspension mit einer konstanten Radioligand-Konzentration und

steigenden Konzentrationen des nicht markierten Liganden inkubiert, so nimmt die Bindung des Radioliganden ab.

Zur Datenanalyse trägt man die Radioligandbindung gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration des unmarkierten Liganden auf. Mit Hilfe einer Modifikation der allgemeinen Hill-Gleichung (Hill, 1910) erfolgte eine computergestützte nicht-lineare Regressionsanalyse. Diese ergibt einen sigmoiden Kurvenverlauf:

$$Y = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + \left(\frac{\text{IC}_{50}}{10^x}\right)^{n_H}} \quad (3)$$

Y: Bindung des Radioliganden

Min: unteres Plateau der Kurve, Bindung des Radioliganden bei hoher Konzentration von nicht markiertem NMS, respektive Atropin

Max: oberes Plateau der Kurve, Bindung in Abwesenheit von unmarkiertem NMS

IC₅₀: Konzentration von unmarkiertem NMS, welche die maximale Bindung des Radioliganden um 50 % reduziert

X: dekadischer Logarithmus der NMS-Konzentration

n_H: Hill-Koeffizient, Maß für die Steilheit der Kurve

Aus dem ermittelten IC_{50} -Wert lässt sich bei Kenntnis der eingesetzten Radioligandkonzentration L und der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_D des Radioliganden die Affinität des Kompetitors zum Rezeptor gemäß Cheng-Prusoff (1973) ableiten:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{L}{K_D}} \quad (4)$$

K_i : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Kompetitors

L : Konzentration des Radioliganden

K_D : Gleichgewichts Dissoziationskonstante des Radioliganden

Zwar ist die Affinität des Radioliganden zu seiner Bindungsstelle nicht bekannt. Da jedoch im Fall der *homologen* Competition Radioligand und Kompetitor strukturidentisch sind, besitzen sie identische Affinität zur gemeinsamen Bindungsstelle. Gleichung 3 lässt sich daher vereinfachen zu:

$$K_i = K_D = IC_{50} - L \quad (5)$$

Zur Berechnung der Anzahl spezifischer Bindungsstellen des Homogenates (B_{max}) wurde eine von De Blasi et al. (1989) publizierte Gleichung verwendet. Die Substitution von K_D (entsprechend Gleichung 3) im Massenwirkungsgesetz führt zu folgendem Term:

$$B_{max} = \frac{B_0 \cdot IC_{50}}{L} \quad (6)$$

B_{max} : Anzahl spezifischer Bindungsstellen des Homogenates

B_0 : spezifische Bindung von [3H]NMS in Abwesenheit des unmarkierten Kompetitors (Gesamtbindung)

2.4.1.2 Theoretische Grundlagen nicht homologer Inhibitionsexperimente

Wenn der nicht markierte Ligand und der Radioligand strukturell unterschiedlich sind, werden zwei Möglichkeiten der Interaktion betrachtet:

1. Radioligand und unmarkierter Ligand besetzen die gleiche Bindungsstelle am Rezeptorprotein (nicht homologe Konkurrenz)
2. Radioligand und unmarkierter Ligand besetzen unterschiedliche Bindungsstellen am Rezeptorprotein (allosterische Interaktion)

Im Fall der nicht homologen Konkurrenz dient ein Inhibitionsexperiment zur Ermittlung der Affinität des unmarkierten Konkurrenten, also der Gleichgewichts-Bindungskonstante K_i . In diesem Fall gilt die Gleichung von Cheng-Prusoff (Gleichung 4), die sich dann nicht mehr vereinfachen lässt.

Besetzen Radioligand und unmarkierter Ligand unterschiedliche Bindungsstellen, kann es zu einer kooperativen Interaktion zwischen beiden Liganden kommen. Der Begriff der Kooperativität beschreibt eine gegenseitige Beeinflussung der Affinität der Bindungspartner. Gegenseitig heißt, dass die Art Beeinflussung für beide Liganden qualitativ und quantitativ in gleichem Ausmaß stattfindet.

Zur Quantifizierung der Kooperativität entwarfen Stockton et al. 1983 das ternäre Modell allosterischer Interaktion, welches durch Ehlert (1988) sowie Lazareno und Birdsall (1995) fortentwickelt wurde:

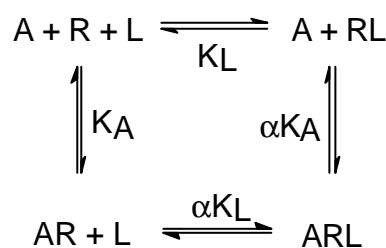


Abb. 1: Ternäres Rezeptormodell nach Ehlert (1988)

A: Ligand der allosterischen Bindungsstelle

R: Rezeptor

L: Ligand der orthosterischen Bindungsstelle

K_L : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Radioliganden L für die orthosterische Bindungsstelle am freien Rezeptor R

Methoden und Materialien

- K_A : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Allostere A für die allosterische Bindungsstelle am freien Rezeptor R
- α : Kooperativitätsfaktor, Maß für die Veränderung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_L durch Bindung von A an R bzw. K_A durch Bindung von L an R
- αK_L : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Radioliganden für die orthosterische Bindungsstelle am Alloster-Rezeptorkomplex AR
- αK_A : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Allostere für die allosterische Bindungsstelle am Ligand-Rezeptorkomplex RL

Art und Ausmaß der Kooperativität werden in diesem Modell quantifiziert durch den Faktor α . Der Faktor beschreibt die Fähigkeit des Allostere, nach Besetzung der allosterischen Bindungsstelle die Affinität des orthosterischen Liganden L zu dessen Bindungsstelle zu modulieren. Ebenso moduliert der orthosterische Ligand L die Affinität des allosterischen Liganden zu dessen Bindungsareal.

Die Bindung des Allostere an den Komplex RL hemmt typischerweise die Dissoziation von RL. Die Besetzung des freien Rezeptors R durch ein muskarinisches Alloster hemmt die Assoziation von L. Meist hemmt der allosterische Modulator die Radioligand-Dissoziation mit anderer Wirksamkeit (Affinität) als die Assoziation. Die Hemmung der Dissoziation stellt einen bindungsfördernden Effekt dar, die Hemmung der Assoziation einen bindungshemmenden. Wird die Assoziation bei niedrigeren Konzentrationen gehemmt als die Dissoziation, nimmt α einen Wert größer 1 an. Man spricht in diesem Fall von negativer Kooperativität, also einer Senkung der Affinität des orthosterischen Bindungspartners zum Rezeptor.

Bei $0 < \alpha < 1$ beeinflussen sich beide Liganden im Sinne einer positiven Kooperativität, die als ansteigende Gleichgewichts-Bindung zu beobachten ist.

Neutrale Kooperativität liegt vor, wenn sich die Liganden in ihrer Bindungskinetik zwar beeinflussen, die Gleichgewichtsbindung jedoch unbeeinflusst bleibt, α hat dann einen Wert von 1. Es zeigt sich, dass Kooperativität die Bilanz der Modulierung von Assoziations- und Dissoziationsvorgängen am Rezeptor beschreibt. Der Kooperativitätsfaktor α ist stets spezifisch für zwei bestimmte Substanzen an einem speziellen Rezeptor.

Hierauf basierend lassen sich die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators sowie der Kooperativitätsfaktor α für die gegenseitige Interaktion dieser beiden Substanzen an einem Rezeptor nach folgender Gleichung (Ehlert, 1989) bestimmen:

$$B_A = \frac{B_o \cdot (L + K_L)}{L + K_L \left(\frac{K_A + A}{K_A + \frac{A}{\alpha}} \right)} \quad (7)$$

- B_A : spezifische Radioligand-Bindung in Anwesenheit von Alloster
- B_o : spezifische Radioligand-Bindung in Abwesenheit des Allosters
- K_L : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Radioliganden für die orthosterische Bindungsstelle am freien Rezeptor R (K_D)
- K_A : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Allosters A für die allosterische Bindungsstelle am *freien* Rezeptor R
- α : Kooperativitätsfaktor
- L: molare Konzentration des Radioliganden
- A: molare Konzentration des Allosters

Eine nichtlineare computergestützte Analyse der Gleichgewichtsbindungs-Daten unter Verwendung dieser Gleichung ergibt α und K_A . K_L und L können konstant gesetzt werden, da sie durch den eingesetzten Radioliganden vorgegeben sind.

Der Wert für die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_A entspricht der Konzentration des Allosters, bei welcher der *freie* Rezeptor halbmaximal mit Alloster besetzt ist. Das Produkt aus α und K_A gibt die Konzentration des Allosters an, bei der die Hälfte aller *Radioligand-besetzten* Rezeptoren mit Modulator besetzt ist (entsprechend des EC_{50Diss} -Wertes der kinetischen Experimente).

2.4.1.3 Berechnung der Inkubationsdauer bis zur Gleichgewichtseinstellung

Allosterische Modulatoren an muskarinischen Rezeptoren führen typischerweise zu einer Verzögerung der Dissoziation des orthosterischen Liganden. Die Inkubationsdauer bis zur Gleichgewichtseinstellung zwischen den beiden Bindungspartnern muß demnach größer sein, als unter Kontrollbedingungen (in Abwesenheit allosterischer Modulatoren). Es wurden zunächst kinetische Experimente durchgeführt, um den Einfluß des Allostere auf die Dissoziations-Halbwertszeit des orthosterischen Radioliganden zu quantifizieren.

Mit Hilfe einer von Lazareno und Birdsall 1995 publizierten Gleichung (Gl. 8) läßt sich die Halbwertszeit der Ligandassoziation $t_{1/2obs}$ in Anwesenheit der entsprechenden Modulatorkonzentration berechnen. Das Fünffache dieser Zeit ergibt die Inkubationsdauer bis zur Gleichgewichtseinstellung.

$$t_{1/2obs} = t_{1/2off} \cdot \left(1 + X \cdot \frac{1}{EC_{50Diss}}\right) \quad (8)$$

$t_{1/2obs}$: Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung

$t_{1/2off}$: Dissoziations-Halbwertszeit unter Kontrollbedingungen

X: Konzentration des Modulators

EC_{50Diss} : Modulator-Konzentration bei halbmaximaler Reduktion der Radioligand-Dissoziationsgeschwindigkeit

Die Untersuchung der Substanzen in Inhibitions-Experimenten erfolgte unter den gleichen Bedingungen (Temperatur, Pufferzusammensetzung, Radioligandkonzentration) wie die kinetischen Experimente.

2.4.2 Versuchsdurchführung

2.4.2.1 Gleichgewichtsbindungsexperimente

Der Effekt allosterer Modulatoren auf die Gleichgewichtsbindung des Radioliganden wurde durch heterologe Inhibitionsexperimente bestimmt.

Methoden und Materialien

Bei Bindungsexperimenten im Gleichgewicht wurden die Homogenate mit dem Radioliganden in Inkubationspuffer (10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl; pH 7,4) bei 23 bzw. 30°C inkubiert. Die Zusammensetzung des Ansatzes für Gleichgewichtsbindungsexperimente ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Zuvor wurden die NMS-Bindungseigenschaften der Homogenate unter Kontrollbedingungen charakterisiert (K_D und B_{max}). Dies erfolgte in homologen Konkurrenzexperimenten in Form von Dreifachbestimmungen.

	Volumen [μ l]	Bestandteil	Endkonzentration im Reaktionsansatz
1.	75	Radioligand in dest. Wasser, [³ H]NMS oder [³ H]Oxotremorin-M	0,2 nM 1 bzw. 6 nM
2.	15	Dest. Wasser (Gesamtbindung) Atropin in dest. Wasser (unspezifische Bindung) Testsubstanz in dest. Wasser (alloster. Modulator oder kompetit. Antag.)	1 μ M 0,1 nM bis 10 μ M
3.	1265	Versuchspuffer	10 mM HEPES 10 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl
4.	145	Ventrikelhomogenat des Hausschweins bzw. Homogenat aus CHO Zellen in Versuchspuffer	
	1500	Ansatzgröße (=Gesamtvolumen)	

Tabelle 1: Ansatzvolumina und -konzentrationen der Gleichgewichtsbindungs-Experimente

Als Ansatzgefäße dienen 2,0 ml Polypropylen-(PP)-Reaktionsgefäße (Roth, Karlsruhe). Nach Zugabe der Komponenten in der Reihenfolge der Tabelle, wurden die Reaktionsgefäße verschlossen und mit einem Rotationsmischer (Vortex Genie 2[®], Bender & Hobein AG, Zürich) geschüttelt. Für die Dauer der Inkubation wurden die Gefäße in einem Wasserbad (GFL 1083, Ges. f. Labortechnik mbH, Burgwedel) bei konstanter Temperatur (23°C bzw. 30°C) geschüttelt.

Methoden und Materialien

Nach nochmaligem Mischen wurde 1 ml Volumen abgenommen und mittels Vakuumfiltration über Glasfaserrundfiltern (GF6, Schleicher & Schüll, Dassel) filtriert. Die abfiltrierten Membranen wurden mit 2 mal 5 ml des auf 4°C vortemperierten Inkubationspuffers gespült. Die Glasfaserrundfilter wurden vor der Verwendung mindestens eine Stunde in 0,25%iger Polyethylenimin Lösung eingelegt, um die unspezifische Bindung zu reduzieren. Die Filter wurden nach Beendigung des Versuches in 20 ml Polyethlengefäße überführt (Greiner[®], Solingen) und mit 5 ml Ready Protein[®] (Beckman) versetzt. Nach einer Einwirkzeit von mindestens 2 Stunden wurde die membrangebundene Aktivität in einem Flüssigszintillationszähler (LS 6000 SC, Beckman) gemessen.

Die Messung der unspezifischen Bindung erfolgte in Gegenwart von 1 µM Atropin.

2.4.2.2 Dissoziationsversuche (Ungleichgewichtsversuche)

Bei den kinetischen Experimenten dieser Arbeit handelte es sich um Experimente zur Ermittlung der Dissoziationsgeschwindigkeit eines Radioliganden in Ab und Anwesenheit allosterer Modulatoren.

Analog den Bindungsexperimenten im Gleichgewicht wurden die kinetischen Experimente in 2,0 ml Polypropylen-(PP)-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Volumina und Konzentrationen sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Methoden und Materialien

	Volumen [μ l]	Bestandteil	Endkonzentrationen im Reaktionsansatz
1.	75	Radioligand in dest. Wasser, [3 H]NMS	0,2 nM
2.	145	Ventrikelhomogenat des Hausschweins bzw. Homogenat aus CHO-Zellen in Versuchspuffer	
3.	1265	Versuchspuffer 10,12 mM HEPES, 10,12 mM MgCl ₂ , 101,2 mM NaCl	10 mM HEPES 10 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl
4.	15	Dest. Wasser (Gesamtbindung) Atropin (unspezifische Bindung) in dest. Wasser Testsubstanz und Atropin in Kombination in dest. Wasser	<ul style="list-style-type: none"> • 1 μM (Atropin) • 0,1 nM bis 10 μM
	1500	Ansatzgröße (=Gesamtvolumen)	

Tabelle 2: Ansatzvolumina und -konzentrationen der Ungleichgewichts Experimente

Bei kinetischen Versuchen wurden die PP-Reaktionsgefäße in der Reihenfolge von Tabelle 2 beschickt, jedoch zunächst 60 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert, bevor je 15 μ l dest. Wasser (Gesamtbindung), Atropin (unspez. Bindung) bzw. Atropin und Testsubstanz zugesetzt wurden (Zeile 4/Tabelle 2). Die 60-minütige Inkubationszeit diente der Einstellung des Bindungsgleichgewichts zwischen Rezeptor und Radioligand. Dann erst wurde durch Zusatz von Atropin die Dissoziation sichtbar gemacht. Die Zusammensetzung des Puffers war die gleiche wie in Inhibitionsexperimenten. Auch Filtration und Zählung im Flüssigkeitsszintillationszähler entsprach der im vorangehenden Kapitel geschilderten.

Vor Beginn der Dissoziation wurden je drei Proben der Gesamtbindung filtriert. Danach wurde die Zeitmessung, simultan mit dem Zusatz von 1 μ M Atropin begonnen. Entsprechend nachstehender Tabelle wurden zu bestimmten Zeiten Proben von 1 ml abgenommen und filtriert wie oben dargestellt.

Zeit [min.] nach Zusatz von 1 μ M Atropin	Anzahl der Proben
0 (=Gesamtbindung)	3
1	1
5	2
15	3
30	3
60	3

Tabelle 3: Zeitplan der Dissoziationsversuche

Das Mischen und Temperieren der Reaktionsgefäße erfolgte wie im oben geschilderten Verfahren.

Die dissoziationsverzögernde Wirkung von Testsubstanzen wurde ermittelt, indem diese simultan mit Atropin zugesetzt wurden. Die synchrone Zugabe von Atropin und Testsubstanz ist möglich, da allosterische Modulatoren instantan einen Gleichgewichtszustand mit dem Rezeptor einnehmen (Tränkle & Mohr, 1997; Weyand et al., 2001).

2.5 [³⁵S]GTP γ S Bindungsexperimente

2.5.1 Theoretische Grundlagen

GTP γ S ist ein hydrolysestabiles Analogon von GTP. Es kann nicht durch die α -Untereinheit des G-Proteins gespalten werden. Deshalb bindet GTP γ S irreversibel an G-Proteine und aktiviert diese.

Die GTP γ S-Bindung an G-Proteine kann gemessen werden, wenn radioaktiv markiertes [³⁵S]GTP γ S verwendet wird. Es bindet an G-Proteine und wird mittels Vakuumfiltration von ungebundenem [³⁵S]GTP γ S abgetrennt. Agonisten können so auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden G-Proteine zu aktivieren.

2.5.2 Versuchsdurchführung

Die gelieferte [³⁵S]GTP γ S-Stammlösung wurde mit eisgekühltem Puffer von 20 μ l auf 200 μ l verdünnt (10 mM Tricin, 10 mM Dithiothreitol, pH 7,4). Dithiothreitol (DTT) ist ein Disulfidbrücken-haltiges Agens, das Puffern beigelegt wird, um vor oxidierenden Einflüssen zu schützen. Von den 200 μ l wurden 5 μ l-Aliquota in 2,0 ml PP-Reaktionsgefäße pipettiert und bei -20°C gekühlt.

Pro Experiment wurde ein 5 μ l-Aliquot in einem 15 ml PP-Röhrchen auf 5 ml Endvolumen mit eisgekühltem Inkubationspuffer verdünnt. Hiervon werden je 100 μ l für eine Probe von 1 ml Endvolumen verwendet, so dass eine Endkonzentration von ca 70 pM [³⁵S]GTP γ S im Ansatz vorliegt.

Desweiteren wurde eine 10 mM Lösung von unmarkiertem GDP (Guanosin-Di-Phosphat) in Inkubationspuffer (Zusammensetzung siehe unten) hergestellt. Hiervon wurden je 50 μ l auf 2,0 ml PP-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung im Experiment tiefgefroren. Am Tag des Versuches wurde ein 50 μ l Aliquot in 5 ml Inkubationspuffer verdünnt, so dass eine 100 μ M Lösung entstand. Auch von dieser Lösung wurden 100 μ l für eine 1 ml Probe verwendet, so dass sich eine Endkonzentration von 10 μ M im Ansatz ergab.

Membransuspensionen für [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimente wurden wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben hergestellt.

Methoden und Materialien

Der Inkubationspuffer der [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimente bestand entsprechend obengenannten Voraussetzungen aus 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl und 10 mM HEPES (pH 7,4). Als Inkubationsgefäße dienten 2,0 ml PP-Reaktionsgefäße. In diese wurden zunächst alle Anteile einpipettiert, die in Tabelle 4 aufgeführt sind außer der Membransuspension.

	[³⁵ S]GTP γ S gelöst in Lagerungs-Pf.	GDP	Orthoster gelöst in Vers.-Pf.	Alloster gelöst in Vers.-Pf.	Vers.- puffer	Homogenat gel. in Vers.-Pf.
Basalwert	100	100	0	0	700	100
Kontroll- KWK	100	100	100	0	600	100
KWK mit alloster. Modulator	100	100	100	100	500	100

Tabelle 4: Ansatzvolumina der [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimente in [μ l] (Vers.-Pf.=Versuchspuffer, KWK=Konzentrations-Wirkungs-Kurve)

Dann wurden die Reaktionsgefäße in einem Schüttelwasserbad auf 30°C temperiert. Im Abstand von einer Minute wurden die Reaktionsgefäße mit 100 μ l Membransuspension versetzt und durchmischt. Mit Zugabe des Homogenates begann eine 60-minütige Inkubationsphase in einem auf 30°C vortemperiertem Schüttelwasserbad. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Ansatzvolumen (1 ml) über Glasfaserinterfilter filtriert und die Filter mit 2 x 5 ml eisgekühltem Inkubationspuffer gewaschen. Anschließend wurden die Filter in Szintillationsröhrchen überführt und mit 5ml Szintillationscocktail Ready Protein[®] (Beckman) versetzt. Nach einer Einwirkzeit von mindestens 12 Stunden wurde die Flüssigkeitsszintillationszählung in einem Spektrometer vom Typ Beckman LS 6000 SC begonnen. Da die Homogenate für [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimente eine hohe Proteinkonzentration aufweisen (150 μ g/ml), ist eine Standzeit von 12 Stunden nötig, um sicherzustellen, dass die Proteinfraction quantitativ gelöst wurde.

2.5.3 Auswertung der Daten

Die Analyse von Daten aus [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimenten vollzog sich in zwei Schritten. Zunächst wurden die Rohdaten analysiert. Hierzu wurde die membrangebundene Aktivität gegen den dekadischen Logarithmus der untersuchten Substanz aufgetragen. An diese Werte wurde computerunterstützt eine sigmoidale Kurve angepasst, der Gleichung 3 zugrundelag.

Im zweiten Schritt der Analyse wurden die Rohdaten prozentualisiert. Dabei wurde der Basalwert der [³⁵S]GTP γ S-Bindung gleich hundert Prozent gesetzt.

2.5.4 Datenanalyse nach Arunlakshana und Schild

Voraussetzung für diese Art der Daten-Präsentation ist eine parallele Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven unter Einfluß eines Antagonisten. Als parallel rechtsverschoben bezeichnet man eine Kurve, die gegenüber der Vergleichskurve nur hinsichtlich ihres Wendepunktes rechtsverschoben ist, wobei Steigung und Maximaleffekt nicht beeinflusst sein dürfen. Für die Analyse nach Arunlakshana-Schild wird der Quotient aus den EC₅₀-Werten in An- und Abwesenheit von Antagonist gebildet. Man bezeichnet diesen Quotienten als Verschiebefaktor, VF.

$$VF = EC_{50, \text{Antagonist}} / EC_{50, \text{Kontrolle}} \quad (9)$$

Anschließend wird $[\log_{10}(VF-1)]$ berechnet und dieser Zahlwert gegen den Logarithmus der Antagonistkonzentration aufgetragen und einer linearen Regressionsanalyse unterworfen. Die zugrundeliegende Geradengleichung ist in Gleichung 10 aufgeführt.

Methoden und Materialien

$$\log_{10}(VF-1) = pK_b + s \cdot \log(B) \quad (10)$$

pK_b : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts Dissoziationskonstanten des Antagonisten

s : Steigung der Regressionsgeraden (Schild - Steigung)

$[B]$: Konzentration des Antagonisten

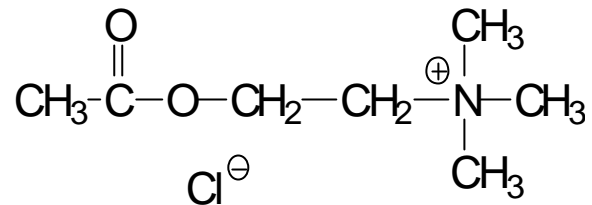
2.6 Verwendete Computerprogramme

<p>GraphPad Prism[®] Version 2.0 bzw. 3.0 (GraphPad, San Diego, USA)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • nichtlineare Regressionsanalysen • statistische Auswertung • graphische Darstellung
<p>GraphPad InStat[®] Version 1.11a (GraphPad, San Diego, USA)</p>	<p>statistische Auswertung</p>
<p>ChemWindow3[®] Version 3.02 (Cherwell Scientific Publishing Ltd., UK)</p>	<p>Erstellung chemischer Strukturformeln</p>
<p>Microsoft Excel[®] Version 7.0</p>	<p>Erstellung graphischer Darstellungen und Tabellenkalkulation</p>
<p>Microsoft Word[®] Version 2000</p>	<p>Textverarbeitung</p>

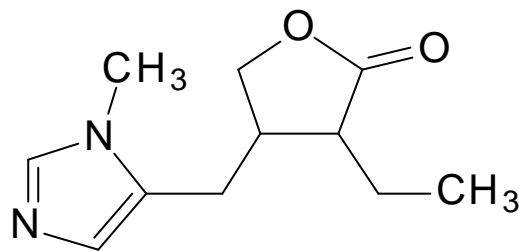
Tabelle 5: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete EDV-Programme

2.7 Strukturformeln

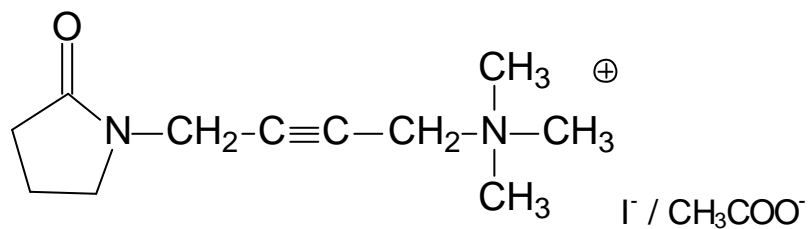
1. **Acetylcholin**-Chlorid, der endogene Neurotransmitter an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren



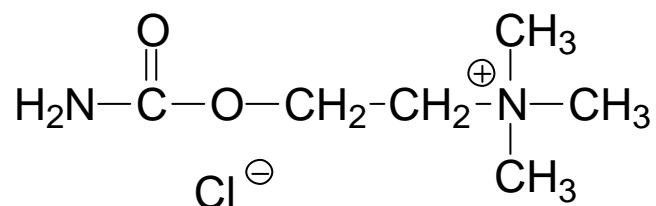
2. **Pilocarpin**, ein Partialagonist an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren, therapeutisch verwendet zur Behandlung des Engwinkelglaukoms (ein Naturstoff; Stammpflanze: *Pilocarpus jaborandus*, Familie: Rutaceae)



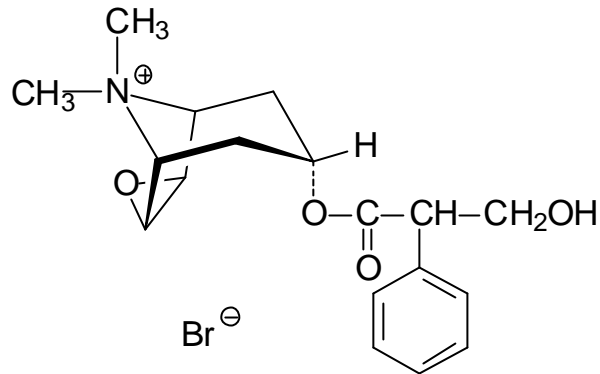
3. **Oxotremorin M**-Iodid bzw. Oxotremorin M-Acetat, (ein synthetischer Vollagonist)



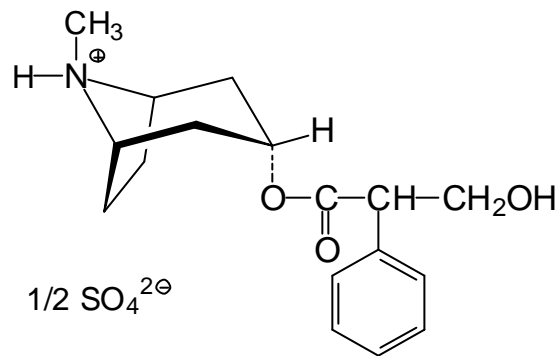
4. **Carbachol**-Chlorid (ein Vollagonist)



