

Allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung  
am muskarinischen M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Acetylcholin-Rezeptor

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Dorothea Klemt

aus

Aachen

Bonn 2005

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. Eberhard Schlicker

Tag der Promotion: 24.06.2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Bonn 2005

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2001 bis Februar 2005 in der Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Institutes der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Klaus Mohr angefertigt.

# Inhaltsverzeichnis

<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Allosterische Modulation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren</b>	<b>2</b>
1.2.1    Therapeutische Aspekte der allosterischen Modulation	3
<b>1.3 Pilocarpin</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Fragestellung</b>	<b>4</b>
<b>METHODEN UND MATERIALIEN</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Zellkultur</b>	<b>6</b>
2.1.1    Zelllinien	6
2.1.2    Kultivierung der CHO-Zellen	6
2.1.3    Membranpräparation aus CHO-Zellen	6
2.1.4    Protein-Gehaltsbestimmung der Membransuspensionen	7
<b>2.2 Radioligandbindungsexperimente mit [<sup>3</sup>H]NMS</b>	<b>7</b>
2.2.1    Theoretische Grundlagen	7
2.2.2    Homologe kompetitive Inhibition	8
2.2.3    Versuchsdurchführung	9
<b>2.3 [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S Bindungsexperimente</b>	<b>10</b>
2.3.1    Theoretische Grundlagen	10
2.3.2    Versuchsdurchführung	11
2.3.3    Auswertung der Daten aus [ <sup>35</sup> S]GTP <sub>γ</sub> S-Bindungsexperimenten	12
2.3.3.1    Datenanalyse für eine kompetitive Interaktion	12
2.3.3.2    Datenanalyse für eine allosterische Interaktion	13
2.3.3.3    Testung auf Parallelverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven	14
<b>2.4 Verwendete Computerprogramme</b>	<b>15</b>

<b>2.5</b>	<b>Substanzen</b>	<b>15</b>
2.5.1	Muskarinrezeptor-Agonisten	15
2.5.2	Muskarinrezeptor-Antagonisten	16
2.5.3	Allosterische Modulatoren	16
2.5.4	Radioliganden	19
<b>2.6</b>	<b>Materialien</b>	<b>20</b>
2.6.1	Reagenzien	20
2.6.2	Geräte	21
2.6.3	Firmen	22
2.6.4	Lösungen	22
2.6.5	Puffer	23
2.6.6	Nährmedien	23
2.6.7	Zelllinien	24
<b>2.7</b>	<b>Statistik</b>	<b>24</b>
<b>ERGEBNISSE</b>		<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Vorversuche an CHO-M<sub>2</sub>- und CHO-M<sub>4</sub>-Membranen</b>	<b>27</b>
3.1.1	Radioligandbindungsexperimente	27
3.1.2	[ <sup>35</sup> S]GTPyS-Bindungsexperimente	28
3.1.2.1	Kinetische [ <sup>35</sup> S]GTPyS-Experimente	28
3.1.2.2	Effekt rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden	31
<b>3.2</b>	<b>Versuche mit CHO-M<sub>2</sub>-Zellmembranen</b>	<b>34</b>
3.2.1	Konzentrationsabhängiger Effekt von Agonisten	34
3.2.2	Effekt des kompetitiven Antagonisten Atropin	36
3.2.3	Allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung	39
3.2.3.1	Alcuronium	39
3.2.3.2	Caracurine	42
3.2.3.2.1	Caracurin V (CarB)	42
3.2.3.2.2	Caracurin VII (Wieland-Gumlich-Aldehyd, WGA)	45
3.2.3.2.3	Di-WGA 6	48
3.2.3.2.4	Vergleichende Betrachtung der Kenndaten der Caracurine	52
3.2.3.3	Di-Strychnin 6 und Strychnin	52
3.2.3.3.1	Di-Strychnin 6	52
3.2.3.3.2	Strychnin	54

## Inhaltverzeichnis

3.2.3.3.3	Vergleichende Betrachtung der pharmakologischen Kenndaten von Di-Strychnin 6 und Strychnin	58
3.2.3.4	Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen	58
3.2.3.4.1	W84	58
3.2.3.4.2	SH28	61
3.2.3.4.3	Naphmethonium (MM3a)	64
3.2.3.4.4	MM7a	68
3.2.3.4.5	Str6Naph	70
3.2.3.4.6	Kenndaten der Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen	73
3.2.3.5	Bispyridinium-Verbindung: Duo3	74
3.2.3.6	Gallamin	77
3.2.4	Einfluss des Lösungsmittels DMSO	81
3.2.4.1	Einfluss von DMSO auf den Effekt von Pilocarpin	81
3.2.4.2	Einfluss von DMSO auf die allosterische Wirksamkeit von Alcuronium	82
<b>3.3</b>	<b>Versuche mit CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen</b>	<b>83</b>
3.3.1	Konzentrationsabhängiger Effekt von Pilocarpin	83
3.3.2	Interaktion des kompetitiven Antagonisten Atropin mit der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung	85
3.3.3	Interaktion von allosterischen Modulatoren mit der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung	87
3.3.3.1	Alcuronium	87
3.3.3.2	Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen	90
3.3.3.2.1	W84	90
3.3.3.2.2	Naphmethonium (MM3a)	93
3.3.3.3	Gallamin	96
<b>DISKUSSION</b>		<b>100</b>
<b>4.1</b>	<b>Rezeptoraktivitätszustände und G Protein-Aktivierung</b>	<b>100</b>
<b>4.2</b>	<b>Praktische Durchführung der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsexperimente</b>	<b>101</b>
4.2.1	Reagenzien im Versuchsansatz	101
4.2.2	Vorteile der [ <sup>35</sup> S]GTPγS-Experimente	102
<b>4.3</b>	<b>Ergebnisse der kinetischen [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsexperimente</b>	<b>103</b>

<b>4.4</b>	<b>Agonismus</b>	<b>104</b>
4.4.1	Voll- und Partialagonismus an M <sub>2</sub> - und M <sub>4</sub> -Rezeptoren	104
4.4.1.1	Vergleich der Affinitäten von Oxotremorin M und Pilocarpin am M <sub>2</sub> - und M <sub>4</sub> -Rezeptor	104
4.4.1.2	Vergleich der intrinsischen Aktivitäten von Oxotremorin M und Pilocarpin am M <sub>2</sub> - und M <sub>4</sub> -Rezeptor	105
4.4.2	Rezeptorreserve	105
<b>4.5</b>	<b>Antagonismus</b>	<b>106</b>
4.5.1	Kompetitiver Antagonismus	106
4.5.2	Inverser Agonismus	107
<b>4.6</b>	<b>Allosterie</b>	<b>108</b>
4.6.1	Theoretische Grundlagen	108
4.6.1.1	Allosterische Modulation der Affinität	108
4.6.1.2	Allosterische Modulation der intrinsischen Aktivität	109
4.6.1.3	Unterschiede zwischen kompetitivem und allosterischem Antagonismus	110
4.6.1.4	Voraussetzungen für die Auswertung nach dem kompetitiven und dem allosterischen Modell	111
4.6.2	Allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung am M <sub>2</sub> -Rezeptor	111
4.6.2.1	Allosterische Modulation der Wirksamkeit („potency“) von Pilocarpin	111
4.6.2.1.1	Pharmakologische Kenngrößen der allosterischen Modulation der Pilocarpin-Wirksamkeit am M <sub>2</sub> -Rezeptor	111
4.6.2.1.2	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	115
4.6.2.1.2.1	„Monomer-Dimer-Paare“	115
4.6.2.1.2.2	Einfluss des Strychnin-Rings, der Alkan-Bis-Ammonium-Struktur und der Caracurin-Struktur auf Affinität und Kooperativität mit Pilocarpin und NMS	116
4.6.2.1.3	Korrelation zwischen den Kooperativitäten der Allosterie mit Pilocarpin und NMS	117
4.6.2.2	Allosterische Modulation der intrinsischen Aktivität („efficacy“)	119
4.6.2.2.1	Pharmakologische Kenngrößen der allosterischen Modulation des Pilocarpin-Effektes am M <sub>2</sub> -Rezeptor	119
4.6.2.2.2	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	120
4.6.2.2.3	Mechanistische Deutung	121
4.6.2.2.4	Schlussfolgerungen	122
4.6.3	Allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung am M <sub>4</sub> -Rezeptor	123

## Inhaltverzeichnis

4.6.3.1	Interaktion mit der Wirksamkeit („potency“) von Pilocarpin	123
4.6.3.2	Interaktion mit der intrinsischen Aktivität	124
	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>125</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>127</b>
	<b>ANHANG</b>	<b>138</b>
	<b>7.1 Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden</b>	<b>138</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>140</b>
	<b>PUBLIKATIONSLISTE</b>	<b>141</b>
	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>142</b>



# Kapitel 1

## Einleitung

Zellen des menschlichen Körpers vermögen miteinander durch chemische Botenstoffe zu kommunizieren. Über die Bindung eines Botenstoffes an Zellmembran-ständige Rezeptorproteine der Zielzelle wird ein Signal in das Zellinnere übertragen. Die Botenstoffe haben eine bestimmte Bindungsneigung zu ihren Rezeptoren (Affinität) und induzieren einen rezeptorvermittelten Effekt (intrinsische Aktivität).

### 1.1 Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren

Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren gehören zu der Superfamilie der G Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese Art von Rezeptoren wandelt die Bindung eines Agonisten über ein Guaninnucleotid bindendes Protein (G Protein) in einen zytosolischen Effekt um (Birnbauer et al., 1990). G Protein-gekoppelte Rezeptoren bestehen aus einem Peptidfaden, der sieben ringförmig angeordnete, transmembranäre  $\alpha$ -helikale Domänen bildet, die durch jeweils drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Aminosäure-Schleifen verbunden sind (Hulme et al., 1990; Palcewski et al., 2000). Die dritte intrazelluläre Schleife ist besonders groß und scheint für die Interaktion des Rezeptors mit dem G Protein wichtig zu sein (Liu et al., 1995; Wess, 1996). Bis heute sind fünf Subtypen der Muskarinrezeptoren ( $M_1$ - $M_5$ ) bekannt (Bonner et al., 1987).

G Proteine sind Heterotrimere, bestehend aus den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ . Die  $\beta$ - und die  $\gamma$ -Untereinheit bilden einen nicht dissoziierbaren Komplex und eine funktionelle Einheit (Gilman, 1987). Es existieren verschiedene  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten, wobei die  $\alpha$ -Untereinheit den Subtyp des G Proteins definiert. Die Aktivität des G Proteins wird reguliert durch die rezeptorkatalysierte Bindung von Guaninnucleotiden an die  $\alpha$ -Untereinheit. Ein aktiviertes G Protein dissoziiert in seine  $\alpha$ - und  $\beta\gamma$ -Untereinheiten; beide vermögen membranständige Enzyme zu aktivieren oder zu deaktivieren (Offermanns, 2003).

Die Rezeptorsubtypen  $M_1$ ,  $M_3$  und  $M_5$  koppeln bevorzugt an  $G_{q/11}$ -Proteine, woraufhin eine Aktivierung der Phospholipase C erfolgt. Die Phospholipase C vermag ihrerseits aus dem Membranlipid Phosphatidylinositol die sekundären Botenstoffe Inositoltriphosphat und Diacylglycerol abzuspalten.  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptoren koppeln hingegen an  $G_{i/o}$ -Proteine, was zu einer Hemmung der Adenylatcyclase und somit zu einer Abnahme der cAMP-Konzentration führt (Hulme et al., 1990).

Aus immunhistochemischen Untersuchungen (Levey et al., 1991) ist über die Verteilung der Subtypen im zentralen Nervensystem (ZNS) und peripherem Gewebe Folgendes bekannt: Muskarinische Acetylcholinrezeptoren vom Subtyp  $M_1$  liegen insbesondere in den Bereichen Cortex und Hippocampus des ZNS sowie in peripheren Ganglien vor.  $M_2$ -Rezeptoren werden typischerweise in der Muskulatur des Herzens exprimiert, darüber hinaus jedoch auch im ZNS und in der glatten Muskulatur. Muskarinrezeptoren vom Subtyp  $M_3$  sind hauptsächlich in der glatten Muskulatur sowie im exokrinen Drüsengewebe zu finden.  $M_4$ -Rezeptoren werden im ZNS, vor allem in den Bereichen Vorderhirn und Striatum, sowie in der Lunge exprimiert.  $M_5$ -Rezeptoren liegen ebenfalls im ZNS in der Substantia nigra sowie im Hippocampus vor (Mutschler et al., 1995; IUPHAR Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification, 1998).

Die nachgeschalteten Effekte der muskarinischen Rezeptoren werden durch Bindung des endogenen Liganden Acetylcholin an die orthosterische Bindungsstelle vermittelt. Diese liegt in der Tiefe der von den sieben transmembranalen Domänen des Rezeptors gebildeten Bindungstasche (Wess, 1993) und ist unter den Muskarinrezeptor-Subtypen  $M_1$ - $M_5$  hochkonserviert (Hulme et al., 1990). Die ausgeprägte Sequenzhomologie der verschiedenen Muskarinrezeptor-Subtypen im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle ist vermutlich die Ursache dafür, dass bis heute keine absolut Subtyp-selektiven Muskarinrezeptor-Agonisten bzw. Antagonisten für die Therapie gefunden werden konnten (Felder et al., 2000).

## **1.2 Allosterische Modulation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren**

Allosterie ist die gleichzeitige Bindung und gegenseitige Beeinflussung der Affinität und / oder intrinsischen Aktivität zweier Liganden an einer Zielstruktur (Ehlert, 1988; Hall, 2000). Das Alkan-bis-Ammonium-Derivat W84 zeigte erstmals in Organbaduntersuchungen (Kords et al., 1968) in Kombination mit dem kompetitiven Antagonisten Atropin eine überadditive Wirkung. Im Gegensatz zu Atropin war die antagonistische Wirkung von W84 in hohen Konzentrationen sättigbar (Lüllmann et al., 1969). Clark und Mitchelson berichteten 1976 über ein ähnliches Verhalten von Gallamin und postulierten ebenfalls einen allosterischen Wirkungsmechanismus. In Radioligandbindungsexperimenten wurde die allosterische Interaktion zweier Liganden an einem Rezeptorprotein bestätigt; die Autoren postulierten eine zweite, allosterische Bindungsstelle neben der Neurotransmitterbindungsstelle an Muskarinrezeptoren (Birdsall et al., 1983). Diese allosterische Bindungsstelle an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren wurde bisher am  $M_2$ -Rezeptor am eingehendsten untersucht (Lazareno und Birdsall, 1995; Holzgrabe und Mohr 1998). Das Haftareal für allosterische Modulatoren am  $M_2$ -Rezeptor ist extrazellulär am Eingang der Bindungstasche lokalisiert, so dass das Alloster die orthosterische Bindungsstelle räumlich abschirmt (Ellis et al., 1993; Jakubík und Tuček 1994). Voigtländer et al. (2003) identifizierten essentielle Epitope der allosterischen Bindungsstelle und

erstellten ein dreidimensionales Modell, das die Bindungsstelle für allosterische Modulatoren aus der Gruppe der Caracurin-Derivate am Antagonist(*N*-Methylscopolamin/NMS)-besetzten M<sub>2</sub>-Rezeptor zeigt.

### 1.2.1 Therapeutische Aspekte der allosterischen Modulation

Das Prinzip der allosterischen Modulation wird in der Arzneimitteltherapie genutzt. Prominentestes Beispiel ist die Arzneistoffgruppe der Benzodiazepine, die im zentralen Nervensystem allosterisch die Bindung des inhibitorischen Neurotransmitters GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure) an den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, einen Ligand-gesteuerten Ionenkanal, fördert. Benzodiazepine werden insbesondere zur Anxiolyse und Sedierung eingesetzt, aber auch in der Therapie der Epilepsie und in der Anästhesie finden sie Verwendung.

Galantamin, das in der Therapie des Morbus Alzheimer als Hemmstoff des Enzyms Acetylcholinesterase eingesetzt wird, entfaltet einen Teil seiner Wirksamkeit über die allosterische Förderung der Wirkung des endogenen Liganden Acetylcholin an nicotinischen Acetylcholinrezeptoren (Maelicke et al., 2000).

Allosterisch wirksame Arzneistoffe haben vielfältige therapeutische Vorteile gegenüber direkten Agonisten und Antagonisten.

Zunächst ist der Effekt allosterischer Modulatoren auf die Bindung orthosterischer Liganden sättigbar (Birdsall et al., 1999), d. h. mit steigender Alloster-Konzentration ist nur eine begrenzte Förderung oder Hemmung der Orthoster-Bindung möglich, was Intoxikationen infolge einer Überdosierung unwahrscheinlich macht. Im Bereich der Arzneimitteltherapie hat die gute Verträglichkeit der allosterisch wirkenden Benzodiazepine zur Ablösung der Barbiturate als Sedativa geführt.

Ein allosterischer Ligand, der selbst nicht agonistisch wirkt, aber die Bindung von Acetylcholin fördert, kann nur dann einen Effekt auslösen, wenn Acetylcholin zugegen ist. Auf diese Weise würde sich die Wirkung auf Orte (Synapsen) beschränken, an denen der Organismus eine Erregung erreichen „will“ (Voigtländer und Mohr, 2004). Im Vergleich zu orthosterischen Agonisten verändern allosterische Modulatoren das physiologische Muster der Signaltransduktion nicht, da sie keine Dauererregung der Rezeptoren herbeiführen. Eine Desensibilisierung des Rezeptorsystems ist daher unwahrscheinlich.

Ein weiterer Vorteil allosterischer Modulatoren am muskarinischen Acetylcholinrezeptor besteht in der Möglichkeit der Entwicklung subtypspezifischer Pharmaka. Im Vergleich zu der tiefer in der Ligandbindungstasche gelegenen orthosterischen Bindungsstelle unterscheidet sich die Aminosäuresequenz im extrazellulären Bereich des Rezeptorproteins zwischen den einzelnen Subtypen stärker (Tuček und Proška, 1995; Buller et al., 2002). Tatsächlich zeigen viele der bekannten allosterischen Modulatoren eine unterschiedliche Affinität zu den fünf Muskarinrezeptor-Subtypen, typischerweise in der Reihenfolge M<sub>2</sub> > M<sub>4</sub> > M<sub>1</sub> > M<sub>3</sub> > M<sub>5</sub> (Ellis et al., 1993; Jakubík et al., 1995; Ellis und Seidenberg, 2000).

### 1.3 Pilocarpin

Pilocarpin ist ein nichtselektiver Partialagonist an muskarinschen Acetylcholin-Rezeptoren. Das natürlich vorkommende Alkaloid entstammt den Blättern der Pflanze *Pilocarpus jaborandus* aus der Familie der Rutaceae. Seit mehr als 100 Jahren wird Pilocarpin zur Behandlung des trockenen Mundes (Xerostomie) eingesetzt (Fox, 2004). Therapeutisch genutzt wird Pilocarpin lokal zur Behandlung des Glaukoms und systemisch zur Behandlung von Mund- und Augentrockenheit bei Sjögren-Syndrom oder nach einer Bestrahlungstherapie bei Krebspatienten (Rote Liste 2004). In Tiermodellen wird Pilocarpin zur Induktion von epileptischen Anfällen genutzt (Cavalheiro, 1995). Auch zur Therapie des Tinnitus wurden Versuche mit Pilocarpin durchgeführt (DeLucchi, 2000).

### 1.4 Fragestellung

Durch geeignete allosterische Modulatoren können die Affinitäten von Agonisten oder von Antagonisten zum muskarinischen Acetylcholinrezeptor erhöht werden. Während Struktur-Wirkungs-Beziehungen allosterischer Förderer der *Antagonist*-Bindung bereits untersucht wurden (Mohr et al., 2003), ist die Entwicklung allosterischer Förderer der *Agonist*-Bindung weniger fortgeschritten. Lediglich für einzelne, in ihrer chemischen Struktur ähnliche Allosterie wie Brucin und Derivate, (-)Eburnamonin sowie für Thiochrom wurde eine Erhöhung der Stabilität des Acetylcholin-Rezeptor-Komplexes an einzelnen Muskarinrezeptor-Subtypen festgestellt (Birdsall et al., 1997 und 1999; Proška und Tuček, 1996; Lazareno et al., 2004).

Allosterische Modulatoren können möglicherweise die Bindung des Partialagonisten Pilocarpin erhöhen und dabei gleichzeitig dessen intrinsische Aktivität senken (Zahn et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wird der Einfluss verschiedener allosterischer Modulatoren auf die Affinität *und* die intrinsische Aktivität von Pilocarpin an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren untersucht. Die Rezeptor-vermittelte G Protein-Aktivierung wird durch Messung der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung erfasst. Die Experimente erfolgen an klonierten humanen M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren, die in stabil transfizierten CHO-Zellen exprimiert werden. Beide Rezeptorsubtypen koppeln an die gleichen G Protein-Subtypen G<sub>i/o</sub>. Es werden strukturell unterschiedliche, große und kleine allosterische Modulatoren aus verschiedenen Substanzgruppen (Caracurine, Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen, Strychnin und Derivate) sowie der mit dem Rezeptorprotein atypisch interagierende allosterische Modulator Duo3 und die beiden „Prototyp-Modulatoren“ Gallamin und Alcuronium eingesetzt (Strukturformeln siehe Kapitel 2.5).

## Einleitung

Die Beantwortung folgender Fragen wird angestrebt:

- (1) Wie verhalten sich strukturverschiedene allosterische Modulatoren in Hinblick auf die Modulation der Wirksamkeit („potency“) und intrinsischen Aktivität („efficacy“) von Pilocarpin an muskarinischen  $M_2$ -Acetylcholinrezeptoren?  
Ist die allosterische Verminderung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin, wie sie durch Zahn et al. (2002) gefunden wurde, ein allgemeines Phänomen?
- (2) Durch Halbierung „dimerer“ allosterischer Modulatoren mit hoher Affinität zum Antagonist- (NMS-) besetzten  $M_2$ -Rezeptor erhält man „monomere“ Allosteren mit im Vergleich zu den „Dimeren“ geringerer Affinität zur Antagonist-, jedoch gleichbleibender Affinität zur Agonist- (Oxotremorin M-) besetzten Rezeptorkonformation (Großmüller 2003).  
Unterscheiden sich „monomere“ und „dimere“ allosterische Modulatoren bezüglich der Veränderung der Wirksamkeit („potency“) und der intrinsischen Aktivität („efficacy“) des Partialagonisten Pilocarpin?
- (3) Korrelieren die mit Pilocarpin erhobenen pharmakologischen Daten der allosterischen Modulatoren (Affinität zum Pilocarpin-besetzten  $M_2$ -Rezeptor, Bindungsförderung oder –senkung von Pilocarpin) mit den am Antagonist(*N*-Methylscopolamin)-besetzten  $M_2$ -Rezeptor bestimmten Kenngrößen?
- (4) Ausgewählte allosterische Modulatoren sollen in Hinblick auf die Modulation der  $M_4$ -Subtyp-vermittelten, Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung untersucht werden und mit den am  $M_2$ -Rezeptor erhaltenen pharmakologischen Daten verglichen werden.

# Kapitel 2

## Methoden und Materialien

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden Membransuspensionen aus Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters *Cricetulus griseus* verwendet, die mit dem humanen M<sub>2</sub>- oder M<sub>4</sub>- Rezeptorgen stabil transfiziert sind (CHO-M<sub>2</sub> bzw. CHO-M<sub>4</sub>) und die entsprechenden Rezeptorsubtypen überexprimieren. CHO-Wildtyp-Zellen exprimieren keinen der fünf Subtypen der Muskarinrezeptoren (Buckley et al., 1989; Wess et al., 1991; Eckstein, 2003).

#### 2.1.2 Kultivierung der CHO-Zellen

Sämtliche Arbeiten mit lebenden Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Ausschließlich sterilisierte Utensilien und steril filtrierte Zubereitungen kamen zur Anwendung. Die CHO-Zellen wurden in einer Atmosphäre bei 37°C mit ca. 96% relativer Luftfeuchtigkeit und ca. 5% CO<sub>2</sub> im unter 2.6.6 beschriebenen Nährmedium in Gewebekulturschalen kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Nährmedium ausgetauscht, bei Konfluenz wurden die Zellen vereinzelt. Dazu wurde der Zellrasen mit PBS-Lösung (siehe Kapitel 2.6.5) gespült und durch Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen von den Gewebekulturschalen abgelöst. Nach Abzentrifugieren des Trypsin-EDTA-haltigen Überstandes mit einer Ultrazentrifuge (Rotor JS 4.3 / 900 rpm (185 g) / 4 min / 4°C) sowie Resuspension in frischem Nährmedium wurden die Zellen gleichmäßig auf mehrere Kulturschalen verteilt.

#### 2.1.3 Membranpräparation aus CHO-Zellen

Die Vorbereitung der Zellen für Membranpräparationen erfolgte, wenn 20 Kulturschalen zu ca. 80-90% bewachsen waren. Ein frisch hergestelltes, 5 mM Natriumbutyrat enthaltendes Nährmedium wurde auf den Zellrasen gegeben, um den Expressionsgrad des jeweiligen muskarinischen

Rezeptorsubtyps zu erhöhen (Kruh, 1982). 18-24 Stunden nach Zugabe der butyrathaltigen Nährlösung wurde diese durch 2,4 ml Homogenisationspuffer je Gewebekulturschale ersetzt. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Oberfläche abgeschabt, unter Zugabe von 1,2 ml Homogenisationspuffer in Polypropylen-(PP-)Röhrchen überführt und auf Eis gekühlt gelagert. Jeweils 5 Kulturschalen wurden gleichzeitig bearbeitet. Dem Zellaufschluss mit einem Polytron-Homogenisator (zweimal im Abstand von ca. 2 min 10 sec auf Stufe 6-7) folgten drei Zentrifugationen (Rotor: JA 25.50 / 40000 g / 10 min / 2°C). Zwischen den einzelnen Zentrifugationsschritten wurde der Überstand abgesaugt und die Pellets in 10 ml Lagerungspuffer resuspendiert. Die Pellets wurden nach der dritten Zentrifugation in 9 ml Inkubationspuffer aufgenommen, die erhaltene Membransuspension wurde zu je 500-1000 µl aliquotiert, bei -80°C eingefroren und gelagert.

### 2.1.4 Protein-Gehaltsbestimmung der Membransuspensionen

Die Quantifizierung des Proteingehaltes sämtlicher Membransuspensionen wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) mit humanem Serumalbumin als Standard durchgeführt. Die durchschnittlichen Werte sind in Tabelle 1 dargestellt.

Membransuspension	Proteingehalt (mg/ml)	Anzahl untersuchter Membransuspensionen
CHO M <sub>2</sub>	1,92 ± 0,07	44
CHO M <sub>4</sub>	2,46 ± 0,26	10

**Tabelle 1:** Zusammenstellung des nach Lowry et al. (1951) bestimmten Proteingehaltes der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Membransuspensionen (Mittelwert ± Standardfehler).

## 2.2 Radioligandbindungsexperimente mit [<sup>3</sup>H]NMS

Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der in den [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsexperimenten eingesetzten CHO-Zellhomogenate wurde mit Hilfe von homologen Konkurrenzexperimenten die Zahl spezifischer Bindungsstellen (B<sub>max</sub>) für den Radioliganden [<sup>3</sup>H]N-Methyl-Scopolamin ([<sup>3</sup>H]NMS) und dessen Affinität (K<sub>D</sub>) zu diesen Bindungsstellen ermittelt.

### 2.2.1 Theoretische Grundlagen

Die reversible Bindung eines Ligand-Rezeptor-Komplexes [RL] aus Ligand [L] und Rezeptor [R] folgt dem Massenwirkungsgesetz:



k<sub>+1</sub> Assoziations-Geschwindigkeitskonstante  
k<sub>-1</sub> Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante

Die Geschwindigkeit der Assoziation von Ligand und Rezeptor ( $v_{\text{hin}}$ ) bzw. der Dissoziation eines Ligand-Rezeptor-Komplexes ( $v_{\text{rück}}$ ) werden folgendermaßen beschrieben:

$$v_{\text{hin}} = k_{+1} [R] [L] \quad (2)$$

$$v_{\text{rück}} = k_{-1} [RL] \quad (3)$$

Nehmen die Geschwindigkeiten der Assoziations- und Dissoziationsreaktion den gleichen Wert an, so ändert sich die Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe nicht mehr. Die Reaktion befindet sich im dynamischen Gleichgewicht und es gilt:

$$v_{\text{hin}} = v_{\text{rück}} \cong k_{+1} [R][L] = k_{-1} [RL] \quad (4)$$

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_D$  berechnet sich aus dem Quotienten der kinetischen Konstanten:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R][L]}{[RL]} \quad (5)$$

Der  $K_D$ -Wert beschreibt diejenige Ligandkonzentration, bei der 50% der Rezeptoren mit Ligand besetzt sind. Je kleiner der  $K_D$ -Wert eines Liganden ist, desto höher ist seine Affinität zum Rezeptor.

## 2.2.2 Homologe kompetitive Inhibition

Bei Konkurrenzexperimenten werden Rezeptorsuspensionen mit einer konstanten Konzentration des Radioliganden und steigenden Konzentrationen des Inhibitors inkubiert. Im Falle der homologen Konkurrenz sind Radioligand und Inhibitor strukturidentisch und unterscheiden sich lediglich in ihren physikalischen Eigenschaften. Nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes wird die Bindung des Radioliganden an den Rezeptor bestimmt. Bei der Auftragung der Radioligandbindung gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration des Inhibitors ergibt sich ein sigmoider Verlauf der Messwerte, der an eine vier Parameter enthaltende logistische Gleichung (Barlow und Blake, 1989) angepasst werden kann. Das Steilheitsmaß entspricht dem Hill-Koeffizienten in der Hill-Gleichung (Hill, 1910).

$$B_{\text{ges}} = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{+ 10^{(\log_{10} \text{IC}_{50} - [X]) \cdot n_H}} \quad (6)$$

$B_{\text{ges}}$	Radioligand-Gesamtbindung
Max	Radioligandbindung in Abwesenheit des Inhibitors; oberes Kurvenplateau
Min	Radioligandbindung in Anwesenheit hoher Konzentrationen des Inhibitors (nicht sättigbare Radioligandbindung, üblicherweise der unspezifischen Radioligandbindung entsprechend); unteres Kurvenplateau
$\text{IC}_{50}$	Inhibitorkonzentration, die die spezifische Bindung des Radioliganden um 50% reduziert; Wendepunkt des Sigmoids
$[X]$	dekadischer Logarithmus der Konzentration des Inhibitors
$n_H$	Hill-Koeffizient; Maß für die Steigung der Kurve



Ein Hill-Koeffizient, dessen Betrag nicht signifikant von dem Wert  $n_H = 1$  abweicht, weist auf eine homogene Rezeptorpopulation mit einer konstanten Affinität des Liganden hin (Monod et al., 1965).

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

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad (7)$$

$K_i$  Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Kompetitors  
 $K_D$  Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Radioliganden

Im Falle einer homologen Konkurrenz sind Radioligand und Inhibitor strukturidentisch und besitzen eine identische Affinität ( $K_i = K_D$ ) zur gemeinsamen Bindungsstelle. Daraus folgt:

$$K_D = IC_{50} - [L] \quad (8)$$

Somit kann der  $K_D$ -Wert aus dem Wendepunkt des erhaltenen Sigmoiden und der Konzentration des eingesetzten Radioliganden errechnet werden. Die gleichen Parameter liefern unter Berücksichtigung der spezifischen Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Inhibitors  $[RL]_0$  (DeBlasi et al., 1989) auch die Konzentration der vorhandenen Bindungsstellen ( $B_{max}$ ):

$$B_{max} = \frac{[RL]_0 IC_{50}}{[L]} \quad (9)$$

### 2.2.3 Versuchsdurchführung

Die homologe Konkurrenz wurde mit den in Tabelle 2 beschriebenen Versuchsansätzen als Dreifachbestimmung durchgeführt. Atropin als kompetitiver Antagonist diente zur Bestimmung der unspezifischen Bindung von  $[^3H]NMS$  an die CHO-Membransuspension. GDP (Guanosin-5'-diphosphat) wurde zugegeben, da Radioligandbindungsstudien und  $[^{35}S]GTP\gamma S$ -Bindungsexperimente mit identischen Reagenzien durchgeführt werden sollten.

Die einzelnen Komponenten wurden sukzessive mit einer Multipipette in die Bohrungen der „96-well“-Mikrotiterplatte gegeben, auf einem Rotationsmischer geschüttelt und im vortemperierten Wasserbad 60 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Filtration mittels des Harvesters 96® über eine mit 0,1%iger Polyethylenimin (PEI)-Lösung benetzte Filtermatte gestoppt. Nach zweimaligem Spülen mit Aqua dest. wurde der Filter 3 min bei 400 W in der Mikrowelle getrocknet. Mithilfe eines Heizblocks wurde Szintillationswachs auf die Filtermatte aufgeschmolzen und diese nach Erstarren des

Wachses in einer Klarsichthülle in eine Zählkassette überführt. Nach Messung der radioaktiven Zerfälle mittels Szintillationsspektrometrie (Zähldauer je Probe: 3 min) wurden die Daten wie unter 2.2.1 und 2.2.2 beschrieben analysiert.

Volumen [µl]	Einpipettierte Lösung	Endkonzentration im Ansatz
50	[ <sup>3</sup> H]NMS in Aqua dest.	0,2 nM
50	Aqua dest. (Gesamtbindung) oder Atropin in Aqua dest. (unspezifische Bindung) oder NMS in Aqua dest. (spezifische Bindung)	1 µM  10 <sup>-6</sup> bis 10 <sup>-11</sup> M
300	Inkubationspuffer (pH = 7,4 bei 25°C)	10 mM HEPES, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl
50	GDP in Inkubationspuffer	10 µM
50	CHO-Membransuspension in Inkubationspuffer	Proteingehalt 50 µg/ml
Gesamtvolumen: je 500 µl		

**Tabelle 2:** Ansatzvolumina der Gleichgewichtsbindungs-Experimente

## 2.3 [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S Bindungsexperimente

### 2.3.1 Theoretische Grundlagen

Das Nukleotid GTP (Guanosin-5'-triphosphat) überführt G Proteine in ihren aktiven Zustand, indem es durch Bindung an die α-Untereinheit die Dissoziation der α- und βγ-Untereinheit des G Proteins initiiert. Nach Hydrolyse des GTP zu GDP durch eine an der α-Untereinheit befindliche GTPase erfolgt eine Re-Assoziation der Untereinheiten und somit die Beendigung der G Protein-Aktivierung (Hepler und Gilman, 1992).

Bei dem GTP-Analogon GTP<sub>γ</sub>S wird der Angriff der GTPase durch Einbau eines Schwefelatoms am gamma-ständigen Phosphatrest der Ribose verhindert (Milligan 2003). Da GTP<sub>γ</sub>S irreversibel an die α-Untereinheit bindet, führt es zu einer Daueraktivierung des G Proteins.

Im Bindungsexperiment erfolgt nach Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Rezeptor, G Protein und Ligand die Assoziation von radioaktiv markiertem [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S an die α-Untereinheit. GDP katalysiert die Anlagerung von GTP bzw. [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S (Hilf et al., 1989), Magnesiumionen verringern die Abdissoziation von [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S vom G Protein (Hilf und Jakobs, 1989). Nach einer definierten Inkubationszeit kann die Assoziation gestoppt und gebundenes [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S quantitativ bestimmt werden. Das Ausmaß der [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S Bindung ist ein Ausdruck der Ligand-induzierten, Rezeptor-vermittelten G Protein-Aktivierung.

### 2.3.2 Versuchsdurchführung

In [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S Bindungsexperimenten wurde der Einfluss einer Testsubstanz auf die basale [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S Bindung ([<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz) und der Einfluss einer Testsubstanz auf die durch den Partialagonisten Pilocarpin induzierte [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung bestimmt.

Die Messung des Effektes sättigender Konzentrationen einer Testsubstanz auf die basale [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S Bindung wurde an CHO-Zellmembranen als Sieben- bis Achtfachbestimmung durchgeführt. Eingesetzt wurden der muskarinische Vollagonist Oxotremorin M (Endkonzentration 1 mM), der Partialagonist Pilocarpin (Endkonzentration 1 mM), der allosterische Modulator Alcuronium (Endkonzentration 0,1 mM) sowie der muskarinische Antagonist Atropin (Endkonzentration 1 μM).

Der Einfluss einer Testsubstanz auf die durch Pilocarpin induzierte [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S Bindung wurde mit einem Stichprobenumfang von n=4 ermittelt. Es wurde entweder der Einfluss einer Testsubstanz in *einer* definierter Konzentration auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (Endkonzentrationen: 10<sup>-9</sup> bis 10<sup>-3</sup> M) oder der Einfluss einer Testsubstanz in einem definierten Konzentrationsbereich auf den Pilocarpin-Maximaleffekt (Endkonzentration von Pilocarpin: 10<sup>-3</sup> M) bestimmt. In jedem Experiment wurde zur Kontrolle eine Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin in Abwesenheit einer Testsubstanz mitgeführt.

Die in Tabelle 3 aufgeführten Reagenzien wurden in „96-well“-Mikrotiterplatten einpipettiert. Nach Zugabe der [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Lösung und Durchmischen des Versuchsansatzes begann eine 60-minütige Inkubationsphase in einem auf 30°C vortemperierten Schüttelwasserbad. Die Reaktion wurde durch Vakuumfiltration mittels eines Harvesters 96® über mit Aqua dest. benetzte Filtermatten gestoppt. Die Filter wurden wie unter 2.2.3 beschrieben weiter bearbeitet.

Volumen [μl]	Einpipettierte Lösung	Endkonzentration im Ansatz
100	<b>Aqua dest.</b> (Basale Bindung) oder <b>Pilocarpin</b> und / oder <b>Testsubstanz</b> in Aqua dest.	siehe Text
250	<b>Inkubationspuffer</b> (pH = 7,4 bei 25°C)	10 mM Hepes, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl
50	<b>GDP</b> in Inkubationspuffer	10 μM
50	<b>CHO-Membransuspension</b> in Inkubationspuffer	Proteingehalt 50 μg/ml
50	<b>[<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S</b> in Inkubationspuffer	0,07 nM
Gesamtvolumen: je 500 μl		

**Tabelle 3:** Ansatzvolumina der [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindungsexperimente

Die [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Stammlösung (finale Konzentration: 0,07 nM) wurde mit eisgekühltem TRICINE/DTT-Puffer (Kapitel 2.6.5) von 20 μl auf 200 μl verdünnt. Das Disulfidbrücken enthaltende Agens Dithiothreitol (DTT) schützt vor oxidierenden Einflüssen. TRICINE (Gemisch aus N-Tris-

(hydroxymethyl)-methyl]-glycin und *N*-[2-Hydroxy-1,1-bis-(hydroxymethyl)-ethyl]-glycin) dient der Aufrechterhaltung des pH-Werts. Von den 200 µl wurden 5 µl-Aliquota in 2,0 ml Polypropylen-(PP-) Reaktionsgefäßen bei -20°C eingefroren. Pro Experiment wurde ein 5 µl-Aliquot in einem PP-Röhrchen auf 5 ml Endvolumen mit eisgekühltem Inkubationspuffer verdünnt. Hiervon wurden je 50 µl für eine Probe von 500 µl Endvolumen verwendet, so dass eine approximale Endkonzentration von 70 pM [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S resultierte.

### 2.3.3 Auswertung der Daten aus [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindungsexperimenten

Die Rohdaten wurden normiert, indem die basale [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S Bindung gleich 0% und die maximale durch Pilocarpin induzierbare [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S Bindung gleich 100% gesetzt wurde.<sup>1</sup> Die erhaltenen Werte ([<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S Bindung in %) wurden gegen den dekadischen Logarithmus der Testsubstanz aufgetragen. An diese Daten wurde computerunterstützt eine sigmoidale Kurve mit Hilfe von Gleichung 6 angepasst. Dabei wurde jeweils per F-Test überprüft, ob die Kurve besser durch eine auf  $n_H = 1$  bzw.  $n_H = -1$  festgesetzte oder durch eine freilaufende Hill-Steigung beschrieben wurde.

Im Falle einer Rechtsverschiebung des Wendepunktes der Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin durch die Testsubstanz wurde untersucht, ob das Ausmaß der Rechtsverschiebung mit logarithmisch steigender Konzentration der Testsubstanz linear zunimmt (kompetitives Verhalten, Auswertung der Daten nach Arunlakshana und Schild, 1959), oder ob die Rechtsverschiebung einem Maximalwert zustrebt (allosterisches Verhalten, Auswertung nach Lanzafame et al., 1996).

Dazu wird der Verschiebefaktor (dose ratio (DR), Quotient aus den EC<sub>50</sub>-Werten der Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin in An- und Abwesenheit der Testsubstanz) gebildet:

$$DR = \frac{EC_{50, \text{Testsubstanz}}}{EC_{50, \text{Kontrolle}}} \quad (10)$$

Der dekadische Logarithmus aus der Differenz DR-1 wird gegen den dekadischen Logarithmus der Testsubstanz aufgetragen und einer Datenanpassung nach Arunlakshana und Schild (1959) oder nach Lanzafame et al. (1996) unterworfen.

#### 2.3.3.1 Datenanalyse für eine kompetitive Interaktion

Voraussetzung für diese Art der Datenanalyse ist im engeren Sinne eine parallele Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven des Agonisten unter dem Einfluss der Testsubstanz. Eine parallele Kurve ist gegenüber der Vergleichskurve horizontal verschoben, ohne dass sich Steigung oder Maximaleffekt verändern. Die Datenanpassung erfolgt nach folgender Gleichung (Arunlakshana und Schild, 1959):

<sup>1</sup> In den kinetischen Experimenten und der Untersuchung des Effektes rezeptorsättigender Konzentrationen einzelner Liganden auf die [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung wurde der Basalwert nach 60-minütiger Inkubation gleich 100% gesetzt (siehe Kapitel 3).

$$\log(\text{DR}-1) = \text{pK}_A + s \cdot \log(A) \quad (11)$$

DR	dose ratio; Quotient aus den $\text{EC}_{50}$ -Werten der Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin in An- und Abwesenheit der Testsubstanz
$\text{pK}_A$	negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten der Bindung der Testsubstanz
s	Steigung der Regressionsgeraden (Schild-Steigung)
[A]	Konzentration der Testsubstanz

Der Schnittpunkt mit der X-Achse ( $\text{pA}_2$ ) bezeichnet den negativen dekadischen Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die zu einer Verschiebung des Wendepunktes der Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurve um den Faktor 2 ( $\text{DR} = 2$ ) führt.

Ist die Interaktion zwischen Agonist und Testsubstanz kompetitiver Art, so nimmt die Steigung der Gerade aus Gleichung (11) den Wert  $s = 1$  an. Es gilt:

$$\text{pA}_2 = \text{pK}_A \quad (12)$$

Der  $\text{pK}_A$ -Wert ist der negative dekadische Logarithmus der Antagonist-Konzentration, bei der 50% der Rezeptoren besetzt sind, und ist somit ein Maß für die Affinität der Testsubstanz zum freien Rezeptor.

### 2.3.3.2 Datenanalyse für eine allosterische Interaktion

Ist der antagonistische Effekt der Testsubstanz in hohen Konzentrationen sättigbar, so liegt eine allosterische Interaktion am Rezeptor vor und die Datenpunkte der Auftragung nach Arunlakshana und Schild streben einem Plateau zu. Auf Basis des Kooperativitätsmodells nach Ehlert (1988) entwickelten Lanzafame et al. (1996) folgende Gleichung zur nichtlinearen Regressionsanalyse, mithilfe derer die Gleichgewichtsdissociationskonstante  $K_A$  der Bindung des Allosters zum freien Rezeptor (Maß für die Affinität des Allosters zum freien Rezeptor) sowie der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  für die Wechselwirkung zwischen Alloster und Orthoster berechnet werden können:

$$\log(\text{DR} - 1) = \log \left[ \frac{\alpha - 1}{1 + \frac{[\alpha \cdot K_A]}{[A]}} \right] \quad (13)$$

DR	dose ratio; Quotient aus den $\text{EC}_{50}$ -Werten der Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin in An- und Abwesenheit der Testsubstanz
$\text{pK}_A$	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Bindung der Testsubstanz
[A]	Konzentration der Testsubstanz
$\alpha$	Kooperativitätsfaktor (siehe Text)

Kooperativität bezeichnet die gegenseitige Beeinflussung der Affinität von Ligand und allosterischem Modulator zur jeweiligen Bindungsstelle. Der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  spiegelt das Ausmaß der

wechselseitigen Beeinflussung der Bindungsaffinitäten wider. Nimmt der Kooperativitätsfaktor Werte  $> 1$  an, so verringert der allosterische Modulator die Bindung des Liganden (negative Kooperativität). Nimmt der Kooperativitätsfaktor Werte zwischen 0 und 1 an, so erhöht der allosterische Modulator die Gleichgewichtsbindung des Liganden (positive Kooperativität). Dementsprechend bedeutet  $p\alpha < 0$  negative Kooperativität und  $p\alpha > 0$  positive Kooperativität.  $p\alpha = 0$  entspricht einer neutralen Kooperativität.

Anhand der Formel  $p(\alpha \cdot K_A)$  (Differenz aus  $p\alpha$  und  $pK_A$ ) lässt sich auf Basis des Kooperativitätsmodells die Bindungsaffinität des Allostere zum Orthoster-besetzten Rezeptor berechnen (Ellis, 1997).

### 2.3.3.3 Testung auf Parallelverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven

Voraussetzung für die Datenanalyse nach einem kompetitiven oder allosterischen Modell ist eine identische Steigung der Konzentrations-Effekt-Kurven, aus deren Wendepunkten Verschiebefaktoren berechnet werden. Diese Voraussetzung ist beispielsweise dann gegeben, wenn alle Konzentrations-Effekt-Kurven ausreichend durch die Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben werden. Werden einzelne Kurven signifikant besser durch einen freilaufenden Hill-Koeffizienten beschrieben, so kann nach Lew und Angus (1997) per F-Test (Kapitel 2.7) geprüft werden, ob die auf  $n_H = 1$  festgesetzte Hill-Steigung die *Gesamtheit* der Kurven ausreichend beschreibt, oder ob eine freilaufende Steigung für die *Gesamtheit* der Kurven zu einer besseren Kurvenanpassung führt. Dazu werden von den einerseits mit konstanter und andererseits mit freilaufender Steigung beschriebenen Konzentrations-Effekt-Kurven jeweils die Summen der Fehlerquadrate und die Anzahl der Freiheitsgrade addiert. Anhand dieser Parameter wird, basierend auf einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%, ein F-Wert berechnet und mit einem tabellierten F-Wert verglichen. Ist der errechnete F-Wert kleiner als der tabellierte, so ist eine Beschreibung der *Gesamtheit* der Kurven anhand einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  ausreichend. Im anderen Fall wird aus den freilaufenden Hill-Koeffizienten aller Konzentrations-Effekt-Kurven der Mittelwert gebildet und anhand eines weiteren F-Tests bestimmt, ob der gemittelte Hill-Koeffizient im Vergleich zum freilaufenden eine ausreichende Kurvenanpassung ermöglicht, so dass die Kurven anhand der gemittelten Hill-Steigung beschrieben werden können. Andernfalls liegt keine Parallelverschiebung der Kurven vor.

## 2.4 Verwendete Computerprogramme

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

**Tabelle 4:** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete EDV-Programme

## 2.5 Substanzen

### 2.5.1 Muskarinrezeptor-Agonisten

#### Pilocarpin-Hydrochlorid

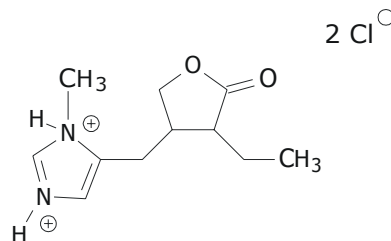
ein Partialagonist

Mr = 244,7 g/mol

**Indikationen:** lokal zur Behandlung des Engwinkelglaukoms, systemisch zur Behandlung von Mund- und Augentrockenheit bei Sjögren-Syndrom (Rote Liste 2004)

**Stammpflanze:** Pilocarpus jaborandus, Familie: Rutaceae

*Lieferant/Best-Nr.:* Sigma/P-6503

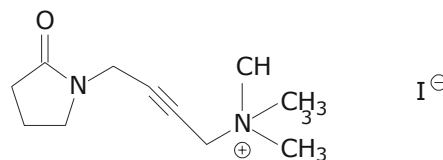


#### Oxotremorin M-Iodid

ein synthetischer Vollagonist

Mr = 322,2 g/mol

*Lieferant/Best-Nr.:* Sigma/O-100

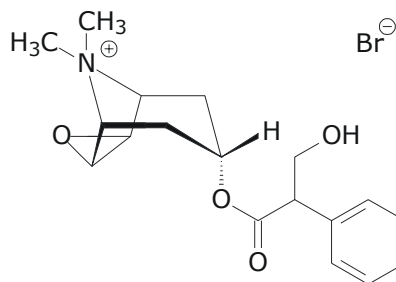


## 2.5.2 Muskarinrezeptor-Antagonisten

### N-Methylscopolamin-Bromid (NMS)

Mr = 398,3 g/mol

Lieferant/Best-Nr.: Sigma/S-8502



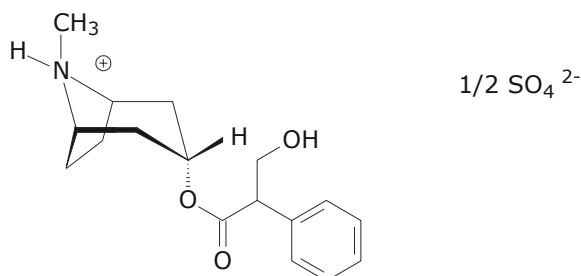
### Atropin-Sulfat

Mr = 676,8 g/mol

**Indikationen:** systemisch als Antidot bei Vergiftungen mit Insektiziden der Organophosphatgruppe, lokal zur Refraktionsbestimmung, zur Behandlung einer Iritis oder Keratitis (Rote Liste 2004)

**Stammpflanze:** Atropa bella-donna; Familie: Solanaceae

Lieferant/Best-Nr.: Sigma/A-0257

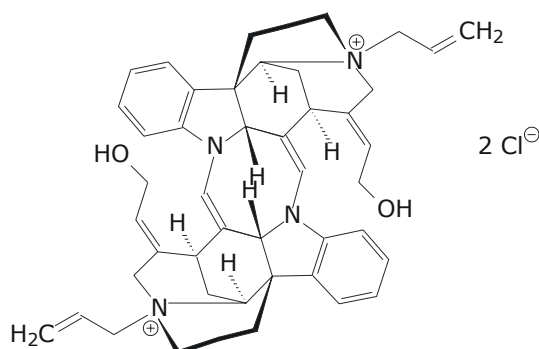


## 2.5.3 Allosterische Modulatoren

### Alcuronium-Dichlorid

Mr = 737,82 g/mol

Alcuronium ist ein allosterischer Modulator an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren und ein kompetitiver Antagonist an nikotinischen Acetylcholinrezeptoren.

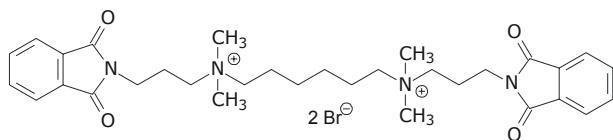


**Indikationen:** parenteral zur Muskelrelaxation einschließlich Präcurarisierung im Rahmen einer Allgemeinanästhesie, Muskelrelaxation im Rahmen der künstlichen Beatmung während der Intensivbehandlung

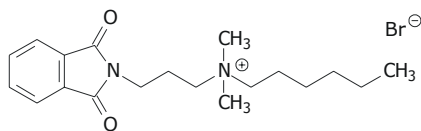
**Bezugsquelle:** Alcuronium wurde freundlicherweise überlassen von der Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Wyhlen, Deutschland).



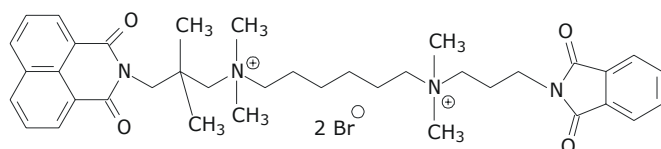
## Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen und Derivate

**W84-Dibromid**

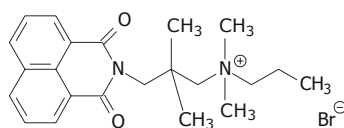
Mr = 708,5 g/mol

**SH28-Bromid**

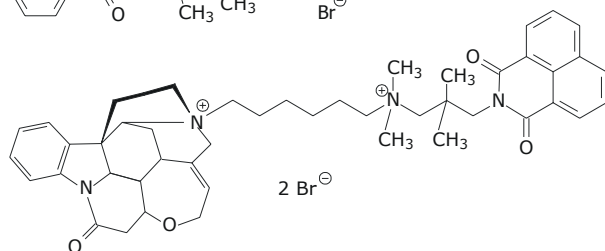
Mr = 391,4 g/mol

**Naphmethonium (MM3a)-Dibromid**

Mr = 786,6 g/mol

**MM7a-Bromid**

Mr = 433,4 g/mol

**Str6Naph-Dibromid**

Mr = 888,8 g/mol

### Herkunft:

W84: Dr. J. Pfeffer (Pharmakologisches Institut, Universität Kiel, Deutschland), synthetisiert nach einer Methode von Wassermann (1970)

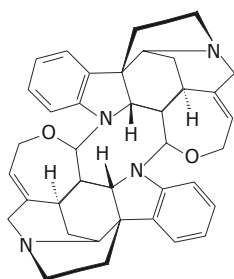
MM3a, MM7a, SH28, Str6Naph: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutisches Institut, Universität Würzburg, Deutschland); Synthese: Dr. M. Muth (MM-Substanzen), PD Dr. D. P. Zlotos (Str6Naph)

Die Leitstruktur W84 ist eine Alkan-bis-Ammonium-Verbindung mit lateralen Phthalimid-Strukturen. Bei der Substanz Naphmethonium (MM3a) wurde einer der beiden lateralen Phthalimid-Reste gegen einen Naphthalimid-Rest ausgetauscht. Von W84 bzw. Naphmethonium leiten sich die „halbierten“ Derivate SH28 bzw. MM7a ab. Str6Naph ist ein Hybrid aus MM7a und Strychnin, bei denen die beiden quartären N-Atome durch eine Hexamethylenbrücke miteinander verknüpft sind.