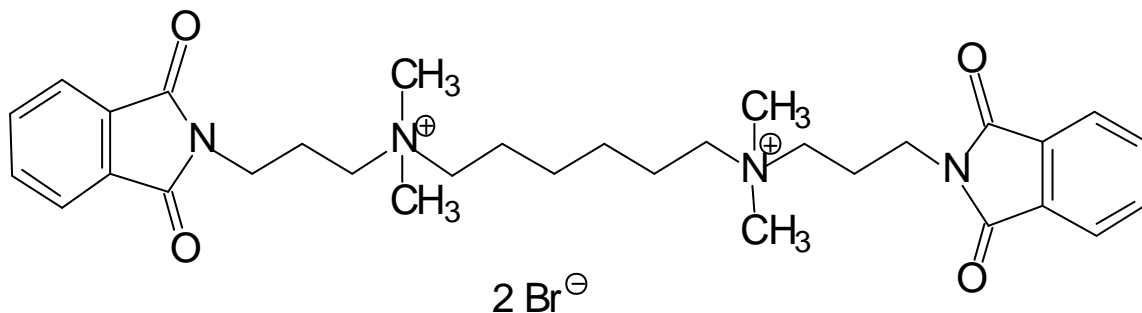
5. **N-Methylscopolamin-Bromid (NMS)**, ein kompetitiver Antagonist an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren



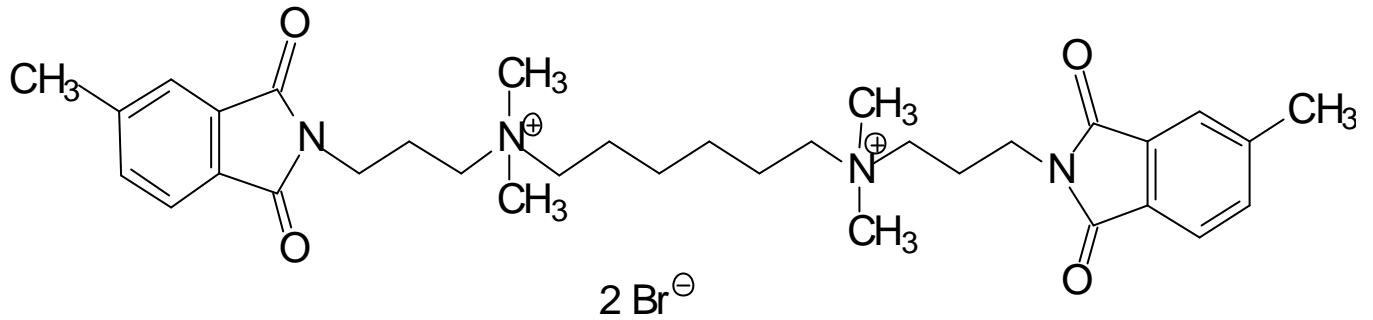
6. **Atropin-Sulfat**, ein kompetitiver Antagonist an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren, ein Naturstoff (Stammpflanze: Atropa Bella-Donna; Familie: Solanaceae)



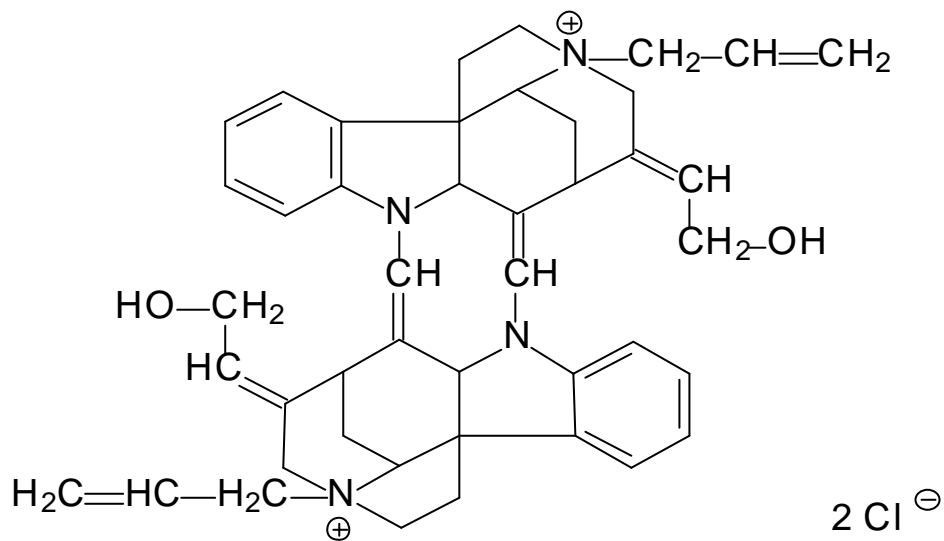
7. **W 84-Bromid**, ein allosterischer Modulator vom Alkan-bis-ammonium - Typ



8. **Dimethyl-W 84-Bromid (DMW)**, der erste als Radioligand verfügbare allosterische Modulator an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren



9. **Alcuronium-Dichlorid**, ein kompetitiver Antagonist an nikotinischen Acetylcholinrezeptoren, ein allosterischer Modulator an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren



2.8 Materialien

2.8.1 Reagenzien

1. bezogen von Sigma-Aldrich Chemie (Taufkirchen):

- tetra-Natrium-Guanosin-5-Triphosphat, sowie -Diphosphat (GTP, Best.-Nr.: G-9002 / GDP, Best.-Nr.: G-9003)
- tetra-Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure (Na₄EDTA, Best.-Nr.: E-9884)
- HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethan-sulfonsäure], Best.-Nr.: H-3375 / als Natrium-Salz: Best.-Nr.: H-7006)
- fetales Kälberserum (FKS), (Best.-Nr.: F-7524)
- L-Glutamin (Best.-Nr.: G-7513)
- Nutrient Mixture Hams F 12 (Best.-Nr.: N-4888)
- Penicillin/Streptomycin, kombinierte Lösung (Best.-Nr.: P-0781)
- Polyethylenimin, PEI, (Best.-Nr.: P-3143)
- Tricine ([N-tris{Hydroxymethyl}methylglycin, (Best.-Nr.: T-6272)
- Trypsin-EDTA-Lösung (Best.-Nr.: T-3924)
- DL-Dithiothreitol, DTT („Cleland's Reagent“), (Best.-Nr.: D-0632)

2. bezogen von Acros Organics (Geel, Belgien):

- Natriumbutyrat (Cat. No.: 263190250)

3. bezogen von Calbiochem, La Jolla, USA)

- Geneticinsulfat (G 418, Cat. No. 345810)

4. bezogen von Merck KG, Darmstadt

- Kaliumhydrogenphosphat p.A.
- Kupfersulfat-Pentahydrat p.A.
- Natriumchlorid p.A.
- di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat p.A.

Methoden und Materialien

- Saccharose p.A.
 - Wasser p.A.
5. bezogen von NEN[®] Life Science Products GmbH (New England Nuclear):
- [³⁵S]Guanosintriphosphat-gamma-S ([³⁵S]GTP- γ -S, Cat. No.: NEG030H)
 - [³H]Scopolaminmethyl-Chlorid ([³H]MMS, Cat. No.: NET636 / 70 - 87 Ci / mmol)
 - [³H]Oxotremorin-M - Acetat ([³H]Oxo-M, Cat. No.: NET671 / 70-90 Ci / mmol)

Alcuronium wurde dankenswerterweise überlassen von der Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Wühlen, Deutschland). W 84 wurde von Herrn Dr. Joachim Pfeffer (Pharmakologisches Institut, Universität Kiel, Deutschland) nach einer Methode von Wassermann (1970) synthetisiert.

2.8.2 Geräte

1. Werkbank mit gefiltertem, laminar fließendem Luftstrom zum Arbeiten unter aseptischen Bedingungen: BIO-FLOW Technik, Flerzheimer Straße 3, D-53340 Meckenheim, Germany
2. Invers - Mikroskop zur morphologischen Untersuchung der Zellkultur sowie zur Prüfung auf Kontaminationen: Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena, Germany
3. Ultrazentrifuge zur Pelletierung von Zellen und Abzentrifugation von rezeptorhaltigen Membranfragmenten: Avanti[™] J 25, Rotortypen: JS-7.5 bzw. JA 25.50, Beckman, Palo Alto, USA
4. Inkubator zur Subklonierung der CHO-Zellen: CO₂ Water Jacketed Incubator, Forma Scientific, Marjetta, USA (96%ige Luftfeuchtigkeit, Begasung mit 5% CO₂, 37°C)
5. Polytron-Homogenisator zur Zerkleinerung von Zellsuspensionen und Herstellung von Membranfragmenten (ein schnelllaufendes Scherkraftgerät, das nach dem Rotor-Stator-Prinzip die zytosolische Membran der Zellen zerreißt): PT 10-35, Kinematica AG, Littau, Schweiz
6. Wasserbad, erstens zum Anwärmen von Nährmedien, Trypsin/EDTA-Lösung und weiteren Utensilien der Zellkultur; zweitens zur Konstanthaltung der

Methoden und Materialien

Temperatur bei Radioligandbindungs- und [^{35}S]GTP- γ -S Experimenten: Julabo 19 A, Julabo Labortechnik GmbH, D-77960 Seelbach, Germany

7. Schüttler (engl.: „Vortexer“): K MS 1 Minishaker, IKA[®] Works, INC., Wilmington, NC 28405, USA

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der [³H]NMS-Bindung an Membran- und Zellsuspensionen

3.1.1 Charakterisierung der [³H]NMS-Bindung an Suspensionen aus CHO-hM₁-Zellen

Vor der Verwendung einer Membran- oder Zellsuspension im Experiment wurden die Kennwerte der Radioligandbindung ermittelt. Es handelt sich dabei um die Gleichgewichts-Dissoziations-Konstante (K_D) und die Anzahl spezifischer Bindungsstellen (B_{max}). Sie wurden in homologen Konkurrenzexperimenten ermittelt (2.4.1). Abbildung 3 zeigt eine repräsentative Konkurrenzkurve, die an einer Suspension von CHO-M₁-Zellen bei 23°C in Krebs-HEPES-Puffer aufgenommen wurde.

Der Ausgangswert der Kurve spiegelt die spezifische Bindung von [³H]N-Methyl-Scopolamin ([³H]NMS) in Abwesenheit von unmarkiertem N-Methyl-Scopolamin wider. Es handelt sich um die spezifische Bindung des Radioliganden, weil die unspezifische Bindung von [³H]NMS (gemessen in Gegenwart von 1 µM Atropin) subtrahiert ist.

Die Ermittlung des IC₅₀-Wertes für NMS (Wendepunkt) erfolgte mittels nichtlinearer Regressionsanalyse unter Anwendung von Gleichung 3. Die statistische Auswertung ergab, dass der Hill-Koeffizient n_H ($n_H = -1,098 \pm 0,097$) als Maß der Kurvensteilheit nicht signifikant unterschiedlich von $n_H = -1$ war (F-Test, $p > 0,05$).

Werden im Folgenden Angaben zu statistischen Untersuchungen gemacht, wurde ein Konfidenzintervall von 95% ($p = 0,05$) zu Grunde gelegt.

Ergebnisse

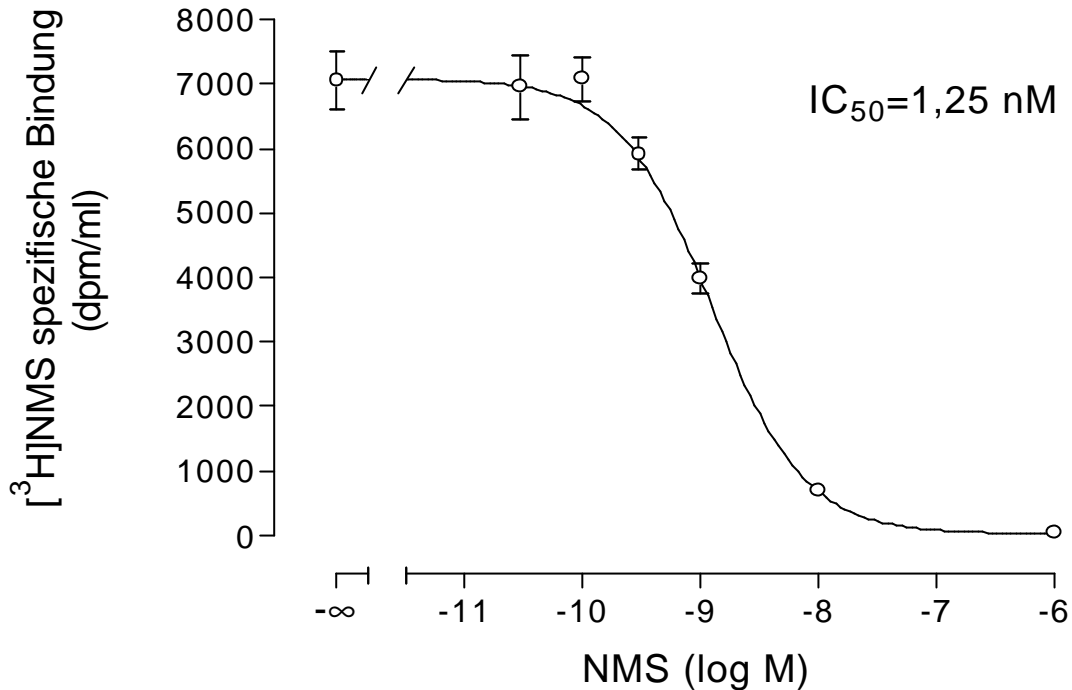


Abb. 3: Homologe Konkurrenz zwischen $[^3\text{H}]$ NMS (0,19nM) und unmarkiertem NMS in steigenden Konzentrationen an einer Suspension intakter CHO-hM₁-Zellen in Krebs-HEPES-Puffer. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in tripplizierter Ausführung.

Ordinate: Spezifische $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung in dpm/ml Inkubationsmedium

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration an unmarkiertem NMS

Aus dem IC_{50} -Wert der Kurve wurden die Bindungsparameter K_D nach Cheng & Prusoff (Gleichungen 4 und 5) sowie B_{max} nach De Blasi (Gleichung 6) berechnet. Es ergaben sich für die dargestellte Kurve Werte von $K_D = 1,06 \pm 0,22$ nM für die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante sowie $B_{\text{max}} = 4813 \pm 78$ fmol_{Rezeptoren}/mg_{Protein} für die Anzahl spezifischer Bindungsstellen.

Die homologen Inhibitionsexperimente an Suspensionen intakter CHO-hM₁-Zellen wurden mit einer Gesamtanzahl von $n = 4$ Experimenten, jeweils mit Dreifachbestimmung der Werte, durchgeführt. Die Mittelung über alle Experimente an CHO-hM₁-Zellsuspensionen ergab einen K_D -Wert von $1,04 \pm 0,24$ nM (Mittelwert \pm Standardfehler). Die Anzahl spezifischer Bindungsstellen war $B_{\text{max}} = 4723 \pm 53$ fmol/mg_{Protein}.

Ergebnisse

3.1.2 Charakterisierung der [³H]NMS-Bindung an Homogenaten aus dem Herzventrikel des Hausschweins

Wie die Suspensionen transfizierter Zellen wurden auch die Homogenate aus dem Ventrikelgewebe des Hausschweins in Bindungsuntersuchungen mit [³H]N-Methyl-Scopolamin ([³H]NMS) charakterisiert. Abbildung 4 zeigt das Ergebnis.

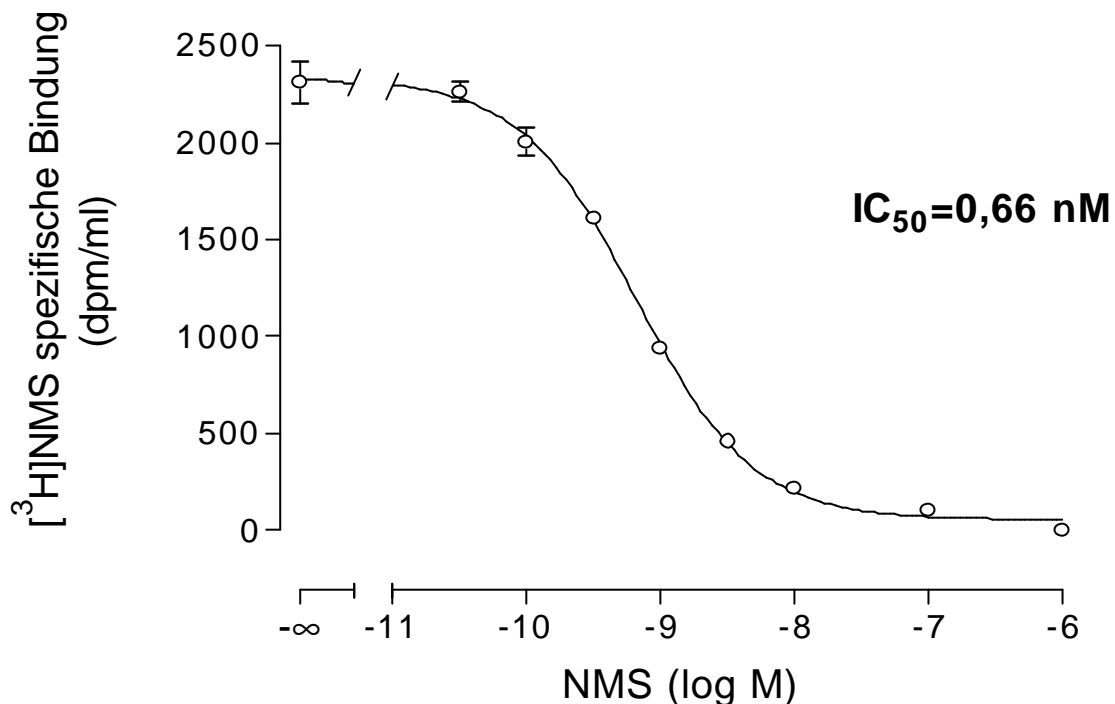


Abb. 4: Homologe Konkurrenzexperimente zwischen [³H]NMS (0,19nM) und unmarkiertem NMS in steigenden Konzentrationen an Homogenaten aus Ventrikelgewebe des Hausschweins in einem Puffer aus 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl und 10 mM HEPES. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 Experimenten in duplizierter Ausführung.

Ordinate: Spezifische [³H]NMS Bindung in dpm/ml Inkubationsmedium

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration an unmarkiertem NMS

Es ergaben sich Werte von $0,47 \pm 0,11$ nM für K_D , sowie von 209 ± 37 fmol/mg_{Protein} für B_{max} . Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler. Die Experimente wurden mit einer Anzahl von $n = 3$ in Form einer

Ergebnisse

Doppelbestimmung, durchgeführt. Der Hill-Koeffizient ($n_H = -0,9824 \pm 0,069$) war nicht signifikant unterschiedlich von $n_H = -1$ (F-Test, $p > 0,05$).

Ergebnisse

3.1.3 Charakterisierung der [³H]NMS-Bindung an Homogenaten aus CHO-M₂-Zellen für [³⁵S]GTPγS-Bindungsuntersuchungen

Analog wurden Homogenate aus CHO-hM₂-Zellen charakterisiert, die in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten verwendet wurden. Diese Experimente wurden bei 30°C in einem Puffer aus 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl und 10 mM HEPES bei pH 7,4 durchgeführt.

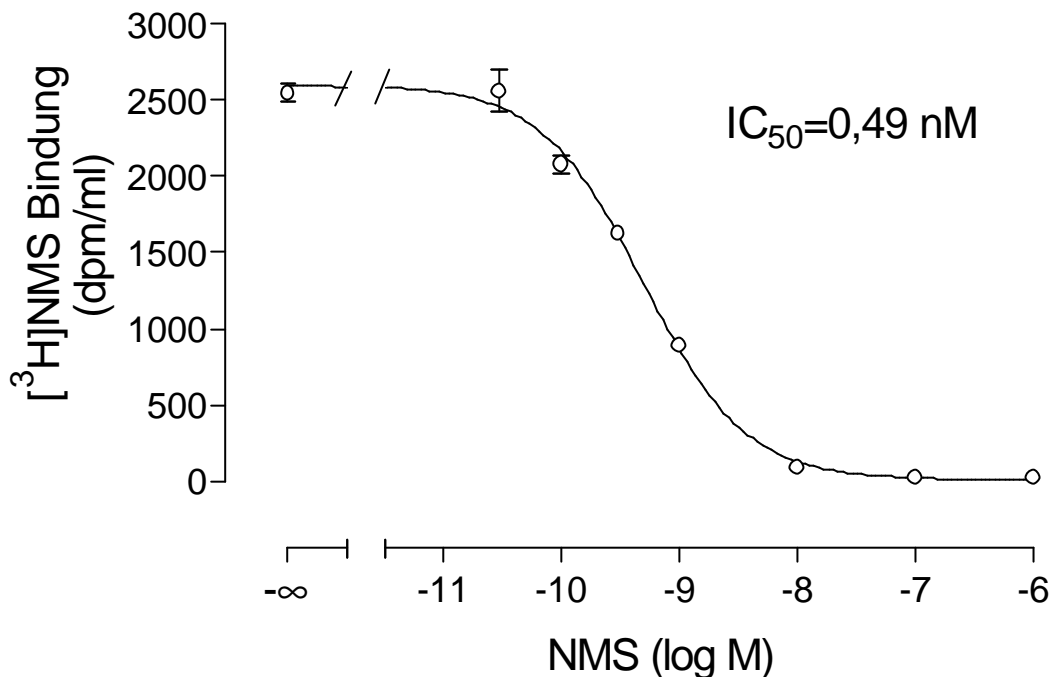


Abb. 5: Homologe Konkurrenz zwischen [³H]NMS (0,19nM) und unmarkiertem NMS in steigenden Konzentrationen an einem Homogenat aus CHO-hM₂-Zellen in einem Puffer aus 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl und 10 mM HEPES. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 Experimenten in triplicierter Ausführung.

Ordinate: Spezifische [³H]NMS Bindung in dpm/ml Inkubationsmedium

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration an unmarkiertem NMS

Es errechnete sich ein K_D-Wert von 0,30 ± 0,10 nM und ein B_{max}-Wert von 2351 ± 84 fmol/mg_{Protein}. Der Hill-Koeffizient (n_H = -1,001 ± 0,093) war nicht signifikant unterschiedlich von n_H = -1 (F-Test, p > 0,05).

Ergebnisse

Da in [³⁵S]GTP γ S Bindungsexperimenten pro Experiment eine gesamte Charge Homogenat verbraucht wurde, konnten für dieses System nur stichpunktartig Proben zur Charakterisierung der [³H]NMS-Bindungseigenschaften herangezogen werden. Dies stellt ein übliches Verfahren dar, weil mit der Charakterisierung des Meßsystems mehr die Zelllinie als das einzelne Homogenat charakterisiert wird.

Alle Meßsysteme zeigten in homologen Konkurrenzexperimenten einen Hill-Koeffizienten, der sich statistisch nicht von $n_H = -1$ unterschied (F-Test, $p > 0,05$). Diese Steigungen lassen auf eine einheitliche Population nicht interagierender Rezeptoren schließen.

Ergebnisse

3.1.4 Vergleich der Kennwerte dieser Arbeit mit Literaturwerten

Tabelle 6 zeigt die Kennwerte von Homogenaten und Zellsuspensionen, die in dieser Arbeit verwendet wurden und einige Vergleiche aus der Literatur.

Quelle	Gewebe-Spezies	Inkubationsbedingungen	K_D [nM]	B_{max} [fmol/mg _{Prot.}]	n
Diese Arbeit	CHO-hM ₁	Krebs-HEPES-Puffer pH 7,4; 23°C	1,04 ± 0,24	4723 ± 53	4
Burford et al., 1992	CHO-hM ₁	10 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 10 mM HEPES pH 7,4; 23°C	1,26 ± 0,26	3043 ± 165	3
Diese Arbeit	Herzventrikel, Hausschwein	10 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 10 mM HEPES pH 7,4 ; 23°C	0,47 ± 0,11	209 ± 37	3
Mohr et al., 1992	Herzventrikel Hausschwein	3mM MgP _i 50mM TrisHCl pH 7,4; 23°C	1,2 ± 0,2	203 ± 19	6
Diese Arbeit ([³⁵ S]GTPγS- Experimente)	CHO-hM ₂	10 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 10 mM HEPES pH 7,4; 30°C	0,30 ± 0,10	2351 ± 84	3
Lazareno & Birdsall, 1993, ([³⁵ S]GTPγS- Experimente)	CHO-hM ₂	10 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 20 mM HEPES pH 7,4; 30°C	0,46 ± 0,09	1012 ± 78	3

Tabelle. 6: Kenngrößen der [³H]NMS-Bindung an den verwendeten Homogenaten und Zellsuspensionen sowie Vergleichswerte aus der Literatur (Mittelwerte ± Standardfehler).

Ergebnisse

Die Vergleiche mit der Literatur zeigen eine weitgehende Übereinstimmung in Bezug auf die pharmakologischen Kennwerte. Bei der Auswahl der Literaturvergleiche wurde beachtet, dass die Werte für K_D und B_{max} eine Pufferabhängigkeit aufweisen können. Es ist zu bedenken, dass der Einfluss bivalenter Kationen, besonders Magnesium, einen Affinitätsverlust bei NMS bewirken kann (Schulz, Dissertationsschrift 1998).

Ergebnisse

3.2 Messung der Ca^{2+} -induzierten Fluoreszenz an M_1 -transfizierten CHO-Zellen

3.2.1 Effekt an Wildtyp Zellen (CHO-WT Zellen)

Um die Spezifität der Messungen sicherzustellen, wurden Kontrollexperimente am Wildtyp der Zelllinie durchgeführt. Eine Mikrotiterplatte wurde mit nicht transfizierten CHO-Zellen (CHO-Wildtyp Zellen) beschickt. Dann wurden nacheinander Krebs-HEPES-Puffer ohne Substanzzusatz und mit $10 \mu\text{M}$ Carbachol in verschiedene Bohrungen der Platte injiziert. Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abbildung 6 dargestellt ($n = 9_{\text{(Kontrolle)}}$, $n = 3_{\text{(Carbachol, } 10 \mu\text{M)}}$, tripliziert).