## Caracurine und synthetische Derivate

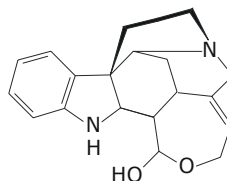
Die Caracurine I-VII wurden erstmalig aus der Rinde einer aus Venezuela stammenden Strychnos-toxifera-Pflanze isoliert und sind daher nach der Stadt Carácas benannt (Asmis et al., 1954). Caracurin V ist ein dimeres C<sub>40</sub>-Curare-Alkaloid, Caracurin VII gehört zu der Gruppe der C<sub>20</sub>-Alkaloide vom Strychnan-Typ. WGA (Wieland-Gumlich-Aldehyd) ist identisch mit Caracurin VII (Bernauer et al., 1959). In seiner cyclischen Halbacetal-Form unterscheidet sich WGA von Strychnin nur durch das

Fehlen der C<sub>2</sub>-Brücke zwischen N-1 und C-17. Bei dem synthetischen Derivat Di-WGA 6 wurden zwei Moleküle Caracurin VII über eine Hexamethylenkette unter Quaternisierung der Stickstoffatome verbrückt.



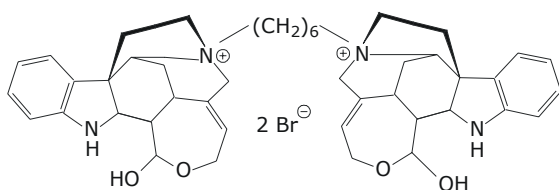
**Caracurin V (CarB)**

Mr = 584,8 g/mol



**Caracurin VII (WGA)**

Mr = 310,4 g/mol



**Di-WGA 6-Dibromid**

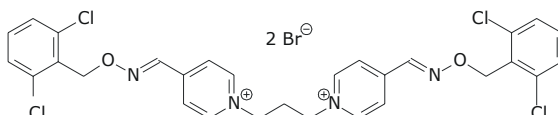
Mr = 864,8 g/mol

*Herkunft:* PD Dr. D. P. Zlotos (Synthese), Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe

### Bispyridinium-Verbindungen: Duo3-Dibromid

Duo3 ist ein allosterischer Modulator von Bispyridinium-Typ und ein Derivat des TMB-4, das nach Vergiftungen mit Organophosphaten die Acetylcholinesterase durch Umphosphorylierung reaktivieren kann.

Mr = 762 g/mol



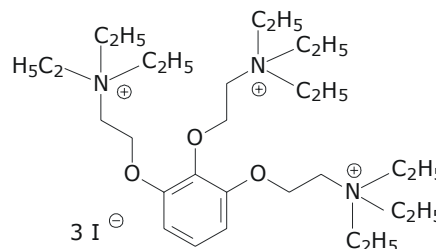
*Herkunft:* Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe

### Gallamin-Triiodid

Gallamin ist ein allosterischer Modulator an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren und ein kompetitiver Antagonist an nikotinischen Acetylcholinrezeptoren an der motorischen Endplatte.

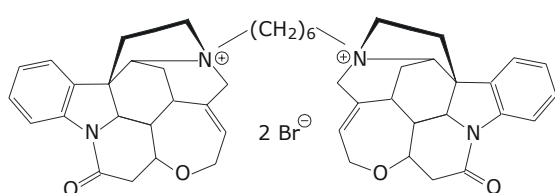
Mr = 891,54 g/mol

Sigma/G-8134



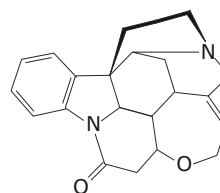
## Di-Strychnin 6 und Strychnin

Strychnin ist ein kompetitiver Antagonist an Glycin-Rezeptoren auf Motoneuronen im Rückenmark (Forth et al., 1998) und ein allosterischer Modulator an Muskarinrezeptoren (Lazareno et al., 1998; Jakubík et al., 1997). Vergiftungen äußern sich in Krampfanfällen, die bis zur Ateminsuffizienz führen können. Strychnin stammt aus den Samen der indischen Gehölze *Strychnos nux-vomica* und *Strychnos ignatii*. Bei dem synthetischen Derivat Di-Strychnin 6 wurden zwei Moleküle Strychnin über eine Hexamethylenkette unter Quaternisierung der Stickstoffatome verbrückt.



**Di-Strychnin 6-Dibromid**

Mr = 912,8 g/mol



**Strychnin**

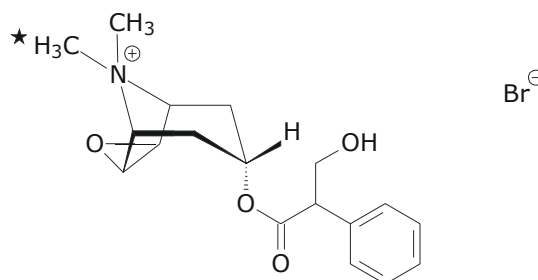
Mr = 370,9 g/mol

Lieferant/Best-Nr. von Strychnin: Sigma/S-0532

Herkunft von Di-Strychnin 6: PD Dr. D. P. Zlotos (Synthese), Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe

## 2.5.4 Radioliganden

### [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin-Bromid



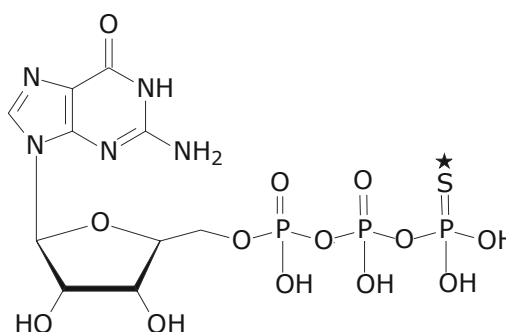
Mr = 398,3 g/mol

Lieferant: Perkin Elmer Life Sciences (Boston, USA)

spezifische Aktivität: 81 bis 83,5 Ci/mmol

### [<sup>35</sup>S]GTPγS

hydrolysestabiles GTP-Analogon



Mr = 563 g/mol

Lieferant: Perkin Elmer Life Sciences

spezifische Aktivität: 1250 Ci/mmol

## 2.6 Materialien

### 2.6.1 Reagenzien

Reagenz	Best.-Nr.	Lieferant
Aqua dest.		(Elix <sup>®</sup> )
Aqua pro analysi		(Milli-Q <sup>®</sup> )
Dimethylsulfoxid (DMSO; Mr = 78,1 g/mol)	D-5879	Sigma
D-PBS Pulver (Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline Modified)	D-5652	Sigma
Dithiothreitol (DTT; Mr = 154,3)	D-0632	Sigma
Fetales Rinder Serum	F-7524	Sigma
G418 Sulfat (Geneticin <sup>®</sup> )	345810	Calbiochem
GDP (Guanosin-5´-diphosphat), Dinatriumsalz (Mr = 487,2)	G-7127	Sigma
L-Glutamin-Lösung 200 mM	G-7513	Sigma
Hepes-Natriumsalz (Mr = 260,3 g/mol)	H-7006	Sigma
Hepes-Säure (Mr = 238,3 g/mol)	H-3375	Sigma
Humanes Serum-Albumin, Fraction V, 96-99% Albumin	A-1653	Sigma
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (Mr = 302,3 g/mol)	M-2670	Sigma
Na <sub>2</sub> -Ethylendiamintetraessigsäure(EDTA)-Dihydrat (Mr = 372,2 g/mol)	E-5134	Sigma
NaCl (Mr = 58,4 g/mol)	1.06404	Merck
Natriumbutyrat (Mr = 110,1 g/mol)	26319	Acros
Nutrient Mixture F-12 Ham (mit NaHCO <sub>3</sub> ; ohne L-Glutamin)	N-4888	Sigma
Penicillin-Streptomycin-Lösung (Penicillin 10,000 U/ml; Streptomycin 10 mg/ml)	P-0781	Sigma
Polyethylenimin-Lösung 50 % (g/ml), wässrige Lösung (PEI)	P-0781	Sigma
TRICINE (Mr = 179,2 g/mol)	T-0377	Sigma
Trypsin-EDTA-Lösung	T-3924	Sigma

## 2.6.2 Geräte

Gerät	Artikel-Nr.	Hersteller
1450 Microbeta Trilux Liquid Scintillation & Luminescence counter		Perkin Elmer
96-well-Mikrotiterplatten aus Polypropylen (Deep Well Plates)	Cat. No. AB-0564	Abgene
Beckman Counter LS-6000 SC		Beckman
Cell Scraper 25 cm 2-position blade	83.1830	Sarstedt
Centrifuge Bottles Polycarbonate (with caps) 25*104 mm; 50 ml	Reorder-No.: 357002	Beckmann
Drehzahlregler		Kinematica
Dri-Block® DB-2A		Techne
Elix®	ZLXS5005Y	Millipore
Finnpipette® 4540		Labsys
Forma Scientific Water Jacketed CO <sub>2</sub> Incubator		Forma Sc.
Gewebekulturschalen 145/20	639160	Greiner
Harvesters 96® (Mach III M, Tomtec)	963-589	Perkin Elmer
Harvesters 96® (Mach III M, Tomtec)	990607010	Perkin Elmer
Invers - Mikroskop Axiovert 25		Carl Zeiss
K MS 1 Minishaker		IKA
Meltilex™ A, 1450-441 (Szintillationswachs)		Perkin Elmer
Mikrowelle 12-611		Sharp
Milli-Q® (zur Herstellung von Aqua pro analysi)	ZMQ550FT1	Millipore
Parafilm® M laboratory film		Pechiney
Plate Cassette, 1450-105 (Zählkassette)		Perkin Elmer
Polypropylen-Röhrchen 50 ml, steril, Cellstar®	Cat. No. 227261	Greiner
Polytron-Homogenisator PT 10-35		Kinematica
Printed Filtermat A, 1450-421		Perkin Elmer
Ready Protein <sup>+TM</sup>		Beckman
Sample Bag, 1450-432 (Klarsichthülle)		Perkin Elmer
Ultrazentrifuge Avanti™ J 25, Rotortypen: JS-7.5 bzw. JA 25.50		Beckman
Ultrazentrifuge Avanti™ J J-20 XP, Rotortypen: JS-4,3 bzw. JA 25.50		Beckman
Vortexer	2-108073	Scientific
Werkbank mit gefiltertem, laminar fließendem Luftstrom		BIO-FLOW

### 2.6.3 Firmen

Kürzel	Firma, Adresse
Abgene	Abgene House, Epsom, UK
Acros	Acros Organics, Geel, Belgien
Beckman	Beckman, Palo Alto, CA, USA
Beckman	Beckman Instruments, INC, Fullerton, CA, USA
BIO-FLOW	BIO-FLOW Technik, Meckenheim
Calbiochem	Calbiochem-Novabiochem GmbH, Schwalbach
Carl Zeiss	Carl Zeiss, Jena
Forma Sc.	Forma Scientific, Marjetta, OH, USA
Greiner	Greiner Bio-One GmbH, Solingen-Wald
IKA	IKA® Works, INC., Wilmington, NC, USA
Kinematica	Kinematica AG, Littau, Schweiz
Labsys	Labsystems, Helsinki, SF
Merck	Merck KGaA, Darmstadt
Millipore	Millipore S.A. 37120 Molsheim, France
Pechiney	Pechiney Plastic Packaging Chicago, IL, USA
Perkin Elmer	Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA
Sarstedt	Sarstedt Inc., Newton, NC, USA
Scientific	Scientific Industry Inc. Bohemia, NY, 11716 USA
Sharp	Sharp P611, Hamburg
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Techne	Techne, Duxford Cambridge, UK

### 2.6.4 Lösungen

#### Butyrat Stammlösung (100 mM)

Natriumbutyrat 5,55 g wurde in 500 ml Aqua dest. gelöst.

#### G418 Stammlösung (100 mg/ml)

Das in 5 g Glasflaschen gelieferte Geniticinsulfat (G418) wurde in ein 50 ml PP-Röhrchen eingewogen. Es wurde eine entsprechende Menge Aqua pro analysi hinzupipettiert, um die chargenabhängige Wirkstärke auf 100 mg/ml einzustellen. Die Geniticinlösung wurde steril in ein anderes PP-Röhrchen filtriert und anschließend unter aseptischen Bedingungen zu je 1,0 ml aliquotiert.

### **GDP Stammlösung (10 mM)**

0,0045 g GDP wurden in 1,0 ml Aqua pro analysi gelöst, zu je 50 µl auf 2,0 ml PP-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -20°C gekühlt.

### **Polyethylenimin (PEI)-Lösung 0,1 %**

1,0 g PEI-Lösung 50% (Gew.-%) wurden ad 500 g Aqua dest. verdünnt.

## **2.6.5 Puffer**

### **Inkubationspuffer (12,5 mM Hepes, 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 125 mM NaCl)**

Hepes (*N*-[2-Hydroxyethyl]piperazin-*N'*[2-ethansulfonsäure]) Säure 9,9 g, Hepes-Salz 5,4 g, MgCl<sub>2</sub> 12,7 g und NaCl 36,5 g wurden in 5 l Wasser gelöst und der pH-Wert mit 0,1 N NaOH auf 7,4 eingestellt. Im Versuchsansatz resultierten folgende Ionenkonzentrationen: 10 mM Hepes, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl.

### **Hepes Stammlösung (200 mM)**

5,51 g Hepes-Natriumsalz wurde in 100 ml Aqua dest. gelöst und auf pH 7,4 eingestellt.

### **Homogenisationspuffer (20 mM Hepes, 10 mM Na<sub>2</sub> EDTA)**

50 ml Hepes-Stammlösung wurden mit 50 ml Na<sub>2</sub>EDTA-Lösung (100 mM) und mit Aqua dest. ad 500 ml aufgefüllt.

### **Lagerungspuffer (20 mM Hepes, 0,1 mM Na<sub>2</sub> EDTA)**

50 ml Hepes-Stammlösung wurden mit 0,5 ml Na<sub>2</sub>EDTA-Lösung (100 mM) vermischt und mit Aqua dest. ad 500 ml aufgefüllt.

### **“Phosphate Buffered Saline” (PBS)**

9,6 g D-PBS Pulver wurde in 900 ml Aqua dest. gelöst, der pH-Wert auf 7,3 eingestellt und die Lösung bei 121°C 20 Minuten lang autoklaviert. Es resultierten folgende Ionenkonzentrationen: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

### **TRICINE / DTT-Puffer**

0,0896 g TRICINE und 0,0771 g Dithiothreitol (DTT) wurden in 50,0 ml Aqua p. a. gelöst, auf pH 7,4 eingestellt und bei -20°C eingefroren.

## **2.6.6 Nährmedien**

Zur Kultivierung der CHO-Zellen wurde ein Nährmedium verwendet, dessen Zusammensetzung in Tabelle 5 aufgeführt ist.

Komponente	Volumen [ml]	Endkonzentration
Nutrient Mixture F-12 Ham	500	
Fetales Rinder Serum	50	ca. 10%
Penicillin-Streptomycin-Lösung	5	ca. 100 Einheiten/ml
L-Glutamin-Lösung	3	ca. 1 mM
Geneticinsulfat (G418)	1	0,2 mg/ml

**Tabelle 5:** Zusammensetzung des für die Züchtung der CHO-Zellen eingesetzten Nährmediums. Die einzelnen Komponenten wurden der Nutrient mixture F-12 Ham unter aseptischen Bedingungen zugefügt. Lagerung des fertig gemischten Nährmediums bei 4-8°C im Kühlschrank.

### 2.6.7 Zelllinien

CHO-Zellen, die die Subtypen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren stabil exprimieren, sind unserem Labor von Herrn Prof. Dr. G. Lambrecht (Universität Frankfurt) und von Herrn Dr. N. Birdsall (National Institute for Medical Research, London) zur Verfügung gestellt worden.

## 2.7 Statistik

Bei der Auswertung der Versuche wurden folgende statistische Parameter eingesetzt:

**Arithmetisches Mittel  $\bar{x}$ :**

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (14)$$

$x_i$ : gemessener Wert

$n$ : Anzahl der Messwerte

### Standardabweichung (SD, „standard deviation“):

Die Standardabweichung quantifiziert die Streuung eines Werte-Kollektives. Sie beschreibt, wie weit die einzelnen Werte voneinander abweichen.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (15)$$

### Standardfehler des Mittelwertes (SEM, „standard error of the mean“):

Der Standardfehler des Mittelwertes ist ein Maß für dessen Genauigkeit. Er drückt aus, wie weit der Mittelwert der Stichprobe vom wahren Mittelwert entfernt ist.



$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (16)$$

### Vergleich unterschiedlicher Modelle zur Kurvenanpassung (F-Test)

Stehen für die Datenanalyse mehrere Modelle der Kurvenanpassung zur Verfügung, kann statistisch entschieden werden, welches der Modelle die Datenpunkte ausreichend beschreibt.

Die Anzahl  $v$  der Variablen einer Gleichung und die Anzahl  $N$  der bestimmten Messpunkte definiert die Anzahl der Freiheitsgrade:

$$DF = N - v \quad (17)$$

Die Summe der Fehlerquadrate berechnet sich wie folgt:

$$SS = \sum (Y_n - R_n)^2 \quad (18)$$

$Y_n$	$n$ experimentell ermittelte Werte für die Zielvariable (z.B. Effekt eines Modulators)
$R_n$	$n$ durch Regressionsanalyse errechnete Werte für die Zielvariable

Zum Vergleich zweier Modelle bei der Datenanalyse werden zunächst die Anzahl der Variablen und die Summe der Fehlerquadrate ermittelt. Haben die beiden Gleichungen eine identische Anzahl Variablen, so wird dem Modell mit der geringeren Summe der Fehlerquadrate der Vorzug gegeben. Bei einer unterschiedlichen Anzahl an Variablen wird überprüft, ob die Einführung zusätzlicher Variablen die Summe der Fehlerquadrate überproportional reduzieren kann (Motulsky, 1999).

Beim F-Test werden die Summe der Fehlerquadrate sowie die Anzahl der Freiheitsgrade des einfacheren Modells (Gleichung a,  $ss_a$ ,  $df_a$ ) in ein Verhältnis zum komplexeren Modell (Gleichung b,  $ss_b$ ,  $df_b$ ) gesetzt. Liegt der errechnete F-Wert oberhalb eines tabellierten Wertes oder ist er mit diesem identisch, so ist diejenige Kurvenanpassung signifikant besser, die eine zusätzliche Variable aufweist.

$$F = \frac{\frac{SS_a - SS_b}{df_a - df_b}}{\frac{SS_b}{df_b}} \quad (19)$$

$ss_a$ ( $ss_b$ )	Summe der Fehlerquadrate unter Einsatz der Gleichung a (b)
$df_a$ ( $df_b$ )	Anzahl der Freiheitsgrade von Gleichung a (b)

### t-Test

Ein t-Test beantwortet die Frage nach der Wahrscheinlichkeit, mit der zwei Messreihen a und b oder deren Mittelwerte dem gleichen Wertekollektiv entstammen.

Sind die zu vergleichenden Daten voneinander unabhängig, wird ein ungepaarter t-Test angewendet. Dieser parametrische Test beruht auf der Annahme, dass die Einzelwerte normalverteilt und dass deren Streuungen gleich sind. Per F-Test wird geprüft, ob sich die Varianz bzw. die Standardabweichung der zwei Messreihen signifikant unterscheidet. Ist dies der Fall, wird eine durch Welch entwickelte Modifikation des t-Tests (Welch correction) angewendet.

Der t-Wert beschreibt das Verhältnis zwischen der Differenz der Mittelwerte ( $\bar{x}_a$ ;  $\bar{x}_b$ ) und dem Standardfehler (SE, standard error) der Differenz.

$$t_b = \frac{\bar{x}_a - \bar{x}_b}{\sqrt{\text{SE der Differenz}}} \quad (20)$$

Basierend auf dem berechneten  $t_b$ -Wert wird mittels Tabellen oder computergestützt ein p-Wert bestimmt, der die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der die Messreihen demselben Wertekollektiv entstammen.

### **Irrtumswahrscheinlichkeit**

Bei Signifikanztests wurde für die gesamte Arbeit ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  angenommen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit war somit kleiner als 5%.

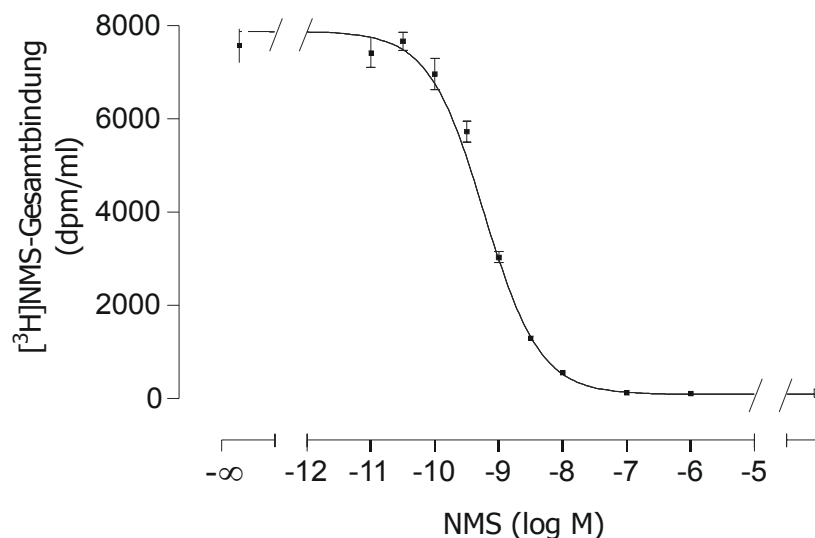
## Kapitel 3

### Ergebnisse

#### 3.1 Vorversuche an CHO-M<sub>2</sub>- und CHO-M<sub>4</sub>-Membranen

##### 3.1.1 Radioligandbindungsexperimente

Vor der Verwendung der Membransuspensionen aus CHO-M<sub>2</sub> bzw. CHO-M<sub>4</sub>-Zellen im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Experiment wurden homologe Konkurrenzexperimente mit dem muskarinischen Antagonisten *N*-Methylscopolamin (NMS) und seinem radioaktiv markierten Analogon [<sup>3</sup>H]NMS durchgeführt. Ziel war die Charakterisierung der Bindungseigenschaften der CHO-M<sub>2</sub>- und CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen durch Bestimmung der Rezeptorkonzentration (Gesamtzahl der Bindungsstellen von [<sup>3</sup>H]NMS, B<sub>max</sub>) sowie die Affinität von NMS zu den muskarinischen M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>4</sub>-Rezeptoren (K<sub>D</sub>). Abbildung 1 zeigt eine repräsentative Konkurrenzkurve, die an einem Homogenat aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen aufgenommen wurde.



**Abb. 1:** Homologe Konkurrenz zwischen [<sup>3</sup>H]*N*-Methylscopolamin ([<sup>3</sup>H]NMS; 0,2 nM) und nicht markiertem NMS an einer Membransuspension aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen.

*Ordinate:* [<sup>3</sup>H]NMS-Gesamtbindung (dpm/ml).

*Abszisse:* Logarithmus der molaren Konzentration NMS (log M).

*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus einer Dreifachbestimmung. Offenes Symbol: unspezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung, bestimmt mit 1 μM Atropin.

*Kurvenanpassung:* nichtlineare Regressionsanalyse anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung mit auf  $n_H = -1$  konstant gesetztem Hill-Koeffizienten.

## Ergebnisse

Die Versuche wurden wie unter 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Die vier Parameter enthaltende logistische Gleichung wurde zur Kurvenanpassung verwendet. Per F-Test wurde überprüft, ob die Kurven ausreichend durch die Hill-Steigung  $n_H = -1$  oder signifikant besser durch einen freilaufenden Hill-Koeffizienten beschrieben wurden. Der Hill-Koeffizient trifft eine Aussage über die Stöchiometrie der Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor. Ist der Betrag des Hill-Koeffizienten nicht signifikant verschieden von dem Wert 1, so interagieren nach Monod et al. (1965) Ligand und Rezeptorprotein im Verhältnis 1:1.

Bei dem in Abbildung 1 gezeigten Versuch betrug die in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Atropin bestimmte unspezifische Bindung 1,6 % der Gesamtbindung, die Affinitätskonstante wurde mit  $pK_D = 9,4$  ermittelt. Die Rezeptorkonzentration betrug 2359 fmol / mg Protein. Dies ist ein repräsentatives Ergebnis und spiegelt die durchschnittlichen Werte für alle  $M_2$ -Rezeptor-Membransuspensionen aus stabil transfizierten CHO-Zellen wider.

Tabelle 6 zeigt die Mittelwerte und Standardfehler der pharmakologischen Kenngrößen, berechnet für alle in dieser Arbeit untersuchten CHO- $M_2$ - und CHO- $M_4$ -Zellhomogenate.

Zelllinie	$pK_D$	$B_{\max}$ [fmol/mg Protein]	Anzahl untersuchter Homogenate
CHO $M_2$	$9,38 \pm 0,02$	$2655 \pm 171$	44
CHO $M_4$	$9,33 \pm 0,06$	$4266 \pm 461$	10

**Tabelle 6:** Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Kenngrößen der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung an den eingesetzten Membransuspensionen aus homologen Konkurrenzexperimenten.

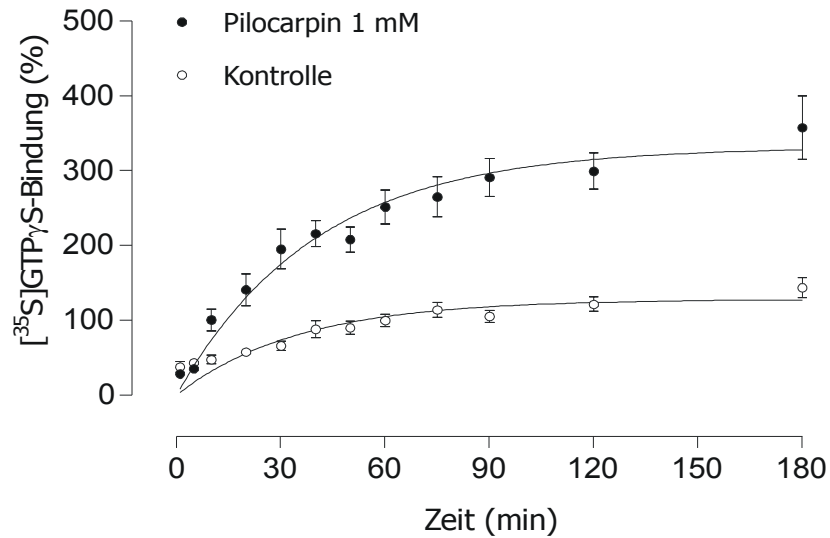
### 3.1.2 [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindungsexperimente

#### 3.1.2.1 Kinetische [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Experimente

Im [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindungsexperiment erfolgt eine Assoziation von [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S an G Proteine. Agonisten können die Assoziation beschleunigen (Senogles et al., 1990; Munshi et al., 1991; Negishi et al., 1993) oder die maximal gebundene [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Menge erhöhen (Gierschik et al., 1991; Chidiac et al., 1992). Die Aufnahme der Assoziationskinetik von [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S diente der Bestimmung des Filtrationszeitpunktes. An diesem sollte der Quotient aus Pilocarpin-induzierter und basaler [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindung ([ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz) groß und die absolute Radioligandbindung hoch sein, damit bei einem maximalen Messfenster die Anfälligkeit der Werte für experimentell bedingte Streuungen gering ist.

Die Assoziationskinetiken des Radioliganden [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S unter Kontrollbedingungen sowie unter Stimulation durch Pilocarpin in einer Rezeptorsättigenden Konzentration (1 mM) wurden an Membranpräparationen aus CHO- $M_2$ - sowie CHO- $M_4$ -Zellen aufgenommen (Abb. 2 und 3, Tabelle 7 zeigt die pharmakologischen Kenngrößen).

## Ergebnisse



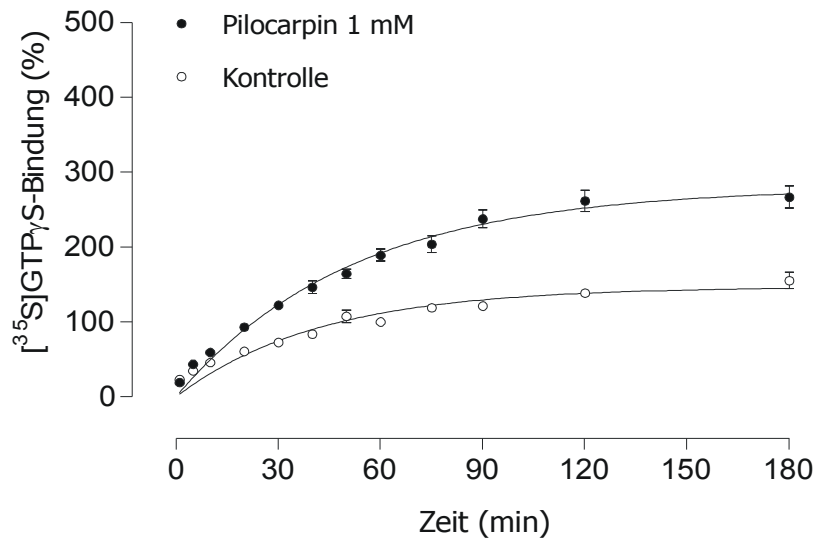
**Abb. 2:** Basale (Kontrolle) und Pilocarpin-induzierte (1 mM) Assoziationsbindungskinetik von [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S an CHO-M<sub>2</sub>-Zellmembranen.

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent. Der 60-Minuten-Wert der Kontrolle wurde auf 100% festgesetzt.

*Abszisse:* Zeit in Minuten.

*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler von acht Werten aus zwei unabhängigen Experimenten.

*Kurvenanpassung:* monophasische Assoziationskinetik.



**Abb. 3:** Basale (Kontrolle) und Pilocarpin-induzierte (1 mM) Assoziationsbindungskinetik von [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S an CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen.

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent. Der 60-Minuten-Wert der Kontrolle wurde auf 100% festgesetzt.

*Abszisse:* Zeit in Minuten.

*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler von acht Werten aus zwei unabhängigen Experimenten.

*Kurvenanpassung:* monophasische Assoziationskinetik.

## Ergebnisse

	CHO-M <sub>2</sub> -Membranen		CHO-M <sub>4</sub> -Membranen	
	Kontrolle	Pilocarpin 1 mM	Kontrolle	Pilocarpin 1 mM
Maximum [%]	128	332	147	280
Assoziationsgeschwindigkeitskonstante $k_{+1}$ [s <sup>-1</sup> ]	0,029 ± 0,004	0,025 ± 0,003	0,024 ± 0,002	0,019 ± 0,001
n	2	2	2	2

**Tabelle 7:** Kenngrößen der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Assoziationskinetiken aus Abb. 2 und 3 (Mittelwerte ± Standardfehler). Der nach 60 min erreichte Wert der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung unter Kontrollbedingungen wurde zu 100% gesetzt.

Sowohl an CHO-M<sub>2</sub>- als auch an CHO-M<sub>4</sub>-Membransuspensionen unterschieden sich die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten der basalen (Kontrolle) und der Pilocarpin-induzierten [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung nicht signifikant voneinander (t-Test,  $p = 0,51$  für CHO-M<sub>2</sub>- und  $p = 0,15$  für CHO-M<sub>4</sub>-Membranen). Die Pilocarpin-induzierte [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung erreichte ein höheres Maximum als die basale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung. Die asymptotische Annäherung der basalen und Agonist-induzierten [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an unterschiedliche Maxima beobachtete auch Chidiac et al. (1992) an muskarinischen M<sub>2</sub>-Acetylcholinrezeptoren.

Für die Assoziation von [<sup>35</sup>S]GTPγS an G Proteine, die mit muskarinischen M<sub>2</sub>-Rezeptoren in Lipidvesikeln zusammengebracht wurden, ermittelten Jakubík et al. (1998) eine Geschwindigkeitskonstante von  $0,029 \pm 0,001 \text{ s}^{-1}$  ( $n = 5$ ). Der Wert stimmt mit dem in dieser Arbeit gefundenen genau überein.

Der Quotient aus Pilocarpin-induzierter und basaler [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung wurde bei Experimenten mit CHO-M<sub>2</sub>- und CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen nach etwa 30 Minuten maximal (Tab. 8), jedoch stieg die absolut gebundene Menge [<sup>35</sup>S]GTPγS nach 30 Minuten noch deutlich an (Abb. 2 und 3). Die Inkubationsdauer wurde deshalb analog der vorangegangenen Arbeit von Zahn et al. (2002) auf 60 Minuten festgesetzt. In der Literatur finden sich für Membranpräparationen mit muskarinischen Rezeptoren Inkubationszeiträume zwischen 30 und 90 Minuten (Hilf und Jakobs, 1992; Birdsall et al., 1998; Zahn et al., 2002).

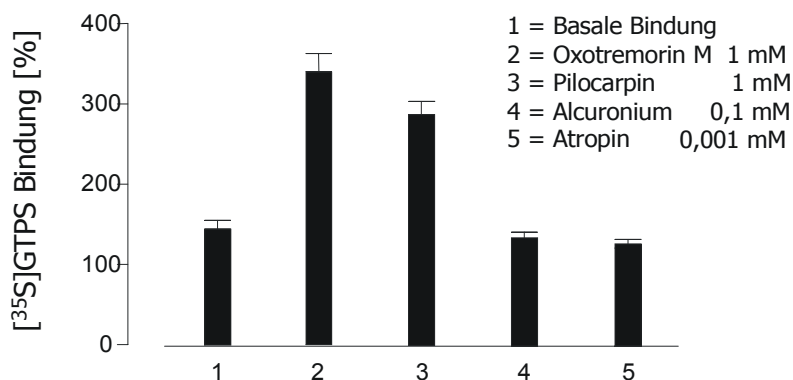
Zeit (min)	1	5	10	20	30	40	50	60	75	90	120	180
Quotient CHO M <sub>2</sub>	0,9 ± 0,4	0,9 ± 0,3	2,1 ± 0,7	2,6 ± 1,2	3,0 ± 0,7	2,5 ± 0,4	2,5 ± 0,8	2,5 ± 0,4	2,4 ± 0,8	2,9 ± 0,6	2,6 ± 0,1	2,5 ± 0,8
Quotient CHO M <sub>4</sub>	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,0	1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1

**Tabelle 8:** Quotient aus Pilocarpin-induzierter und basaler [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung (Mittelwerte ± Standardfehler,  $n = 2$ ) an CHO-M<sub>2</sub>- und CHO-M<sub>4</sub>-Membransuspensionen. Es liegen die Werte aus Abb. 2 und 3 zu Grunde.

### 3.1.2.2 Effekt rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden

CHO-Wildtyp-Zellen besitzen keine muskarinischen Rezeptoren (Buckley et al., 1989; Eckstein 2003). Die Messung der Agonist-induzierten [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an CHO-M<sub>2</sub>- und CHO-M<sub>4</sub>-Zellemembranen ist daher für den jeweiligen stabil transfizierten Rezeptorsubtyp spezifisch.

Für die einzelnen CHO-M<sub>2</sub>- und CHO-M<sub>4</sub>-Membranpräparationen wurde in einem Vorversuch nach 60minütiger Inkubation das durch muskarinische Agonisten und Antagonisten aufgeschlossene Messfenster bestimmt. Dazu wurden die Effekte von Oxotremorin M (Agonist), Pilocarpin (Partialagonist), Alcuronium (Alloster) und Atropin (Antagonist) in rezeptorsättigenden Konzentrationen (Abb. 4) auf die basale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung ([<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz) ermittelt. Als „rezeptorsättigend“ galten diejenigen Konzentrationen, die im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Experiment einen maximalen Effekt hervorriefen. Oxotremorin M und Pilocarpin induzierten in dieser Arbeit in der Konzentration 1 mM ihre höchste [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung. Alcuronium und Atropin verhielten sich in der Arbeit von Zahn et al. (2002) invers agonistisch und senkten in den Konzentrationen 0,1 mM bzw. 0,001 mM die basale Bindung maximal. Abbildung 4 zeigt ein repräsentatives Ergebnis, aufgenommen an einem CHO-M<sub>2</sub>-Zellhomogenat.



**Abb. 4:** Effekt rezeptorsättigender Konzentrationen einzelner muskarinischer Liganden auf die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen. Repräsentatives Experiment.

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung in % der basalen [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz

*Abszisse:* Untersuchte Substanzen in rezeptorsättigenden Konzentrationen.

*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler (n = 7).

Der Agonist Oxotremorin M (1 mM) steigerte in dem vorliegenden, repräsentativen Experiment die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung von 100% (Basalwert) auf 295 ± 11%, der Partialagonist Pilocarpin erhöhte die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung auf 243 ± 8%. Alcuronium und Atropin senkten die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung auf 90 ± 7% und 83 ± 6%.

Tabelle 9 zeigt die Effekte (Mittelwerte ± Standardfehler) rezeptorsättigender Konzentrationen von Oxotremorin M, Pilocarpin, Alcuronium und Atropin, berechnet für alle innerhalb dieser Arbeit verwendeten CHO-M<sub>2</sub>- sowie CHO-M<sub>4</sub>-Zellhomogenate.

## Ergebnisse

Zelllinie	Effekt (%)				Anzahl untersuchter Homogenate
	Oxotremorin M 1 mM	Pilocarpin 1 mM	Alcuronium 0,1 mM	Atropin 0,001 mM	
CHO M <sub>2</sub>	325 ± 12 <sup>#*</sup>	245 ± 7 <sup>*</sup>	91 ± 3 <sup>*</sup>	86 ± 2 <sup>*</sup>	38 (30 für Alcuronium)
CHO M <sub>4</sub>	229 ± 15 <sup>#*</sup>	180 ± 9 <sup>*</sup>	88 ± 2 <sup>*</sup>	94 ± 3	10 (5 für Alcuronium)

**Tabelle 9:** Effekt von Rezeptorsättigenden Konzentrationen einzelner muskarinischer Liganden auf die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M<sub>2</sub>- und CHO-M<sub>4</sub>-Zellen (Mittelwerte ± Standardfehler der Bindung in Prozent der basalen [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung).

\* Signifikante Abweichung von der basalen [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung (100%; t-Test, p < 0,05).

# Signifikant unterschiedlich von dem Pilocarpin-Effekt (t-Test, p < 0,05).

Der Vollagonist Oxotremorin M induzierte eine im Vergleich zu dem Partialagonisten Pilocarpin höhere Rezeptorvermittelte [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung. Für den M<sub>2</sub>-Rezeptor und für den M<sub>4</sub>-Rezeptor ist dieser Unterschied statistisch signifikant (t-Test, p < 0,0001). Die maximale Pilocarpin-induzierte [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung liegt zwischen der basalen und der maximalen Oxotremorin M-stimulierten [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung. Der partialagonistische Charakter von Pilocarpin erlaubt die Messung einer allosterischen Steigerung sowie einer allosterischen Senkung des Pilocarpin-Maximaleffektes. Auch in der Literatur zeigt Pilocarpin im Vergleich zu Oxotremorin M an CHO-M<sub>2</sub>- sowie CHO-M<sub>4</sub>-Membranen einen partialagonistischen Effekt (Lazareno et al., 1993).

Die Verminderung der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung durch Alcuronium und Atropin ist für die Gesamtheit der CHO-M<sub>2</sub>-Zellmembranen zwar statistisch signifikant (Tab. 9), jedoch schließt das kleine Messfenster eine Aufnahme von Konzentrations-Effekt-Kurven für invers agonistische Substanzen aus. In der Literatur wurde für Atropin in Bezug auf die Modulation der basalen [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an M<sub>2</sub>-Rezeptoren enthaltenden Membranen neben neutralem Antagonismus (Lazareno und Birdsall, 1993) auch inverser Agonismus beschrieben (Hilf und Jakobs, 1992; Jakubík et al., 1998; Zahn et al., 2002). Auch für Alcuronium ist bekannt, dass es den Basalwert der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung zu senken vermag (Jakubík et al., 1998; Zahn et al., 2002).

Die beiden agonistisch wirksamen Substanzen Oxotremorin M und Pilocarpin induzierten eine höhere M<sub>2</sub>-Rezeptor- als M<sub>4</sub>-Rezeptor-vermittelte [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung. Dieser Unterschied ist im Falle des Pilocarpins signifikant (t-Test, p = 0,001). Der größere Maximaleffekt an M<sub>2</sub>-Rezeptoren kann nicht auf eine entsprechend höhere Expressionsdichte der Rezeptoren zurückgeführt werden, da diese in CHO-M<sub>4</sub>-Homogenaten statistisch signifikant höher als in CHO-M<sub>2</sub>-Homogenaten war (t-Test, p = 0,0003; siehe Tab. 6). Akam et al. (2001) beobachteten für den Agonisten Methacholin im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Experiment einen höheren Maximaleffekt an CHO-M<sub>2</sub>- als an CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen.

In Bezug auf die auf 100% festgesetzte basale Bindung rief Pilocarpin in der Konzentration 1 mM in den verwendeten CHO-Zellhomogenaten eine Steigerung der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung um den Faktor 1,69 bis 3,52 (CHO-M<sub>2</sub>, Einzelwerte siehe Anhang) bzw. um den Faktor 1,48 bis 2,37 (CHO-M<sub>4</sub>, Einzelwerte



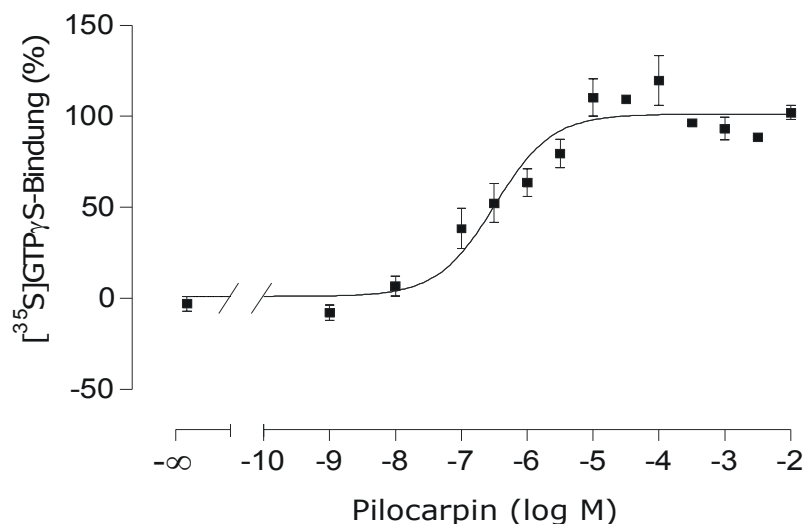
## Ergebnisse

siehe Anhang) hervor. Um eine allosterische Veränderung relativ zu den unterschiedlichen Pilocarpin-Maximaleffekten messen zu können, wurden in jedem der folgenden Experimente die Daten normalisiert, indem die basale [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindung auf 0% und die maximale durch Pilocarpin induzierbare [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindung auf 100% festgesetzt wurde.

## 3.2 Versuche mit CHO-M<sub>2</sub>-Zellmembranen

### 3.2.1 Konzentrationsabhängiger Effekt von Agonisten

Für den Partialagonisten Pilocarpin und den Vollagonisten Oxotremorin M wurde die konzentrationsabhängige [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an CHO-M<sub>2</sub>-Zellmembranen aufgenommen (Abb. 5 und 6), um zu überprüfen, ob die Wirksamkeit (Lage des Wendepunktes) der Agonisten mit literaturbekannten Daten übereinstimmt.



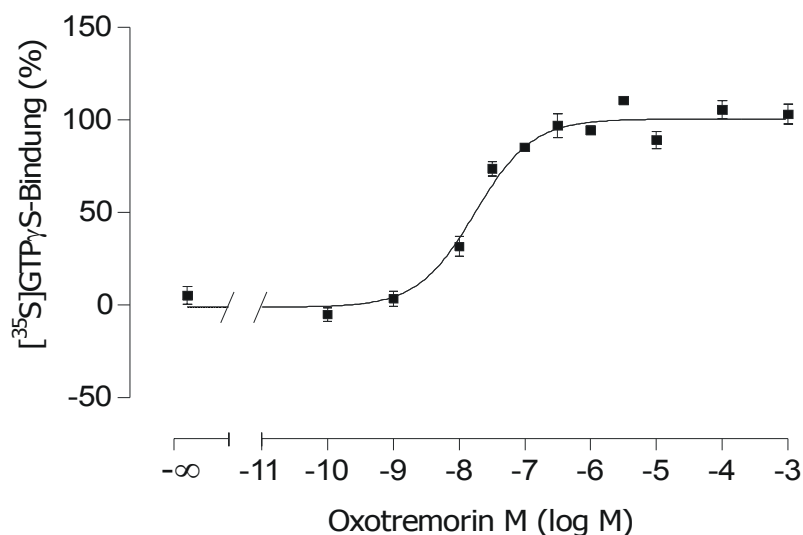
**Abb. 5:** Effekt von Pilocarpin auf die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an CHO-M<sub>2</sub>-Zellmembranen.

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.

*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 3 Experimenten in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* nichtlineare Regressionsanalyse anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung mit auf n<sub>H</sub> = 1 konstant gesetztem Hill-Koeffizienten (siehe Text).



**Abb. 6:** Effekt von Oxotremorin M auf die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an CHO-M<sub>2</sub>-Zellmembranen.

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Oxotremorin M.

*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 4 Experimenten in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* nichtlineare Regressionsanalyse anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung mit auf n<sub>H</sub> = 1 konstant gesetztem Hill-Koeffizienten (siehe Text).

## Ergebnisse

Die Daten wurden prozentualisiert, indem der Basalwert der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung ([<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz) auf 0% und der Maximaleffekt des jeweiligen Agonisten auf 100% festgesetzt wurde (siehe Kapitel 3.1.2.2). Zur Kurvenanpassung wurde die vier Parameter enthaltende logistische Gleichung verwendet. Der in den Vorversuchen (Abb. 5) bestimmte Logarithmus der halbmaximal effektiven Pilocarpin-Konzentration lag bei  $pEC_{50} = 6,49 \pm 0,14$  ( $n = 3$ ), der Wendepunkt der Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurve bei  $pEC_{50} = 7,76 \pm 0,08$  ( $n = 4$ ). Per F-Test wurde geprüft, ob die Hill-Steigung  $n_H = 1$  die Daten ausreichend beschreibt, oder ob ein nicht festgesetzter Hill-Koeffizient eine signifikant genauere Kurvenanpassung ermöglicht. Da der auf  $n_H = 1$  konstant gesetzte Steigungswert ausreichend war, dürfte der Effekt von Pilocarpin proportional der Rezeptorbesetzung sein (siehe Kapitel 4.3.2.3) und eine dem Massenwirkungsgesetz folgende Wechselwirkung von Ligand und Rezeptor im Verhältnis 1:1 vorliegen (Monod et al., 1965). Der freilaufende Hill-Koeffizient betrug  $0,68 \pm 0,17$  (Pilocarpin; Werte der Einzelerperimente:  $0,59 \pm 0,27$ ;  $0,82 \pm 0,43$ ;  $0,89 \pm 0,30$ ) bzw.  $1,22 \pm 0,21$  (Oxotremorin M; Werte der Einzelerperimente:  $1,09 \pm 0,27$ ;  $1,48 \pm 0,70$ ;  $0,88 \pm 0,41$ ;  $1,21 \pm 0,34$ ). Die freilaufenden Hill-Koeffizienten der Pilocarpin- und Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 5 und 6 unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (t-Test,  $p = 0,09$ ).

In den Vorversuchen wurden Pilocarpin-Konzentrationen bis zu 10 mM eingesetzt (Abb. 5), während in der weiteren Arbeit oftmals 1 mM Pilocarpin die höchste untersuchte Konzentration darstellte. Zusätzlich wurden *alle* in dieser Arbeit an CHO-M<sub>2</sub>-Membranen bestimmten Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven gemittelt und der erhaltene Wert in Tabelle 10 den Literaturwerten gegenübergestellt. Die in der weiteren Arbeit zur Kontrolle mitgeführten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven wurden ebenfalls ausreichend durch eine Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben.

Quelle	Agonist	Gewebe	Methode	$pEC_{50}$	n
diese Arbeit	Pilocarpin	CHO M <sub>2</sub> -Zellhomogenate	[ <sup>35</sup> S]GTPγS-Bindungsexperiment	$6,43 \pm 0,03$	16
McKinney et al., 1991	Pilocarpin	CHO M <sub>2</sub> -Zellen	Messung der cAMP-Bildung	4,96	5
Zahn et al., 2002	Pilocarpin	CHO M <sub>2</sub> -Zellhomogenate	[ <sup>35</sup> S]GTPγS-Bindungsexperiment	$5,48 \pm 0,12$	3
Zahn et al., 2002	Pilocarpin	Meerschweinchen-vorhof	Messung der Kontraktionskraft am Meerschweinchenvorhof	$6,10 \pm 0,03$	13
diese Arbeit	Oxotremorin M	CHO M <sub>2</sub> -Zellhomogenate	[ <sup>35</sup> S]GTPγS-Bindungsexperiment	$7,76 \pm 0,08$	4
Zahn et al., 2002	Oxotremorin M	CHO M <sub>2</sub> -Zellhomogenate	[ <sup>35</sup> S]GTPγS-Bindungsexperiment	$7,32 \pm 0,11$	3
Zahn et al., 2002	Oxotremorin M	Meerschweinchen-vorhof	Messung der Kontraktionskraft am Meerschweinchenvorhof	$7,92 \pm 0,05$	8

**Tabelle 10:** Mittelwerte und Standardfehler der Wendepunkte von Pilocarpin- und Oxotremorin M- Konzentrations-Effekt-Kurven.

$pEC_{50}$  Konzentration des Agonisten, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft (Wendepunkt der Kurve).

## Ergebnisse

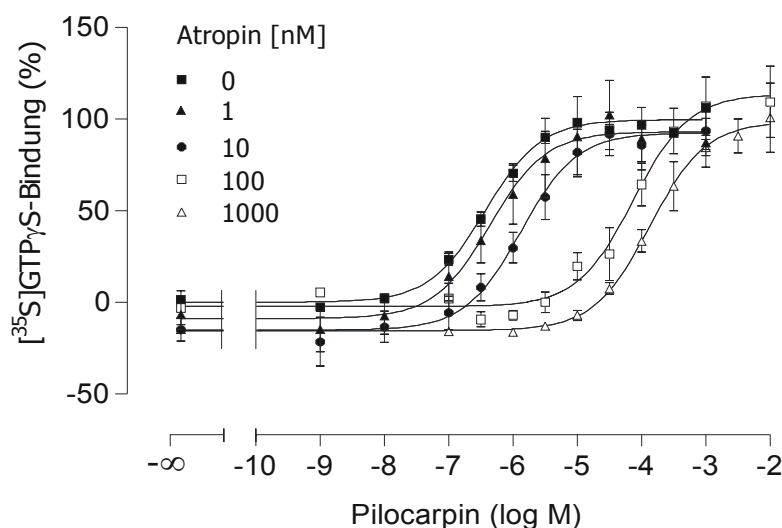
Die halbmaximal effektive Pilocarpin-Konzentration dieser Arbeit ( $pEC_{50} = 6,43 \pm 0,03$ ;  $n = 16$ ) weicht von der in cAMP-Bildungsexperimenten ( $pEC_{50} = 4,96$ ,  $n = 5$ ; McKinney et al., 1991), in [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindungsexperimenten ( $pEC_{50} = 5,48 \pm 0,12$ ;  $n = 3$ ; Zahn et al., 2002) und in Organbadversuchen ermittelten ( $pEC_{50} = 6,10 \pm 0,03$ ;  $n = 13$ ; Zahn et al., 2002) etwas ab. Der in dieser Arbeit bestimmte Wendepunkt von Oxotremorin M liegt jedoch in der gleichen Größenordnung wie der von Zahn et al. (2002) in [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindungsexperimenten ermittelte  $pEC_{50}$  ( $7,32 \pm 0,11$ ;  $n = 3$ ) und unterscheidet sich nicht signifikant dem von durch Zahn et al. (2002) in funktionellen Experimenten an Meerschweinchenherzvorhöfen erhobenen  $pEC_{50}$  ( $7,92 \pm 0,05$ ;  $n = 8$ ; t-Test,  $p = 0,11$ ).

In den folgenden Experimenten dienen die pharmakologischen Kenndaten der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven (Wendepunkt und Maximaleffekt, in jedem Experiment durch eine mitgeführte Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve als Kontrolle bestimmt) als Bezugsgrößen für die Quantifizierung des Einflusses allosterischer Modulatoren.

### 3.2.2 Effekt des kompetitiven Antagonisten Atropin

Zur Charakterisierung einer Konkurrenz um die orthosterische Bindungsstelle und der Abgrenzung zu einer allosterischen Modulation auf Ebene der G Protein-Aktivierung wurde der Einfluss des orthosterischen Antagonisten Atropin auf die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin untersucht.

Den konzentrationsabhängigen Effekt von Atropin auf die durch Pilocarpin induzierte G Protein-Aktivierung, gemessen anhand der Bindung von [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S, zeigt Abbildung 7. Alle Kurven wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1).