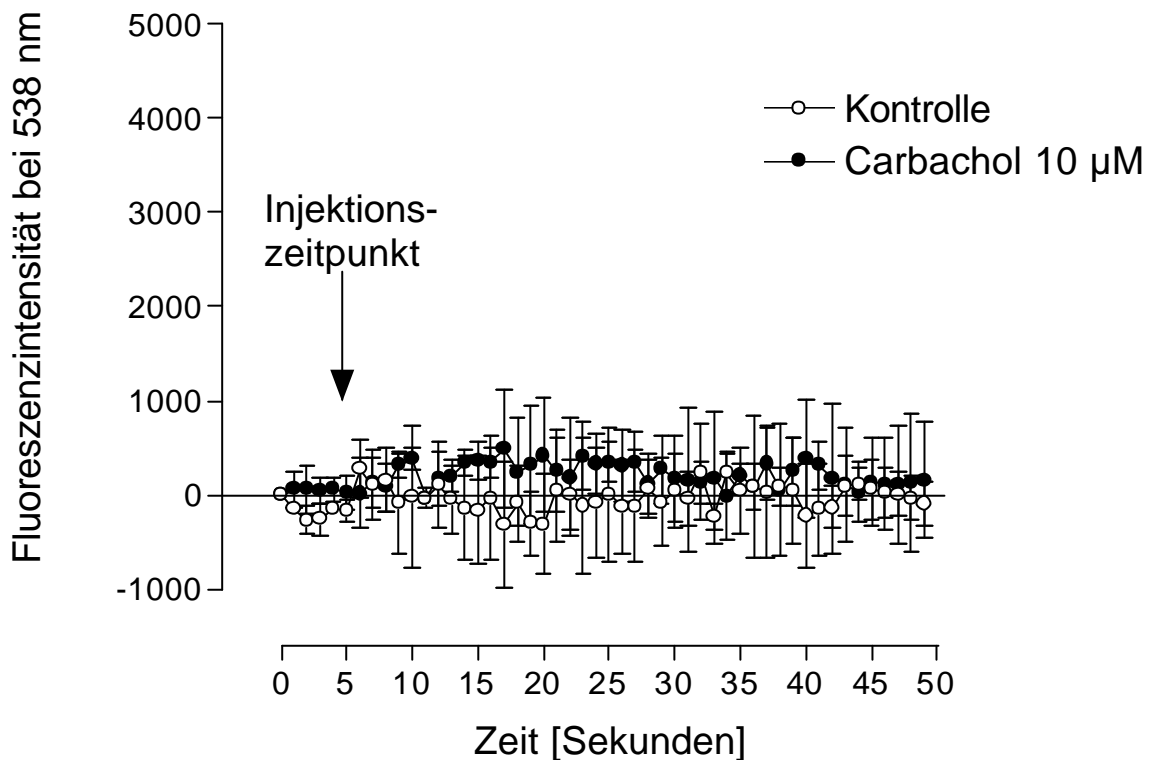


Abb. 6: Effekt von Carbachol auf die Ca^{2+} -induzierte Fluoreszenz in CHO-Wildtyp Zellen. Die Injektion erfolgte nach 5 Sekunden (Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3 - 9$ (tripliziert)).

Ordinate: Fluoreszenzintensität bei 538 nm (nach Subtraktion der basalen Fluoreszenz, Näheres siehe Text).

Abszisse: Zeit in Sekunden; bei $t=5$ Sekunden: Zusatz von Carbachol oder Substanz-freiem Krebs-HEPES-Puffer.

Ergebnisse

Die Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenz als Maß für die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist in den Abbildungen 6 - 9 wiedergegeben. Die Kontrollkurve wurde aufgenommen, indem ein Aliquot Krebs-HEPES-Puffer ohne Substanzzusatz in eine Bohrung der Mikrotiterplatte injiziert wurde.

Die Injektion der jeweiligen Lösungen erfolgte nach 5 Sekunden (Pfeil in Abbildung 6). Alle Kurven wurden auf Null normiert. Dies geschah, indem die basale Fluoreszenz (der Wert vor der Substanzzugabe) subtrahiert wurde. Aus diesem Grund liegen die Anfangspunkte der Kurven übereinander bei Null.

Keine der Injektionen führte im Wildtyp der CHO-Zelllinie zu einem Anstieg der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz.

Die in Abbildung 6 zusätzlich eingezeichnete Nulllinie veranschaulicht, dass keine der Messungen zu einem statistisch signifikanten Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz führte.

3.2.2 Effekt an CHO-M₁ Zellen

Es wurde untersucht, ob M₁-transfizierte CHO-Zellen auf den Zusatz von Carbachol mit einer cytosolischen Calciumfreisetzung reagieren. Das Ergebnis zeigt Abbildung 7.

Während sich beim Kurvenverlauf ohne Substanzzusatz kein Effekt zeigte (Kontrolle, Abb. 7), nahm die Fluoreszenzintensität im Cytosol der behandelten Zellen deutlich zu.

Diese Experimente wurden mit einer Versuchsanzahl von $n = 3$, tripliziert, durchgeführt. In Abbildung 7 sind Mittelwerte und Standardfehler dieser Versuchsreihe dargestellt.

Ergebnisse

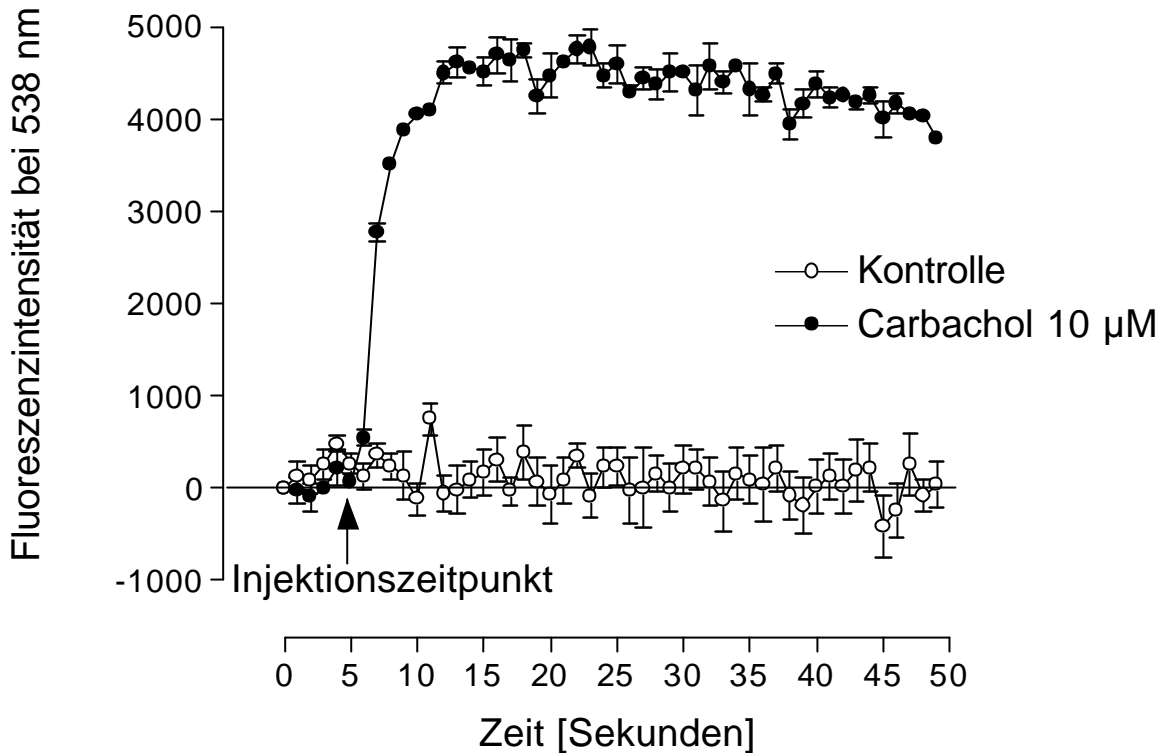


Abb. 7: Effekt von Carbachol auf die Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenz in CHO- M_1 Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von drei Messungen ($n = 3$, tripliciert). Der Zeitpunkt des Zusatzes der Lösung ist mit einem Pfeil gekennzeichnet (nach 5 Sekunden). *Ordinate:* Fluoreszenzintensität bei 538 nm (nach Subtraktion der basalen Fluoreszenz). *Abszisse:* Zeit in Sekunden; bei $t=5$ Sekunden: Zusatz von Carbachol ($10\mu\text{M}$) oder Substanz-freiem Krebs-HEPES-Puffer.

3.2.3 Untersuchung der Wirkung von allosterischen Modulatoren auf die Ca^{2+} -induzierte Fluoreszenz in CHO- M_1 -Zellen

Es wurde untersucht, ob allosterische Modulatoren in der Lage sind, einen Eigeneffekt über M_1 -Rezeptoren auf die Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenz zu entfalten. Wie in Abbildung 8 dargestellt, konnte eine Steigerung der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenzintensität nach Injektion von Lösungen allosterischer Modulatoren nicht festgestellt werden. Abbildung 8 zeigt aber auch, dass eine Steigerung der Ca^{2+} -induzierten Fluoreszenzintensität durch Carbachol auftrat. Das Meßsystem funktionierte demnach.

Diese Experimente wurden mit einer Versuchsanzahl von $n = 2$, tripliciert, durchgeführt.

Ergebnisse

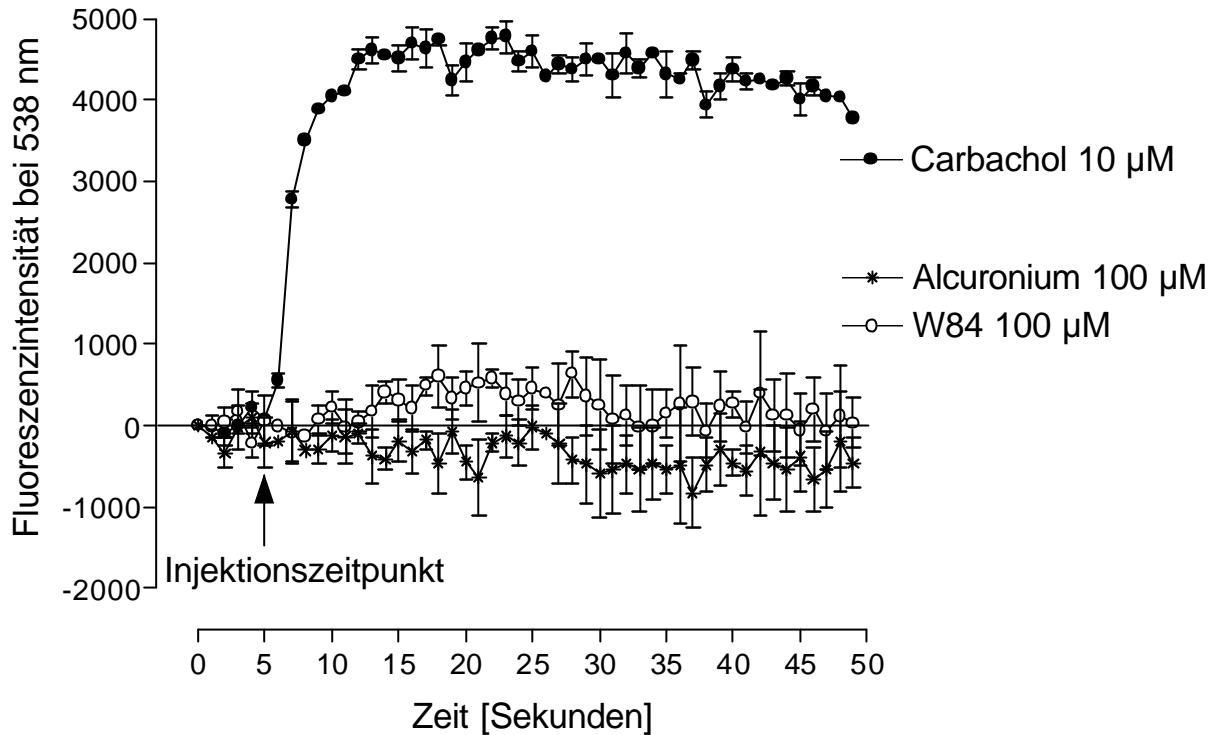


Abb. 8: Effekte von Alcuronium, W84 und Carbachol auf die Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenz in CHO- M_1 -Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler ($n = 2$, tripliciert).

Ordinate: Fluoreszenzintensität bei 538 nm

Abszisse: Zeit in Sekunden; bei $t=5$ Sekunden: Zusatz von Carbachol- oder Alloster-haltigem Krebs-HEPES-Puffer.

3.2.4 Messung der Konzentrations-Effekt-Beziehung von Carbachol

Im Folgenden wurde die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Carbachol untersucht. Zu diesem Zweck wurden CHO- M_1 -Zellen mit steigenden Konzentrationen Carbachol behandelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt. Die Experimente wurden mit einer Versuchsanzahl von $n = 3$, dupliziert, durchgeführt.

Ergebnisse

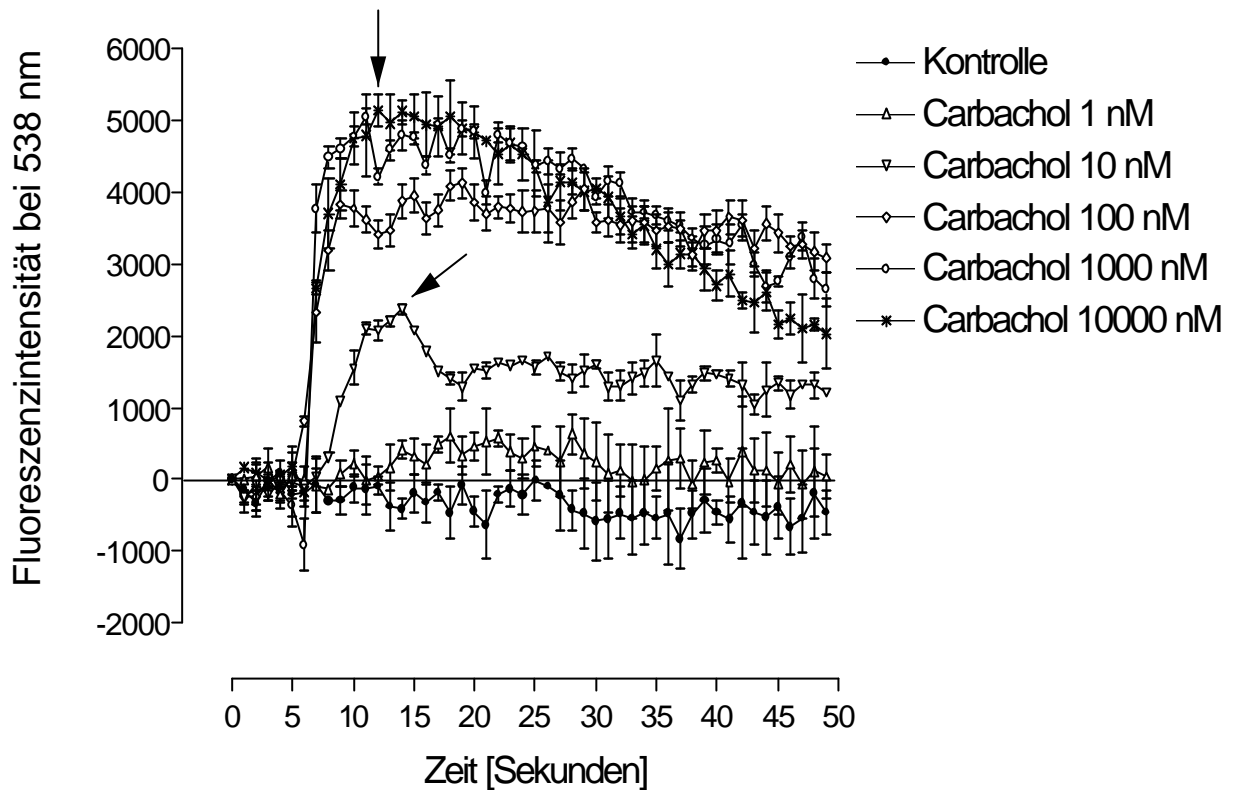


Abb. 9: Effekt von steigenden Carbachol-Konzentrationen auf die Ca^{2+} -abhängige Fluoreszenz in CHO- M_1 -Zellen. Mit Pfeilen gekennzeichnet sind beispielhaft die Punkte höchster Fluoreszenzintensität für 10 nM bzw. 10000 nM Carbachol. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten in triplicierter Ausführung.

Ordinate: Fluoreszenzintensität bei 538 nm

Abszisse: Zeit in Sekunden; bei t=5 Sekunden: Zusatz von Carbachol oder Substanz-freiem Krebs-HEPES-Puffer.

Zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungskurven wurden manuell die Werte höchster Fluoreszenzintensität ermittelt. In Abbildung 9 sind diese Meßpunkte beispielhaft für 10 nM und für 10000 nM Carbachol mit Pfeilen hervorgehoben.

Aus Abbildung 9 geht außerdem hervor, dass diese Messpunkte nicht zeitgleich für die einzelnen Carbacholkonzentrationen liegen müssen.

Die Meßpunkte maximaler Fluoreszenzintensität wurden anschließend gegen den Logarithmus der Carbacholkonzentration aufgetragen (enthalten in Abb. 10).

Ergebnisse

3.2.5 Messung des Carbachol-Effektes unter Einfluß von allosterischen Modulatoren

Nach dem oben beschriebenen Verfahren wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Carbachol erstellt. Dabei wurden die Maxima der Fluoreszenzintensität aus den Kurven in Abbildung 9 in die Kontroll-Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Abbildung 10 überführt. Anschließend wurde die Carbachol-Konzentrations-Wirkungs-Kurve unter dem Einfluß verschiedener Konzentrationen allosterischer Modulatoren aufgenommen. Im einzelnen handelte es sich dabei um 10 μM und 100 μM der Substanzen W84 und Dimethyl-W84 (DMW). Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in Abbildung 10 zu sehen. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler. Die Experimente wurden mit einer Versuchsanzahl von $n = 3 - 12$ durchgeführt. Hierbei wurde die Kontroll-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (Carbachol ohne Zusatz allosterischer Modulatoren) in jedem einzelnen Experiment mitgeführt. Das Meßfenster der jeweiligen Kontrollkurve wurde gleich 100 % gesetzt. Die Kurven, die unter dem Einfluß allosterischer Modulatoren entstanden, wurden bezogen auf die festgelegten 100 % der Kontrolle. Dargestellt sind also die Kurven unter dem Einfluß allosterischer Modulatoren in Relation zur Kontrollkurve (ohne den Einfluß allosterischer Modulatoren). Die aus dieser Abbildung resultierenden pharmakologischen Kenngrößen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Die Messungen zeigten, dass der Maximaleffekt des Carbachols durch W84 gemindert werden kann. Diese Feststellung erscheint recht sicher, da die Kontrollkurve bei jedem Experiment mitgeführt wurde. Die Kurvenanpassung an die Meßwerte erfolgte mittels Gleichung 3. Das Ausgangsniveau der Kurven wurde dabei konstant Null gesetzt.

Ergebnisse

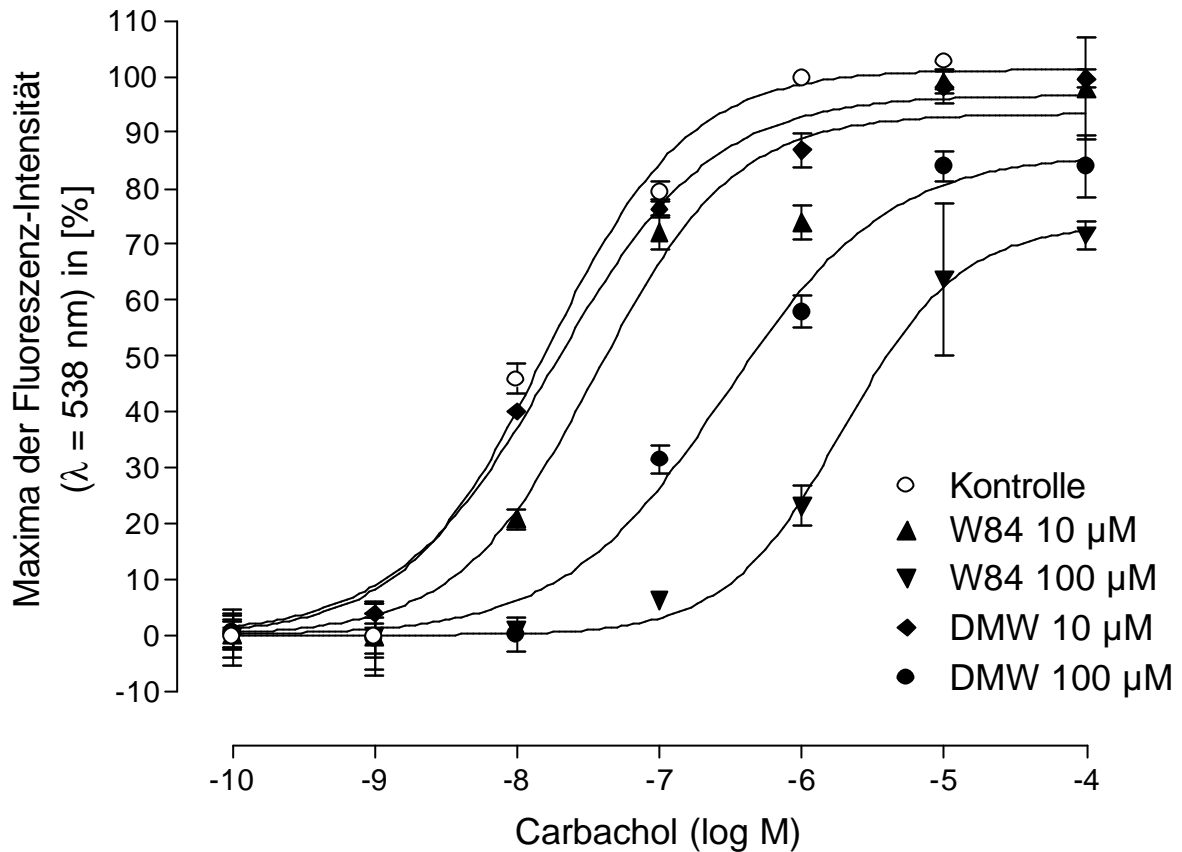


Abb. 10: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Carbachol in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von je 10 µM und 100 µM der allosterischen Modulatoren W84 und Dimethyl-W84 (DMW). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von $n = 3 - 12$ Experimenten in triplicierter Ausführung.

Ordinate: Maxima der Fluoreszenz-Intensität bei 538 nm in Prozent der Kontrolle (Carbachol ohne Zusatz allosterischer Modulatoren). Das Meßfenster der Kontrollkurve wurde gleich 100 % gesetzt.

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Carbachol-Konzentration

Ergebnisse

	Kontrolle	W84, 10 μM	W84, 100 μM	DMW, 10 μM	DMW, 100 μM
pWP	$7,80 \pm 0,08$	$7,45 \pm 0,13$	$5,71 \pm 0,17$	$7,74 \pm 0,06$	$6,54 \pm 0,13$
n_H	$0,88 \pm 0,12$	$0,90 \pm 0,19$	$1,06 \pm 0,34$	$0,79 \pm 0,08$	$0,76 \pm 0,13$
E_{\max} [%]	100 ± 3	93 ± 4	73 ± 4	97 ± 2	86 ± 4
n	12	3	3	3	3

Tabelle 7: Einfluß allosterischer Modulatoren auf die Kenngrößen der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz durch Carbachol an CHO-M₁-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler bei einer Versuchsanzahl von n = 3 - 12 Experimenten. ^a pWP = negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration am Wendepunkt der Kurve.

Ergebnisse

3.3 Ergebnisse der [³⁵S]GTP γ S Bindungsexperimente

3.3.1 Methodenetablierung

3.3.1.1 Einführung

Zur Messung der intrinsischen Aktivität von Testsubstanzen am M₂-Acetylcholinrezeptor wurde ein funktionelles System etabliert. Es sollte verwendet werden, um die allosterische Modulation der intrinsischen Aktivität von Agonisten zu messen und mit der Affinität aus Radioligand-Bindungsuntersuchungen zu vergleichen. Gemessen wurde die Assoziation von [³⁵S]GTP γ S an G Proteine.

3.3.1.2 Kinetische Experimente mit [³⁵S]GTP γ S

Als erstes wurden Assoziationskinetiken des Radioliganden [³⁵S]GTP γ S unter Kontrollbedingungen und unter Stimulation mit 10 mM Pilocarpin an Membranpräparationen aus CHO-hM₂-Zellen aufgenommen. In diesen Experimenten sollte der Meßbereich der Agonist-stimulierten G Protein-Aktivierung erfasst werden.

In Abbildung 11 sind diese Assoziationsexperimente dargestellt. Die Kurven wurden an die Meßpunkte unter Annahme einer monophasisch-exponentiellen Assoziationskinetik angepasst. Eine biphasische Anpassung der Kurven ergibt ein signifikant schlechteres Ergebnis verglichen mit einer monophasischen Anpassung der Kurven an die Meßpunkte (F-Test, $p > 0,05$). Da zum Zeitpunkt $t = \infty$ davon auszugehen ist, dass alle vorhandenen G Proteine radioligandbesetzt vorliegen, wurden beide Kurven auf das gleiche Maximum, dasjenige unter Agonist-Stimulation, festgesetzt.

Ergebnisse

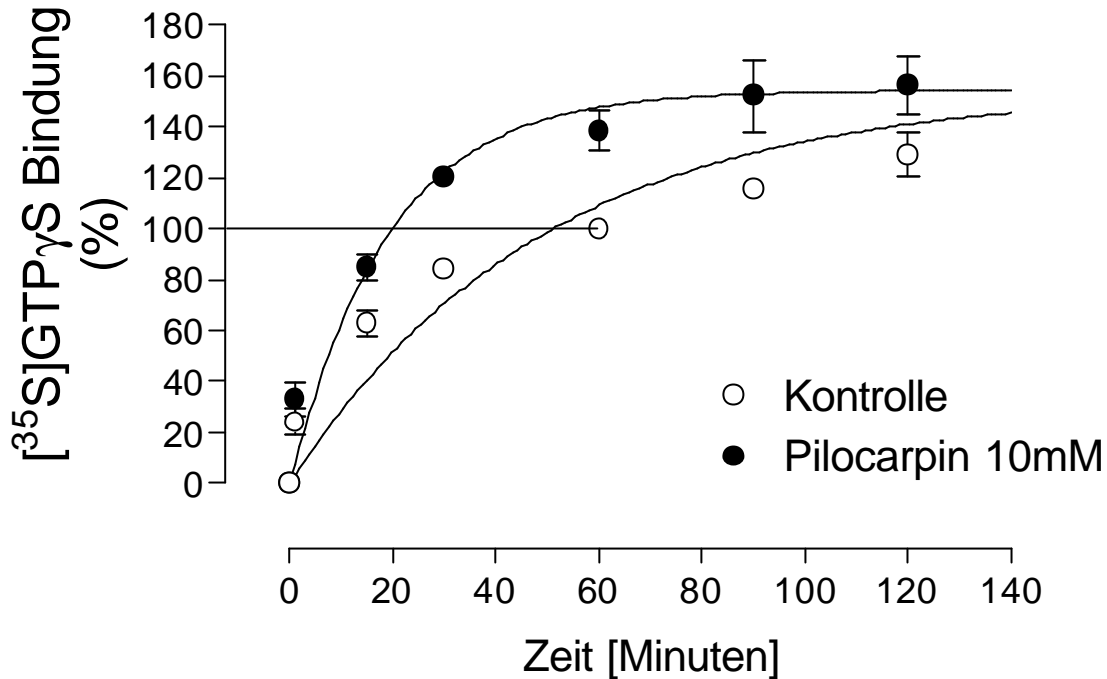


Abb. 11: Spontane und Pilocarpin-induzierte (10 mM) Assoziationsbindungskinetik von $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ an G-Proteine aus Homogenaten von CHO-hM₂-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von n = 2 Experimenten in triplizierter Ausführung.

Ordinate: $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ Bindung in %. Der 60-Minuten-Wert der Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt (siehe Text).

Abszisse: Zeit in Minuten

	Kontrolle	Pilocarpin, 10mM
Maximum [%] (konstant)	154	154
Assoziationsgeschw. - Konstante (k_{+1})	$0,020 \pm 0,002$	$0,053 \pm 0,008$
n	3	3

Tabelle 8: Pharmakologische Kennwerte der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Assoziationskinetiken in Abbildung 11 (Mittelwerte \pm Standardfehler, n = 2, tripliziert).

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{+1} der Kontrolle wird von Jakubík et al. (1998) mit $0,020 \pm 0,0$ angegeben. Die Werte stimmen somit gut überein mit bereits publizierten Kenngrößen.