**Abb. 7:** Einfluss von Atropin auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen.  
*Ordinate:* [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-4$  (Kontrolle:  $n = 12$ ) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* nichtlineare Regressionsanalyse anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung mit auf  $n_H = 1$  konstant gesetztem Hill-Koeffizienten (siehe Kapitel 3.2.1).

## Ergebnisse

In Tabelle 11 sind die Kennwerte der Kurven dargestellt (Wendepunkt und Maximaleffekt, beruhend auf der Steigung  $n_H = 1$ ). Zusätzlich werden in Tabelle 11 die freilaufenden Hill-Koeffizienten aufgeführt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.

	Kontrolle	Atropin 1 nM	Atropin 10 nM	Atropin 100 nM	Atropin 1000 nM
pEC <sub>50</sub>	6,43 ± 0,04	6,35 ± 0,20	5,87 ± 0,12 <sup>◊</sup>	4,22 ± 0,14 <sup>◊</sup>	3,89 ± 0,09 <sup>◊</sup>
Emax (%)	100 ± 1	93 ± 7	92 ± 5	111 ± 7	99 ± 4
n	12	3	3	4	2
n <sub>H</sub> (freilaufend)	0,93 ± 0,08	0,93 ± 0,40	0,93 ± 0,23	1,06 ± 0,30	0,91 ± 0,18

**Tabelle 11:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Atropin (Mittelwerte ± Standardfehler).

pEC<sub>50</sub> negativer dekadischer Logarithmus der Pilocarpin-Konzentration, die eine halbmaximale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung hervorruft, beruhend auf dem Hill-Koeffizienten  $n_H = 1$ .

Emax Maximaleffekt von Pilocarpin (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), beruhend auf dem Hill-Koeffizienten  $n_H = 1$ .

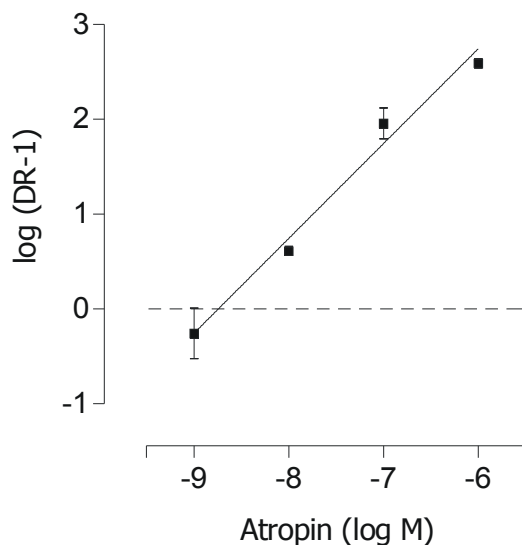
n<sub>H</sub> Hill-Koeffizient.

◊ Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test,  $p < 0,001$ ).

Atropin in Konzentrationen ab 10 nM verschob den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve statistisch signifikant nach rechts. Die Wirksamkeit von Pilocarpin wird also durch Atropin vermindert. Den Maximaleffekt von Pilocarpin, der ein Ausdruck der intrinsischen Aktivität ist, verändert Atropin nicht.

Die Rechtsverschiebung des Wendepunktes der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven durch verschiedene Konzentrationen Atropin wurde durch die Berechnung von Verschiebefaktoren für die Einzelexperimente (siehe Kapitel 2.3.3) quantifiziert. Dazu wurde der Quotient (dose ratio, DR) aus dem Wendepunkt jeder einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin in Anwesenheit von Atropin und dem Wendepunkt der jeweils mitgeführten Pilocarpin-Kontrollkurve berechnet. Im Falle einer kompetitiven Interaktion zweier Substanzen verhält sich das Ausmaß der Verschiebung ( $\log(DR-1)$ , siehe Abb. 8) linear zur logarithmierten Antagonist-Konzentration, ausgedrückt durch eine Schild-Gerade mit der Steigung  $s = 1$  (Arunlakshana und Schild, 1959). Voraussetzung für diese Art der Datenanalyse ist die Rechtsverschiebung der Wendepunkte durch den Antagonisten ohne Veränderung der Steilheit der Kurve. Diese Voraussetzung ist erfüllt, da sämtliche Konzentrations-Effekt-Kurven in Abbildung 7 ausreichend durch die Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben werden.

## Ergebnisse



**Abb. 8:** Verschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven, abhängig von der Atropin-Konzentration. *Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) minus eins:  $DR = EC_{50, Pilocarpin}$  in Anwesenheit von Atropin dividiert durch  $EC_{50, Pilocarpin}$  in Abwesenheit von Atropin. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Atropin. *Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-4$  Experimenten in Vierfachbestimmung pro Atropin-Konzentration. *Anpassung der Geraden:* anhand der Gleichung nach Arunlakshana und Schild (1959); es liegen die Kurven aus Abb. 7 zu Grunde.

Die Auswertung der Verschiebefaktoren nach dem kompetitiven Modell (Arunlakshana und Schild, 1959) in Abbildung 8 ergab eine Schild-Gerade mit der Steigung  $s = 1$ . Eine freilaufende Steigung ebenso wie die Anwendung der Gleichung von Lanzafame et al. (1996) führten zu keiner signifikant besseren Anpassung (F-Test,  $p < 0,05$ ). Es wurde eine Affinität von Atropin zum freien  $M_2$ -Rezeptor von  $pK_A = 8,74 \pm 0,08$  ( $n = 12$ ) ermittelt. In Tabelle 12 wird dieser Wert Literaturdaten gegenübergestellt.

Quelle	$pK_A$	n	Gewebe	Methode
diese Arbeit	$8,74 \pm 0,08$	12	CHO $M_2$ -Zellhomogenate	$[^{35}S]$ GTP $\gamma$ S-Bindungsexperiment
Jakubík et al., 1995	$9,41 \pm 0,26^*$	3	CHO $M_2$ -Zellhomogenate	$[^3H]$ NMS-Bindungsexperiment
Jakubík et al., 1995	$9,36 \pm 0,27^*$	3	Rattencardiomyozyten	cAMP-Bildungsexperiment
Dong et al., 1995	$8,95 \pm 0,23$	2	Sf9-Zellen	$[^3H]$ NMS-Bindungsexperiment
Lazareno et al., 1993	$8,53 \pm 0,03$ $8,57 \pm 0,03$ $8,62 \pm 0,02$ $8,67 \pm 0,02$	2	CHO $M_2$ -Zellhomogenate	$[^3H]$ NMS-Bindungsexperiment
Tränkle et al., 1998	$9,10 \pm 0,05^*$	4-6	Meerschweinchenherz-Membranen	$[^3H]$ NMS-Bindungsexperiment
Zahn et al., 2002	$9,01 \pm 0,10$	2	CHO $M_2$ -Zellhomogenate	$[^{35}S]$ GTP $\gamma$ S-Bindungsexperiment

**Tabelle 12:** Mittelwerte und Standardfehler der Affinität von Atropin ( $pK_A$ ) zum freien  $M_2$ -Rezeptor.

\* Signifikante Abweichung vom  $pK_A$ -Wert dieser Arbeit ( $p < 0,05$ ).

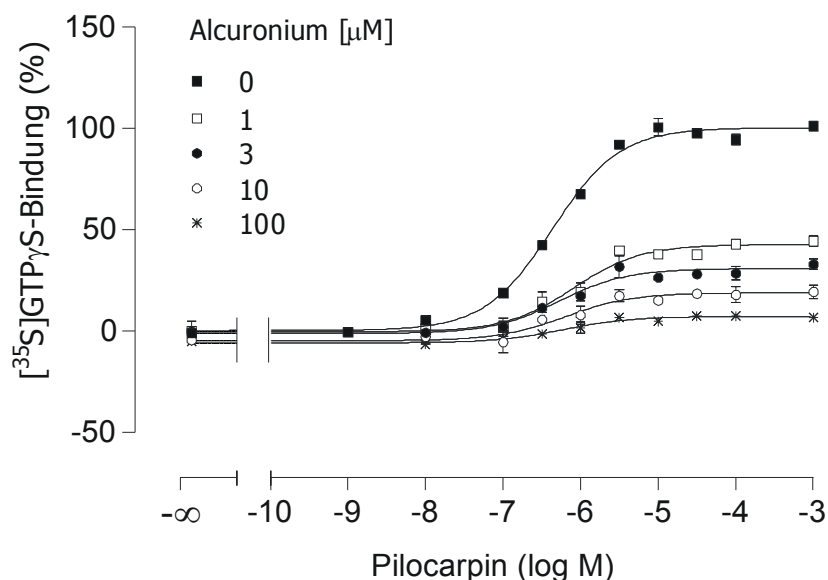
Der  $pK_A$ -Wert von Atropin dieser Arbeit weicht nicht signifikant von dem durch Dong et al. (1995) und Zahn et al. (2002) ermittelten ab ( $p = 0,92$  und  $p = 0,21$ ). Insgesamt liegt der in dieser Arbeit bestimmte  $pK_A$ -Wert von Atropin in der gleichen Größenordnung und somit in guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten.

### 3.2.3 Allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung

#### 3.2.3.1 Alcuronium

In Radioligandbindungsexperimenten erhöhte der allosterische Modulator Alcuronium die Gleichgewichtsbindung von Pilocarpin zum  $M_2$ -Rezeptor (Jakubík et al., 1997). Doch fand man in  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Experimenten eine durch Alcuronium vermittelte Verminderung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin bei unveränderter Affinität (Zahn et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst der von Zahn et al. (2002) erhobene Befund reproduziert werden. Dazu wurde der Einfluss von Alcuronium auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin bestimmt (Abb. 9). Alle Kurven wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 13 dargestellten Kennwerte der Kurven (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.



**Abb. 9:** Einfluss von Alcuronium auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO- $M_2$ -Zellen.  
*Ordinate:*  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2$  (Kontrolle:  $n = 8$ ) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* nichtlineare Regressionsanalyse anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung mit auf  $n_H = 1$  konstant gesetztem Hill-Koeffizienten (siehe Kapitel 3.2.1).

## Ergebnisse

	Kontrolle	Alc. 1 $\mu\text{M}$	Alc. 3 $\mu\text{M}$	Alc. 10 $\mu\text{M}$	Alc. 100 $\mu\text{M}$
pEC <sub>50</sub>	6,36 $\pm$ 0,03	6,09 $\pm$ 0,13	6,27 $\pm$ 0,14	6,20 $\pm$ 0,20	6,23 $\pm$ 0,14
Emax (%)	100 $\pm$ 1	43 $\pm$ 2 <sup>◊</sup>	31 $\pm$ 1 <sup>◊</sup>	19 $\pm$ 2 <sup>◊</sup>	7 $\pm$ 1 <sup>◊</sup>
n	8	2	2	2	2
n <sub>H</sub> (freilaufend)	1,05 $\pm$ 0,07	1,28 $\pm$ 0,38	1,20 $\pm$ 0,51	1,13 $\pm$ 0,34	1,14 $\pm$ 0,31

**Tabelle 13:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Alcuronium (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler).

pEC<sub>50</sub> Negativer dekadischer Logarithmus der Pilocarpin-Konzentration, die eine halbmaximale [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung hervorruft, beruhend auf dem Hill-Koeffizienten n<sub>H</sub> = 1.

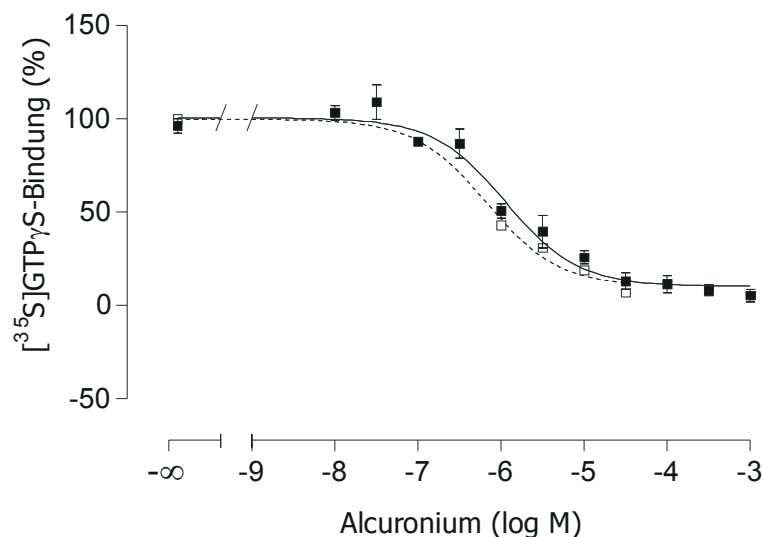
Emax Maximaleffekt von Pilocarpin (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), beruhend auf dem Hill-Koeffizienten n<sub>H</sub> = 1.

n<sub>H</sub> Freilaufender Hill-Koeffizient; führt laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung.

◊ Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, p < 0,001).

Analog zu den Befunden von Zahn et al. (2002) zeigte Alcuronium keinen signifikanten Einfluss auf die Lage des Wendepunktes der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve, senkte jedoch den Maximaleffekt von Pilocarpin konzentrationsabhängig. Die intrinsische Aktivität wurde also vermindert, ohne dass die Wirksamkeit von Pilocarpin verändert wurde.

Da sämtliche Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven ein oberes Plateau erreichten (Abb. 9), konnte der Einfluss von Alcuronium auf den Maximaleffekt von Pilocarpin bestimmt werden, indem die G Protein-Aktivierung durch 1 mM Pilocarpin in Anwesenheit von steigenden Alcuronium-Konzentrationen vermessen wurde (Abb. 10, geschlossene Symbole). Um zu zeigen, dass die Daten übereinstimmen, wurden die Emax-Werte von Pilocarpin für die einzelnen Alloster-Konzentrationen (Abb. 9 / Tab. 13) in Abbildung 10 ergänzt (offene Symbole).



**Abb. 10:** Einfluss von Alcuronium auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM).

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Alcuronium.

*Datenpunkte:* Geschlossene Symbole: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus n = 4 Experimenten in Vierfachbestimmung. Offene Symbole: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Emax-Werte aus Abb. 9 bzw. Tab. 13.

*Kurvenanpassung:* nichtlineare Regressionsanalyse anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung mit auf n<sub>H</sub> = -1 konstant gesetztem Hill-Koeffizienten (siehe Text).



## Ergebnisse

Die Kurvenanpassungen erfolgten anhand des Hill-Koeffizienten  $n_H = -1$  (siehe Kapitel 3.2.1). Der freilaufende Hill-Koeffizient betrug  $-0,79 \pm 0,14$  (geschlossene Symbole) und führte laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung. Bei der Auftragung der Emax-Werte (offene Symbole) beschrieb der freilaufende Hill-Koeffizient  $n_H = -0,28 \pm 0,01$  die Kurve signifikant genauer; angemerkt sei jedoch, dass dieser Hill-Koeffizient vermutlich darauf beruht, dass die Kurve nicht vollständig beschrieben ist.

Bei der experimentellen Bestimmung des Einflusses steigender Alcuronium-Konzentrationen auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Maximaleffekt (Abb. 10, geschlossene Symbole) wurde ein halbmaximaler Effekt von Alcuronium ( $pIC_{50}$ -Wert) von  $5,95 \pm 0,09$  ( $n = 4$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 10 \pm 3\%$  gefunden. Dieser Wert unterscheidet sich signifikant von 0% (t-Test,  $p = 0,045$ ). Alcuronium senkt also die intrinsische Aktivität von Pilocarpin nicht vollständig. Anhand der Auftragung der oberen Plateaus der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit von bestimmten Alcuronium-Konzentrationen (Emax-Werte aus Abb. 10, offene Symbole) berechnete sich ein  $pIC_{50}$ -Wert von  $6,17 \pm 0,14$  ( $n = 2-8$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 10 \pm 3\%$ . Auch dieser Wert ist signifikant größer als 0% (t-Test,  $p = 0,045$ ). Zwischen den  $pIC_{50}$ -Werten und  $E_{min}$ -Werten aus beiden Auftragungen besteht kein signifikanter Unterschied (t-Test,  $p = 0,20$  für die  $pIC_{50}$ -Werte und  $p > 0,99$  für die  $E_{min}$ -Werte).

Einen Vergleich der pharmakologischen Kenngrößen mit den von Zahn et al. (2002) gefundenen zeigt Tabelle 14.

	diese Arbeit	Zahn et al., 2002
$pIC_{50}$	$5,95 \pm 0,09$	$5,47 \pm 0,21$
$E_{min}$ (%)	$10 \pm 3$	<i>(andere Datenauftragung)</i>
n	4	2

**Tabelle 14:** Einfluss von Alcuronium (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler) auf den Effekt rezeptorsättigender Konzentrationen von Pilocarpin (1 mM) aus dieser Arbeit sowie von Zahn et al. (2002).

$pIC_{50}$  Alcuronium-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt ausübt.

$E_{min}$  Effekt von Pilocarpin unter sättigenden Konzentrationen Alcuronium in Prozent des Maximaleffektes von Pilocarpin ohne Alcuronium-Zusatz (100%).

Der Unterschied zwischen dem in dieser Arbeit und dem von Zahn et al. (2002) ermittelten  $pIC_{50}$ -Wert ist statistisch nicht signifikant (t-Test,  $p = 0,06$ ).

Die im Folgenden betrachteten allosterischen Modulatoren wurden ebenfalls in Hinblick auf ihre Wirkung auf die Affinität (Wendepunkt) und die intrinsischen Aktivität (Maximaleffekt) von Pilocarpin untersucht.

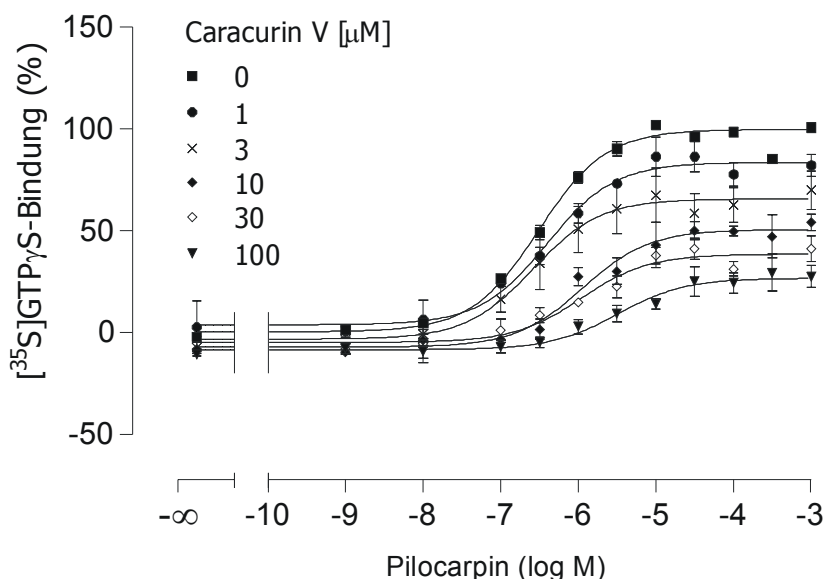
### 3.2.3.2 Caracurine

Es wurden drei Vertreter der Substanzgruppe der Caracurine untersucht: das „dimere“, strukturell mit Alcuronium verwandte und aus zwei kondensierten Caracurin VII-Molekülen bestehende Caracurin V (CarB), das „monomere“ Caracurin VII (Wieland-Gumlich-Aldehyd, WGA), das gleichzeitig die kleinste gemeinsame Struktureinheit der drei Vertreter der Caracurine darstellt, und Di-WGA 6, bei dem zwei WGA-Moleküle über eine Hexamethylenkette miteinander verbrückt wurden (Strukturformeln siehe Kapitel 2.5).

#### 3.2.3.2.1 Caracurin V (CarB)

Caracurin V ist ein allosterischer Modulator der Bindung des Antagonisten *N*-Methylscopolamin (NMS) am muskarinischen  $M_2$ -Acetylcholinrezeptor (Zlotos et al., 2000). Es verzögert die Dissoziation von NMS vom  $M_2$ -Rezeptor, lässt jedoch dessen Gleichgewichtsbindung unbeeinflusst (Buller, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde der konzentrationsabhängige Effekt von Caracurin V auf die durch Pilocarpin induzierte G Protein-Aktivierung (gemessen anhand der Bindung von [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S) untersucht. Dargestellt ist der Einfluss steigender Caracurin V-Konzentrationen auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (Abb. 11, pharmakologische Kennwerte in Tab. 15), auf den Pilocarpin-Maximaleffekt (intrinsische Aktivität von Pilocarpin, Abb. 12) sowie auf den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve (Affinität von Pilocarpin, Abb. 13).



**Abb. 11:** Einfluss von Caracurin V auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO- $M_2$ -Zellen.  
*Ordinate:* [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.

*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-4$  (Kontrolle:  $n = 14$ ) Experimenten in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 9.

## Ergebnisse

Alle Kurven in Abbildung 11 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 15 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung, zudem werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt.

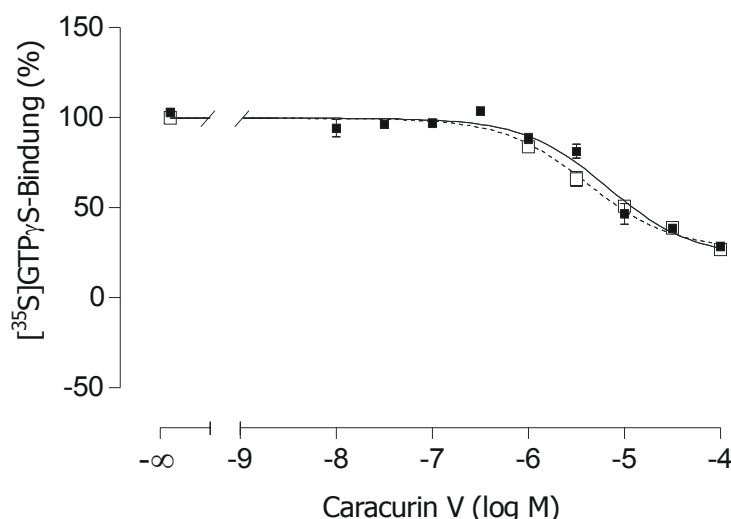
	Kontrolle	CarB 1 $\mu\text{M}$	CarB 3 $\mu\text{M}$	CarB 10 $\mu\text{M}$	CarB 30 $\mu\text{M}$	CarB 100 $\mu\text{M}$
pEC <sub>50</sub>	6,51 $\pm$ 0,04	6,40 $\pm$ 0,11	6,58 $\pm$ 0,18	5,95 $\pm$ 0,14 <sup>†</sup>	5,96 $\pm$ 0,16 <sup>°</sup>	5,49 $\pm$ 0,16 <sup>‡</sup>
Emax (%)	100 $\pm$ 1	84 $\pm$ 3 <sup>°</sup>	66 $\pm$ 4 <sup>°</sup>	51 $\pm$ 3 <sup>°</sup>	39 $\pm$ 3 <sup>°</sup>	27 $\pm$ 2 <sup>°</sup>
n	14	2	4	4	3	4
$n_H$ (freilaufend)	0,97 $\pm$ 0,08	0,91 $\pm$ 0,22	0,97 $\pm$ 0,39	0,90 $\pm$ 0,24	0,79 $\pm$ 0,25	1,01 $\pm$ 0,52

**Tabelle 15:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Caracurin V (CarB; Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, Emax,  $n_H$ : siehe Tab. 11.

<sup>†</sup>; <sup>‡</sup>; <sup>°</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>†</sup> p < 0,05; <sup>‡</sup> p < 0,01; <sup>°</sup> p < 0,001).

Caracurin V in Konzentrationen ab 10  $\mu\text{M}$  verschob den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve signifikant nach rechts und verringerte in allen untersuchten Konzentrationen den Maximaleffekt von Pilocarpin. Somit senkte Caracurin V sowohl die Affinität als auch die intrinsische Aktivität von Pilocarpin.

Da sämtliche Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven ein oberes Plateau erreichten (Abb. 11), konnte der Einfluss von Caracurin V auf den Pilocarpin-Maximaleffekt bestimmt werden, indem die G Protein-Aktivierung durch 1 mM Pilocarpin in Anwesenheit von steigenden Caracurin V-Konzentrationen vermessen wurde (Abb. 12). Um zu zeigen, dass die Daten mit den Befunden aus Abbildung 11 übereinstimmen, wurden die Emax-Werte von Pilocarpin für die einzelnen Alloster-Konzentrationen (Abb. 11 / Tab. 15) in Abbildung 12 ergänzt (offene Symbole).



**Abb. 12:** Einfluss von Caracurin V auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM).

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Caracurin V.

*Datenpunkte:* Geschlossene Symbole: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus n = 3 Experimenten in Vierfachbestimmung. Offene Symbole: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Emax-Werte aus Abb. 11 bzw. Tab. 15.

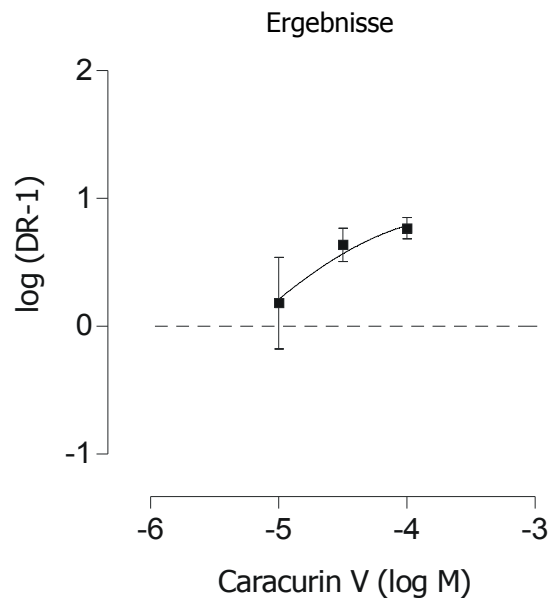
*Kurvenanpassung:* nichtlineare Regressionsanalyse anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung mit auf  $n_H = -1$  konstant gesetztem Hill-Koeffizienten. (siehe Text).

## Ergebnisse

Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Hill-Koeffizienten  $n_H = -1$  (siehe Kapitel 3.2.1). Die freilaufenden Hill-Koeffizienten betragen  $-1,57 \pm 0,41$  (geschlossene Symbole) bzw.  $-0,70 \pm 0,12$  (offene Symbole) und führten laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung.

Bei der experimentellen Bestimmung des Einflusses steigender Caracurin V-Konzentrationen auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Maximaleffekt (Abb. 12, geschlossene Symbole) wurde ein halbmaximaler Effekt von Caracurin V ( $pIC_{50}$ -Wert) von  $5,17 \pm 0,09$  ( $n = 3$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 23 \pm 4\%$  gefunden. Dieser Wert unterscheidet sich signifikant von 0% (t-Test,  $p < 0,001$ ). Caracurin V hob die intrinsische Aktivität von Pilocarpin also nicht vollständig auf. Anhand der Auftragung der  $E_{max}$ -Werte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit von bestimmten Caracurin V-Konzentrationen (Abb. 12, offene Symbole) berechnete sich ein  $pIC_{50}$ -Wert von  $5,38 \pm 0,08$  ( $n = 2-14$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 27 \pm 2\%$ . Auch dieser Wert unterscheidet sich signifikant von 0% (t-Test,  $p < 0,001$ ). Die  $pIC_{50}$ -Werte und  $E_{min}$ -Werte aus beiden Auftragungen unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test,  $p = 0,43$  für die  $pIC_{50}$ -Werte und  $p = 0,55$  für die  $E_{min}$ -Werte).