Ergebnisse

Um Konzentrations-Wirkungs-Kurven aufzunehmen, ist es nötig, einen Zeitpunkt festzulegen, an dem die Proben filtriert werden, das heißt der Assoziationsvorgang abgebrochen wird. Basierend auf den Ergebnissen aus Abbildung 11 wurde das größte Meßfenster berechnet, indem die einzelnen Datenpunkte unter Agonist-Stimulation durch diejenigen der Kontrollkurve dividiert wurden. Dabei zeigte sich, dass das größte Meßfenster entsteht, wenn man diesen Zeitpunkt nach 60 Minuten wählt. Bei den folgenden Experimenten wurde daher nach 60 Minuten filtriert. In der Literatur werden Werte von 30 bis zu 120 Minuten genannt (Hilf und Jakobs, 1992).

Nun sollte der Einfluß von unmarkiertem Guanosin-Di-Phosphat (GDP) auf die basale Bindung und die durch Pilocarpin stimulierte Bindung von [³⁵S]GTP γ S gemessen werden.

An G Proteine gebundenes, unmarkiertes GDP bewirkt auf molekularer Ebene eine Überführung des Rezeptorproteins in einen für Acetylcholin oder Agonisten hochaffinen Zustand (Higashijima et al., 1987; Taylor, 1990). Im unbesetzten Zustand besitzt der Rezeptor eine Spontanaktivität (basale Aktivität) zur Aktivierung von G Proteinen (Jakubík et al., 1998). Der unbesetzte Zustand des Rezeptors wurde mit 100% definiert (siehe Abbildung 11).

Wie in Abbildung 12 zu sehen, ist eine konzentrationsabhängige Aufweitung des Meßfensters mit steigenden GDP-Konzentrationen zu beobachten. Da das größte Meßfenster bei 10 μ M GDP zu beobachten war, wurde diese Konzentration im Folgenden verwendet. Eine höhere Konzentration birgt die Gefahr unspezifischer Effekte.

Ergebnisse

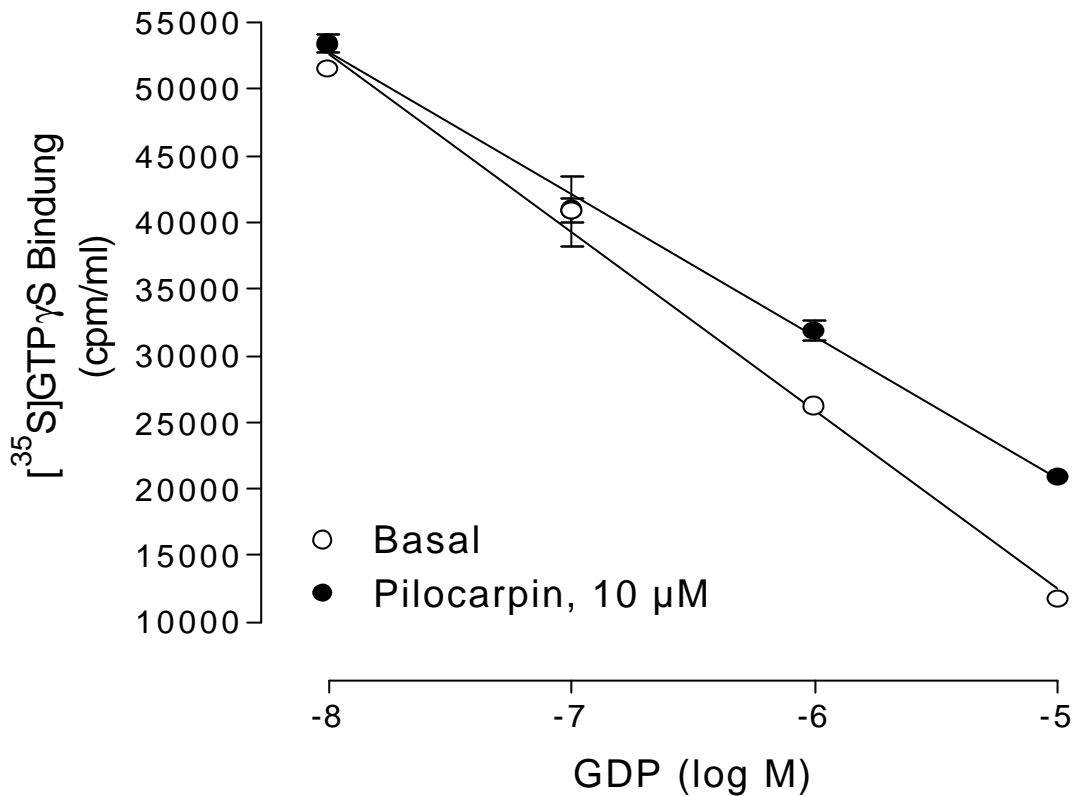


Abb. 12: Darstellung des konzentrationsabhängigen Effektes von unmarkiertem GDP auf die Größe des Pilocarpin-induzierten Meßfensters der [35 S]GTP γ S Bindung. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von $n = 2$ Experimenten in triplicierter Ausführung.

Ordinate: [35 S]GTP γ S Bindung, cpm pro 1 ml Ansatzvolumen (Rohdaten)

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von nicht radioaktiv markiertem Guanosin-Di-Phosphat (GDP)

Es sollte geprüft werden, ob literaturbekannte Werte mittels des dargestellten Versuchssystems reproduziert werden können. Desweiteren sollte gezeigt werden, dass die untersuchten Effekte spezifisch durch den M_2 -Rezeptorsubtyp vermittelt werden. Aus diesem Grund wurden Kontroll-Experimente am Wildtyp der Zelllinie (CHO-WT) durchgeführt.

Ergebnisse

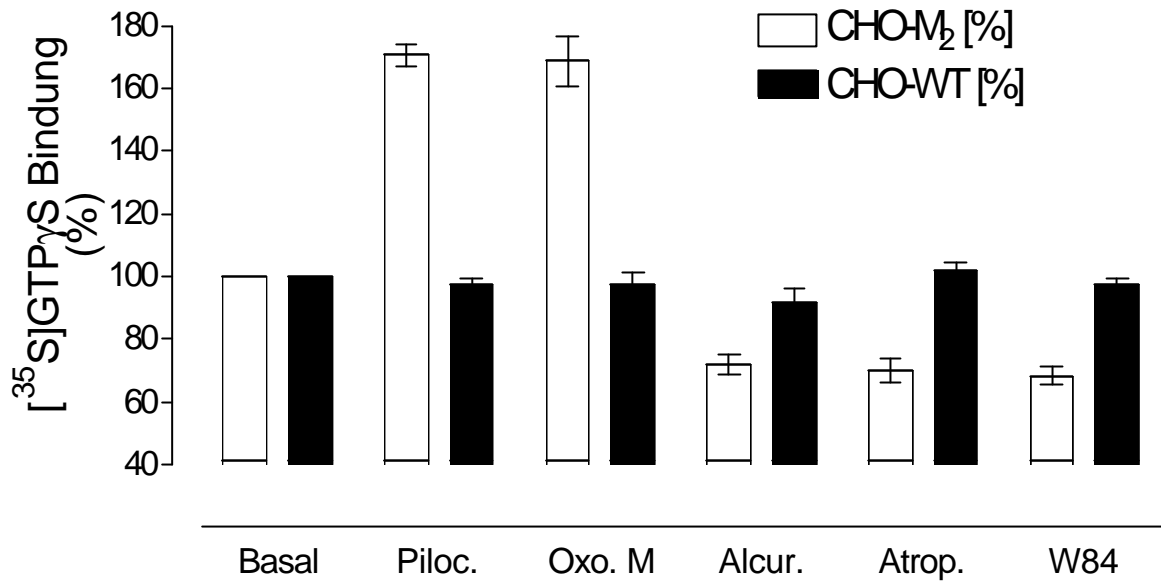


Abb. 13: Effekt rezeptorsättigender Konzentrationen einzelner Liganden auf die [³⁵S]GTP_γS Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen und CHO-WT-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von n= 4 Experimenten in triplizierter Ausführung. Filtriert wurde nach 60-minütiger Inkubation bei 30°C.

Ordinate: [³⁵S]GTP_γS Bindung in (%), der jeweilige Basalwert der [³⁵S]GTP_γS Bindung wurde auf 100% festgesetzt (siehe Text).

Abszisse: Untersuchte Substanzen in rezeptorsättigenden Konzentrationen (siehe Tabelle 9).

Ergebnisse

Substanzname, Konzentration	CHO-hM ₂	CHO-WT
Basalwert [%]	100 ± 0,0	100 ± 0,0
Pilocarpin, 1mM	170,5 ± 5,5 ^{a,b}	97,0 ± 2,0 ^a
Oxotremorin M, 1mM	169,0 ± 1,0 ^{a,b}	97,0 ± 1,0 ^a
Alcuronium, 100µM	71,0 ± 1,5 ^{a,c}	91,5 ± 7,5 ^a
Atropin, 1µM	70,0 ± 4,0 ^{a,c}	102,0 ± 1,0 ^a
W84, 1mM	68,0 ± 4,0 ^{a,c}	97,0 ± 4,0 ^a

Tabelle 9: Mittelwerte und Standardfehler des Effektes von rezeptorsättigenden Konzentrationen einzelner Liganden auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung (n = 4, tripliciert). Index ^a statistisch signifikanter Unterschied, verglichen werden die Spalten 2 und 3 (CHO-M₂ versus CHO-WT), F-Test, p>0,05; Index ^b statistisch nicht signifikanter Unterschied, verglichen werden die Zeilen 3 und 4 der zweiten Spalte (Pilocarpin versus Oxotremorin M an CHO-M₂), F-Test, p>0,05; Index ^c statistisch nicht signifikanter Unterschied, verglichen werden die Zeilen 5, 6 und 7 der zweiten Spalte (Alcuronium versus Atropin versus W84 an CHO-M₂), F-Test, p>0,05.

In Abbildung 13 und Tabelle 9 sind die Befunde dieser Meßreihe dargestellt. Hierbei wurden rezeptorsättigende Konzentrationen verwendet (Lazareno et al., 1993 und 1993b; Jakubíc et al., 1998; Hilf & Jakobs, 1991). Der Effekt auf beide Transfektanten der Zelllinie wurde gemessen und in Form eines Balkendiagramms in Abbildung 13 gegenübergestellt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten (n = 4) in duplizierter Ausführung.

Die hier erhobenen Daten stehen im Einklang mit Befunden, die von verschiedenen Autoren publiziert wurden (Hilf & Jakobs, 1989; Hilf et al., 1992; Hilf & Jakobs, 1992; Liebmann et al., 1992; Lazareno & Birdsall, 1993; Birdsall et al., 1999).

Die Daten wurden mittels F-Test bei einem Konfidenzintervall von 95% (p>0,05) auf Signifikanz geprüft (Indices in Tabelle 9). Das Ergebnis war:

1. Innerhalb der Untersuchungen an CHO-WT-Zellen existiert kein signifikanter Unterschied der Werte für den maximal erreichbaren Effekt (E_{max}). Die

Ergebnisse

Befunde belegen, dass keiner der Liganden einen unspezifischen (nicht muskarinisch vermittelten) Effekt auf CHO-WT-Zellen ausübte.

2. Unter diesen Versuchsbedingungen ergeben der Partialagonist Pilocarpin und der Vollagonist Oxotremorin M statistisch gleiche Werte für den maximal erreichbaren Effekt (E_{max}). Dieser Befund ist allerdings - speziell für [35 S]GTP γ S Experimente - bereits literaturbekannt (bsp. Vogel et al., 1995).
3. Die beiden strukturell unterschiedlichen allosterischen Modulatoren Alcuronium und W84 sowie der orthosterische Antagonist Atropin (Strukturformeln siehe 2.7) senken die basale Bindung von [35 S]GTP γ S. Das Ausmaß der Senkung ist gleich, denn die E_{max} -Werte sind statistisch nicht verschieden voneinander (F-Test, $p > 0,05$).

Anschließend wurde die Konzentrations-Effekt-Kurve des orthosterischen Antagonisten Atropin aufgenommen. Auch diese Experimente dienten der Prüfung auf Reproduzierbarkeit hinsichtlich literaturbekannter Daten. Das Ergebnis von $n = 2$ unabhängigen Experimenten in triplizierter Ausführung ist in Abbildung 14 dargestellt (Mittelwerte \pm Standardfehler). Die pharmakologischen Kennwerte sind in Tabelle 10 aufgeführt und den Befunden von Jakubík et al. (1998) gegenübergestellt.

Ergebnisse

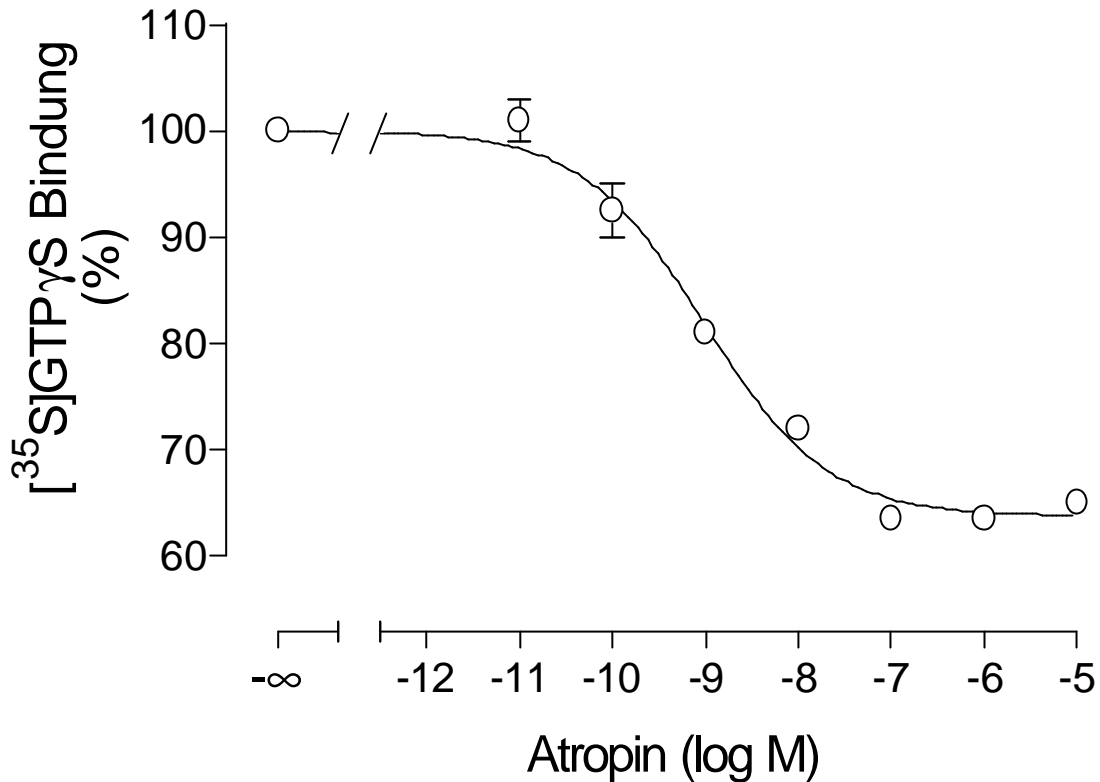


Abb. 14: Effekt von Atropin auf die [³⁵S]GTPγS Bindung in Prozent der Basalaktivität ([³⁵S]GTPγS Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz), die gleich 100% gesetzt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von n=2 unabhängigen Experimenten in triplizierter Ausführung. Filtriert wurde nach 60-minütiger Inkubation bei 30°C.

Ordinate: [³⁵S]GTPγS Bindung in Prozent des Basalwertes

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Atropin

Parameter	Zahlwert	Jakubík et al., 1998
pEC ₅₀	9,01 ± 0,10	8,796 ± 0,00
n _H	-0,66 ± 0,09 ^a	keine Angabe
n	2, tripliziert	3
E _{max}	64% ± 1%	81% ± 1%

Tabelle 10: Pharmakologische Kennwerte der Atropin-induzierten Senkung der [³⁵S]GTPγS-Bindung (Mittelwerte und Standardfehler). Index ^a statistisch signifikanter Unterschied des Steigungskoeffizienten n_H von 1 (F-Test, p > 0,05).

Ergebnisse

Mit diesen Schritten war die Etablierung des Versuchssystems und Prüfung auf Reproduzierbarkeit von Literaturdaten abgeschlossen.

3.3.2 Allosterische Modulation der Agonist-induzierten G Protein-Aktivierung

3.3.2.1 Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung durch Alcuronium

Es sollte der Einfluß des allosterischen Modulators Alcuronium auf die intrinsische Aktivität von Pilocarpin untersucht werden. Der Effekt von Alcuronium in Konzentrationen von 3 μM bzw. 10 μM auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin ist in Abbildung 13 dargestellt. Über die pharmakologischen Kennwerte gibt Tabelle 11 Auskunft. Die Kurvenanpassung an die Messwerte unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss vom 3 μM Alcuronium wurden mittels Vier-Parameter-Kurven-Gleichung (Gleichung 3) vorgenommen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von $n = 2 - 3$ unabhängigen Experimenten in triplizierter Ausführung.

Ergebnisse

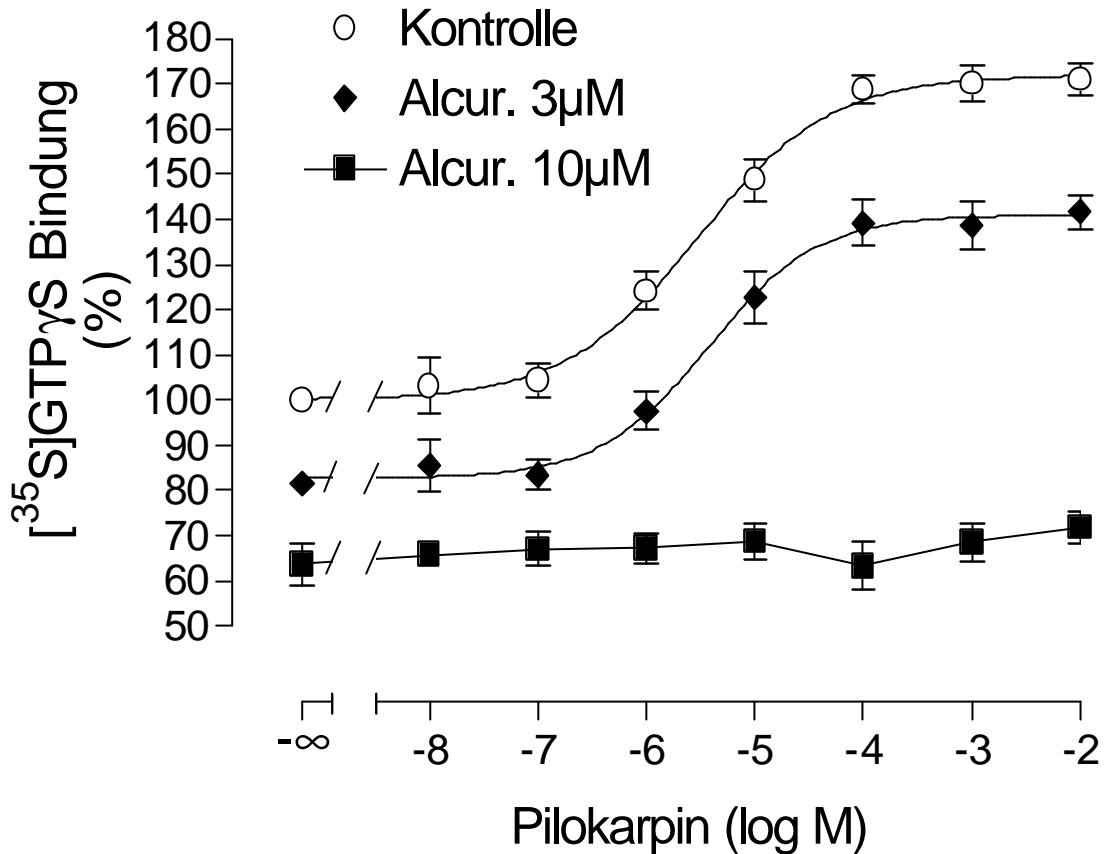


Abb. 15: Darstellung des Effektes zweier Konzentrationen von Alcuronium (3 μ M und 10 μ M) auf die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-hM₂-Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler von n= 2 - 3 unabhängigen Experimenten in triplizierter Ausführung. Fehlerbalken sind nicht dargestellt, wenn sie in der Größe des Symbols enthalten sind. Die Kurven wurden mittels Vier-Parameter-Kurven-Gleichung (Gleichung 3) an die Datenpunkte angepasst; bei den Messwerten unter Einfluss von 10 μ M Alcuronium handelt es sich um eine Punkt-zu-Punkt Verbindung. Filtriert wurde nach 60-minütiger Inkubation bei 30°C.

Ordinate: [³⁵S]GTP γ S Bindung in Prozent des Wertes ohne Zusatz von Testsubstanz (Basalwert)

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Agonisten Pilocarpin

Ergebnisse

	Kontrolle (Pilocarpin-KWK)	Pilocarpin-KWK+3 μ M Alcur.
pEC ₅₀	5,48 \pm 0,12	5,43 \pm 0,16
E _{max}	172% \pm 6%	141% \pm 3%
n _H	0,68 \pm 0,10	0,85 \pm 0,23
N	3, Doppel u. Vierfachbestimmungen	3, Doppelbestimmungen

Tabelle 11: Pharmakologische Kennwerte der Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluß von 3 μ M Alcuronium. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Der Basalwert der Kontrollkurve wurde konstant auf 100% festgesetzt. In Anwesenheit von 3 μ M Alcuronium wurde der Ausgangswert der Kurve nicht festgesetzt. Die Bezeichnung E_{max} kennzeichnet das obere Plateau der Kurve. Der Wert pEC₅₀ steht für den negativen dekadischen Logarithmus der Konzentration am Wendepunkt der Kurve.

Den Werten von Tabelle 11 kann man entnehmen, dass sich die Affinität von Pilocarpin (pEC₅₀) zum Rezeptor nicht ändert, während die intrinsische Aktivität (E_{max}) unter dem Einfluss von Alcuronium statistisch signifikant abnimmt.

Als nächstes wurde untersucht, wie Alcuronium allein und in Kombination mit 10 mM Pilocarpin auf die [³⁵S]GTP γ S Bindung wirkt. Das Ergebnis ist in Abbildung 16 dargestellt. Tabelle 12 zeigt die pharmakologischen Kennwerte der Kurven aus Abbildung 16.

Ergebnisse

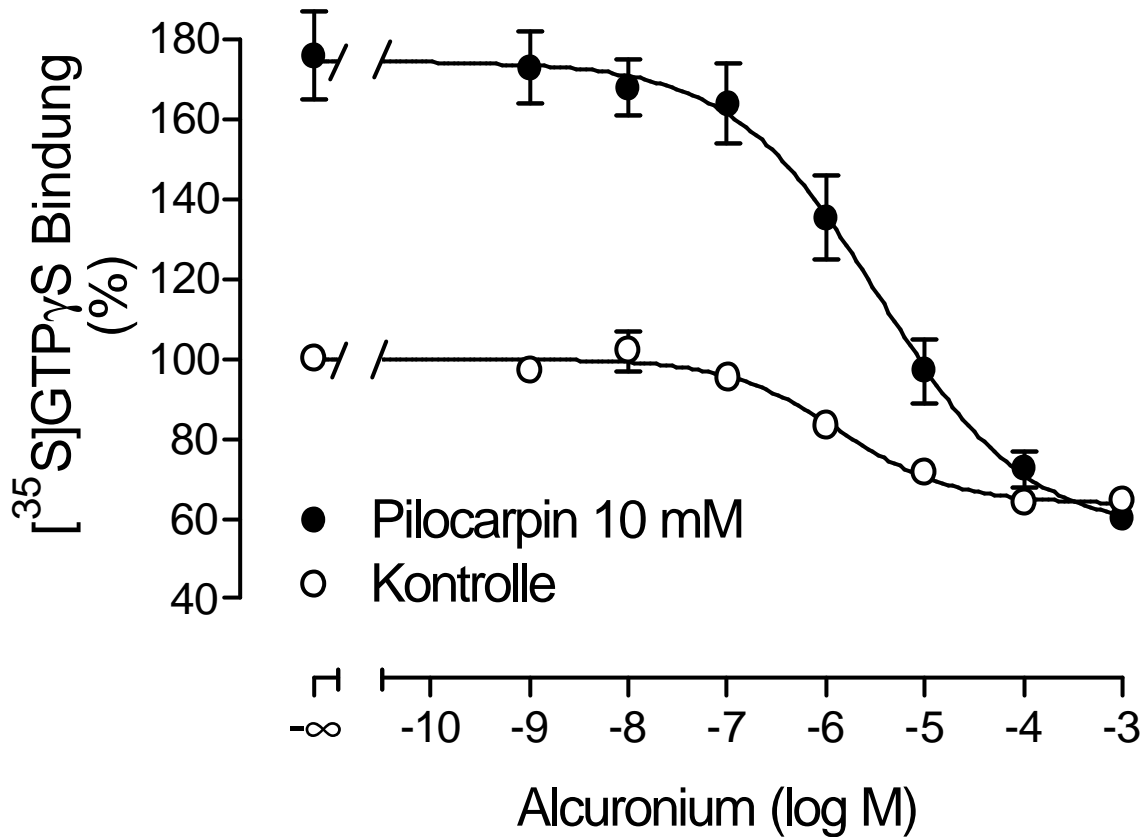


Abb. 16: Einfluß von Alcuronium allein und in Anwesenheit von 10 mM Pilocarpin auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent des Wertes ohne Substanzzusatz (Basalwert). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von n= 2 unabhängigen Experimenten in triplicierter Ausführung. Fehlerbalken sind nicht dargestellt, wenn sie in der Größe des Symbols enthalten sind. Die Kurve wurde an die Datenpunkte mittels der Vier-Parameter-Kurven-Gleichung (Gleichung 3) angepasst. Filtriert wurde nach 60-minütiger Inkubation bei 30°C.

Ordinate: [³⁵S]GTPγS Bindung in Prozent des Wertes ohne Substanzzusatz (Basalwert)

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Alcuronium-Konzentration

	Kontrolle (Alcuronium-KWK)	Kontr. + 10 mM Pilocarpin (Alcur.-KWK + Piloc., 10mM)
pIC ₅₀	5,86 ± 0,15	5,47 ± 0,21
E _{max}	64% ± 2%	57% ± 1%
n _H	-0,76 ± 0,16	-0,59 ± 0,15
n	2, Dreifachbestimmungen	2, Dreifachbestimmungen

Tabelle 12: Effekt von Alcuronium alleine sowie von Alcuronium in Anwesenheit von Pilocarpin 10 mM auf das Niveau der [³⁵S]GTPγS Bindung (Mittelwerte und Standardfehler)

Ergebnisse

Die Affinitäten von Alcuronium scheinen unabhängig davon zu sein, ob der Rezeptor Pilocarpin-besetzt ist oder nicht; denn die Wendepunkte der Kurven in Abbildung 18 (pIC_{50} -Werte) unterscheiden sich nicht statistisch signifikant voneinander (t-Test, $p = 0,27$).

3.3.2.2 Modulation der Oxotremorin M-induzierten G Protein-Aktivierung durch Alcuronium

Das Ausgangsniveau der Oxotremorin M Kontrollkurve wurde auf 100% festgesetzt. Bei den weiteren Kurven in Abbildung 15 wurde das Ausgangsniveau der Kurven auf 60% festgesetzt. Dieser Wert entspricht dem Mittelwert aller Basalwerte unter Alcuronium-Einfluß ($n_{\text{gesamt}}=7$, Doppel- bis Vierfachbestimmungen). Auf die gleiche Art wurden die Maximalwerte der Kurven analysiert und auf 165% festgesetzt ($E_{\text{max, Oxotremorin M}} = 165\% \pm 2\%$). Auch im Fall der Untersuchung einer Oxotremorin M Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Anwesenheit einer Kombination aus 10 μ M Alcuronium und 100 μ M Pilocarpin wurde ein Wert von 60% für das Ausgangsniveau gefunden. Bei der Darstellung dieser Konzentrations-Effekt-Beziehung in Abbildung 17 handelt es sich um eine Punkt-zu-Punkt-Verbindung. Diese Kurve verläuft bis zu einer Oxotremorin M-Konzentration von 100 μ M deckungsgleich mit derjenigen unter Einfluss von 1000 μ M Alcuronium. Die pharmakologischen Kennwerte sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Ergebnisse

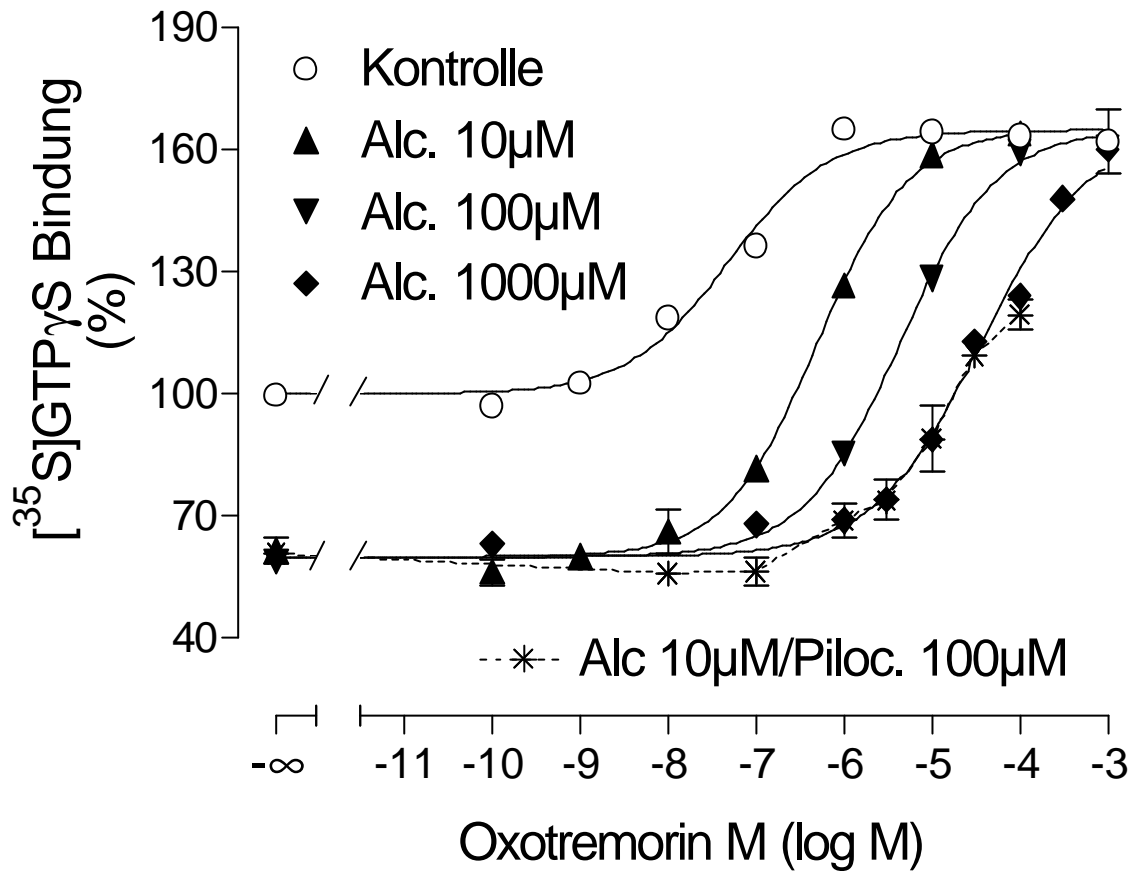


Abb. 17: Effekt von steigenden Konzentrationen von Alcuronium sowie einer Kombination aus 10 μ M Alcuronium und 100 μ M Pilocarpin auf die Oxotremorin M-abhängige $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ Bindung in Prozent des Wertes ohne Substanzzusatz (Basalwert). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von $n = 1 - 3$ unabhängigen Experimenten in triplizierter Ausführung. Fehlerbalken sind nicht dargestellt, wenn sie in der Größe des Symbols enthalten sind. Die Kurven wurden mittels der Vier-Parameter-Kurven-Gleichung (Gleichung 3) an die Messwerte angepasst. Filtriert wurde nach 60-minütiger Inkubation bei 30°C.

Ordinate: $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ Bindung in Prozent des Wertes ohne Substanzzusatz (Basalwert)

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Oxotremorin M

Ergebnisse

	Kontrolle (Oxo.M-KWK)	Kontr.+ Alcur. 10 μ M	Kontr.+Alcur. 100 μ M	Kontr.+Alcur. 1000 μ M
pEC ₅₀	7,32 \pm 0,11	6,31 \pm 0,11	5,39 \pm 0,11	4,45 \pm 0,11
n _H	0,76 \pm 0,12	0,84 \pm 0,11	0,85 \pm 0,10	0,70 \pm 0,12
n	3	3	1	1

Tabelle 13: Pharmakologische Kennwerte der Oxotremorin M Konzentrations-Effekt-Kurven in An- und Abwesenheit verschiedener Konzentrationen von Alcuronium sowie in Anwesenheit einer Kombination aus 10 μ M Alcuronium und 100 μ M Pilocarpin (Mittelwerte und Standardfehler); n = Anzahl der Experimente.

Die Ergebnisse der Oxotremorin M Konzentrations-Effekt-Kurven wurden anschließend in Form einer Auftragung nach Arunlakshana-Schild dargestellt (Abbildung 18). Das Ziel der Transformation dieser Daten in einen Schild-Plot war, die Affinität des Allostere Alcuronium anhand seines Effektes auf die Konzentrations-Effekt-Kurven von Oxotremorin M zu bestimmen.

Der Schnittpunkt der Schild-Geraden mit der Abszisse kennzeichnet die Antagonistkonzentration, bei der eine Rechtsverschiebung der Kurve um den Faktor 2 bewirkt wird (pA₂ Wert). Bei einer kompetitiven Interaktion beider Liganden nimmt die Schildsteigung s den Wert 1 an. Ist die Steigung unterschiedlich von 1,0 spricht dies für einen nicht kompetitiven Mechanismus. Im dargestellten Fall war die Interaktion zwischen Oxotremorin M und Alcuronium nach statistischer Prüfung (F-Test, p=0,05) jedenfalls formal kompetitiv, denn die Schildsteigung s war nicht signifikant unterschiedlich von 1. Der aus der Schild-Auftragung ermittelte pK_B Wert von Alcuronium war 5,97 \pm 0,04. Dieser Wert beschreibt die Affinität des Alcuroniums zu unbesetzten M₂-Rezeptoren.

Ergebnisse

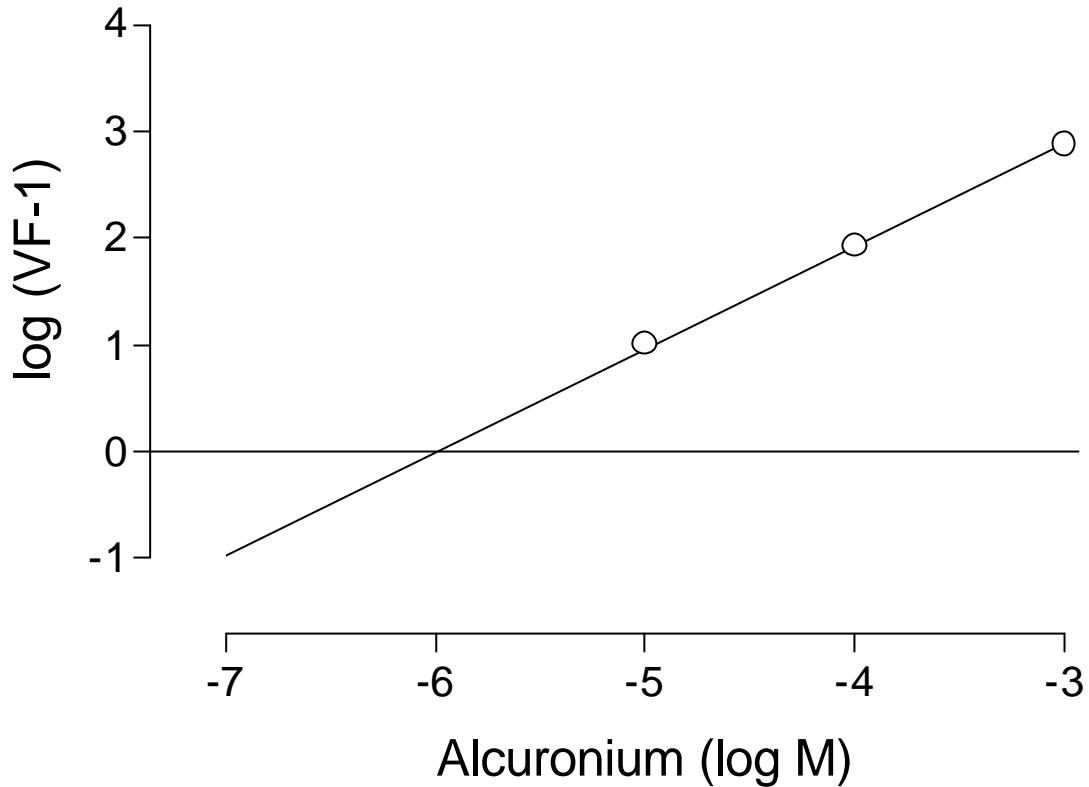


Abb. 18: Schild-Auftragung der Alcuronium-induzierten Verschiebungen von Oxotremorin M Konzentrations-Effekt-Kurven. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler der Daten aus Abbildung 17 (Nähere Erklärung im Text).

Ordinate: Dekadischer Logarithmus der Verschiebungsfaktoren (VF) minus eins:
$$VF = \frac{EC_{50, \text{Oxotremorin M in Anwesenheit von Alcuronium}}}{EC_{50, \text{Oxotremorin M in Abwesenheit von Alcuronium}}}$$

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Alcuroniumkonzentration

Ergebnisse

3.4 Radioligand Bindungsexperimente an M₂ Acetylcholinrezeptoren

Radioligand Bindungsexperimente am M₂ Acetylcholinrezeptor wurden mit den Radioliganden [³H]NMS und [³H]Oxotremorin M durchgeführt. Die Experimente hatten zum Ziel, die Affinitäten derjenigen drei Liganden zum M₂ Rezeptor zu messen, die bereits zuvor in [³⁵S]GTP γ S Experimenten verwendet worden waren (Pilocarpin, Oxotremorin M und Alcuronium). Es sollte untersucht werden, wie sich der Agonist-besetzte, humane M₂ Rezeptor in Radioligand-Bindungsuntersuchungen hinsichtlich einer allosterischen Beeinflussbarkeit durch Alcuronium verhält.

3.4.1 Ergebnisse mit [³H]N-Methyl-Scopolamin

Da [³H]Pilocarpin nicht zur Verfügung stand, wurde die Affinität des Partialagonisten in Ab- und Anwesenheit von Alcuronium auf indirektem Weg ermittelt. Dies geschah durch Interaktionsexperimente mit [³H]NMS.

Diese Experimente wurden allein und in Anwesenheit von zwei Konzentrationen Alcuronium durchgeführt, 1 μ M und 3 μ M. Diese Konzentrationen sollten nach Befunden von Jakubík et al. (1997) einen deutlichen Effekt auf die Bindung von Pilocarpin ausüben. Die Berechnung der Inkubationsdauer für diese Experimente erfolgte mittels Gleichung 8. Es wurde eine Inkubationsdauer von 8 Stunden errechnet. Der kinetische Parameter EC_{50, Diss.} wurde der Literatur entnommen (Tränkle et al., 1996). Der EC_{50, Diss.} Wert ist die Konzentration des Inhibitors, der die Dissoziationsgeschwindigkeit des Radioliganden um 50% reduziert.

Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 19 zusammengefasst. Die Versuchszahl betrug vier unabhängige Experimente für die Meßpunkte der Kontrollkurve und je zwei unabhängige Experimente pro eingesetzte Alcuronium-Konzentration, wobei die Kontrollkurve jedesmal komplett mitgeführt wurde. Alle Experimente wurden tripliciert durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Da Alcuronium positiv kooperativ mit [³H]NMS interagiert (Tränkle et al., 1996; Jakubík et al., 1997), zeigt sich in Abbildung 19 eine konzentrationsabhängige

Ergebnisse

Steigerung der Gesamtbindung. Die hier beobachtete Steigerung des Ausgangsniveaus der Kurven war also zu erwarten.

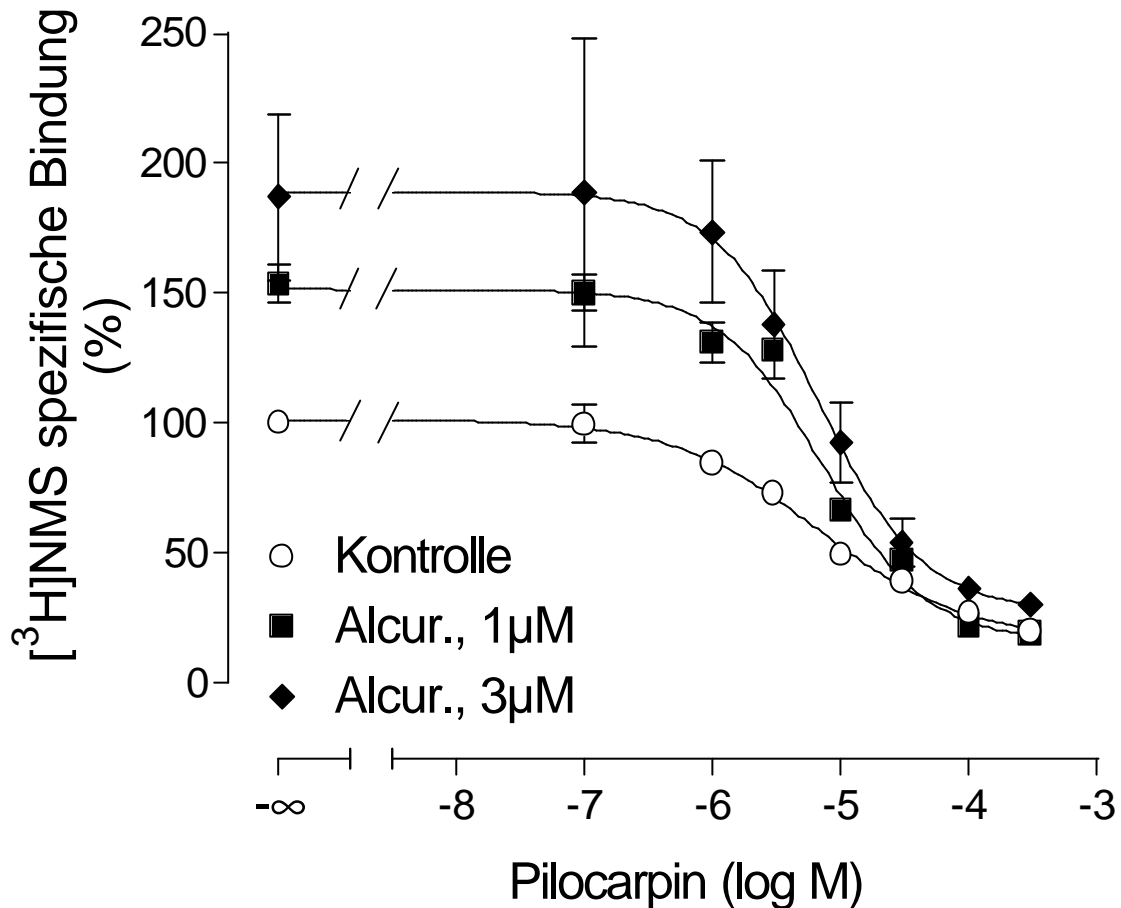


Abb. 19: Inhibition der $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung durch Pilocarpin in Ab- und Anwesenheit von 1 μM und 3 μM Alcuronium. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von $n = 2 - 4$ unabhängigen Experimenten in jeweils triplicierter Ausführung. Fehlerbalken sind nicht dargestellt, wenn sie die Größe des Symbols nicht übersteigen.

Ordinate: Spezifische $[^3\text{H}]$ NMS Bindung in Prozent; die Gesamtbindung der Kontrolle wurde auf 100% festgesetzt.

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.

Ergebnisse

	pWP \pm SEM	n _H \pm SEM	Max. \pm SEM	Min. \pm SEM	n
Kontrolle	5,18 \pm 0,12	-0,76 \pm 0,15	101,3 \pm 3,26	16,66 \pm 5,77	4
Alcuronium, 1 μ M	5,14 \pm 0,09	-1,08 \pm 0,23	151,4 \pm 4,88	16,02 \pm 8,03	2
Alcuronium, 3 μ M	5,18 \pm 0,24	-1,08 \pm 0,56	189,1 \pm 16,63	27,65 \pm 22,35	2

Tabelle 14: Pharmakologische Kenngrößen der Kurven von Abbildung 19. Aufgeführt sind Mittelwerte und Standardfehler. pWP = negativer dekadischer Logarithmus des Wendepunktes der Kurven, die durch Anpassung der Messwerte an Gleichung 3 entstanden sind.

Abbildung 19 wie auch die korrespondierenden Zahlwerte aus Tabelle 14 zeigen, dass sich die Affinität von Pilocarpin zum M₂ Rezeptor nicht statistisch signifikant verändert unter dem Einfluß von Alcuronium (F-Test, p=0,05). Erwähnenswert an diesen Befunden ist, dass Pilocarpin unter dem Einfluß von Alcuronium weiterhin an den Rezeptor bindet.

Um zu analysieren, ob die Inkubationsdauer Einfluß nimmt auf die Affinität (K_D) oder die maximale Anzahl der Bindungsstellen im Homogenat (B_{max}) wurden homologe Konkurrenzexperimente durchgeführt. Im Mittelpunkt des Interesses stand die Frage, ob die Inkubationsdauer von 8 Stunden für den oben angeführten Fehler verantwortlich ist. Denn die Bestimmung von B_{max} und K_D erfolgte in homologen Konkurrenzexperimenten, welche nach 2 Stunden Inkubationszeit filtriert wurden (s. 2.3.1). Um die Differenz von 6 Stunden als Fehlerquelle zu untersuchen, wurden homologe Konkurrenzexperimente nach 2 und 8 Stunden Inkubationszeit filtriert und die erhaltenen Werte für B_{max} und K_D verglichen. Abbildung 20 zeigt das Ergebnis, die zugehörigen Zahlwerte sind in Tabelle 15 aufgeführt (jeweils Mittelwerte und Standardfehler, n = je 2 unabhängige Experimente, tripliciert). Die Affinität des NMS zu seiner Bindungsstelle am M₂ Rezeptor (K_D) änderte sich nicht in statistisch signifikantem Ausmaß (F-Test, p=0,05). Auch die Menge an spezifischen Bindungsstellen (B_{max}) änderte sich kaum.

Ergebnisse

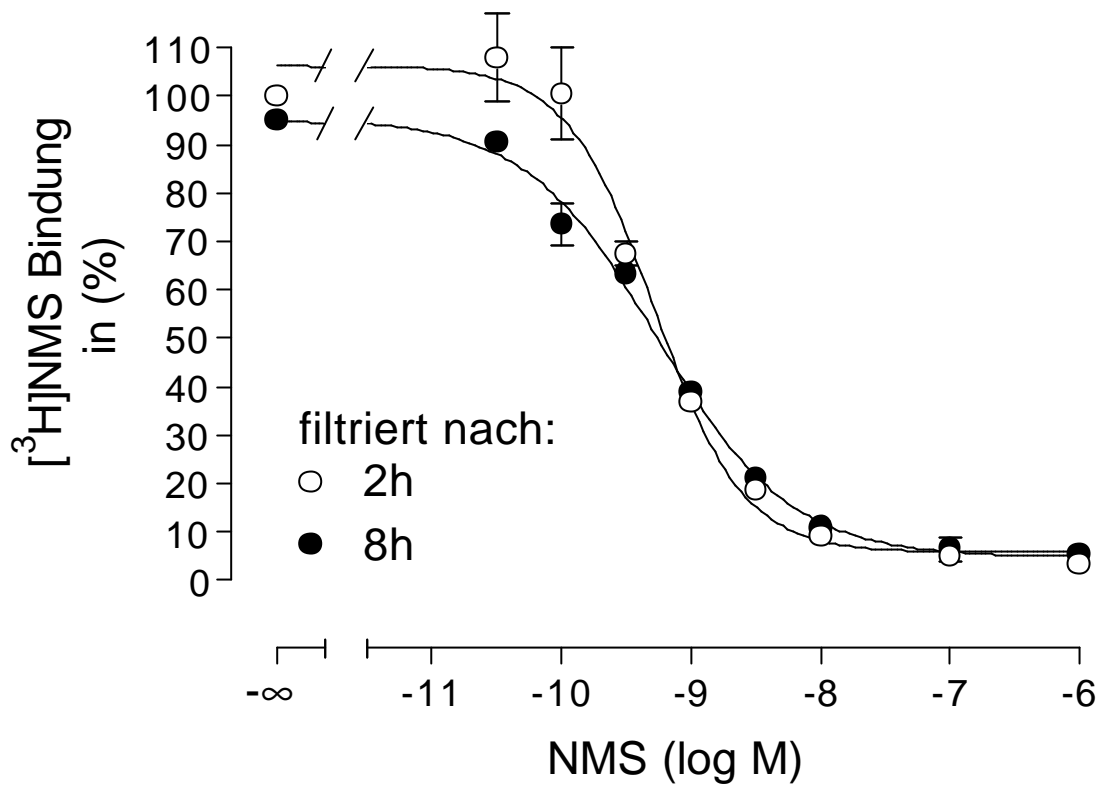


Abb. 20: Inhibition von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durch NMS nach 2 bzw. 8 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von je 2 unabhängigen Experimenten in triplizierter Ausführung. Der Maximalwert der Kurven wurde in beiden Fällen *nicht* fixiert. *Ordinate:* $[^3\text{H}]\text{NMS}$ Bindung in Prozent, die Gesamtbindung der Kontrolle nach 2 Stunden Inkubationszeit wurde gleich 100% gesetzt. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration an nicht markiertem NMS

	2 Stunden Inkubations-Zeit	8 Stunden Inkubations-Zeit
pIC_{50}	$9,28 \pm 0,06$	$9,26 \pm 0,05$
Max. (%)	$106,3 \pm 3,63$	$95,5 \pm 2,17$
Min. (%)	$5,85 \pm 2,85$	$4,88 \pm 1,66$
n_H	$-1,27 \pm 0,20$	$-0,85 \pm 0,07$
n	2	2

Tabelle 15: Pharmakologische Parameter der zwei- bzw. achtstündigen Inkubation von homologen Konkurrenzexperimenten (Mittelwerte \pm Standardfehler; n = 2, tripliziert).

Ergebnisse

3.4.2 Ergebnisse mit dem Radioliganden [³H]Oxotremorin M

Der Vollagonist Oxotremorin M war in tritierter Form vorhanden. Bei den Untersuchungen mit diesem Radioliganden konnte somit der zu untersuchende Agonist direkt zur Markierung des Rezeptors verwendet werden.

Um den Mechanismus der Interaktion von [³H]Oxotremorin M mit Alcuronium am M₂ Rezeptor zu untersuchen, wurde [³H]Oxotremorin M in einer fixen Konzentration von 1,28 nM mit steigenden Konzentrationen Alcuronium inkubiert. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in Abbildung 21 dargestellt. Tabelle 16 gibt Auskunft über die pharmakologischen Kennwerte. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardfehler von n = 3 Versuchen in triplicierter Ausführung.

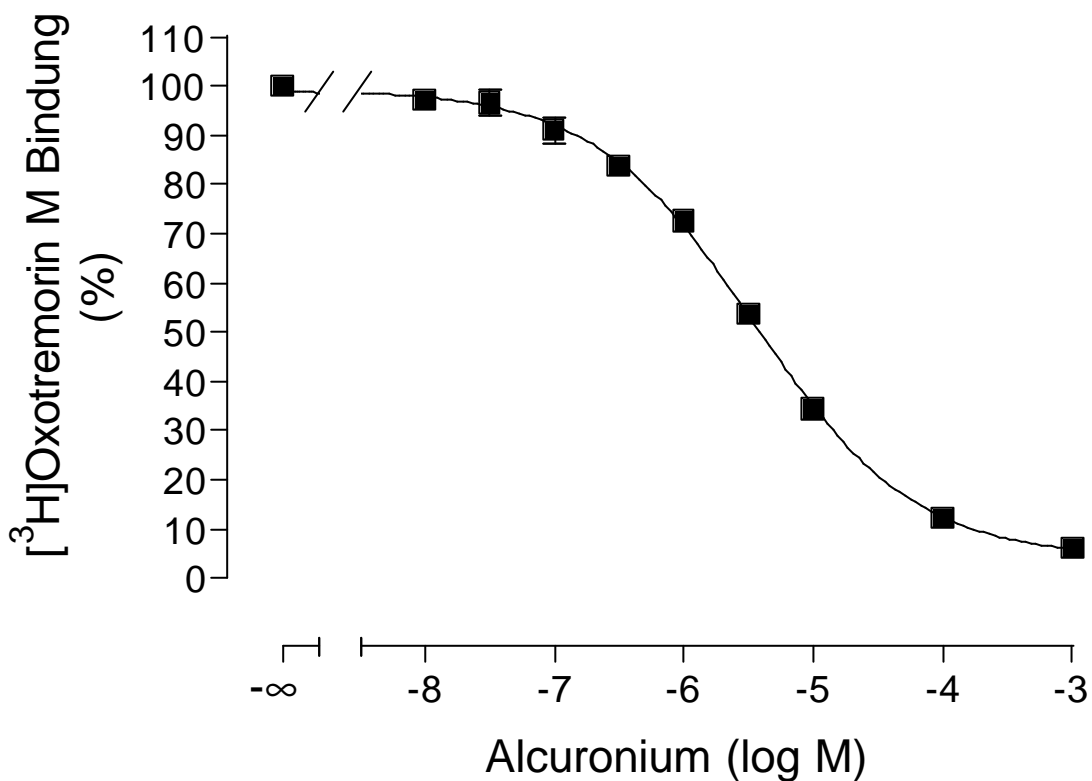


Abb. 21: Bindung von [³H]Oxotremorin M in Abhängigkeit steigender Konzentrationen von Alcuronium in Prozent (spezifische Gesamtbindung = 100%). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler von n = 3 Experimenten in triplicierter Form.

Ordinate: Spezifische [³H]Oxotremorin M Bindung in [%] der Gesamtbindung.

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Alcuroniumkonzentration

Ergebnisse

Maximum des Effektes	4,2 ± 1,8
Minimum des Effektes	99,2 ± 1,2
pIC ₅₀	5,5 ± 0,04
Steigungskoeffizient n _H	0,7 ± 0,05
n	3, tripliziert

Tabelle 16: Pharmakologische Kennwerte der Kurve aus Abbildung 21 (Mittelwerte ± Standardfehler).