Die Rechtsverschiebung des Wendepunktes der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve durch unterschiedliche Konzentrationen Caracurin V wurde durch die Berechnung von Verschiebefaktoren (Kapitel 2.3.3) quantifiziert. Dazu wurde der Quotient (dose ratio, DR) aus den Wendepunkten jeder einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin in Anwesenheit von Caracurin V und dem Wendepunkt der jeweils mitgeführten Pilocarpin-Kontrollkurve berechnet. Bei einer allosterischen Interaktion der Testsubstanz mit Pilocarpin am Rezeptorprotein strebt das Ausmaß der Verschiebung der Wendepunkte ( $\log(DR-1)$ , s. Abb. 13) einem Maximalwert zu. Die Daten können anhand der aus dem ternären Modell nach Ehlert (1988) und der Gleichung nach Arunlakshana und Schild (1959) entwickelten Gleichung nach Lanzafame et al. (1996) beschrieben werden. Voraussetzung ist eine identische Steigung aller betrachteten Kurven. Dies ist erfüllt, da sämtliche Konzentrations-Effekt-Kurven in Abbildung 11 ausreichend durch die Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben werden. Die Anwendbarkeit der Gleichung nach Lanzafame et al. (1996) ist trotz der Senkung des Pilocarpin-Maximaleffektes durch Caracurin V gegeben, da in der vorliegenden Arbeit ein gleicher Wert für den Effekt (in Prozent des Maximaleffektes) von Pilocarpin in An- und in Abwesenheit des allosterischen Modulators einem gleichen Wert für die relative Rezeptorbesetzung durch Pilocarpin entsprechen dürfte (siehe Kapitel 4.3.2.3). Deshalb dürften die Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Gegenwart und in Abwesenheit des Allosters jeweils der halbmaximalen Rezeptorbesetzung durch Pilocarpin entsprechen.



**Abb. 13:** Verschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Abhängigkeit von der Caracurin V-Konzentration.

*Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) minus eins:  $DR = \frac{EC_{50, \text{Pilocarpin}} \text{ in Anwesenheit von Caracurin V}}{EC_{50, \text{Pilocarpin}} \text{ in Abwesenheit von Caracurin V}}$ .

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Caracurin V.

*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-4$  Experimenten pro Caracurin V-Konzentration in Vierfachbestimmung.

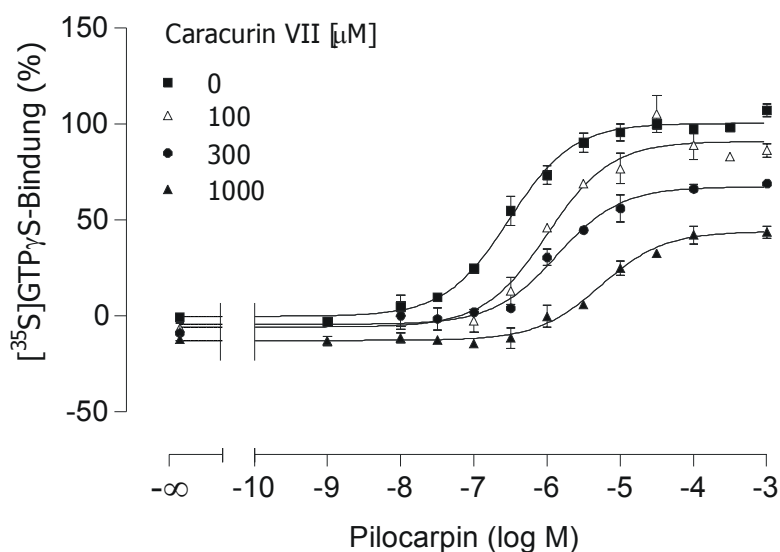
*Kurvenanpassung:* anhand der aus dem ternären Modell nach Ehlert (1988) und der Gleichung nach Arunlakshana und Schild (1959) entwickelten Gleichung nach Lanzafame et al. (1996); es liegen die Kurven aus Abb. 11 zu Grunde.

Aus der Gleichung nach Lanzafame et al. (1996) lassen sich die Affinität des Allosters zum unbesetzten Rezeptor ( $pK_A$ ) und der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  ermitteln.  $p\alpha < 0$  steht für eine allosterische Verminderung,  $p\alpha > 0$  steht für eine allosterische Förderung der Orthoster-Bindung. Für Caracurin V berechnete sich ein  $pK_A = 5,35 \pm 0,32$  und ein  $p\alpha = -1,00 \pm 0,34$  ( $n = 11$ ). Die rechnerisch ermittelte Affinität von Caracurin V zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor  $p(\alpha \cdot K_A)$  beträgt 4,35.

### 3.2.3.2.2 Caracurin VII (Wieland-Gumlich-Aldehyd, WGA)

Analog zu den Experimenten mit Caracurin V wurde der konzentrationsabhängige Effekt von Caracurin VII auf die durch Pilocarpin induzierte [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindung untersucht. Dargestellt ist der Einfluss steigender Konzentrationen von Caracurin VII auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (Abb. 14, pharmakologische Kennwerte in Tab. 16), auf den Pilocarpin-Maximaleffekt (Abb. 15) sowie auf den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve (Abb. 16). Alle Kurven in Abbildung 14 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 16 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.

## Ergebnisse



**Abb. 14:** Einfluss von Caracurin VII auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen.  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2-4 (Kontrolle: n = 8) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 9.

	Kontrolle	Caracurin VII 100 μM	Caracurin VII 300 μM	Caracurin VII 1000 μM
pEC <sub>50</sub>	6,52 ± 0,06	6,00 ± 0,11 <sup>†</sup>	5,87 ± 0,09 <sup>‡</sup>	5,27 ± 0,09 <sup>°</sup>
E <sub>max</sub> (%)	101 ± 2*	91 ± 3 <sup>†</sup>	67 ± 3 <sup>°</sup>	44 ± 2 <sup>°</sup>
n	8	4	2	2
n <sub>H</sub> (freilaufend)	0,86 ± 0,10	1,24 ± 0,30	0,93 ± 0,17	0,93 ± 0,17

**Tabelle 16:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Caracurin VII (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, E<sub>max</sub>, n<sub>H</sub>: siehe Tab. 11.

<sup>†</sup>; <sup>‡</sup>; <sup>°</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>†</sup> p < 0,05; <sup>‡</sup> p < 0,01; <sup>°</sup> p < 0,001).

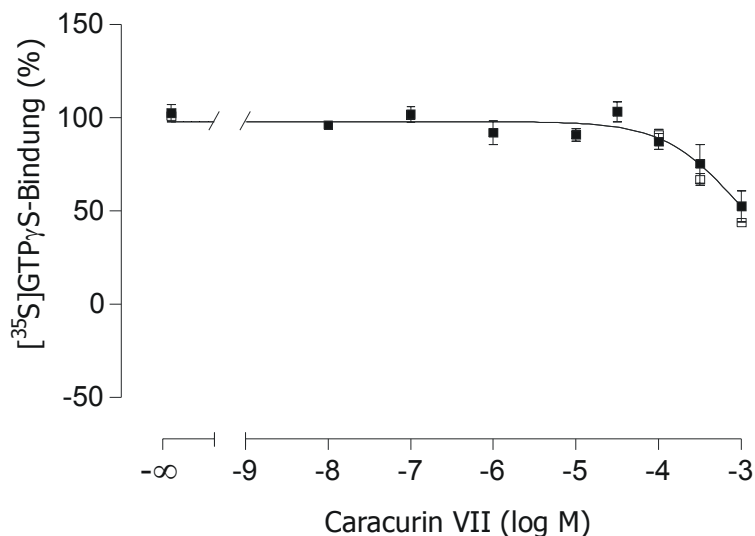
\* Die Abweichung von 100% beruht auf Rundungsungenauigkeiten.

Caracurin VII rief eine konzentrationsabhängige Rechtsverschiebung der Wendepunkte der Konzentrations-Effekt-Kurven unter Verminderung des Maximaleffektes von Pilocarpin hervor. Die Substanz verringerte also sowohl die Affinität als auch die intrinsische Aktivität von Pilocarpin.

Bei allen untersuchten Caracurin VII-Konzentrationen erreichten die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven ein oberes Plateau (Abb. 14). Der Einfluss von Caracurin VII auf den Maximaleffekt von Pilocarpin konnte bestimmt werden, indem die G Protein-Aktivierung durch 1 mM Pilocarpin unter dem Einfluss von steigenden Konzentrationen Caracurin VII vermessen wurde (Abb. 15). Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Hill-Koeffizienten n<sub>H</sub> = -1 (siehe Kapitel 3.2.1). Der freilaufende Hill-Koeffizient betrug -0,91 ± 0,96 und führte laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung. Um zu zeigen, dass die Daten mit den Befunden der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-

## Ergebnisse

Kurven aus Abbildung 14 übereinstimmen, wurden die Emax-Werte von Pilocarpin für die einzelnen Alloster-Konzentrationen (Abb. 14 / Tab. 16) in Abbildung 15 ergänzt (offene Symbole).



**Abb. 15:** Einfluss von Caracurin VII auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM).

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Caracurin VII.

*Datenpunkte:* Geschlossene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 3 Experimenten in Vierfachbestimmung. Offene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler der Emax-Werte aus Abb. 14 bzw. Tab. 16.

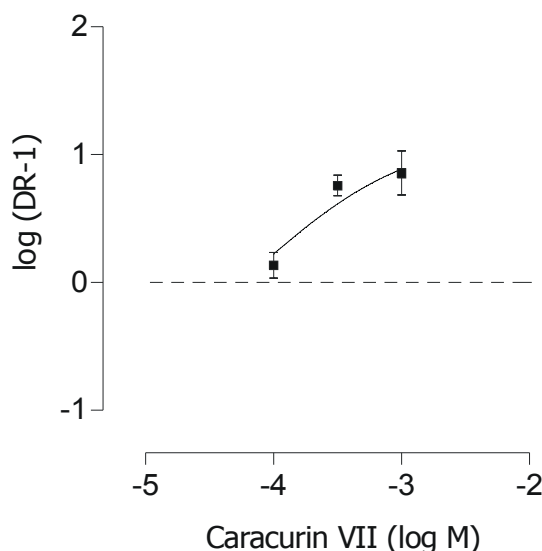
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 10.

Die computergestützte Regressionsanalyse ergab einen Wendepunkt  $pIC_{50} = 3,01 \pm 0,43$  und einen maximal senkenden Effekt des Caracurin VII von  $E_{min} = 15 \pm 42\%$  (geschlossene Symbole; an die durch offene Symbole dargestellten Emax-Werte konnte aufgrund derer geringen Anzahl keine Kurve angepasst werden). Die Konzentrations-Effekt-Kurve von Caracurin VII konnte nicht vollständig aufgenommen werden, da die Verdünnungen von Caracurin VII in Konzentrationen über 1 mM im Versuchsansatz zu große Mengen des Lösungsvermittlers DMSO enthielten (zum Eigeneffekt von DMSO siehe Kapitel 3.2.4). Aufgrund dessen unterliegt der Maximaleffekt des Allostere in Hinblick auf die Senkung des Pilocarpin-Effektes ( $E_{min}$ ) einer großen Streuung. Eine Aussage über die Vollständigkeit der Unterbindung der intrinsischen Aktivität durch den allosterischen Modulator Caracurin VII ist allein aufgrund der Daten aus Abbildung 15 nicht möglich. Dennoch ist die Kurvenanpassung in Hinblick auf den Wendepunkt offenbar zutreffend, da der  $pIC_{50}$ -Wert (aus der Senkung der intrinsischen Aktivität bestimmte Affinität des Allostere zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor) sehr gut mit der anhand der Wirksamkeitsverschiebung berechneten Affinität des Allostere zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor  $p(\alpha \cdot K_A)$  übereinstimmt (s. u.).

Die Rechtsverschiebung des Wendepunktes der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve durch verschiedene Konzentrationen Caracurin VII wurde durch die Berechnung von Verschiebefaktoren (dose ratio (DR), siehe Kapitel 2.3.3 und 3.2.3.2.1) quantifiziert. Bei einer allosterischen Interaktion der Testsubstanz mit Pilocarpin am Rezeptorprotein strebt das Ausmaß der Verschiebung der

## Ergebnisse

Wendepunkte ( $\log(DR-1)$ , s. Abb. 16) einem Maximalwert zu. Die Daten können anhand der Gleichung nach Lanzafame et al. (1996) beschrieben werden. Voraussetzung für diese Art der Datenpräsentation ist, dass die Rechtsverschiebung der zu Grunde liegenden Kurven nicht mit einer Veränderung der Steigung der Kurven einhergeht. Dies ist erfüllt, da sämtliche Konzentrations-Effekt-Kurven in Abbildung 14 ausreichend durch die Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben werden. Die Anwendbarkeit der Auswertung nach Lanzafame et al. (1996) ist trotz der Senkung des Pilocarpin-Maximaleffektes durch Caracurin VII gegeben, da in der vorliegenden Arbeit der erzielte Effekt (in Prozent des Maximaleffektes) von Pilocarpin in An- und in Abwesenheit des allosterischen Modulators von einem identischen Ausmaß der Rezeptorbesetzung durch Pilocarpin hervorgerufen wird (siehe Kapitel 4.6.1.2).



**Abb. 16:** Verschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Abhängigkeit von der Caracurin VII-Konzentration.

*Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) minus eins:  $DR = EC_{50, \text{Pilocarpin}}$  in Anwesenheit von Caracurin VII dividiert durch  $EC_{50, \text{Pilocarpin}}$  in Abwesenheit von Caracurin VII.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Caracurin VII.

*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-4$  Experimenten pro Caracurin VII-Konzentration in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 13, es liegen die Daten aus Abb. 14 zu Grunde.

Die Analyse der Daten aus Abbildung 16 nach Lanzafame et al. (1996) ergab eine Affinität von Caracurin VII zum freien Rezeptor von  $pK_A = 4,31 \pm 0,24$  und einen Kooperativitätsfaktor  $p\alpha = -1,14 \pm 0,28$  ( $n = 8$ ). Die berechnete Affinität von Caracurin VII zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor  $p(\alpha \cdot K_A)$  beträgt 3,17.

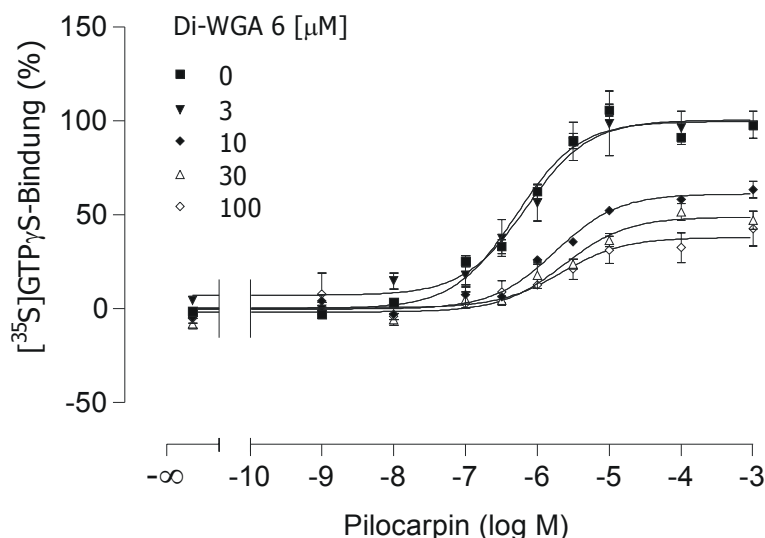
### 3.2.3.2.3 Di-WGA 6

Di-WGA 6 kann ebenso wie Caracurin V als ein „Dimer“ aus zwei Molekülen Caracurin VII aufgefasst werden. Die beiden Moleküle Caracurin VII wurden anders als bei der Substanz Caracurin V nicht unter Ringkondensation, sondern über eine Hexamethylenkette unter Quaternisierung der beiden Stickstoffatome zusammengefügt.



## Ergebnisse

Im Folgenden ist der Einfluss steigender Di-WGA 6-Konzentrationen auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (Abb. 17, pharmakologische Kennwerte in Tab. 17), auf den Pilocarpin-Maximaleffekt (Abb. 18) sowie auf den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve (Abb. 19) dargestellt. Alle Kurven in Abbildung 17 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 17 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.



**Abb. 17:** Einfluss von Di-WGA 6 auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen.  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2-4 (Kontrolle: n = 10) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 9.

	Kontrolle	Di-WGA 6 3 μM	Di-WGA 6 10 μM	Di-WGA 6 30 μM	Di-WGA 6 100 μM
pEC <sub>50</sub>	6,34 ± 0,05	6,16 ± 0,14	5,75 ± 0,09 <sup>◊</sup>	5,63 ± 0,13 <sup>◊</sup>	5,66 ± 0,25 <sup>◊</sup>
Emax (%)	99 ± 2*	93 ± 7	61 ± 2 <sup>◊</sup>	49 ± 3 <sup>◊</sup>	38 ± 4 <sup>◊</sup>
n	10	3	2	3	2
n <sub>H</sub> (freilaufend)	1,00 ± 0,11	1,11 ± 0,33	0,85 ± 0,15	0,72 ± 0,18	0,67 ± 0,33

**Tabelle 17:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Di-WGA 6 (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, Emax, n<sub>H</sub>: siehe Tab. 11.

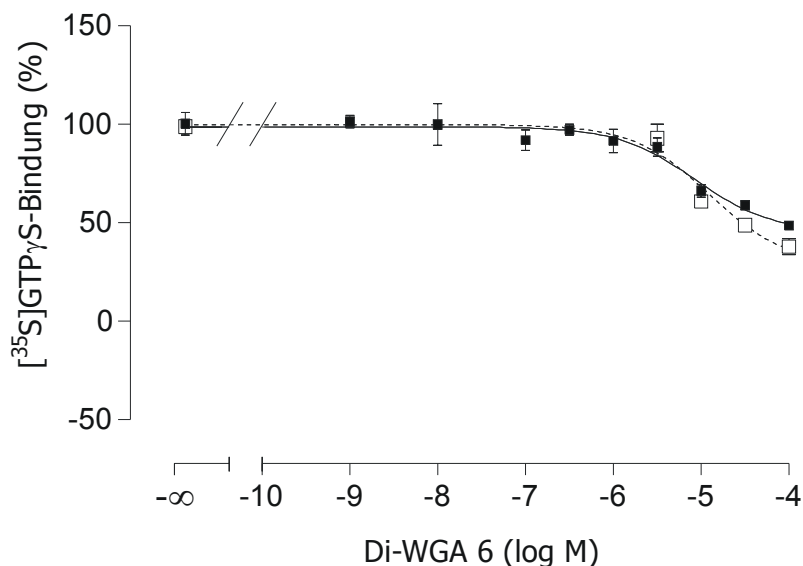
<sup>◊</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, p < 0,001).

\* Die Abweichung von 100% beruht auf Rundungsungenauigkeiten.

Di-WGA 6 in Konzentrationen ab 10 μM verschob den Wendepunkt der Pilocarpin-Kontrollkurve statistisch signifikant nach rechts und senkte den Maximaleffekt von Pilocarpin. Ebenso wie Caracurin V und Caracurin VII verminderte auch Di-WGA 6 sowohl Wirksamkeit als auch intrinsische Aktivität von Pilocarpin.

## Ergebnisse

Da die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven bei allen untersuchten Di-WGA 6-Konzentrationen ein oberes Plateau erreichten (Abb. 17), konnte der Einfluss von steigenden Konzentrationen Di-WGA 6 auf den Maximaleffekt von Pilocarpin (induziert durch 1 mM) bestimmt werden (Abb. 18). Um zu zeigen, dass die Daten mit den Befunden der kompletten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 17 übereinstimmen, wurden die Emax-Werte von Pilocarpin für die einzelnen Alloster-Konzentrationen (Abb. 17 / Tab. 17) in Abbildung 18 ergänzt (offene Symbole).



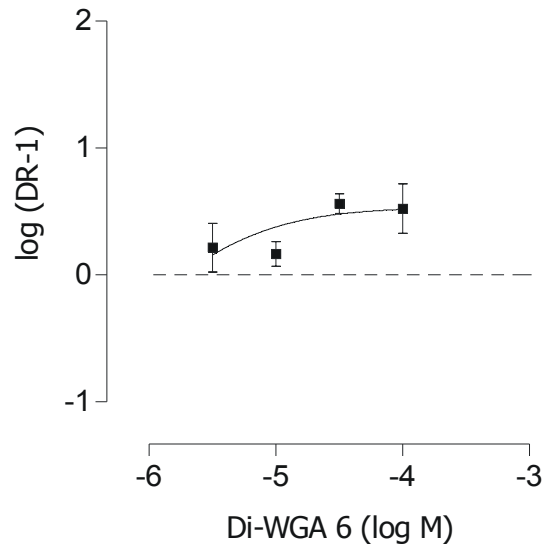
**Abb. 18:** Einfluss von Di-WGA 6 auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM).  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Di-WGA 6.  
*Datenpunkte:* Geschlossene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 3 Experimenten in Vierfachbestimmung. Offene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler der Emax-Werte aus Abb. 17 bzw. Tab. 17.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 10.

Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Hill-Koeffizienten  $n_H = -1$  (siehe Kapitel 3.2.1). Die freilaufenden Hill-Koeffizienten betragen  $-1,01 \pm 0,42$  (geschlossene Symbole) bzw.  $-2,11 \pm 0,96$  und führten laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung.

Bei der experimentellen Bestimmung des Einflusses steigender Di-WGA 6-Konzentrationen auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Maximaleffekt (Abb. 18, offene Symbole) wurde ein halbmaximaler Effekt von Di-WGA 6 ( $pIC_{50}$ -Wert) von  $5,07 \pm 0,19$  ( $n = 3$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 46 \pm 7\%$  gefunden. Dieser Wert unterscheidet sich signifikant von 0% (t-Test,  $p < 0,001$ ). Di-WGA 6 hob die intrinsische Aktivität von Pilocarpin also nicht vollständig auf. Anhand der Auftragung der oberen Plateaus der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit von bestimmten Di-WGA 6-Konzentrationen (Abb. 18, gestrichelte Linie) berechnete sich ein  $pIC_{50}$ -Wert von  $4,90 \pm 0,24$  ( $n = 2-10$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 29 \pm 12\%$ . Auch dieser Wert unterscheidet sich signifikant von 0% (t-Test,  $p = 0,026$ ). Die  $pIC_{50}$ -Werte und  $E_{min}$ -Werte aus beiden Auftragungen unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test,  $p = 0,79$  für die  $pIC_{50}$ -Werte und  $p = 0,24$  für die  $E_{min}$ -Werte).

## Ergebnisse

Eine Analyse der Verschiebung der Wendepunkte durch Di-WGA 6 nach dem allosterischen Modell (Lanzafame et al., 1996) in Abb. 19 war aufgrund der identischen Steigung aller Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 17 zulässig (siehe Kapitel 3.2.3.2.1), aber wegen der geringen Rechtsverschiebung der Kurven mit einer Unsicherheit behaftet.



**Abb. 19:** Verschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Abhängigkeit von der Di-WGA 6-Konzentration.

*Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) minus eins:  $DR = EC_{50, \text{Pilocarpin}}$  in Anwesenheit von Di-WGA 6 dividiert durch  $EC_{50, \text{Pilocarpin}}$  in Abwesenheit von Di-WGA 6.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Di-WGA 6.

*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-3$  Experimenten pro Di-WGA 6-Konzentration in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 13, es liegen die Daten aus Abb. 17 zu Grunde.

Es ergaben sich eine Affinität zum freien Rezeptor von  $pK_A = 6,01 \pm 0,29$  und ein Kooperativitätsfaktor von  $p\alpha = -0,65 \pm 0,10$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 10$ ). Die berechnete Affinität von Di-WGA 6  $p(\alpha \cdot K_A)$  zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor beträgt 5,36 und stimmt recht gut mit dem Wendepunkt der Kurve aus Abbildung 18 ( $pIC_{50} = 5,07 \pm 0,19$ ) überein.

### 3.2.3.2.4 Vergleichende Betrachtung der Kenndaten der Caracurine

Die pharmakologischen Kenndaten von Caracurin V, Caracurin VII und Di-WGA 6 werden in Tabelle 18 gegenübergestellt:

Substanz	Emin (%)	$p\alpha$	$pK_A$	$p(\alpha \cdot K_A)$	$pIC_{50}$
Caracurin V	23 ± 4 (n = 3)	-0,88 ± 0,23 (n = 15)	5,50 ± 0,25 (n = 15)	4,62	5,17 ± 0,09 (n = 3)
Caracurin VII	15 ± 42 (n = 3)	-1,14 ± 0,45 (n = 8)	4,31 ± 0,24 (n = 8)	3,17	3,01 ± 0,43 (n = 3)
Di-WGA 6	46 ± 7 (n = 3)	-0,65 ± 0,10 (n = 10)	6,01 ± 0,29 (n = 10)	5,36	5,07 ± 0,19 (n = 3)

**Tabelle 18:** Pharmakologische Kennwerte des Effektes der Caracurine auf die Affinität und intrinsische Aktivität von Pilocarpin (Mittelwerte ± Standardfehler).

- Emin Intrinsische Aktivität von Pilocarpin (1 mM) in Anwesenheit von sättigenden Konzentrationen des Allostere (Maximaleffekt des Allostere auf die intrinsische Aktivität von Pilocarpin).
- $p\alpha$  Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$  ( $p\alpha < 0$ : Alloster vermindert die Affinität von Pilocarpin zum Rezeptor;  $p\alpha > 0$ : Alloster erhöht die Affinität von Pilocarpin zum Rezeptor).
- $pK_A$  Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_A$  (Maß für die Affinität des Allostere zum unbesetzten Rezeptor).
- $p(\alpha \cdot K_A)$  Aus der Wirksamkeitsverschiebung von Pilocarpin abgeleitete Affinität des Allostere zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor.
- $pIC_{50}$  Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Allostere, die eine halbmaximale Reduktion des Pilocarpin-Maximaleffektes verursacht; aus der Senkung der intrinsischen Aktivität abgeleitetes Maß für die Affinität des Allostere zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor.

Alle betrachteten Caracurine verringerten die intrinsische Aktivität ( $E_{min} < 100\%$ ) und die Wirksamkeit von Pilocarpin ( $p\alpha < 0$ ). Dabei war die Affinität des kleinen, „monomeren“ Caracurin VII sowohl zum unbesetzten als auch zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor kleiner als die der großen, „dimeren“ Allosteren Caracurin V und Di-WGA 6. Caracurin V senkte die Pilocarpin-induzierte G Protein-Aktivierung stärker als Di-WGA 6 (t-Test,  $p = 0,046$ ).

### 3.2.3.3 Di-Strychnin 6 und Strychnin

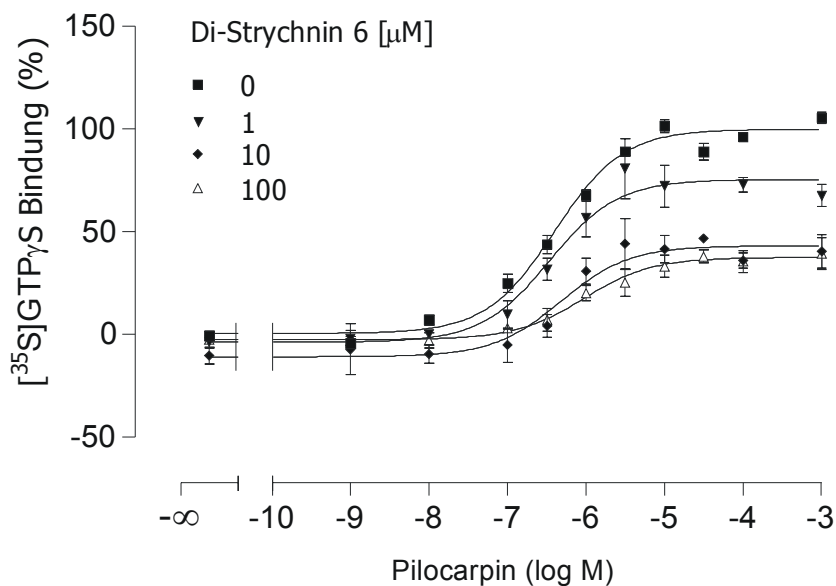
#### 3.2.3.3.1 Di-Strychnin 6

Zlotos et al. (2003) fanden eine Dissoziationsverzögerung des muskarinischen Antagonisten *N*-Methylscopolamin (NMS) vom muskarinischen  $M_2$ -Acetylcholinrezeptor durch Di-Strychnin 6. Die Gleichgewichtsbindung von NMS wurde durch Di-Strychnin 6 erhöht.

Abbildung 20 zeigt den konzentrationsabhängigen Effekt von Di-Strychnin 6 auf den Wendepunkt und das obere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin. Über die pharmakologischen Kennwerte gibt Tabelle 19 Auskunft. Alle Kurven in Abbildung 20 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 19 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die

## Ergebnisse

freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.



**Abb. 20:** Einfluss von Di-Strychnin 6 auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen.  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 3-4 (Kontrolle: n = 12) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 9.

	Kontrolle	Di-Strychnin 6 1 μM	Di-Strychnin 6 10 μM	Di-Strychnin 6 100 μM
pEC <sub>50</sub>	6,40 ± 0,05	6,47 ± 0,14	6,32 ± 0,20	6,03 ± 0,16 <sup>‡</sup>
Emax (%)	100 ± 2	76 ± 4 <sup>◊</sup>	43 ± 4 <sup>◊</sup>	38 ± 2 <sup>◊</sup>
n	10	3	3	4
n <sub>H</sub> (freilaufend)	0,84 ± 0,08	1,51 ± 0,48	2,15 ± 1,02	0,82 ± 0,25

**Tabelle 19:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Di-Strychnin 6 (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, Emax, n<sub>H</sub>: siehe Tab. 11.

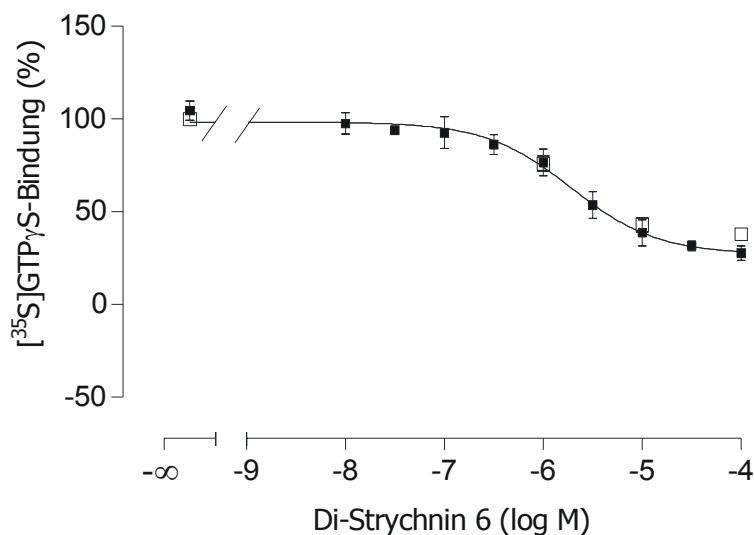
<sup>‡</sup>; <sup>◊</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>‡</sup> p < 0,01; <sup>◊</sup> p < 0,001).

Di-Strychnin 6 verringerte den Pilocarpin-Maximaleffekt unter Beibehaltung des Wendepunktes der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve (mit Ausnahme der Konzentration 100 μM). Höhere Konzentrationen Di-Strychnin 6 konnten aufgrund dessen begrenzter Löslichkeit nicht untersucht werden. Da eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve lediglich in einer Konzentration auftrat, handelt es sich hierbei vermutlich um ein zufälliges Ereignis. Aufgrund der vorliegenden Datenlage kann daher zwar auf eine Verminderung der intrinsischen Aktivität, nicht jedoch auf eine Senkung der Wirksamkeit von Pilocarpin geschlossen werden. Die gleichbleibende Wirksamkeit in Gegenwart des allosterischen Modulators entspricht einer neutralen Kooperativität (pα = 0).

Die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven erreichten bei allen untersuchten Di-Strychnin 6-Konzentrationen ein oberes Plateau (Abb. 20). Der Einfluss von Di-Strychnin 6 auf den Maximaleffekt

## Ergebnisse

von Pilocarpin konnte durch Vermessen der durch 1 mM Pilocarpin induzierten G Protein-Aktivierung unter dem Einfluss steigender Konzentrationen Di-Strychnin 6 bestimmt werden (Abb. 21). Um zu zeigen, dass die Daten mit den Befunden der kompletten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 20 übereinstimmen, wurden die Emax-Werte von Pilocarpin für die einzelnen Alloster-Konzentrationen (Abb. 20 / Tab. 19) in Abbildung 21 ergänzt (offene Symbole).



**Abb. 21:** Einfluss von Di-Strychnin 6 auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM).  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Di-Strychnin 6.  
*Datenpunkte:* Geschlossene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 3 Experimenten in Vierfachbestimmung. Offene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler der Emax-Werte aus Abb. 20 bzw. Tab. 19.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 10.

Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Hill-Koeffizienten  $n_H = -1$  (geschlossene Symbole; an die durch offene Symbole dargestellten Emax-Werte konnte aufgrund der geringen Anzahl keine Kurve angepasst werden). Der freilaufende Hill-Koeffizient betrug  $-0,83 \pm 0,24$  und führte laut F-Test zu keiner signifikant besseren Beschreibung der Kurve.

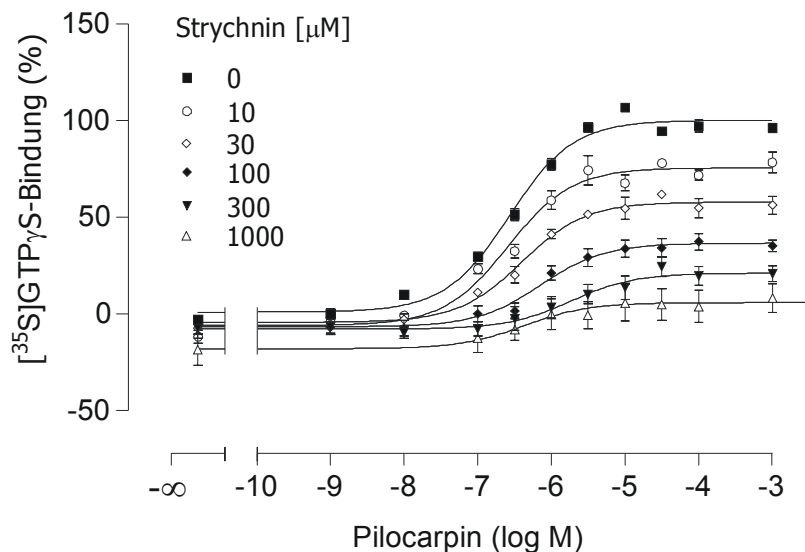
Bei der experimentellen Bestimmung des Einflusses steigender Di-Strychnin 6-Konzentrationen auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Maximaleffekt (Abb. 21, geschlossene Symbole) wurde ein halbmaximaler Effekt von Di-Strychnin 6 ( $pIC_{50}$ -Wert) von  $5,71 \pm 0,08$  ( $n = 3$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 27 \pm 3\%$  gefunden. Dieser Wert unterscheidet sich signifikant von 0% (t-Test,  $p < 0,001$ ). Di-Strychnin 6 hob die intrinsische Aktivität von Pilocarpin also nicht vollständig auf.

### 3.2.3.3.2 Strychnin

Strychnin erhöht in Radioligandbindungsexperimenten die Gleichgewichtsbindung des Antagonisten *N*-Methylscopolamin (NMS), vermindert jedoch die Bindung des endogenen Agonisten Acetylcholin zum  $M_2$ -Rezeptor (Lazareno et al., 1997). Zlotos et al. (2003) postulierten, dass der unveränderte

Strychnin-Ring ein optimales Strukturelement für eine hohe allosterische Wirksamkeit gegenüber NMS am  $M_2$ -Rezeptor darstellt.

Im Folgenden wird der konzentrationsabhängige Effekt von Strychnin auf die durch Pilocarpin induzierte G Protein-Aktivierung (gemessen anhand der Bindung von  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ ) gezeigt. Dargestellt ist der Einfluss steigender Strychnin-Konzentrationen auf die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve (Abb. 22, Tab. 20), auf den Pilocarpin-Maximaleffekt (intrinsische Aktivität von Pilocarpin, Abb. 23) sowie auf den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve (Affinität von Pilocarpin, Abb. 24).



**Abb. 22:** Einfluss von Strychnin auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO- $M_2$ -Zellen.  
*Ordinate:*  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-6$  (Kontrolle:  $n = 16$ ) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 9.

Alle Kurven in Abbildung 22 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 20 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.

Strychnin verringerte den Maximaleffekt von Pilocarpin und verschob den Wendepunkt der Pilocarpin-Kontrollkurve in Konzentrationen ab 100  $\mu\text{M}$  statistisch signifikant nach rechts. Am  $M_2$ -Rezeptor verminderte Strychnin demnach sowohl die Wirksamkeit als auch die intrinsische Aktivität von Pilocarpin.

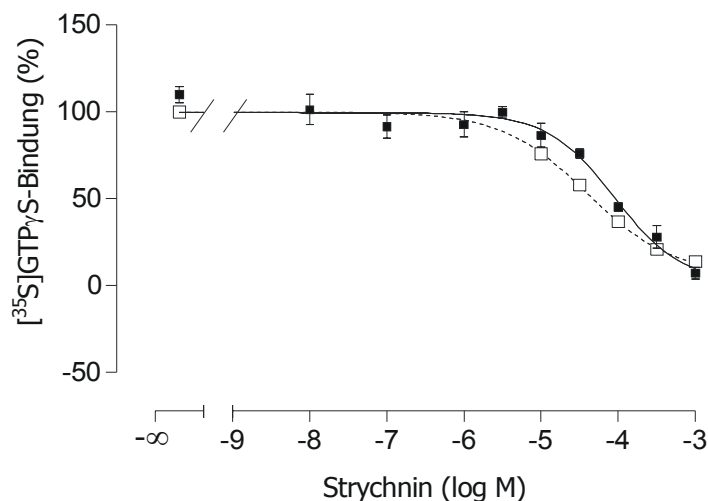
## Ergebnisse

	Kontrolle	Strychnin 10 $\mu\text{M}$	Strychnin 30 $\mu\text{M}$	Strychnin 100 $\mu\text{M}$	Strychnin 300 $\mu\text{M}$	Strychnin 1000 $\mu\text{M}$
pEC <sub>50</sub>	6,57 $\pm$ 0,04	6,59 $\pm$ 0,09	6,40 $\pm$ 0,08	6,14 $\pm$ 0,13 <sup>†</sup>	5,74 $\pm$ 0,23 <sup>†</sup>	5,73 $\pm$ 0,20 <sup>†</sup>
Emax (%)	100 $\pm$ 1	76 $\pm$ 2 <sup>◊</sup>	58 $\pm$ 2 <sup>◊</sup>	37 $\pm$ 2 <sup>◊</sup>	21 $\pm$ 3 <sup>◊</sup>	14 $\pm$ 1 <sup>◊</sup>
n	16	2	2	6	4	2
n <sub>H</sub> (freilaufend)	0,99 $\pm$ 0,08	0,81 $\pm$ 0,15	0,98 $\pm$ 0,17	1,27 $\pm$ 0,36	0,91 $\pm$ 0,43	0,73 $\pm$ 0,60

**Tabelle 20:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Strychnin (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, Emax, n<sub>H</sub>: siehe Tab. 11.

<sup>†</sup>; <sup>◊</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>†</sup> p < 0,05; <sup>◊</sup> p < 0,001).

Da die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit aller untersuchten Strychnin-Konzentrationen ein oberes Plateau erreichten (Abb. 22), konnte der konzentrationsabhängige Einfluss von Strychnin auf den durch sättigende Konzentrationen von Pilocarpin (1 mM) induzierten Maximal-effekt vermessen werden (Abb. 23). Um zu zeigen, dass die Daten mit den Befunden aus Abbildung 22 übereinstimmen, wurden die Emax-Werte von Pilocarpin für die einzelnen Alloster-Konzentrationen (Abb. 22 / Tab. 20) in Abbildung 23 ergänzt (offene Symbole).



**Abb. 23:** Einfluss von Strychnin auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM).

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Strychnin.

*Datenpunkte:* Geschlossene Symbole: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus n = 4 Experimenten in Vierfachbestimmung. Offene Symbole: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Emax-Werte aus Abb. 22 bzw. Tab. 20.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 10.

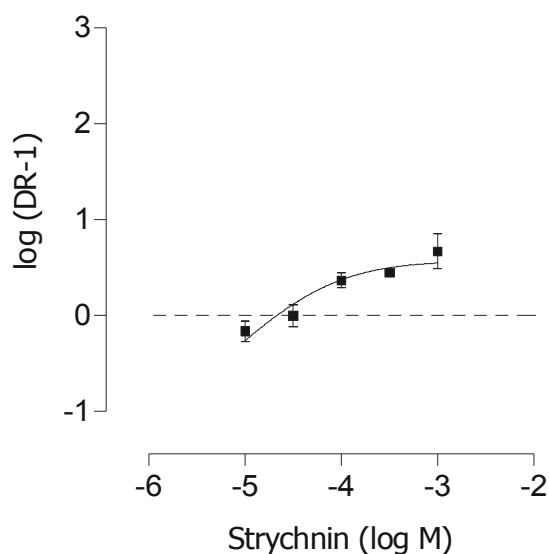
Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Hill-Koeffizienten n<sub>H</sub> = -1 (siehe Kapitel 3.2.1). Der freilaufende Hill-Koeffizient betrug  $-0,83 \pm 0,23$  (geschlossene Symbole) und führte laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung. Für die aus den Emax-Werten in Abbildung 22 gebildete Kurve führte der Hill-Koeffizient  $-0,79 \pm 0,04$  im Vergleich zu dem auf n<sub>H</sub> = -1 konstant gesetzten Hill-Koeffizienten zu einer signifikant besseren Anpassung.



## Ergebnisse

Bei der experimentellen Bestimmung des Einflusses steigender Strychnin-Konzentrationen auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Maximaleffekt (Abb. 23, geschlossene Symbole) wurde ein halb-maximaler Effekt von Strychnin ( $pIC_{50}$ -Wert) von  $4,04 \pm 0,13$  ( $n = 4$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 2 \pm 7\%$  gefunden. Strychnin hob die intrinsische Aktivität von Pilocarpin also vollständig auf. Anhand der Auftragung der oberen Plateaus der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit von bestimmten Strychnin-Konzentrationen (Abb. 23, offene Symbole) berechnete sich ein  $pIC_{50}$ -Wert von  $4,40 \pm 0,03$  ( $n = 2-16$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 7 \pm 2\%$ . Dieser Wert unterscheidet sich signifikant von 0% (t-Test,  $p = 0,0014$ ). Die  $E_{min}$ -Werte aus beiden Auftragungen unterscheiden sich jedoch nicht signifikant (t-Test,  $p = 0,42$ ). Zwischen den  $pEC_{50}$ -Werten besteht ein signifikanter Unterschied (t-Test,  $p = 0,0056$ ), jedoch liegen sie in der gleichen Größenordnung.

Die identische Steigung aller Konzentrations-Effekt-Kurven (Abb. 22) ermöglichte die Analyse der Strychnin-abhängigen Verschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven nach dem allosterischen Modell (Lanzafame et al., 1996) in Abb. 24 (siehe Kapitel 3.2.3.2.1).



**Abb. 24:** Verschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Abhängigkeit von der Strychnin-Konzentration.

*Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) minus eins:  $DR = EC_{50, Pilocarpin}$  in Anwesenheit von Strychnin dividiert durch  $EC_{50, Pilocarpin}$  in Abwesenheit von Strychnin.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Strychnin.

*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-6$  Experimenten pro Strychnin-Konzentration in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 13, es liegen die Daten aus Abb. 22 zu Grunde.

Die Analyse der Daten aus Abbildung 22 nach Lanzafame et al. (1996) ergab eine Affinität von Strychnin zum freien Rezeptor  $pK_A = 4,91 \pm 0,12$  und einen Kooperativitätsfaktor  $p\alpha = -0,68 \pm 0,07$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 16$ ). Die rechnerisch ermittelte Affinität von Strychnin  $p(\alpha \cdot K_A)$  zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor beträgt 4,23.

Der  $pK_A$ -Wert dieser Arbeit unterscheidet sich nicht signifikant von dem von Lazareno et al. (1997) in Bindungsexperimenten gefundenen  $pK_A$ -Wert von 4,86 (t-Test,  $p = 0,68$ ).

### 3.2.3.3.3 Vergleichende Betrachtung der pharmakologischen Kenndaten von Di-Strychnin 6 und Strychnin

Substanz	E <sub>min</sub> (%)	p $\alpha$	pK <sub>A</sub>	p( $\alpha \cdot K_A$ )	pIC <sub>50</sub>
Di-Strychnin 6	27 ± 5 (n = 4)	0	5,71*	5,71*	5,71 ± 0,14 (n = 4)
Strychnin	2 ± 7 (n = 3)	-0,68 ± 0,06 (n = 15)	4,91 ± 0,12 (n = 15)	4,23	4,04 ± 0,12 (n = 3)

**Tabelle 21:** Pharmakologische Kennwerte des Effektes von Strychnin und Di-Strychnin 6 auf die Affinität und intrinsische Aktivität von Pilocarpin (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von E<sub>max</sub>, p $\alpha$ , pK<sub>A</sub>, p( $\alpha \cdot K_A$ ), pIC<sub>50</sub>: siehe Tabelle 18.

\* pK<sub>A</sub> und p( $\alpha \cdot K_A$ ) konnten experimentell nicht bestimmt werden, dürften jedoch wegen der neutralen Kooperativität pIC<sub>50</sub> entsprechen.

Beide Substanzen verringern die intrinsische Aktivität von Pilocarpin: Di-Strychnin 6 senkt die Pilocarpin-induzierte G Protein-Aktivierung um ca. 75%, Strychnin unterbindet sie vollständig. Der Einfluss auf die Affinität von Pilocarpin ist unterschiedlich: Strychnin verringert die Wirksamkeit von Pilocarpin (p $\alpha$  < 0), während Di-Strychnin 6 diese nicht verändert. Die Affinität von Strychnin zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor (pIC<sub>50</sub>) ist deutlich kleiner als die von Di-Strychnin 6.

### 3.2.3.4 Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen

Zu dieser Gruppe allosterischer Modulatoren gehören die beiden „Dimeren / Monomeren-Paare“ W84 / SH28 und Naphmethonium (MM3a) / MM7a sowie das Strukturelemente von MM7a und Strychnin enthaltende Str6Naph.

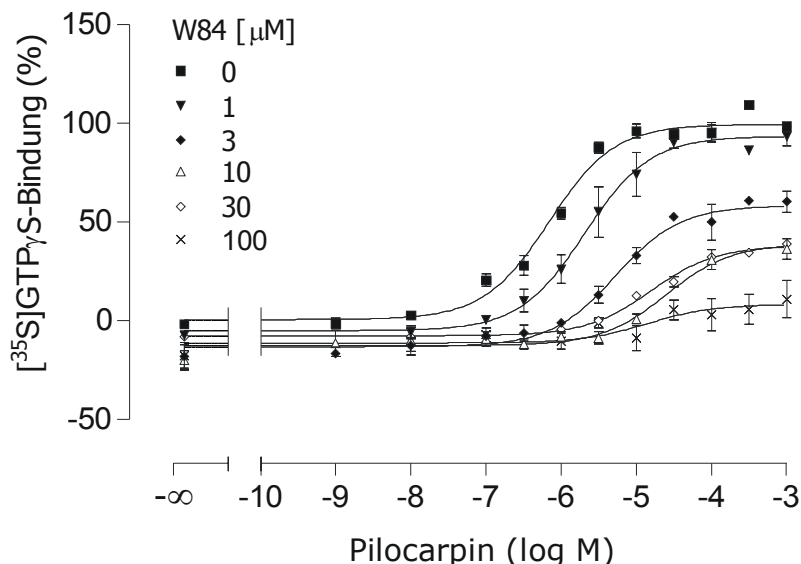
#### 3.2.3.4.1 W84

W84 verzögert die Dissoziation des Agonisten Oxotremorin M sowie des Antagonisten *N*-Methylscopolamin (NMS) vom M<sub>2</sub>-Rezeptor und vermindert die Gleichgewichtsbindung beider Substanzen (Gilsbach et al., 2003; Raasch et al., 2002; Großmüller 2003; Mohr et al., 2004). Im funktionellen Experiment (Organbadversuch) verhält sich W84 zu Oxotremorin M formal kompetitiv (Maaß et al., 1995; Zahn et al., 2002). Eine therapeutischer Perspektive stellt der überadditive Schutz von Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen in Kombination mit Atropin bei Organophosphatvergiftungen dar (Kords et al., 1968).

In der vorliegenden Arbeit wurde der konzentrationsabhängige Effekt von W84 auf die durch Pilocarpin induzierte G Protein-Aktivierung (gemessen anhand der Bindung von [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S) untersucht. Dargestellt ist der Einfluss steigender W84-Konzentrationen auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (Abb. 25, pharmakologische Kennwerte in Tab. 22), auf den Pilocarpin-Maximaleffekt (intrinsische Aktivität von Pilocarpin, Abb. 26) sowie auf den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve (Affinität von Pilocarpin, Abb. 27).

## Ergebnisse

Alle Kurven in Abbildung 25 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 22 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.



**Abb. 25:** Einfluss von W84 auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen.  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2-3 (Kontrolle: n = 13) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 9.

	Kontrolle	W84 1 µM	W84 3 µM	W84 10 µM	W84 30 µM	W84 100 µM
pEC <sub>50</sub>	6,16 ± 0,05	5,69 ± 0,09 <sup>‡</sup>	5,28 ± 0,10 <sup>◊</sup>	4,60 ± 0,18 <sup>◊</sup>	4,80 ± 0,05 <sup>◊</sup>	4,85 ± 0,53
E <sub>max</sub> (%)	100 ± 2	94 ± 4	58 ± 3 <sup>◊</sup>	39 ± 4 <sup>◊</sup>	38 ± 1 <sup>◊</sup>	8 ± 4 <sup>◊</sup>
n	13	3	3	3	2	3
n <sub>H</sub> (freilaufend)	1,01 ± 0,10	0,96 ± 0,18	0,77 ± 0,15	1,24 ± 0,45	0,83 ± 0,09	0,17 ± 0,38

**Tabelle 22:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von W84 (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, E<sub>max</sub>, n<sub>H</sub>: siehe Tab. 12.

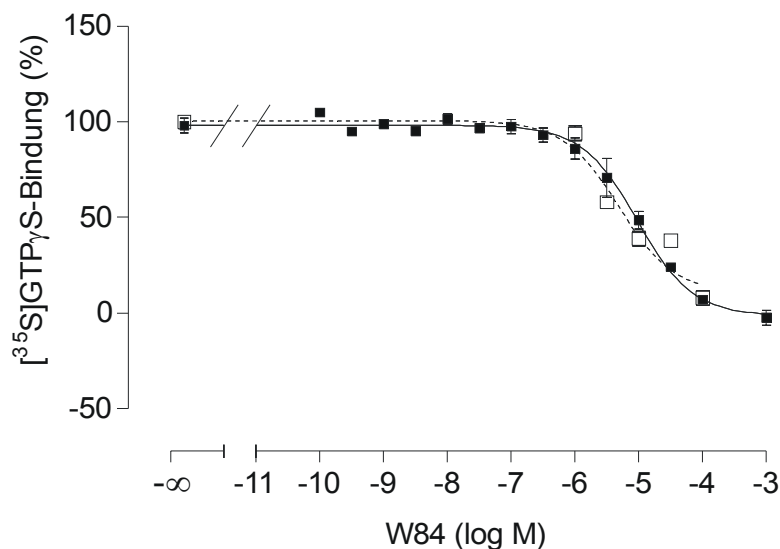
<sup>‡</sup>; <sup>◊</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>‡</sup> p < 0,01; <sup>◊</sup> p < 0,001).

W84 in den Konzentrationen 1 µM bis 30 µM verschob den Wendepunkt der Pilocarpin-Kontrollkurve statistisch signifikant nach rechts. Die Verschiebung durch 100 µM W84 war trotz der großen Differenz der pEC<sub>50</sub>-Werte nicht signifikant. Dies erklärt sich durch das kleine Messfenster (Abb. 25) und den daraus resultierenden hohen Standardfehler des Wendepunktes (Tab. 22). W84 verringerte den Maximaleffekt von Pilocarpin in Konzentrationen ab 3 µM signifikant. Am M<sub>2</sub>-Rezeptor verminderte W84 also sowohl die Wirksamkeit als auch die intrinsische Aktivität von Pilocarpin.

Da die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven bei allen untersuchten W84-Konzentrationen ein oberes Plateau erreichten (Abb. 25), konnte der Einfluss von W84 auf den Maximaleffekt von

## Ergebnisse

Pilocarpin bestimmt werden, indem die G Protein-Aktivierung durch 1 mM Pilocarpin unter dem Einfluss von steigenden Konzentrationen W84 vermessen wurde (Abb. 26). Um zu zeigen, dass die Daten mit den Befunden der kompletten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 25 übereinstimmen, wurden die Emax-Werte von Pilocarpin für die einzelnen Alloster-Konzentrationen (Abb. 25 / Tab. 22) in Abbildung 26 ergänzt (offene Symbole).