3.4.3 Dauer der Gleichgewichtseinstellung von [³H]Oxotremorin M und Alcuronium

Abbildung 21 zeigt ein nicht kompetitives Verhalten von Alcuronium gegenüber [³H]Oxotremorin M, denn der Steigungskoeffizient ist statistisch signifikant verschieden von 1 ($p > 0,05$). Da sich ein allosterisches (ternäres) Gleichgewicht langsamer einstellt als ein binäres, sollte mit unterschiedlicher Inkubationsdauer der Mechanismus der Interaktion von [³H]Oxotremorin M und Alcuronium untersucht werden. Es wurden Inhibitionsexperimente durchgeführt, in welchen [³H]Oxotremorin M in einer Konzentration von 1,28 nM mit steigenden Alcuroniumkonzentrationen inkubiert wurde. Diese Experimente wurden mit einer Versuchsanzahl von $n = 3$, tripliziert, durchgeführt. Die Inkubationsphasen der drei Proben eines Versuchs wurden nach unterschiedlichen Zeiten beendet. Eine Meßreihe wurde nach 1 Stunde, eine zweite nach 6 und die dritte nach 18 Stunden Inkubation filtriert. Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt Abbildung 22. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

Ergebnisse

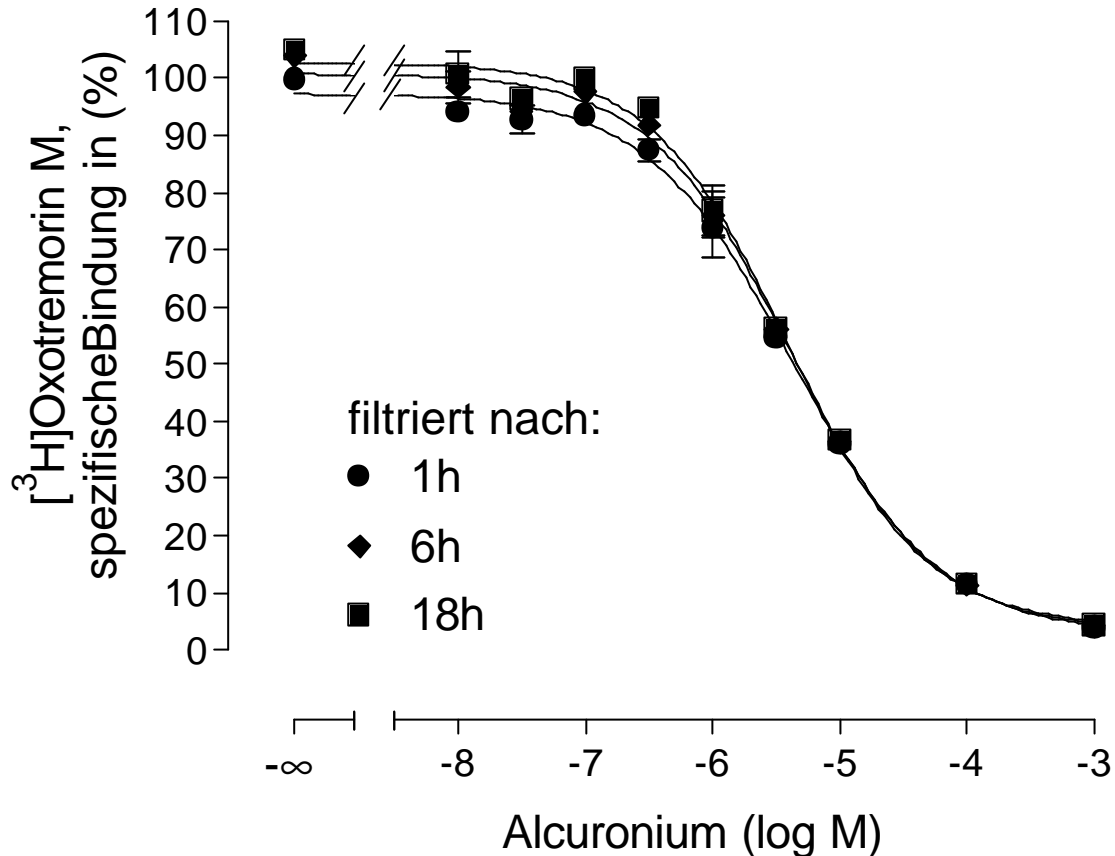


Abb. 22: Spezifische $[^3\text{H}]$ Oxotremorin M Bindung in Prozent der Gesamtbindung (100%) in Abhängigkeit steigender Konzentrationen Alcuronium. Filtriert wurde nach Inkubationszeiten von 1, 6 und 18 Stunden. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von 3 unabhängigen Experimenten in triplicierter Ausführung.

Ordinate: $[^3\text{H}]$ Oxotremorin M Bindung in Prozent (Der ein-Stunden-Wert der Gesamtbindung wurde auf 100% fixiert)

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Alcuroniumkonzentration

Die Anpassung der Meßwerte an verschiedene Modelle ergab ein statistisch signifikant besseres Ergebnis bei Verwendung der vier-Parameter-Kurven-Gleichung (F-Test, $p < 0,05$) als bei der Anpassung der Kurve an das allosterische Modell nach Ehlert. Hierbei wurden wiederum keine der pharmakologischen Parameter fixiert. Die computerunterstützte Datenanalyse wurde mit allen zu Verfügung stehenden Freiheitsgraden durchgeführt. Der Mechanismus läßt sich somit besser mit einem binären (formal kompetitiven) Modell als einem allosterischen beschreiben. Tabelle 17 ist zu entnehmen, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten besteht.

Ergebnisse

Inkubationsdauer	1 Stunde	6 Stunden	18 Stunden
Maximum des Effektes	97,41 ± 1,39	100,9 ± 1,30	102,8 ± 1,38
Minimum des Effektes	2,87 ± 2,26	3,41 ± 2,06	4,02 ± 2,15
pIC ₅₀	5,36 ± 0,05	5,38 ± 0,04	5,41 ± 0,05
n _H	-0,76 ± 0,06	-0,79 ± 0,06	-0,81 ± 0,07
n	3	3	3

Tabelle 17: Pharmakologische Kennwerte der Inhibitionsexperimente [³H]Oxotremorin M gegen Alcuronium, filtriert nach 1, 6 und 18 Stunden (Mittelwerte ± Standardfehler, n = 3, tripliziert).

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der allosterischen Beeinflussbarkeit Agonist-besetzter Muskarinrezeptoren. Hierbei sollten Affinität und intrinsische Aktivität gemessen werden. Als Rezeptorsubtypen wurden der M_1 - und der M_2 -Typ muskarinischer Acetylcholinrezeptoren ausgewählt, die jeweils an unterschiedliche Signaltransduktionswege koppeln (Mitchelson, 1988). In der Literatur wurde zumeist nur entweder die Bindung von Liganden (z.B. Jakubík et al., 1997) oder die Funktion (z.B. Hilf und Jakobs, 1991) des Rezeptors beschrieben. Nur wenige Autoren beschäftigten sich mit beiden Aspekten parallel (z.B. Maaß et al., 1994). Viele dieser Arbeiten beziehen sich auf Tierversuche oder Versuche an isolierten Organen (Lüllmann et al., 1969, Clark & Mitchelson, 1976). Wegen der Komplexität des Modells lassen Versuche dieser Art nur begrenzt Rückschlüsse auf die molekulare Ebene zu. In der vorliegenden Arbeit sollten allosterische Effekte auf der zellulären Ebene untersucht werden.

4.1 Erörterung der Meßsysteme hinsichtlich der Fragestellung

4.1.1 Theoretische Grundlagen der Calciumfreisetzungsexperimente

Das Element Calcium gehört zur Gruppe der Erdalkalimetalle (2. Hauptgruppe, 4. Periode des Periodensystems) (Rudolf et al., 2003). In der Natur kommt es aufgrund seiner Reaktivität ausschließlich als bivalentes Kation vor (Bootman & Berridge, 1995).

Physiologisch sind Calciumionen besonders wichtig, da sie ein weit verbreiteter intrazellulärer Botenstoff sind (Brann, 1992; Rudolf et al., 2003). Relativ hohe Ca^{2+} -Konzentrationen (ca. 1mM) herrschen im Extrazellulärraum sowie im glatten endoplasmatischen Retikulum (gER). Im Zytosol einer Zelle im Ruhezustand ist die Calciumkonzentration dagegen relativ niedrig (ca. 0,1 μ M). Wird die Zelle durch bestimmte Reize erregt, können Ca^{2+} -Ionen durch Kanalproteine aus dem gER

Diskussion

und/oder dem Extrazellulärraum ins Zytosol der Zelle gelangen (Bootman & Berridge, 1995; Huang et al., 1998; Rudolf et al., 2003).

Bei $M_{1,3,5}$ Rezeptoren wird durch den aktivierten Rezeptor ein G Protein der Klasse $G_{q/11}$ aktiviert (Taylor, 1990). Vom aktiven G Protein dissoziiert Guanosindiphosphat (GDP), welches im Ruhezustand gebunden ist. An seiner Stelle wird Guanosintriphosphat (GTP) gebunden. Die aktivierte α -Untereinheit dissoziiert von der $\beta\gamma$ -Untereinheit und diffundiert in der Phospholipidmembran zu ihrer Zielstruktur, dem Enzym Phospholipase C. Die membranständige PLC spaltet Phospholipide der Zytoplasmamembran in IP_3 und DAG. IP_3 aktiviert seinerseits IP_3 -Rezeptoren (Ligand gesteuerte Ionenkanäle) auf der Oberfläche des glatten ER. Durch aktive IP_3 -Rezeptoren strömen aus dem gER Ca^{2+} -Ionen ins Zytosol (Mitchelson, 1988; Taylor, 1990; Bootman & Berridge, 1995; Parekh et al., 1997; Huang & Putney, 1998, Rudolf et al., 2003). Die gesamte Kaskade benötigt einige hundert Millisekunden bis zu mehreren Sekunden (Putney, 1986; Rudolf et al., 2003).

Derzeit werden verschiedene Methoden zur Detektion von intrazellulär freigesetzten Ca^{2+} -Ionen verwendet. Häufig werden Zellen, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura 2 markiert wurden, spektroskopisch untersucht (Dolezal et al., 1997; Rudolf et al., 2003). Erforderlich hierzu sind ca. 10 Millionen Zellen, die in einer Küvette mittels UV-Spektroskopie analysiert werden (Dolezal et al., 1997). Die in dieser Arbeit verwendete Art der Messung arbeitet mit einer Polypropylen-Mikrotiterplatte mit 96 Bohrungen und dem Fluoreszenzfarbstoff Oregon Fluorescence Green-BAPTA 488[®]. Die benötigte Menge an Zellen wird reduziert auf ca. 100.000 Zellen pro Vertiefung der Mikrotiterplatte (Lin et al., 1999). Das entspricht etwa einem Prozent der beim Fura 2-Verfahren erforderlichen Menge.

Die Wirkung von Agonisten kann direkt erfasst werden. Die Effekte von Antagonisten oder allosterischen Modulatoren können nur indirekt, im Zusammenwirken mit Agonisten vermessen werden.

Gemessen wurde in Krebs-HEPES-Puffer (Zusammensetzung unter 2.2.2) an CHO-K1-Zellen. Beim Krebs-HEPES-Puffer handelt es sich um einen Puffer, der

Diskussion

durch physiologische Elektrolytkonzentrationen und Glucosezusatz das Überleben der Zellen für einige Stunden erlaubt (Lin et al., 1999).

Die Wirkungen von Carbachol und Atropin in diesem Meßsystem wurden bereits von Lin et al. (1999) beschrieben. Allosterische Modulatoren waren in jener Arbeit jedoch nicht untersucht worden. In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob allosterische Effekte mit diesem Verfahren messbar sind.

4.1.2 Theoretische Grundlagen der [³⁵S]GTP γ S Bindungsexperimente

Als weitere Meßmethode wurden am M₂ Rezeptorsubtyp Experimente zur quantitativen Messung der Rezeptor-vermittelten G Protein-Aktivierung durchgeführt. Hierzu wurde der Radioligand [³⁵S]GTP γ S verwendet. Ein Vorteil von Experimenten mit dem Radioligand [³⁵S]GTP γ S ist, dass diese Art von Versuchen auf alle G Protein gekoppelten Rezeptoren anwendbar ist (Lazareno & Birdsall, 1993). In diesen Experimenten wird auf der ersten Ebene der Signaltransduktion, der Agonist-induzierten Aktivierung von G Proteinen, gemessen. Deshalb ist diese Versuchsart gut geeignet zur vergleichenden Untersuchung mit Bindungsdaten aus Experimenten mit Radioliganden, die am Rezeptor binden (Lazareno & Birdsall, 1993). Die Methode zur Quantifizierung der G Proteinaktivierung mittels [³⁵S]GTP γ S ist seit Jahren bekannt und wird mit Erfolg zur Untersuchung allosterischer Effekte verwendet (Hilf & Jakobs, 1989 und 1991).

Die Bindung von Agonisten an Muskarinrezeptoren bewirkt eine reversible Aktivierung von G Proteinen (Safrany & Nahorski, 1994). Eine Steigerung der Dissoziationsgeschwindigkeit von GDP und der Assoziationsgeschwindigkeit von GTP an der α -Untereinheit des G Proteins ist die Folge (Higashijima et al., 1987). Die α -Untereinheit und die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G Proteins dissoziieren und beide Untereinheiten modulieren die Aktivität von Effektor-Proteinen (Shiozaki & Haga, 1992; Offermann, 2003). Die GTPase Aktivität der α -Untereinheit überführt schließlich das gebundene GTP in GDP und bewirkt so eine Inaktivierung der α -Untereinheit (Hilf & Jakobs, 1992). Die α -Untereinheit reassoziert dann mit der

Diskussion

$\beta\gamma$ -Untereinheit unter Rückbildung des heterotrimeren G Proteins (Taylor, 1990; Offermann, 2003).

GTP γ S ist ein metabolisch stabiles Analogon des GTP, das an α -Untereinheiten von G Proteinen bindet und wie GTP eine Dissoziation in die Untereinheiten des G Proteins bewirkt. Durch Einführung eines Schwefelatoms in die terminale Esterstruktur wird der Pyroester des GTP-Moleküls zum hydrolytisch stabilen Thioester GTP γ S modifiziert. Das GTP γ S-Molekül hält der hydrolytischen Spaltung des Moleküls durch die α -Untereinheit stand. Die Modifikation des Moleküls bewirkt eine quasi irreversible Bindung und Aktivierung des G Proteins (Katada et al., 1984; Harden et al., 1988; Taylor, 1990; Safrany und Nahorski, 1994; Offermann, 2003).

GTP γ S stimuliert die Zellantwort im Vergleich zu Agonisten mit Verzögerung, was man auf einen relativ langsamen, spontanen Nucleotidaustausch an den α -Untereinheiten des G Proteins in Abwesenheit von Agonisten zurückführt (Taylor, 1990). Kostimulation des G Proteins durch Agonist und GTP γ S resultiert in einer gesteigerten Zellantwort verglichen mit dem Effekt des Agonisten allein. In einem solchen Experiment ist keine Verzögerung mehr zu beobachten (Katada et al., 1984; Safrany und Nahorski, 1994). Ein Agonist-stimulierter Rezeptor steigert die Geschwindigkeit der GDP-Dissoziation vom G Protein und bewirkt eine beschleunigte GTP γ S Assoziation und Aktivierung nachgeschalteter Effekte (Taylor, 1990).

Die Agonist-induzierte GTP γ S-Bindung an α -Untereinheiten von G Proteinen kann gemessen werden, wenn radioaktiv markiertes [³⁵S]GTP γ S zum Einsatz kommt, das an G Proteine bindet und mittels Vakuumfiltration von ungebundenem [³⁵S]GTP γ S abgetrennt wird. Auf diese Art wird die [³⁵S]GTP γ S-Bindung zur Charakterisierung von Agonisten und Antagonisten hinsichtlich ihrer Affinität und intrinsischen Aktivität herangezogen (Lazareno et al., 1993; Jakubík et al., 1998; Offermann, 2003).

Viele Autoren haben die Agonist-induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung in nativem Gewebe (Hilf et al., 1989; Hilf und Jakobs, 1992), Zelllinien (Gierschik et al., 1991),

Diskussion

Zellen, die rekombinante Rezeptoren exprimieren (Lazareno et al., 1993b), sowie in Systemen aus aufgereinigten Muskarinrezeptoren und G Proteinen (Kurose et al., 1986) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass drei Voraussetzungen erfüllt werden müssen, um eine Agonist-induzierte Steigerung der [³⁵S]GTPγS Bindung zu messen.

Zunächst müssen den intrazellulären Bedingungen ähnlich hohe Konzentrationen an Magnesiumionen (Mg²⁺) zugegen sein. Nach Hilf et al. (1989) ist eine Konzentration von mindestens 500 μM nötig, um den Maximaleffekt messen zu können. Ähnlich hohe Mg²⁺-Konzentrationen sind erforderlich, um die Modulation der Agonist Bindung durch Guaninnukleotide zu messen (Higashijima et al., 1987; Shiozaki und Haga, 1992). Auch für den Agonist-induzierten GDP-GTP Austausch wurden Mg²⁺-Ionenkonzentrationen dieser Größenordnung als Voraussetzung gefunden (Higashijima et al., 1987; Shiozaki und Haga, 1992). Als international üblicher Standard werden [³⁵S]GTPγS Bindungsexperimente daher in Anwesenheit hoher Konzentrationen Magnesiumchlorid durchgeführt (≅10mM).

Die zweite wichtige Voraussetzung für [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente ist die Anwesenheit von Guanosin-Di-Phosphat (GDP) im Reaktionsansatz. GDP bewirkt eine Reduktion der Basalbindung von [³⁵S]GTPγS. Es weitet somit das Messfenster der Agonist-induzierten Förderung der [³⁵S]GTPγS-Bindung auf (Hilf et al., 1989; Gierschik et al., 1991; Hilf und Jakobs, 1992; Lorenzen et al., 1993; Lazareno et al., 1993). Der wahrscheinlichste Grund für diesen GDP-Effekt ist die Stabilisierung des G Proteins in einem inaktiven Zustand. Der Rezeptor wird dadurch übrigens in einen für Agonisten hochaffinen Zustand gehalten (Hilf et al., 1989).

Die dritte Voraussetzung, um eine Agonist-induzierte Förderung der [³⁵S]GTPγS Bindung messen zu können, ist die Gegenwart von Natriumionen (Na⁺). In Membransuspensionen aus Vorhöfen des Hausschweins reduzierten 150mM NaCl den Basalwert der [³⁵S]GTPγS Bindung. Dabei blieb der Maximalwert der absoluten, durch den Vollagonisten Carbachol induzierten [³⁵S]GTPγS Bindung unbeeinflusst (Hilf et al., 1989; Hilf und Jakobs, 1992). Als Folge der reduzierten Basalbindung zeigte sich auch bei diesen Untersuchungen eine Aufweitung des

Diskussion

Messfensters für [³⁵S]GTP γ S Bindungsexperimente durch NaCl in hohen Konzentrationen (Konz._{NaCl} \geq 150mM).

NaCl ist außerdem in der Lage, die Bindung von Agonisten an den Rezeptor zu modulieren (Gierschik et al., 1989). Die Reduktion des Basalwertes der [³⁵S]GTP γ S Bindung sowie der basalen GTPase Aktivität durch Natriumionen lassen auf eine Regulation der Agonist-Rezeptor-G Protein-Interaktion durch Natriumionen schließen (Gierschik et al., 1989) sowie darauf, dass Natriumionen den unbesetzten Rezeptor vom G Protein zu entkoppeln vermögen (Hilf et al., 1989). Die Ursache für die Na⁺-Effekte liegt wahrscheinlich in einer Bindungsstelle des Rezeptorproteins für Natriumionen. Diese Bindungsstelle konnte für die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren bereits lokalisiert werden (Wess et al., 1995). Sie liegt für den humanen M₂-Rezeptor an Asparaginsäure 105, also nah an Asparaginsäure 103, welche für die Bindung orthosterischer Liganden eine Schlüsselfunktion besitzt.

Als Anhaltspunkt für die Etablierung der Experimente mit dem Radioliganden [³⁵S]GTP γ S dienen die Arbeiten von Hilf und Jakobs (1989, 1991 und 1992) sowie Arbeiten von Lazareno et al. (1993b) und Jakubík et al. (1998).

4.2 Befunde am M₁ Acetylcholinrezeptor

Der M₁ Rezeptor koppelt vornehmlich an GProteine vom Typ G_{q/11}. Allerdings ist aus der Literatur bekannt, dass er in der Lage ist, auch andere G Proteine zu aktivieren (Tucek et al., 2002). Man bezeichnet dieses Phänomen als Rezeptor-G Protein-Promiskuität. Man findet den M₁ Acetylcholinrezeptor unter anderem in neuronalem Gewebe (Mitchelson, 1988; Brann, 1992). Die Signaltransduktion des aktivierten Rezeptors verläuft über die Aktivierung von Phospholipase C (PLC) und die intrazellulären Botenstoffe Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) (Watson & Arkininstall, 1994; Wess, 1996). IP₃ führt durch Öffnung von Kanalproteinen auf der Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Brown et al., 1995).

4.2.1 Interpretation der Ergebnisse aus Calciumfreisetzungsexperimenten

4.2.1.1 Einführung

Es gibt für muskarinische Rezeptoren eine große Zahl von Agonisten und allosterischen Modulatoren (Mutschler et al., 1995; Tränkle et al., 1996; Jakubík et al., 1997; Birdsall et al., 1999). Die Agonisten Acetylcholin und Carbachol haben verglichen mit einigen orthosterischen Antagonisten (Atropin oder N-Methyl-Scopolamin) eine relativ niedrige Affinität (Jakubík et al., 1997). Der Affinitätsunterschied zwischen Carbachol (einem Strukturanalogen des Acetylcholins) und N-Methyl-Scopolamin beträgt beispielsweise am M_2 -Rezeptorsubtyp bei 23°C in einem Puffer mit 10mM Magnesiumionen mehr als vier Dekaden im Radioligand-Bindungsexperiment (Mutschler et al., 1989; Brann, 1992; Tränkle et al., 1996; Tränkle & Mohr, 1997). Die niedrige Affinität geht mit einer hohen Wechselzahl der Rezeptorbindung einher (Brann, 1992).

Dies ist physiologisch sinnvoll, da so nach Ausschüttung von Acetylcholin in den synaptischen Spalt schnell ein Bindungsgleichgewicht erreicht wird. Dies gewährleistet eine zeitnahe Steuerung der Rezeptorfunktion, zumal der endogene Neurotransmitter durch spezifische Acetylcholinesterasen rasch inaktiviert wird.

Agonisten sollten demnach aufgrund ihrer hohen Wechselzahl am Rezeptor auch zusammen mit allosterischen Modulatoren, die deren Dissoziation verzögern, schnell das Bindungsgleichgewicht mit dem Rezeptor erreichen. Da die Messung in Zellsuspensionen stattfindet, sind die Diffusionswege der gelösten Substanzen zum Rezeptor auf der Zelloberfläche extrem kurz.

4.2.1.2 Etablierung der Methodik zur Messung der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen, dass der gemessene Effekt rezeptorvermittelt ist. Denn in nicht transfizierten CHO-WT-Zellen ohne Rezeptorexpression zeigt sich kein Anstieg der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz nach Zusatz von Carbachol. Erst in CHO- M_1 -Zellen, also solchen Zellen, die den Rezeptor in ihrer Zytoplasmamembran

Diskussion

exponieren, bewirkt der Carbacholzusatz einen Anstieg der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz. Der einzige Unterschied zwischen den beiden Zellarten besteht im Vorhandensein von Muskarinrezeptoren (Bonner et al., 1987). Die vergleichende Untersuchung von transfizierten und nicht-transfizierten Zellen unter identischen Versuchsbedingungen ist ein übliches Verfahren zur Prüfung auf Spezifität der Befunde.

Nach Lin et al. (1999) bewirken $10\mu\text{M}$ Carbachol eine maximale Stimulation der M_1 Rezeptoren. Den Bindungsuntersuchungen verschiedener Autoren zufolge entspricht eine Konzentration von $10\mu\text{M}$ Carbachol dem Zehnfachen der Gleichgewichtsdissoziationskonstante dieses Agonisten (Buckley et al., 1989; Wess et al., 1991). Die Konzentration war demnach so gewählt, dass ein deutlicher Effekt messbar sein sollte.

4.2.1.3 Interpretation der Calciumfreisetzungsexperimente mit allosterischen Modulatoren

Abbildung 8 zeigt, dass es in diesem Meßsystem nicht möglich war, eine Steigerung der Ca^{2+} -abhängigen Fluoreszenz durch die alleinige Zugabe von W84 oder Alcuronium zu messen. Daraus kann geschlossen werden, dass die allosterischen Modulatoren W84 und Alcuronium in diesem Versuchsansatz den M_1 Acetylcholinrezeptor nicht zu aktivieren vermögen.

Jakubík et al. beschrieben 1996, dass es möglich sei, muskarinische Acetylcholinrezeptoren über ihre allosterische Bindungsstelle zu aktivieren. Dieser Befund war insofern überraschend, weil die bekannten allosterischen Modulatoren an isolierten Organen immer nur als Antagonisten wirkten (Mitelson, 1975; Maaß et al., 1994; Zahn, Dissertationsschrift, 1999). Die Autoren verwendeten eine mit den Genen für Muskarinrezeptoren stabil transfizierte CHO-K1-Zelllinie. Sie verglichen den Effekt der allosterischen Modulatoren Alcuronium, Gallamin und Strychnin mit demjenigen des Agonisten Carbachol auf die Bildung von cAMP und IP_3 . Keine andere Arbeitsgruppe hat bis jetzt ähnliche Befunde mitgeteilt. Später berichteten Jakubík et al. (1998), dass eine Alloster-induzierte G Protein Aktivierung von dem Verhältnis zwischen Rezeptor-Dichte und G Protein-Dichte abhängt. Eine Alloster-

induzierte G Protein-Aktivierung war nur unter bestimmten Mengenverhältnissen zu erzielen.

4.2.1.4 Interpretation von Calciumfreisetzungsexperimenten der Allosteren W84 und Methyl-W84 mit dem Agonisten Carbachol

Weiterhin sollte untersucht werden, wie sich allosterische Modulatoren auf den Effekt eines Agonisten auswirken. Hierzu wurde die Konzentrations-Effekt-Beziehung von Carbachol alleine und in Kombination mit den beiden allosterischen Modulatoren W84 und Dimethyl-W84 in je zwei Konzentrationen aufgenommen (Abbildungen 9 und 10 sowie Tabelle 7).

Die Messwerte, die in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt sind, wurden durch gleichzeitige Injektion von Agonist und allosterischem Modulator erhalten. Tabelle 7 zeigt, dass es durch Zugabe der Substanz W84 in einer Konzentration von 100µM möglich ist, sowohl den Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve, als auch das Plateau der Kurve statistisch signifikant zu beeinflussen. Demnach senkt W84 die Affinität des Agonisten Carbachol zum M₁ Acetylcholinrezeptor und mindert gleichzeitig dessen intrinsische Aktivität. Es ist somit möglich, die Agonist-induzierte, Ca²⁺-abhängige Steigerung der Fluoreszenz durch allosterische Modulatoren zu beeinflussen. Die Substanz Dimethyl-W84 wirkt tendenziell wie W84. Die Effekte dieses allosterischen Modulators sind jedoch in diesem Meßsystem weniger stark ausgeprägt - wie an den Werten in Tabelle 7 zu erkennen ist. Dimethyl-W84 beeinflusst somit weder die Affinität noch die intrinsische Aktivität von Carbachol in gleichem Ausmaß wie W84.

Bei der Planung der Experimente wurde davon ausgegangen, dass sich der M₁ Acetylcholinrezeptor mit dem Agonisten und dem allosterischen Modulator sehr schnell im Bindungsgleichgewicht befinden würde. Aufgrund der kurzen Diffusionswege und der raschen Assoziationskinetik von Carbachol (Brann, 1992; Jakubík et al., 1998) wurden beide Liganden simultan zugegeben. Zumal über allosterische Modulatoren berichtet wurde, dass sie sich instantan im Gleichgewichtszustand mit dem Rezeptor befinden nach Zugabe einer wässrigen Lösung des Modulators zum Untersuchungsmedium (Tränkle et al., 1996; Tränkle &

Diskussion

Mohr, 1997). Im Fall einer raschen Gleichgewichtseinstellung zwischen Alloster, Orthoster und Rezeptor sollte ein allosterischer Effekt auf die Interaktion zwischen Agonist und Rezeptor messbar sein.

Somit kann es sich bei den hier beobachteten Effekten um Gleichgewichtseffekte handeln – gesichert ist dies jedoch nicht. Die Abnahme der Affinität des Agonisten ist im Einklang mit der Beobachtung aus Organbadversuchen an isolierten, kontrahierenden Herzvorhöfen des Meerschweinchens, dass W84 ein allosterischer Antagonist an M_2 -Rezeptoren ist (Zahn, Dissertationsschrift, 1999). In den Organbadexperimenten wurde jedoch nie eine Abnahme des Maximaleffektes von Carbachol beobachtet. Dieser Effekt wäre nur unter der Bildung ternärer Komplexe aus Rezeptor, orthosterischem Ligand (Carbachol) und allosterischem Ligand (W84) vorstellbar. Die Bildung ternärer Komplexe geht mit einer Verzögerung der Orthoster- (Agonist-) Dissoziation einher. Es bleibt somit tatsächlich unbeantwortet, ob in den hier gezeigten Experimenten Gleichgewichtseffekte gemessen wurden.

4.3 Befunde am M₂-Rezeptor

Auch der M₂-Acetylcholinrezeptor gehört zur Familie der G Protein gekoppelten Rezeptoren (Brann, 1992). Er kommt in vielen Organen und Geweben von Säugetieren vor, beispielsweise am Herz, im Drüsengewebe, im ZNS, in der Blase und im Gastrointestinaltrakt (Mohr et al., 1992; Watson & Arkininstall, 1994). Am Herzen findet man nahezu ausschließlich den M₂-Rezeptor als Subtyp der muskarinischen Rezeptoren (Krejčí & Tucek, 2002). Er koppelt hauptsächlich an G Proteine vom Typ G_{i/o} (Hilf & Jakobs, 1989; Offermann, 2003). Im Fall einer Rezeptoraktivierung bewirkt ein aktiviertes G_{i/o}-Protein eine Hemmung des membranständigen Enzyms Adenylatzyklase sowie eine Öffnung von Kaliumkanälen. Daraufhin sinkt die cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP) Konzentration im Inneren der Zelle (Brann, 1992; Taylor, 1995; Offermann, 2003). Die Folge vor allem der Kaliumkanalöffnung am Herzen ist ein Absinken der Frequenz, also eine negativ dromotrope Wirkung. Außerdem wird die Kontraktionskraft des Herzvorhofs vermindert. Diese negativ inotrope Wirkung am Vorhof kann in Organbadversuchen am kontrahierenden Meerschweinchenherzvorhof erfasst werden (Mitchelson, 1975; Maaß et al., 1994; Zahn et al., 2002).

Die Erfassung der Rezeptorbindung mit Hilfe von [³H]NMS und [³H]Oxotremorin M und die Messung der G Protein-Aktivierung mittels [³⁵S]GTPγS erlaubte die Untersuchung zweier Ereignisse, die im Verlauf der Signaltransduktion direkt aufeinander folgen (Taylor, 1995; Wess, 1996).

Zu Beginn dieser Untersuchungen waren folgende Befunde bekannt: Mohr et al. (2001) sowie Zahn (Dissertationsschrift, 1999) hatten herausgefunden, dass Alcuronium im Organbadexperiment am intakten Meerschweinchenherzvorhof die intrinsische Aktivität des Partialagonisten Pilocarpin senkte, ohne die Affinität von Pilocarpin zu beeinflussen.

Des Weiteren verminderte Alcuronium die Affinität des Vollagonisten Oxotremorin M, während es dessen intrinsische Aktivität gleich ließ. Die Autoren fanden für den negativ inotropen Effekt von Pilocarpin einen pEC₅₀-Wert von 6,10,

Diskussion

der Wert für Oxotremorin M war 7,92. Im Bindungsexperiment mit [³H]Oxotremorin M ergab sich in der vorliegenden Arbeit für Pilocarpin ein pIC₅₀-Wert von 6,77, für nicht radioaktiv markiertes Oxotremorin M von 8,82. Beide Substanzen zeigen also in den Zell-unterstützten Versuchsmethoden in dieser Arbeit eine leichte Erhöhung ihrer Affinität zum M₂ Rezeptor gegenüber den Organbadexperimenten. In beiden Systemen ist Oxotremorin M jedoch ca. hundertfach affiner als Pilocarpin.

4.3.1 Erörterung der [³⁵S]GTPγS Bindungsexperimente

4.3.1.1 Etablierung der Versuche

In einem komplexen Modell wie dem des schlagenden Meerschweinchenherzvorhofs kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Rezeptorsubtypen das Geschehen auf molekularer Ebene beeinflussen. Daher wurde in dieser Arbeit eine Zelllinie verwendet, welche als Wildtyp keinen der fünf bekannten Muskarinrezeptorsubtypen exprimiert. Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) sind eine solche Zelllinie. Untersuchungen mit [³⁵S]GTPγS wurden sowohl an CHO-M₂-Zellen, als auch an CHO-WT-Zellen durchgeführt. Dies geschah im Rahmen der Etablierung dieser Experimente, um die M₂-Rezeptorspezifität der Effekte zu sicherzustellen. Ein weiterer Anreiz, mit diesem Zellmodell die Ergebnisse aus den Organbaduntersuchungen zu überprüfen, war die Möglichkeit, dadurch eventuell in Zukunft Organbadversuche einsparen zu können.

4.3.1.2 Kinetische Experimente

Da [³⁵S]GTPγS nicht hydrolysierbar ist, bindet es quasi irreversibel an die α-Untereinheit von G Proteinen. Ein Agonist vermag diese Bindung zu beschleunigen. Die Bindung eines Agonisten katalysiert die Assoziation von GTP oder dessen Strukturanalogen [³⁵S]GTPγS (Kurose et al., 1986). Es besteht jedoch auch im unbesetzten Zustand der Rezeptoren ein Gleichgewicht zwischen aktiven

Diskussion

und inaktiven Rezeptorkonformationen. Die aus diesem Gleichgewicht resultierende Fähigkeit des unbesetzten Rezeptors zur G Proteinaktivierung wird basale Aktivität oder Spontanaktivität genannt (Jakubík et al., 1998).

Die Bindung von [³⁵S]GTP γ S an α -Untereinheiten aktiviert das G Protein (Kurose et al., 1986). Dies gilt für alle Subtypen von G Proteinen, so dass die Methode der Messung auf alle G Protein gekoppelten Rezeptoren anwendbar ist (Burford et al., 1992; Lazareno et al., 1993). Aktivierte G Proteine dissoziieren nach Bindung von [³⁵S]GTP γ S in α -Untereinheit und $\beta\gamma$ -Untereinheit. Nach dem Gesetz von LeChatelier verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten der aktiven G Proteine. Zum Zeitpunkt $t=\infty$ ist das Bindungsgleichgewicht vollständig auf Seiten der Produkte: der α -Untereinheit mit gebundenem GTP γ S und der $\beta\gamma$ -Untereinheit (Birdsall et al., 1999). Aus dieser Überlegung heraus wurden die Kurven in Abbildung 11 an einen gemeinsamen Maximalwert der Bindung angepasst. Abbildung 11 zeigt die Veränderung des Messfensters über die Zeit. Je größer die Differenz zwischen beiden Kurven ist, desto mehr G Proteine können von der inaktiven Konformation in eine aktive Konformation überführt werden. Würde man lange genug warten, so wäre kein Unterschied mehr zu messen; alle G Proteine wären dann Radioligand-besetzt (Birdsall, 1999).

Der Vorteil dieser Art funktioneller Messungen gegenüber den Calciumfreisetzungsversuchen besteht darin, dass an jedem G Protein gekoppelten Rezeptor gemessen werden kann (Gierschik et al., 1991; Lorenzen et al., 1993; Lazareno & Birdsall, 1993 und 1993b). Dies gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, dass der untersuchte Rezeptor in der Zellmembran des Expressionssystems, also der jeweiligen Zelllinie, geeignete G Proteine vorfindet. Für den in dieser Arbeit untersuchten Fall muß also der transfizierte M₂-Acetylcholinrezeptor ein G_o Protein in der Zytoplasmamembran der CHO-Zelle vorfinden.

Abbildung 12 zeigt Experimente, bei denen der Einfluss von unmarkiertem GDP auf das Messfenster der agonistinduzierten G Proteinaktivierung gemessen wurde. GDP muss zunächst vom G Protein abdissoziieren, bevor der Radioligand [³⁵S]GTP γ S binden kann (Hilf und Jakobs, 1989). Beide Liganden benutzen die

Diskussion

gleiche Bindungsstelle am G Protein. Je mehr G Proteine an GDP gebunden vorliegen, um so größer sollte der Effekt eines Agonisten sein. Mit steigenden Konzentrationen an unmarkiertem GDP im Ansatz sollte sich das Messfenster für Agonisten aufweiten. In Abbildung 12 ist diese konzentrationsabhängige Aufweitung des Messfensters mit steigenden GDP-Konzentrationen zu beobachten. Da das größte Meßfenster bei 10µM GDP zu beobachten war, wurde diese Konzentration im folgenden verwendet.

Anschließend sollte die Spezifität der Messungen überprüft werden. Analog der Vorgehensweise am M₁-Acetylcholinrezeptor wurde mit vergleichenden Untersuchungen zwischen CHO-WT-Zellen und CHO-M₂-Zellen die Spezifität der Messungen sichergestellt. Es wurden von verschiedenen Substanzgruppen, also Agonisten, Antagonisten und allosterischen Modulatoren, rezeptorsättigende Konzentrationen (Jakubík et al., 1997; Tränkle & Mohr, 1997) verwendet und die Wirkung auf beide Zellarten untersucht. So kann geprüft werden, ob die beobachteten Effekte vom M₂-Subtyp des Rezeptors vermittelt werden. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms dargestellt. Auffällig ist, dass der Meßwert für den unbesetzten Rezeptors (in Abbildung 13 als Basal bezeichnet und als 100% festgesetzt) unter Einwirkung des orthosterischen Antagonisten Atropin und der beiden allosterischen Modulatoren Alcuronium und W84 unterschritten wird. Die Gründe für dieses Phänomen sollen im Folgenden erörtert werden. Das Meßsystem der [³⁵S]GTPγS Bindung ist für folgende Besonderheit bekannt (Jakubík et al., 1998): Antagonisten, also Substanzen, die Affinität aber keine intrinsische Aktivität aufweisen, sollten im funktionellen Experiment keinen Effekt zeitigen. Im [³⁵S]GTPγS Bindungsexperiment zeigt sich bei der Untersuchung orthosterischer Antagonisten ein Effekt, der wie ein invers agonistischer aussieht. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Autoren gemacht, beispielsweise Hilf & Jakobs (1991) und Jakubík und Mitarbeitern (1998). Es ergibt sich bei Auftragung des Effektes gegen den Logarithmus der Konzentration ein Sigmoid, das eine negative Kurvensteigung n_H aufweist. Es entsteht der Eindruck, der Antagonist würde die Funktion des Rezeptors auf das G Protein in die Gegenrichtung auslenken, wie es der Definition eines inversen

Diskussion

Agonisten entspricht: ein inverser Agonist ist ein Ligand, welcher Affinität und dem Agonisten entgegengerichtete intrinsische Aktivität besitzt.

Es ist im Einklang mit Befunden aus der Literatur, dass die Maximaleffekte der allosterischen Modulatoren W84 und Alcuronium sich in den eigenen Experimenten statistisch nicht signifikant von dem des Atropin unterscheiden (Hilf & Jakobs, 1991; Jakubík et al., 1998). Man kann aus diesen Befunden schlussfolgern, dass Allosterie wie Antagonisten eine inaktive Konformation des Rezeptors selektieren bzw. stabilisieren. Der Befund, dass orthosterische Antagonisten im [³⁵S]GTPγS Experiment invers agonistische Aktivität entfalten, lässt sich durch das von Leff (1995) postulierte „two-state-model“ erklären. Nach diesem Modell gibt es zwei funktionelle Zustände eines Rezeptors, die durch eine Konformationsänderung ineinander übergehen können, einen inaktiven und einen aktiven. Nach dem „conformational selection-model“ für Funktionsproteine stabilisieren Antagonisten den inaktiven und Agonisten den aktiven Zustand des Rezeptors. So ist die basale Aktivität (Spontanaktivität) eines Rezeptors zu erklären mit der Wahrscheinlichkeit, mit der ein unbesetzter Rezeptor von der inaktiven in die aktive Konformation übergehen kann. Somit beschreibt die Spontanaktivität einer Rezeptorpopulation nach dem „two-state-model“ die Lage des Gleichgewichts zwischen aktiven und inaktiven Rezeptoren im unbesetzten Zustand. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor verschiebt das Gleichgewicht in dem sich die Konformationen des Rezeptors befinden. Allerdings präsentiert Kenakin (2003), dass es Evidenzen gibt für viele unterschiedliche ligandbesetzte Rezeptorkonformationen. Kenakin führt weiterhin aus, dass es für viele unterschiedliche Rezeptoren Untersuchungen mit verschiedenen Meßmethoden gibt, welche nahelegen, dass es eine ganze Reihe unterschiedlicher aktiver Rezeptorzustände gibt, welche von der chemischen Struktur des bindenden Agonisten abhängig sind.

In den Befunden zur ligandinduzierten [³⁵S]GTPγS Bindung zeigte sich, dass von der Basalbindung ausgehend in beide Richtungen ein Messfenster bestand. Die [³⁵S]GTPγS Bindung konnte also ligandabhängig erhöht oder erniedrigt werden. Die Abbildungen 14 und 16 zeigen, dass es möglich war, eine Senkung der Basalaktivität (intrinsische Aktivität) des Rezeptors zu messen, die Abbildungen 15

Diskussion

und 17 zeigen eine Steigerung der Basalaktivität des Rezeptors. In der Literatur findet man viele Untersuchungen, deren Aussagen in diesem Punkt divergieren. Es wurden sowohl Befunde publiziert, bei denen wie in dieser Arbeit auch eine Abnahme der [³⁵S]GTP γ S Bindung gemessen werden konnte (Hilf & Jakobs, 1989; Hilf & Jakobs, 1991; Hilf & Jakobs, 1992; Jakubík et al., 1998), als auch solche, bei denen sich nur ein agonistischer, aktivierender Effekt von der basalen Aktivität unterschied, nicht jedoch ein antagonistischer (Burford et al., 1992; Lazareno & Birdsall, 1993).

Auffällig an den hier präsentierten Befunden ist, dass für diese Resultate eine hohe Rezeptordichte erforderlich war (siehe 3.1.1, Tabelle 6). Daraus kann gefolgert werden, dass das Verhältnis von Rezeptor zu G Protein relativ hoch sein sollte, um auch die Abnahme der Basalaktivität messen zu können. Befunden von Jakubík et al. (1998) zufolge sollte es sich bei den hier erhobenen Daten um ein Verhältnis von M₂-Rezeptor zu G_{i/o} Protein von etwa 1 zu 2 handeln. Die Autoren untersuchten Verhältnisse von M₂-Acetylcholinrezeptor zu G_{i/o} Protein von 1 zu 100, 1 zu 10 und 1 zu 2, fanden aber nur bei der höchsten Konzentration an Rezeptoren im Homogenat eine Absenkung der basalen Aktivität durch Antagonisten bzw. allosterische Modulatoren. In der Arbeit von Jakubík et al. wurde Atropin als Antagonist und Alcuronium als allosterischer Modulator untersucht und dem Effekt von Carbachol sowie dem des unbesetzten Rezeptors gegenübergestellt.

Tabelle 9 zeigt, dass der Einfluss von Atropin und derjenige des allosterischen Modulators Alcuronium auf die G Protein Aktivierung sich statistisch nicht signifikant unterscheiden (Tabelle 9, Index ^o). Dies wird außerdem durch die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Atropin und Alcuronium in den Abbildungen 14 und 16 demonstriert (pharmakologische Kennwerte in den Tabellen 10 und 12).

Auch diese Befunde können nach der Theorie von Leff gedeutet werden, dass ein Rezeptor zwei Konformationen (aktiv – inaktiv) annehmen kann, an die bestimmte Liganden selektiv binden. Es ist weiterhin möglich, dass Atropin und Alcuronium an zwei unterschiedliche, inaktive Rezeptorkonformationen binden. Bemerkenswert ist zudem, dass das Alloster Alcuronium und das Orthoster Atropin trotz

Diskussion

unterschiedlicher Bindungsstellen am Rezeptor eine quantitativ gleich stark ausgeprägte Senkung der Rezeptoraktivität bewirken ($E_{\max.} = 64\% \pm 2\%$ bzw. $64\% \pm 1\%$). Der Maximaleffekt von 64% der Basalaktivität repräsentiert wahrscheinlich eine Situation, in der die M_2 -Rezeptorproteine vollständig im inaktiven Zustand vorliegen. Demzufolge entfalten beide Liganden eine maximal wirksame invers agonistische Aktivität an topologisch unterschiedlichen Bindungsdomänen des M_2 -Rezeptors. Atropin war dabei 1400fach stärker affin gegenüber dem M_2 -Rezeptor als der allosterische Modulator Alcuronium unter den gegebenen Bedingungen. Wichtig für die Interpretation der folgenden Befunde ist, dass auch Alcuronium bevorzugt an die inaktive Konformation des Rezeptors bindet.

4.3.2 Allosterische Modulation Agonist-induzierter Effekte

4.3.2.1 Deutung der Befunde mit dem Partialagonisten Pilocarpin

Es wurde untersucht, wie sich Affinität und intrinsische Aktivität des Partialagonisten Pilocarpin unter dem Einfluss des allosterischen Modulators Alcuronium verhalten. Aus den Abbildungen 15 und 19 und den zugehörigen Werten in den Tabellen 11 und 14 geht hervor, dass Pilocarpin unter dem Einfluss von Alcuronium nicht an Affinität zum M_2 -Rezeptor verliert; denn die pEC_{50} -Werte von Pilocarpin ändern sich nicht unter dem Einfluss steigender Konzentrationen von Alcuronium. Zu beobachten ist jedoch eine Verminderung des Maximaleffektes, den der Partialagonist erreichen kann. Letztlich wird bei einer Alcuronium-Konzentration von $10\mu\text{M}$ die intrinsische Aktivität von Pilocarpin auf das Niveau von Alcuronium alleine ($71,5\% \pm 1,5\%$) gesenkt.

Dieser Befund wird erklärbar, wenn man den partialagonistischen Charakter von Pilocarpin und die rigide Molekülstruktur des Alcuroniums in die Betrachtung einbezieht (Strukturformel siehe 2.7). Allerdings verhält sich der allosterische Modulator W84 ähnlich in Bezug auf die Minderung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin. Demzufolge scheint der partialagonistische Charakter von Pilocarpin für diesen Befund wichtiger zu sein, als die Molekülstruktur des allosterischen Modulators.

Diskussion

Pilocarpin scheint die M_2 -Rezeptorpopulation nur teilweise in eine aktive Konformation zu überführen oder es stabilisiert eine aktive Konformation, die noch Spielraum für Konformationsänderungen zulässt. Das starre, größtenteils kondensierte Ringsystem des Alcuroniums jedoch scheint das Rezeptorprotein vollständig in einen konformativ stabilen, inaktiven Zustand zu zwingen oder es stabilisiert ebenfalls einen bestehenden, inaktiven Zustand.

Lagert sich Alcuronium an die Pilocarpin-besetzten Rezeptoren an, so zwingt es aktiven Pilocarpin/Rezeptor-Komplexen eine inaktive Konformation auf oder es selektiert inaktive Pilocarpin/Rezeptor-Komplexe und vermindert so den Anteil aktiver Komplexe.

Zudem zeigen die pharmakologischen Kennwerte aus Tabelle 12 für Alcuronium in Ab- und Anwesenheit einer rezeptorsättigenden Konzentration von Pilocarpin die gleiche Affinität zum M_2 -Rezeptor ($pIC_{50} = 5,86 \pm 0,15$ bzw. $5,47 \pm 0,21$). Alcuronium und Pilocarpin verhalten sich demnach neutral kooperativ zueinander.

4.3.2.2 Interpretation der Befunde mit dem Vollagonisten Oxotremorin M

Anders als im Fall des Pilocarpins stellt sich die Situation beim Vollagonisten Oxotremorin M dar. In Tabelle 9 ist zu sehen, dass beide Liganden über den M_2 -Rezeptor ihren Effekt vermitteln und den gleichen Maximaleffekt erreichen.

Es stellt sich die Frage, warum Partialagonist und Vollagonist den gleichen Maximaleffekt erreichen. Ähnlich wie beim Vergleich der Effekte von Alcuronium und Atropin sind die Befunde erklärbar mit einem relativ großen Quotienten aus Rezeptor und GProtein (siehe 4.3.1.3). Eine hohe Rezeptordichte würde für eine ausgeprägte Rezeptorreserve sprechen. Für diesen Fall nähern sich die Effekte von Partialagonisten und Vollagonisten einander an (Brann, 1992; Tucek et al., 2002).

Es wurden Konzentrations-Effekt-Kurven für Oxotremorin M in Ab- und Anwesenheit steigender Konzentrationen Alcuronium aufgenommen. Abbildung 17 und Tabelle 13 zeigen, dass die intrinsische Aktivität von Oxotremorin M durch Alcuronium nicht beeinflusst wird. Es ist eine deutliche Rechtsverschiebung der

Diskussion

Konzentrations-Effekt-Kurve zu beobachten. Die apparente Affinität des Oxotremorin M nimmt also offenbar unter dem Einfluß von Alcuronium ab.

Abbildung 15 zeigt auch, dass sich mit steigenden Konzentrationen Alcuronium kein Grenzwert einstellt, bis zu dem die Oxotremorin M Konzentrations-Effekt-Kurve hin verschoben wird. Es zeigt sich vielmehr eine konzentrationsabhängige parallele Rechtsverschiebung des pEC_{50} -Wertes wie bei einer kompetitiven Interaktion (Abbildung 16). Eine Gerade in der Schild-Auftragung mit einer Steigung nicht signifikant unterschiedlich von 1 beschreibt formal eine kompetitive Interaktion zweier Liganden an einer homogenen Rezeptorpopulation. Es erscheint an dieser Stelle wichtig, darauf hinzuweisen, dass die Analyse nach Schild eine rein mechanistische und keine topologische Betrachtung ist. Der Mechanismus der Interaktion zwischen Oxotremorin M und Alcuronium ist also formal kompetitiver Natur, dies bedeutet jedoch nicht, dass beide Liganden an der gleichen Bindungsdomäne am Rezeptorprotein angreifen. Der pK_B Wert von 5,97 ist ein Maß für die Affinität des Alcuroniums zum unbesetzten M_2 -Rezeptor. Dieser Wert ist in Übereinstimmung mit der Literatur (Jakubík et al., 1997; Zahn et al., 2002).

Zur Oxotremorin M Konzentrations-Effekt-Kurve in Abbildung 15, die unter dem Einfluß von $10\mu M$ Alcuronium und $100\mu M$ Pilocarpin aufgenommen wurde, (Sternchen-Symbole) ist folgendes zu sagen. Die Schlußfolgerung liegt nahe, dass sich Pilocarpin in Gegenwart von Alcuronium gegenüber Oxotremorin M wie ein formal kompetitiver Antagonist verhält.

Zudem ist der antagonistische Pilocarpineffekt ein Nachweis, dass Pilocarpinmoleküle selbst in Anwesenheit hoher Alcuronium-Konzentrationen ($\cong 10$ fach K_D) ihre Bindungsstelle am Rezeptorprotein besetzen.

4.3.3 Interpretation der Radioligandbindungs-Befunde am M_2 -Acetylcholinrezeptor
Mit [^3H]NMS und [^3H]Oxotremorin M wurden als Radioliganden ein Antagonist und ein Agonist verwendet. Pilocarpin wurde in heterologen Konkurrenzexperimenten mit [^3H]NMS indirekt auf eine Beeinflussbarkeit durch Alcuronium untersucht.

4.3.3.1 Interpretation der [^3H]NMS-Befunde

Ziel der Untersuchungen mit [^3H]NMS war die Bestimmung der Affinitäten von Pilocarpin und Alcuronium zum M_2 -Rezeptor. Es sollten zwei Fragen beantwortet werden:

1. Kann Pilocarpin unter dem Einfluss von Alcuronium an den Rezeptor binden?

Und, falls dem so sein sollte:

2. Ändert sich unter Alcuroniumeinfluss die Affinität von Pilocarpin zum Rezeptor?

Das Absinken der [^3H]NMS-Bindung mit steigenden Konzentrationen Pilocarpin in Abbildung 17 zeigt, dass der Partialagonist in Ab- und Anwesenheit des Modulators an den Rezeptor bindet. Pilocarpin bildet mit Alcuronium und dem Rezeptor ternäre Komplexe. Aus Abbildung 19 so wie den Werten in Tabelle 14 ist ersichtlich, dass sich unter dem Einfluss von Alcuronium die Lage des Wendepunktes der Konkurrenzkurve von [^3H]NMS und Pilocarpin nicht verschiebt. Die Affinität von Pilocarpin wird demzufolge statistisch nicht signifikant beeinflusst.

In der Literatur wurde beschrieben, dass Alcuronium und [^3H]N-Methyl-Scopolamin positiv kooperativ miteinander interagieren (Maaß et al., 1994; Jakubik et al., 1997; Birdsall et al., 1999).

Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die Gesamtbindung von [^3H]N-Methyl-Scopolamin (der Wert in Abwesenheit von Pilocarpin) in Anwesenheit von Alcuronium anstieg.

4.3.3.2 Deutung der Befunde mit dem Radioliganden [³H]Oxotremorin M

Abbildung 21 zeigt, dass Alcuronium in der Lage ist, [³H]Oxotremorin M konzentrationsabhängig aus der Rezeptorbindung zu verdrängen. Es liegt auch im Bindungsexperiment mit [³H]Oxotremorin M ein formal kompetitives Verhalten der Bindungspartner vor (vergl. 4.3.2.2). Die Kurve wird signifikant besser angepaßt an ein binäres (formal kompetitives) Modell (Gleichung 3) als an ein ternäres (allosterisches).

Dieses Verhalten ist insofern bemerkenswert, als Alcuronium schon in Konzentrationen, die seiner Affinität zum freien M₂-Rezeptor entsprechen (pIC₅₀ = 6,09) mit Pilocarpin ternäre Komplexe eingeht (pIC₅₀ = 6,04). Alcuronium verhält sich also allosterisch gegenüber dem Partialagonisten Pilocarpin und formal kompetitiv gegenüber dem Vollagonisten [³H]Oxotremorin M.

Aus früheren Arbeiten (Maaß, Dissertationsschrift 1995) ist bekannt, dass die Dissoziation von [³H]Oxotremorin M durch Alcuronium erst in einer Konzentration von 100µM halbmaximal verzögert wird (EC_{50, Diss.}). Man kann daher davon ausgehen, dass sich erst ab einer Alcuroniumkonzentration von 10µM ternäre Komplexe aus Rezeptor, [³H]Oxotremorin M und Alcuronium in quantifizierbarem Ausmaß bilden.

4.4 Topologische Betrachtung des M₂ Rezeptors unter Berücksichtigung der Befunde

Nach Publikationen verschiedener Autoren befindet sich die Acetylcholin-Bindungsstelle des M₂-Rezeptors innerhalb einer Tasche, die von sieben transmembranären Helices gebildet wird (Brann, 1992; Wess, 1995; Birdsall, 1999). Die allosterische Bindungsdomäne liegt aller Wahrscheinlichkeit nach am Eingang der Ligandbindungstasche oberhalb der orthosterischen (Acetylcholin-) Bindungsstelle (Wess, 1995; Voigtländer et al., 2003). Diese Anordnung erklärt die Assoziations- und Dissoziationshemmung orthosterischer Radioliganden durch allosterische Modulatoren. Dem Orthoster wird der Zutritt, aber auch das

Diskussion

Abdissoziieren vom Rezeptor durch sterische Hinderung am Eingang der Ligandbindungstasche verwehrt.

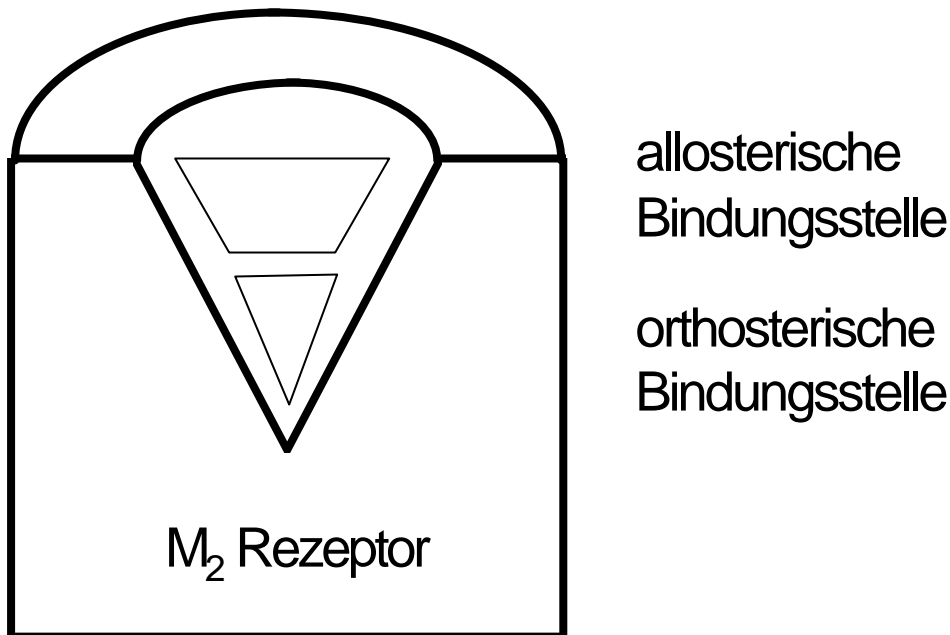


Abbildung 23: Schematische Darstellung des M₂ Acetylcholinrezeptors mit topologischer Betrachtung der allosterischen und orthosterischen Bindungsstelle

Hierbei stellt die allosterische Hemmung der Assoziation einen bindungshemmenden Effekt für das Orthoster dar, während sich eine allosterische Hemmung der Dissoziation als bindungsfördernder Effekt bemerkbar macht. Die Summe dieser gegenläufigen Effekte ergibt den Einfluß des Allosters auf die Gleichgewichtsbindung des Orthosters.

Für die Interaktion von Pilocarpin und Alcuronium gilt, dass sich Orthoster und Alloster nicht wechselseitig hinsichtlich ihrer Affinität beeinflussen. Die Affinität des Rezeptors zum Alcuronium bleibt gleich, unabhängig davon ob Pilocarpin die orthosterische Bindungsstelle besetzt. Ebenso wird die Bindung von Alcuronium an den Rezeptor nicht von einer Affinitätsänderung für Pilocarpin begleitet. Eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins muß trotzdem stattfinden, sonst würde Pilocarpin nicht seine intrinsische Aktivität verlieren unter dem Einfluß von Alcuronium. Da ein Verlust an intrinsischer Aktivität beim Vollagonisten Oxotremorin M nicht beobachtet wird, ist der Unterschied zwischen beiden

Diskussion

Liganden hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Alcuronium in einer unterschiedlichen Rezeptorkonformation des Agonist-besetzten Rezeptors zu suchen.

Setzt man voraus, dass ein Rezeptor abhängig von der Struktur des bindenden Liganden verschiedene Zustände einnehmen kann (Kenakin, 2003), kann man schlußfolgern, dass Agonisten unterschiedlicher Struktur an eine spezifische, jeweils unterschiedliche Rezeptorkonformation binden bzw. diese selektieren. Pilocarpin würde demnach eine Bindung mit einer Konformation des M₂-Rezeptors eingehen, die als binärer Komplex partiell aktiv ist. Die Inaktivierung im ternären Komplex könnte dann auf einer Selektion des inaktiven Zustands durch Alcuronium beruhen. Im hier untersuchten Fall geschah diese Inaktivierung durch Interaktion von Alcuronium mit der allosterischen Bindungsstelle. Bemerkenswert ist, dass der Partialagonist Pilocarpin weiterhin an diesen inaktiven Zustand gebunden bleibt. Selbst der durch das starre Molekül des Alcuroniums dem Rezeptorprotein aufgezwungene Zustand des inaktiven Rezeptors zeigt also Affinität zum Partialagonisten. Im Gegensatz hierzu nimmt die Affinität von Oxotremorin M zum M₂-Rezeptor ab, wenn der Rezeptor Alcuronium-besetzt vorliegt. Alcuronium und Oxotremorin M verhalten sich formal kompetitiv zueinander und binden an unterschiedliche Funktionszustände des Rezeptors; Oxotremorin M an einen aktiven, Alcuronium an einen inaktiven.

Im Lichte dieser Befunde stellt sich die Frage, ob nur Partialagonisten einer allosterischen Modulation ihrer intrinsischen Aktivität unterliegen oder ob diese Art der Beeinflussung auch für Vollagonisten möglich ist. Die Daten der Calciumfreisetzungsexperimente, die auf eine allosterische Minderung des Maximaleffektes deuten, lassen hierzu keine eindeutige Schlußfolgerung zu: es ist sowohl möglich, dass Carbachol als muskarinischer Vollagonist hinsichtlich seiner intrinsischen Aktivität allosterisch modulierbar ist, als auch, dass sich die Liganden nicht im Gleichgewicht mit dem Rezeptor befinden. Sollte sich jedoch in Zukunft herausstellen, dass auch Vollagonisten einer allosterischen Modulation ihrer intrinsischen Aktivität zugänglich sind, wäre es von großem Interesse, zu

Diskussion

untersuchen, ob sich auch der endogene Neurotransmitter Acetylcholin hinsichtlich seiner intrinsischen Aktivität auf allosterischem Weg beeinflussen läßt.

Eine weitere interessante Fragestellung ist, welche der anderen allosterischen Modulatoren zu einer Beeinflussung der intrinsischen Aktivität von (Partial)Agonisten in der Lage sind. Es stellt sich die Frage, ob partialsynthetisch abgewandelte Derivate des Alcuroniums (sogenannte Caracurine) eine ähnliche Potenz zur allosterischen Modulation der intrinsischen Aktivität von orthosterischen Liganden zeigen. Schließlich wäre es interessant, zu untersuchen, ob chemisch andersartige allosterische Modulatoren (beispielsweise Duo 3 oder Tacrin) die intrinsische Aktivität simultan bindender Agonisten beeinflussen können.

5 Zusammenfassung

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren verfügen über (mindestens) zwei Ligandbindungsstellen; die orthosterische Acetylcholinbindungstasche und die weiter extrazellulär lokalisierte allosterische Bindungsdomäne. Seit längerem ist bekannt, dass es möglich ist, durch allosterische Modulatoren orthosterische Liganden in ihrer Affinität zu muskarinischen Rezeptoren zu beeinflussen.

Hinweise auf eine Beeinflussung der intrinsischen Aktivität muskarinischer Agonisten auf allosterischem Weg konnten erstmals von Zahn (Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Bonn, 1999) im Rahmen von Organbadversuchen am schlagenden Meerschweinchenherzvorhof vorgelegt werden. Es zeigte sich, dass Alcuronium offenbar allosterisch die intrinsische Aktivität des Partialagonisten Pilocarpin verringerte, dessen Affinität aber nicht beeinflusste. Beim Vollagonisten Oxotremorin M hingegen verminderte Alcuronium formal kompetitiv dessen Affinität, wohingegen die intrinsische Aktivität dieses Agonisten unverändert blieb.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Hinweise auf eine allosterische Beeinflussung der intrinsischen Aktivität auf zellulärer Ebene verifiziert werden können.

Dazu wurde ein Meßsystem für den M_2 -Acetylcholinrezeptor etabliert, das auf radioaktiver Basis die Aktivierung von G-Proteinen mit dem Radioliganden [35 S]GTP γ S misst. Dazu wurden humane M_2 -Rezeptoren in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) exprimiert und M_2 -Rezeptorhaltige Membransuspensionen hergestellt.

Anschließend wurden Radioligandbindungsexperimente durchgeführt, um die Affinität der einzelnen Liganden zu quantifizieren. Untersucht wurde dazu die Interaktion von Alcuronium und Pilocarpin bzw. Alcuronium und Oxotremorin M.

Es wurde festgestellt, dass Alcuronium die intrinsische Aktivität von Pilocarpin mindert, aber nicht dessen Affinität. Im Gegensatz dazu mindert Alcuronium die Affinität von Oxotremorin M, aber nicht dessen intrinsische Aktivität. Alcuronium in

Zusammenfassung

hohen Konzentrationen war in der Lage, den agonistischen Effekt des Pilocarpins in einen antagonistischen umzuwandeln.

Somit konnte erstmals im biochemisch-pharmakologischen Versuchsansatz die allosterische Hemmbarkeit einer Agonist-induzierten, M_2 -Rezeptor vermittelten G-Protein-Aktivierung gezeigt werden.

6 Literaturverzeichnis

Arunlakshana, O. & Schild, H. O.

Some quantitative uses of drug antagonists.

Br. J. Pharmacol. **14**: 48-58 (1959)

Bennett, J. & H.I. Yamamura

Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding methods.

Yamamura, H.I. (editor): Neurotransmitter receptor binding, 2nd ed.; 61-89; Raven Press (1985)

Birdsall, N. J. M., T. Farries, P. Gharagozloo, S. Kobayashi, S. Lazareno, M. Sugimoto

Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogs and acetylcholine at muscarinic receptors: functional studies.

Mol Pharmacol **55**: 778-786 (1999)

Birdsall N. J., E.C. Hulme & J. M. Stockton

Muscarinic receptor subclasses: allosteric interactions.

Symp Quant Biol. **48** Pt 1:53-56 (1983)

Bonner, T. I., N. J. Buckley, A. C. Young, M. R. Brann

Identification of a family of muscarinic acetylcholine genes.

Science **237**: 527-532 (1987)

Bootman, M. D. & M. J. Berridge

The elemental principles of calcium signaling.

Cell **83**: 675-678 (1995)

Brann, Mark

Molecular biology of G-protein-coupled receptors.
first edition, S. 170-198 (1992)

Brown, E. M., P. M. Vassilev & S. C. Hebert

Calcium ions as extracellular messengers.
Cell **83**: 679-682 (1995)

Buckley, N. J., T. I. Bonner, C. M. Buckley & M. R. Brann

Antagonist binding properties of five-cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells.
Mol. Pharmacol. **35**: 469-476 (1989)

Burford, N. T., A. B. Tobin & S. R. Nahorsky

Agonist binding and G protein activation in CHO cells expressing m1, m2 or m3 muscarinic receptors.
Brit. J. Pharmacol. **106**: 92-98 (1992)

Burgisser E., De Lean A. & R. J. Lefkowitz

Reciprocal modulation of agonist and antagonist binding to muscarinic cholinergic receptor by guanine nucleotide.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**:1732-1736 (1982)

Cheng, Y.C. & W.H. Prusoff

Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of the inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction.
Biochem. Pharmacol. **22**: 3099-3108 (1973)

Clark, A. L. & F. Mitchelson

The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors.
Br. J. Pharmacol. **58**: 323-331 (1976)

Dale, H. H.

The action of certain esters and ethers of choline and their relation to muscarine.
J. Pharmacol. Exp. Ther. **6**: 147-190 (1914)

Danthuluri, N. R., M. I. Cybulsky & T. A. Brock

Ach-induced calcium transients in primary cultures of rabbit aortic endothelial cells.
Am. J. Physiol. **255**: 1549-1553 (1988)

De Blasi, A., K. O'Reilly & H.J. Motulsky

Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor.
Trends Pharmacol.Sci. **10**: 227-229 (1989)

Dolezal, V., V. Lisa & S. Tucek

Differential coupling of the M_1 - M_5 muscarinic acetylcholine receptor subtypes on intracellular calcium and on the incorporation of choline into membrane lipids in genetically modified chinese hamster ovary cell lines.
Brain Res. Bull. **42**: 71-78 (1997)

Ehlert, F.J.

Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods.
Mol. Pharmacol. **33**: 187-194 (1988)

Gazi, L., I. Bobirnac, M. Danzeisen, E. Schüpbach, D. Langenegger, B. Sommer, D. Hoyer, M. Tricklebank, P. Schoeffter

Receptor density as a factor governing the efficiency of the dopamine D₄ receptor ligands L-745, L-870 and U-101958 at human recombinant D₄ receptors expressed in CHO cells.

Brit. J. Pharmacol. **128**: 613-620 (1999)

Gierschik, P., R. Moghtader, C. Straub, K. Dieterich & K. H. Jakobs

Signal amplification in HL-60 granulocytes. Evidence that the chemotactic peptide receptor catalytically activates guanine-nucleotide-binding regulatory proteins in native plasma membranes.

Eur. J. Biochem. **197**: 725-732 (1991)

Hammer, R., C. B. Berrie, N. J. Birdsall, A. S. V. Burgen, E. C. Hulme

Pirenzepine distinguishes between subclasses of muscarinic receptors.

Nature **283**: 90-92 (1980)

Harden, T. K., P. T. Hawkins, L. Stephens, J. B. Boyer & C. P. Downes

Phosphoinositide hydrolysis by guanosine 5'-[gamma-thio] triphosphate-activated phospholipase C of turkey erythrocyte membranes.

Biochem. J. **252**: 583-593 (1988)

Higashijima, T., K. M. Ferguson, P. C. Sternweis, M. D. Smigel & A. G. Gilman

Effects of Mg²⁺ and the beta gamma-subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G proteins.

J. Biol. Chem. **262(2)**: 762-766 (1987)

Hilf, G. & K. H. Jakobs

Activation of cardiac Gproteins by muscarinic acetylcholine receptors: regulation by Mg²⁺ and Na⁺ ions.

Eur. J. Pharmacol. - Molecular Pharmacology Section **172**: 155-163 (1989)

Hilf, G. & K. H. Jakobs

Agonist-independent inhibition of Gprotein activation by muscarinic acetylcholine receptor antagonists in cardiac membranes.

Eur. J. Pharmacol. - Molecular Pharmacology Section **225**: 245-252 (1991)

Hilf, G. & K. H. Jakobs

Activation of solubilized G Proteins by muscarinic acetylcholine receptors.

Cellular Signalling **4**: 787-794 (1992)

Hilf, G., C. Kupprion, T. Wieland, K. H. Jakobs

Dissociation of guanosine 5'-[γ-thio]triphosphate from guanine-nucleotide-binding regulatory proteins in native cardiac membranes.

(Regulation by nucleotides and muscarinic acetylcholine receptors)

Eur. J. Biochem. **204**: 725-731 (1992)

Huang, Y. & J. W. Putney, Jr.

Relationship between intracellular calcium store depletion and calcium release activated calcium current in a mast cell line (RBL-1).

J. Biol. Chem **273**: 19554-19559 (1998)

Hulme, E.C. & N.J.M. Birdsall

Strategy and tactics in receptor binding studies. receptor-ligand Interactions, a practical approach (E.C. Hulme ed.).

Oxford University Press, 63-176 (1992)

Jakubík, J., L. Bacáková, E.E. El-Fakahany & S. Tucek

Subtype selectivity of the positive allosteric action of alcuronium at cloned M₁-M₅ muscarinic acetylcholine receptors.

J. Pharmacol. Exp. Ther. **274**: 1077-1083 (1995)

Jakubík, J., L. Bacáková, V. Lisa, E.E. El-Fakahany & S. Tucek

Activation of muscarinic acetylcholine receptors via their allosteric binding sites.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 8705-8709 (1996)

Jakubík, J., L. Bacáková, E.E. El-Fakahany & S. Tucek

Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors.

Mol. Pharmacol. **52**: 172-179 (1997)

Jakubík, J., T. Haga & S. Tucek

Effects of an agonist, allosteric modulator and antagonist on guanosine-gamma-[³⁵S]thiotriphosphate binding to liposomes with varying muscarinic receptor/G_o protein stoichiometry.

Mol. Pharmacol. **54**: 899-906 (1998)

Jepsen, K., H. Lüllmann, K. Mohr & J. Pfeffer

Allosteric stabilisation of ³H-N-methylscopolamine binding in guinea-pig myocardium by an antidote against organophosphate intoxication.

Pharmacology & Toxicology **63**: 163-168 (1988)

Katada, T., G. M. Bokoch, J. K. Northup, M. Ui & A. G. Gilman

The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. properties and function of the purified protein.

J. Biol. Chem. **259**: 3568-3577 (1984)

Kenakin, T.

Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction.
2nd edition, Raven Press 427-429 (1993)

Kenakin, T.

Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem.
Trends Pharmacol. Sci. **24**: (7) 346-354 (2003)

Kords, H., H. Lüllmann, F. K. Ohnesorge & O. Wassermann

Action of atropine and some hexane-1,6-bis-ammonium derivatives upon the toxicity of DFP in mice.
Eur. J. Pharmacol. **3**: 341-346 (1968)

Krejčí, A. & S. Tucek

Quantitation of mRNAs for M₁ to M₅ subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex.
Mol. Pharmacol. **61**: 1267-1272 (2002)

Kubo, T., K. Fukuda, A. Mikami, A. Maeda, H. Takahashi, M. Mishina, T. Haga, K. Haga, A. Ichiyama, K. Kangawa, M. Kojima, H. Matsuo, T. Hirose, S. Numa
Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor.
Nature **323**: 411-416 (1986)

Kurose, H., T. Katada, T. Haga, K. Haga, A. Ichiyama & M. Ui

Functional interaction of purified muscarinic receptors with purified inhibitory guanine nucleotide regulatory proteins reconstituted in phospholipid vesicles.
J. Biol. Chem. **261**: 6423-6428 (1986)

Lai, J., L. Nunan, S. L. Waite, S.-W. Ma, J. W. Bloom, W. R. Roeske, H. I. Yamamura

Chimeric M_1/M_2 muscarinic receptors: correlation of ligand selectivity and functional coupling with structural modifications.

J. Pharmacol. Exp. Ther. **256**: 173-179 (1992)

Lazareno, S. & N.J.M. Birdsall

Pharmacological characterisation of acetylcholine-stimulated [35 S]GTP γ S binding mediated by human muscarinic m_1 - m_4 receptors: antagonist studies.

Br. J. Pharmacol. **109**: 1120-1127 (1993)

Lazareno, S., T. Farries & N.J.M. Birdsall

Pharmacological characterization of guanine nucleotide exchange reactions in membranes from CHO cells stably transfected with human muscarinic receptors m_1 - m_4 .

Life Sciences **52**: 449-456 (1993b)

Lazareno, S. & N.J.M. Birdsall

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 (1995)

Leff, P.

The two-state model of receptor activation.

Trends Pharmacol Sci. **16**(3):89-97 (1995)

Lesage, A.S., R. Wouters, P. van Gompel, P. Vanhoenacker, G. Haegemann, W. H. M. L. Luyten, J. E. Leysen

Agonistic properties of alniditan, sumatriptan and dihydroergotamine on human 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors expressed in various mammalian cell lines.

Brit. J. Pharmacol. **123**: 1655-1665 (1998)

Liebmann C., S. Nawrath, M. Schnittler, H. Schubert, K.-H. Jakobs

Binding characteristics and functional G protein coupling of muscarinic acetylcholine receptors in rat duodenum smooth muscle membranes.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. **345**: 7-15 (1992)

Lin, K., W. Sadée, J. M. Quillan

Rapid measurements of intracellular calcium using a fluorescence plate reader.

BioTechniques **26**: 318-326 (1999)

Lorenzen, A., M. Fuss, H. Vogt & U. Schwabe

Measurement of guanine nucleotide-binding protein activation by A₁ adenosine receptor agonists in bovine brain membranes: stimulation of guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)triphosphate binding.

Mol. Pharmacol. **44**: 115-123 (1993)

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall

Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. **193**: 265-275 (1951)

Lüllmann, H., F. K. Ohnesorge, G. C. Schauwecker & O. Wassermann

Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated left atria by alkanebisammonium compounds.

Eur. J. Pharmacol. **6**: 241-247 (1969)

Maaß, A.

Vergleich der allosterischen Beeinflußbarkeit der Agonist- und Antagonist-Bindung an Muscarin-Rezeptoren des Hausschweinmyocards. Zur Ursache der überadditiven antimuscarinischen Wirkung von Antagonisten in Kombination mit allosterischen Modulatoren an Herzmuskelpräparaten.

Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn (1995)

Maaß, A., E. Kostenis, C. Tränkle, K. Mohr

Potentialiation by alcuronium of the antimuscarinic effect of *N*-methylscopolamine in guinea pig left atrium.

Eur. J. Pharm. Sci. **2**: 138 P78 (1994)

Mitchelson, F.

Antimuscarinic action of an alkane-bis-ammonium compound alone and in combination with (+)-benzetimide.

Eur. J. Pharmacol. **33 (2)**: 237-246 (1975)

Mitchelson, F.

Muscarinic receptor differentiation.

Pharmacol. Ther. **37**: 357-423 (1988)

Mohr, K., C. M. Staschen, M. Ziegenhagen

Equipotent allosteric effect of W84 on [³H]NMS-binding to cardiac muscarinic receptors from guinea-pig, rat and pig.

Pharmacol. Toxicol. **70**: 198-200 (1992)

Morgan, S.J. & D.C. Darling

Kultur tierischer Zellen.

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg - Berlin - Oxford, 19-80 und 107-111 (1993)

Mutschler, E & G. Lambrecht

Selective muscarinic agonists and antagonists in functional tests.
Trends Pharmacol. Sci. **5** (suppl.): 39-44 (1984)

Mutschler, E, U. Moser, J. Wess, G. Lambrecht

Muscarinic subtypes: agonists and antagonists.
Prog. Pharmacol. **7**: 13-31 (1989)

Mutschler, E, U. Moser, J. Wess, G. Lambrecht

Muscarinic receptor subtypes - pharmacological, molecular biological and therapeutic aspects.
Pharm. Acta Hel. **69**: 243-258 (1995)

Offermann, S

G-proteins as transducers in transmembrane signalling.
Prog. Biophys. Mol. Biol. **83**: 101-130 (2003)

Parekh, A. B., A. Fleig & R. Penner

The store operated calcium current I_{crac} : nonlinear activation by $InsP_3$ and dissoziation from calcium release.
Cell **89**: 973-980 (1997)

Peralta, E.G., A. Ashkenazi, J. W. Winslow, D. H. Smith, J. Ramachandran & D. J. Capon

Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors.
EMBO J. **20**; **6**: 3923-3929 (1987)

Putney, J. W. Jr.

A model for receptor-regulated calcium entry.
Cell Calcium **7**: 1-12 (1986)

Riker, W. F. & W. C. Wescoe

The pharmacology of flaxedil with observations on certain analogues.
Ann. NY Acad. Sci. **54**: 373-394 (1951)

Rudolf, R., M. Mongillo, R. Rizzuto & T. Pozzan

Looking forward to seeing calcium.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **4**: 579-586 (2003)

Safrany, S. T. & S. R. Nahorski

A comparison between muscarinic receptor occupancy, inositol 1,4,5-trisphosphate accumulation and Ca^{2+} mobilization in permeabilized SH-SY5Y neuroblastoma cells.
Neuropharmacology **33**: 837-846 (1994)

Schulz, U.

Antagonismus-Untersuchungen zur Topographie der Bindung allosterischer Modulatoren an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren des Subtyps M_2 .
Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät Bonn (1998)

Shiozaki, K. & T. Haga

Effects of magnesium ion on the interaction of atrial muscarinic acetylcholine receptors and GTP-binding regulatory proteins.
Biochemistry **31**: 10634-10642 (1992)

Taylor, C. W.

The role of G Proteins in transmembrane signalling.
Biochem. J. **272**: 1-13 (1990)

Tietje, K. M. & N. M. Nathanson

Embryonic chick heart express multiple muscarinic acetylcholine receptor subtypes.

J. Biol. Chem. **266**: 17382-17388 (1991)

Tränkle, C., E. Kostenis, U. Burgmer & K. Mohr

Search for lead structures to develop new allosteric modulators of muscarinic receptors.

J. Pharmacol. Exp. Ther. **279**: 926-933 (1996)

Tränkle, C. & K. Mohr

Divergent modes of action among cationic allosteric modulators of muscarinic M₂ receptors.

Mol. Pharmacol. **51**: 674-682 (1997)

Tucek, S., P. Michal & V. Vlachova

Modelling the consequences of receptor-G-protein promiscuity.

Trends Pharmacol. Sci **23**: 171-176 (2002)

Vogel W.K., Mosser V. A., Bulseco D.A., und M. I. Schimerlik

Porcine M₂ muscarinic acetylcholine receptor-effector coupling in chinese-hamster ovary cells.

J. Biol. Chem. **270**: 15485-15493 (1995)

Voigtländer U, K. Jöhren, M. Mohr, A. Raasch, C. Tränkle, S. Buller, J. Ellis, Hötje H.-D. & K. Mohr

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**(1):21-31 (2003)

Watson, S., S. Arkininstall

The G-protein linked receptor facts book.
1st edition, (1994)

Wess, J., D. Gdula & M. R. Brann

Chimeric m_2/m_5 muscarinic receptors: identification of receptor domains conferring antagonist binding selectivity.
Mol. Pharmacol. **41**: 369-374 (1991)

Wess, J.

Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors.
Neurobiology **10**: 69-99 (1996)

Zahn, K.

Verminderung der intrinsischen Aktivität eines Muskarin-Rezeptor-Agonisten durch allosterische Modulatoren im Meerschweinchen-Herzvorhof.
Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät Bonn (1999)

Zahn, K., N. Eckstein, C. Tränkle, W. Sadée und K. Mohr

Allosteric modulation of muscarinic receptor signaling: alcuronium-induced conversion of pilocarpin from an agonist into an antagonist.
J. Pharmacol. Exp. Ther. **301**: 720-728 (2002)

Lebenslauf

Lebenslauf

Name Niels Christoph Eckstein
Geburtstag 25.05.1971
Geburtsort Stuttgart - Bad Canstadt
Familienstand verheiratet

Schulbildung

1977 – 1981 Grundschule, Niederkassel - Ranzel
1981 - 1984 Kopernikusgymnasium, Niederkassel - Lülldorf
1984 - 1985 Heinrich - Hertz - Gymnasium, Bonn - Bad Godesberg
1985 - 1990 Aloisiuskolleg, Bonn - Bad Godesberg
Abitur abgelegt auf dem Aloisiuskolleg Bonn - Bad Godesberg

Staatsdienst 1990 - 1991

Waldkrankenhaus, Bonn - Bad Godesberg

Studium der Pharmazie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung: April, 1994
2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung: April, 1996
3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung: Juli, 1997
4. Approbation als Apotheker, November 1997

Aufnahme in die Studienstiftung des Deutschen Volkes: 25.01.1995

Auslandsaufenthalt

University of California, San Francisco: 19.06.1998 bis 03.12.1998, Departement of Pharmaceutical Chemistry bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Sadée. Ermöglicht durch ein Stipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (DAAD).