**Abb. 26:** Einfluss von W84 auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM).

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von W84.

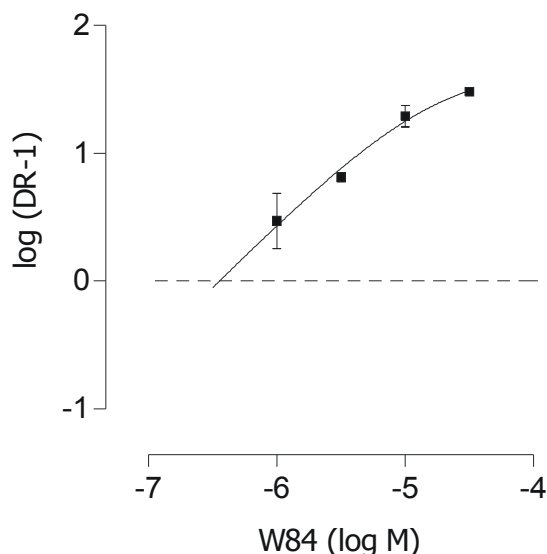
*Datenpunkte:* Geschlossene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 5 Experimenten in Vierfachbestimmung. Offene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler der Emax-Werte aus Abb. 25 bzw. Tab. 22.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 10.

Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Hill-Koeffizienten  $n_H = -1$  (siehe Kapitel 3.2.1). Der freilaufende Hill-Koeffizient betrug  $-0,83 \pm 0,11$  (geschlossene Symbole) bzw.  $-1,00 \pm 0,60$   $-0,83 \pm 0,23$  (offene Symbole) und führte laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung. Bei der experimentellen Bestimmung des Einflusses steigender W84-Konzentrationen auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Maximaleffekt (Abb. 26, geschlossene Symbole) wurde ein halbmaximaler Effekt von W84 ( $pIC_{50}$ -Wert) von  $5,02 \pm 0,07$  ( $n = 5$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = -1 \pm 4\%$  gefunden. W84 hob die intrinsische Aktivität von Pilocarpin also vollständig auf. Anhand der Auftragung der oberen Plateaus der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit von bestimmten W84-Konzentrationen (Abb. 26, offene Symbole) berechnete sich ein  $pIC_{50}$ -Wert von  $5,31 \pm 0,21$  ( $n = 2-13$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 11 \pm 11\%$ . Dieser Wert unterscheidet sich nicht signifikant von 0% (t-Test,  $p = 0,33$ ). Die  $pIC_{50}$ -Werte und  $E_{min}$ -Werte aus beiden Auftragungen unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test,  $p = 0,20$  für die  $pIC_{50}$ -Werte und  $p = 0,31$  für die  $E_{min}$ -Werte).

## Ergebnisse

Die identische Steigung aller Konzentrations-Effekt-Kurven (Abb. 25) ermöglichte die Analyse der W84-abhängigen Verschiebung der Wendepunkte nach dem allosterischen Modell (Lanzafame et al., 1996) in Abb. 27 (siehe Kapitel 3.2.3.2.1).



**Abb. 27:** Verschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Abhängigkeit von der W84-Konzentration.

*Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) minus eins:  $DR = EC_{50, \text{Pilocarpin}}$  in Anwesenheit von W84 dividiert durch  $EC_{50, \text{Pilocarpin}}$  in Abwesenheit von W84.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von W84.

*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-3$  Experimenten pro W84-Konzentration in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 13, es liegen die Daten aus Abb. 25 zu Grunde.

Die Datenanalyse in Abbildung 27 ergab eine Affinität zum freien  $M_2$ -Rezeptor von  $pK_A = 6,46 \pm 0,10$  und einen Kooperativitätsfaktor  $p\alpha = -1,68 \pm 0,21$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler). Die berechnete Affinität von W84 zum Pilocarpin-besetzten  $M_2$ -Rezeptor  $p(\alpha \cdot K_A)$  beträgt 4,78. In Radioligandbindungsexperimenten wurden für W84  $pK_A$ -Werte von 6,41 (Daiss et al., 2002), 6,43 (Mohr et al., 2004) und 6,53 (Raasch et al., 2002) für den  $M_2$ -Rezeptor gefunden. Die in dieser Arbeit ermittelte Affinität von W84 zum freien Rezeptor stimmt mit den Literaturwerten sehr gut überein.

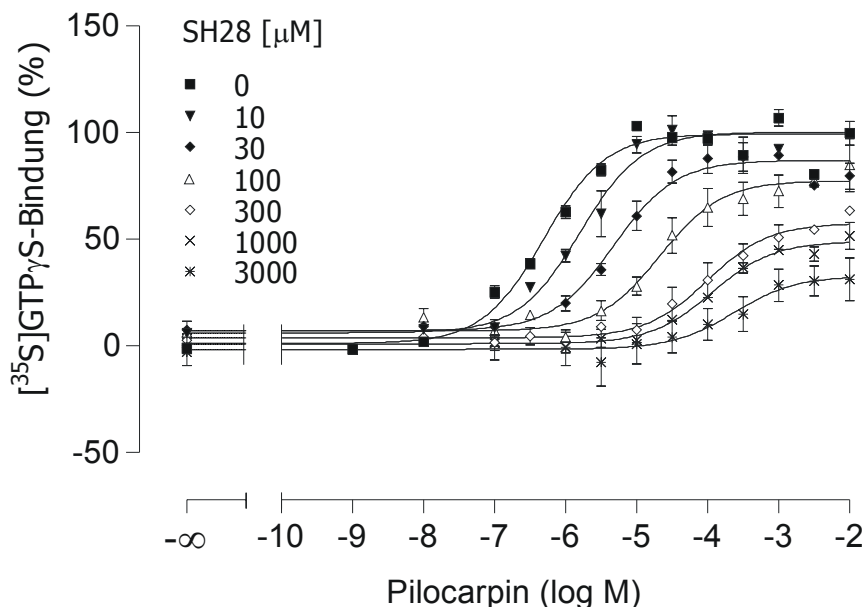
### 3.2.3.4.2 SH28

Der allosterische Modulator SH28, der auch als ein „halbiertes“ W84-Molekül aufgefasst werden kann, reduziert die Gleichgewichtsbindung des Antagonisten *N*-Methylscopolamin (NMS) und des Agonisten Oxotremorin M zum  $M_2$ -Rezeptor (Großmüller, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von SH28 auf die Wirksamkeit und die intrinsische Aktivität von Pilocarpin untersucht. Dargestellt ist der Einfluss steigender SH28-Konzentrationen auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (Abb. 28, pharmakologische Kennwerte in Tab. 23), auf den Pilocarpin-Maximaleffekt (Maß für die intrinsische Aktivität, Abb. 29) sowie auf den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve (Maß für die Affinität von Pilocarpin, Abb. 30).

## Ergebnisse

Alle Kurven in Abbildung 28 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 23 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.



**Abb. 28:** Einfluss von SH28 auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen.  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2-4 (Kontrolle: n = 16) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 9.

	Kontrolle	SH28 10 µM	SH28 30 µM	SH28 100 µM	SH28 300 µM	SH28 1000µM	SH28 3000 µM
pEC <sub>50</sub>	6,30 ± 0,05	5,79 ± 0,09 <sup>‡</sup>	5,32 ± 0,09 <sup>◊</sup>	4,67 ± 0,13 <sup>◊</sup>	4,00 ± 0,14 <sup>◊</sup>	3,94 ± 0,10 <sup>◊</sup>	3,62 ± 0,36 <sup>‡</sup>
E <sub>max</sub> (%)	99 ± 1*	100 ± 3	87 ± 2 <sup>◊</sup>	78 ± 3 <sup>◊</sup>	58 ± 4 <sup>◊</sup>	49 ± 2 <sup>◊</sup>	33 ± 6 <sup>◊</sup>
n	16	2	2	4	4	3	4
n <sub>H</sub> (freilaufend)	0,85 ± 0,08	1,10 ± 0,21	1,29 ± 0,25	1,00 ± 0,27	0,72 ± 0,20	1,03 ± 0,21	0,93 ± 0,72

**Tabelle 23:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von SH28 (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, E<sub>max</sub>, n<sub>H</sub>: siehe Tab. 12.

<sup>‡</sup>; <sup>◊</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>‡</sup> p < 0,01; <sup>◊</sup> p < 0,001).

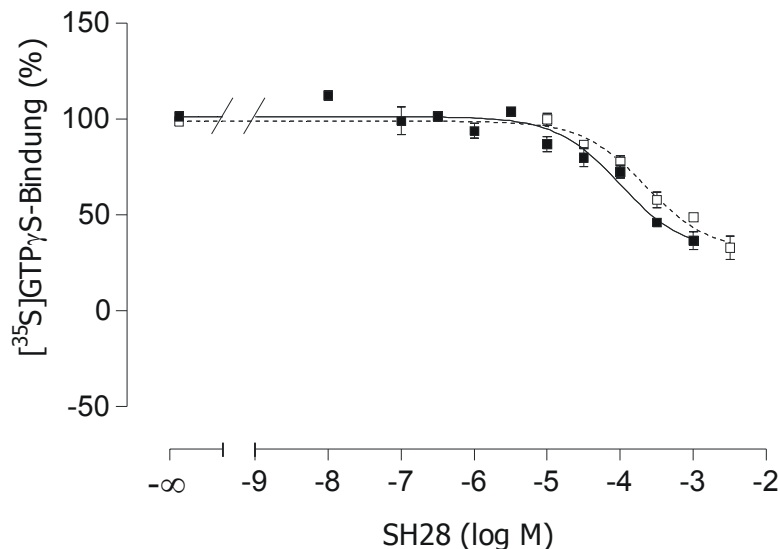
\* Die Abweichung von 100% beruht auf Rundungsungenauigkeiten.

SH28 rief eine konzentrationsabhängige Rechtsverschiebung des Wendepunktes der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve hervor und verringerte den Maximaleffekt von Pilocarpin in Konzentrationen ab 30 µM signifikant. Damit verminderte SH28 die Wirksamkeit und die intrinsische Aktivität von Pilocarpin.

Da sämtliche Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 28 ein oberes Plateau erreichten, konnte der konzentrationsabhängige Effekt von SH28 auf die durch rezeptorsättigende Pilocarpin-

## Ergebnisse

Konzentrationen (1 mM) induzierte [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung vermessen werden (Abb. 29). Um zu zeigen, dass die Daten mit den Befunden der kompletten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 28 übereinstimmen, wurden die Emax-Werte von Pilocarpin für die einzelnen Alloster-Konzentrationen (Abb. 28 / Tab. 23) in Abbildung 29 ergänzt (offene Symbole).



**Abb. 29:** Einfluss von SH28 auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM).

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von SH28.

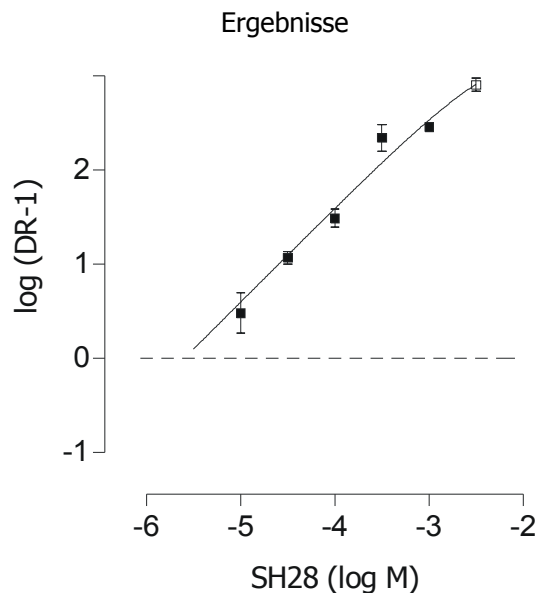
*Datenpunkte:* Geschlossene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 3 Experimenten in Vierfachbestimmung. Offene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler der Emax-Werte aus Abb. 28 bzw. Tab. 23.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 10.

Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Hill-Koeffizienten  $n_H = -1$  (siehe Kapitel 3.2.1). Die freilaufende Hill-Steigung betrug  $-0,57 \pm 0,19$  (geschlossene Symbole) bzw.  $-0,84 \pm 0,21$  (offene Symbole) und führte in beiden Fällen laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung.

Bei der experimentellen Bestimmung des Einflusses steigender SH28-Konzentrationen auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Maximaleffekt (Abb. 29, geschlossene Symbole) wurde ein halbmaximaler Effekt von SH28 ( $pIC_{50}$ -Wert) von  $4,01 \pm 0,13$  ( $n = 3$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 31 \pm 6\%$  gefunden. Dieser Wert ist signifikant unterschiedlich von 0% (t-Test,  $p = 0,035$ ). SH28 hob die intrinsische Aktivität von Pilocarpin also nicht vollständig auf. Anhand der Auftragung der Emax-Werte (Abb. 29, offene Symbole) berechnete sich ein  $pIC_{50}$ -Wert von  $3,65 \pm 0,09$  ( $n = 2-16$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 31 \pm 4\%$ . Auch dieser Wert unterscheidet sich signifikant von 0% (t-Test,  $p < 0,0001$ ). Die  $pIC_{50}$ -Werte und  $E_{min}$ -Werte aus beiden Auftragungen unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test,  $p = 0,26$  für die  $pIC_{50}$ -Werte und  $p > 0,99$  für die  $E_{min}$ -Werte).

Die identische Steigung aller Konzentrations-Effekt-Kurven (Abb. 28) ermöglichte die Analyse der SH28-abhängigen Verschiebung der Wendepunkte nach dem allosterischen Modell (Lanzafame et al., 1996) in Abb. 30 (siehe Kapitel 3.2.3.2.1).



**Abb. 30:** Verschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Abhängigkeit von der SH28-Konzentration.

*Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) minus eins:  $DR = EC_{50, \text{Pilocarpin}}$  in Anwesenheit von SH28 dividiert durch  $EC_{50, \text{Pilocarpin}}$  in Abwesenheit von SH28.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von SH28.

*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-4$  Experimenten pro SH28-konzentration in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 13; es liegen die Daten aus Abb. 28 zu Grunde.

Es ergab sich eine Affinität zum freien Rezeptor von  $pK_A = 5,60 \pm 0,07$  und ein Kooperativitätsfaktor von  $p\alpha = -3,37 \pm 0,33$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 19$ ). Die berechnete Affinität von SH28 zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor  $p(\alpha \cdot K_A)$  beträgt 2,23. In Radioligandbindungsstudien mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  in  $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -Phosphat-Puffer wurde für SH28 ein  $pK_A$ -Wert von  $5,87 \pm 0,14$  ( $n = 3$ ) gefunden (Großmüller, 2003); in Magnesium-Tris-Puffer ermittelte Ataie (2000) den  $pK_A = 5,21$ . Der in  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimenten dieser Arbeit bestimmte  $pK_A$ -Wert weicht nicht signifikant von dem von Großmüller (2003) ab (t-Test,  $p = 0,17$ ) und liegt in der gleichen Größenordnung wie der  $pK_A$  von Ataie (2000).

### 3.2.3.4.3 Naphmethonium (MM3a)

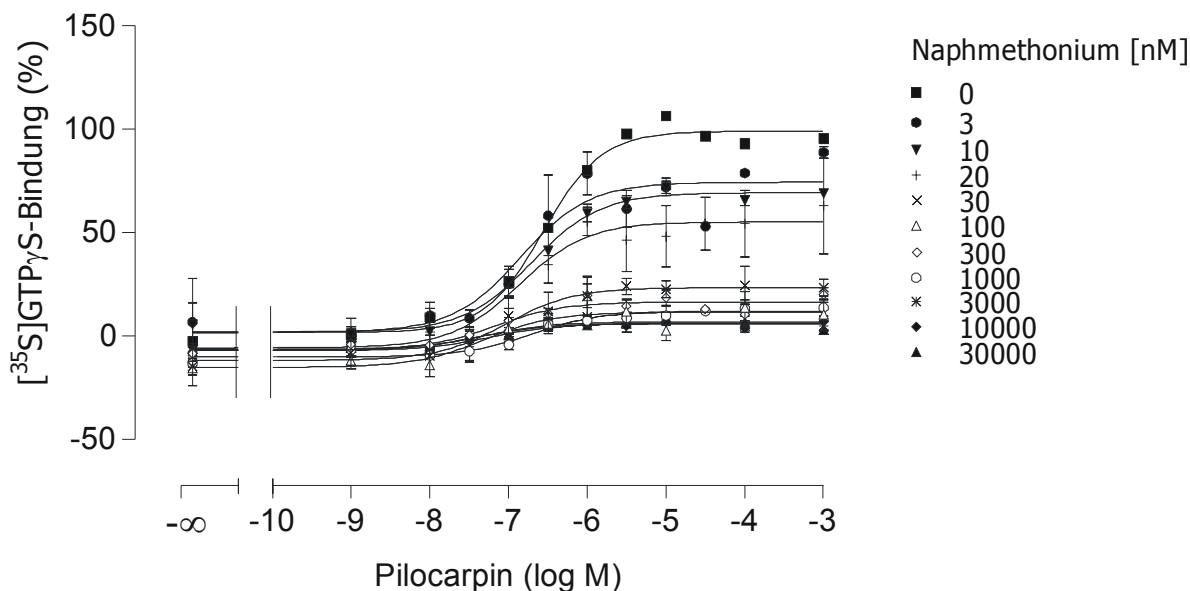
Naphmethonium als Derivat der Leitstruktur W84 besitzt einen lateralen Naphthalimid-Rest sowie eine Bismethylierung in der Propylseitenkette, was in Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen eine besonders hohe Affinität zum Antagonist-(NMS-)besetzten  $M_2$ -Rezeptor hervorruft (Holzgrabe et al., 2000). Tatsächlich hat Naphmethonium neben einer hohen Affinität zum NMS-besetzten ( $pEC_{50, \text{diss}} = 8,36$ ) auch eine hohe Affinität zum freien  $M_2$ -Rezeptor ( $pK_A = 8,29$ ) und erhöht die Gleichgewichtsbindung von NMS (Muth et al., 2003).

Im Folgenden wird der konzentrationsabhängige Effekt von Naphmethonium (MM3a) auf die durch Pilocarpin induzierte G Protein-Aktivierung (gemessen anhand der Bindung von  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ ) gezeigt. Dargestellt ist der Einfluss steigender Naphmethonium-Konzentrationen auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (Abb. 31, pharmakologische Kennwerte in Tab. 24), auf den Pilocarpin-Maximal-effekt (intrinsische Aktivität von Pilocarpin, Abb. 32) sowie auf den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve (Affinität von Pilocarpin, Abb. 33).



## Ergebnisse

Alle Kurven in Abbildung 31 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 24 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.



**Abb. 31:** Einfluss von Naphmethonium (MM3a) auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen.

Ordinate: [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.

Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2-4 (Kontrolle: n = 16) Experimenten in Vierfachbestimmung.

Kurvenanpassung: siehe Abb. 9.

	Kontr.	Naph. 3 nM	Naph. 10 nM	Naph. 20 nM	Naph. 30 nM	Naph. 100 nM	Naph. 300 nM	Naph. 1000 nM	Naph. 3000 nM	Naph. 10000 nM	Naph. 30000 nM
pEC <sub>50</sub>	6,46 ± 0,07	6,85 ± 0,22	6,70 ± 0,11	6,69 ± 0,28	7,04 ± 0,35	7,31 ± 0,42	7,17 ± 0,24	6,70 ± 0,21	7,34 ± 0,32	7,24 ± 0,19 <sup>†</sup>	7,35 ± 0,24 <sup>†</sup>
E <sub>max</sub> (%)	101 ± 3*	74 ± 5 <sup>†</sup>	69 ± 2 <sup>◊</sup>	55 ± 5 <sup>◊</sup>	23 ± 4 <sup>◊</sup>	12 ± 3 <sup>◊</sup>	16 ± 2 <sup>◊</sup>	12 ± 2 <sup>◊</sup>	7 ± 1 <sup>◊</sup>	7 ± 1 <sup>◊</sup>	6 ± 1 <sup>◊</sup>
n	16	2	2	4	4	4	3	4	3	3	3
n <sub>H</sub> (freilaufend)	1,17 ± 0,08	2,05 ± 1,07	1,05 ± 0,26	1,28 ± 0,79	0,77 ± 0,53	1,80 ± 2,53	1,14 ± 0,58	0,85 ± 0,34	1,32 ± 0,96	1,55 ± 0,69	1,07 ± 0,55

**Tabelle 24:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Naphmethonium (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, E<sub>max</sub>, n<sub>H</sub>: siehe Tab. 12.

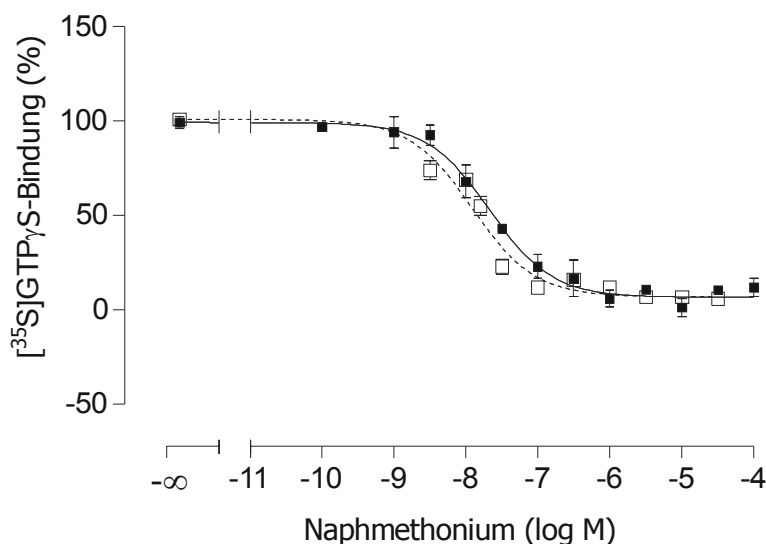
<sup>†</sup>; <sup>◊</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>†</sup> p < 0,05; <sup>◊</sup> p < 0,001).

\* Die Abweichung von 100% beruht auf Rundungsungenauigkeiten.

Naphmethonium in den Konzentrationen 10 μM und 30 μM verschob den Wendepunkt der Pilocarpin-Kontrollkurve statistisch signifikant nach links. In Konzentrationen ab 3 nM senkte es den Maximaleffekt von Pilocarpin signifikant. Naphmethonium erhöht zwar die Wirksamkeit von Pilocarpin, vermindert jedoch gleichzeitig dessen intrinsische Aktivität.

## Ergebnisse

Da die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven bei allen untersuchten Naphmethonium-Konzentrationen ein oberes Plateau erreichten (Abb. 31), konnte der Einfluss von Naphmethonium auf den Maximaleffekt von Pilocarpin bestimmt werden, indem die G Protein-Aktivierung durch 1 mM Pilocarpin unter dem Einfluss von steigenden Konzentrationen Naphmethonium vermessen wurde (Abb. 32). Um zu zeigen, dass die Daten mit den Befunden der kompletten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 31 übereinstimmen, wurden die Emax-Werte von Pilocarpin für die einzelnen Alloster-Konzentrationen (Abb. 31 / Tab. 24) in Abbildung 32 ergänzt (offene Symbole).



**Abb. 32:** Einfluss von Naphmethonium auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM).  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Naphmethonium.  
*Datenpunkte:* Geschlossene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 4 Experimenten in Vierfachbestimmung. Offene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler der Emax-Werte aus Abb. 31 bzw. Tab. 24.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 10.

Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Hill-Koeffizienten  $n_H = -1$  (siehe Kapitel 3.2.1). Der freilaufende Hill-Koeffizient betrug  $-1,03 \pm 0,18$  (geschlossene Symbole) bzw.  $-1,33 \pm 0,33$  (offene Symbole) und führte in beiden Fällen laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung.

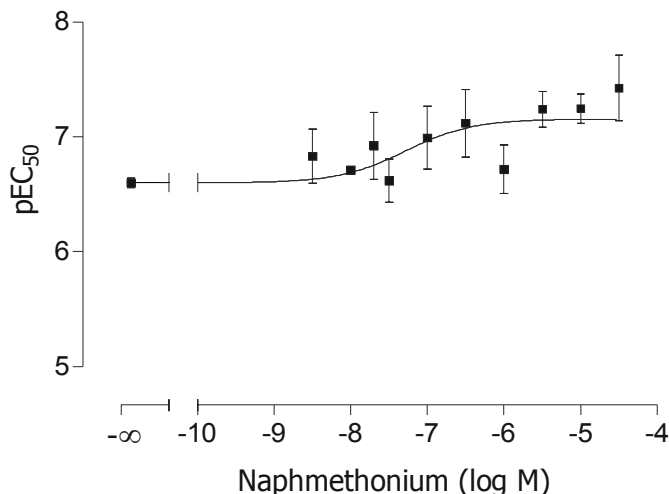
Bei der experimentellen Bestimmung des Einflusses steigender Naphmethonium-Konzentrationen auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Maximaleffekt (Abb. 32, geschlossene Symbole) wurde ein halbmaximaler Effekt von Naphmethonium ( $pIC_{50}$ -Wert) von  $7,67 \pm 0,09$  ( $n = 4$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 7 \pm 3\%$  gefunden.  $E_{min}$  unterscheidet sich nicht signifikant von 0% (t-Test,  $p = 0,01$ ). Naphmethonium hob die intrinsische Aktivität von Pilocarpin also vollständig auf. Anhand der Auftragung Emax-Werte (Abb. 32, offene Symbole) berechnete sich ein  $pIC_{50}$ -Wert von  $7,91 \pm 0,09$  ( $n = 2-16$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 7 \pm 3\%$ . Die  $pIC_{50}$ -Werte und  $E_{min}$ -Werte aus beiden Auftragungen unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test,  $p = 0,09$  für die  $pIC_{50}$ -Werte und  $p > 0,9999$  für die  $E_{min}$ -Werte).

Charakteristisch für die allosterische Interaktionen ist eine sättigbare Verschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve. Eine Auswertung der Verschiebefaktoren (als Maß des

## Ergebnisse

Effekts des Allosters auf die Affinität des Orthosters zum Rezeptor) nach dem allosterischen Modell (Lanzafame et al., 1996) und eine Berechnung des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$  konnte nicht durchgeführt werden, da sich für *Linksverschiebungen* keine Zahlenwerte anhand des Terms  $\log(\text{DR}-1)$  berechnen lassen. Unter Gleichgewichtsbedingungen ist jedoch der Effekt des Allosters auf die Affinität des Orthosters zum Rezeptor gleich dem Effekt des Orthosters auf die Affinität des Allosters zum Rezeptor (Ehlert, 1988). Die Affinität des Orthosters Pilocarpin zum Rezeptor wird durch die Lage des Wendepunktes ( $\text{EC}_{50}$ ) der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve beschrieben. Dieser spiegelt in Anwesenheit hoher Konzentrationen Naphmethonium die Affinität von Pilocarpin zum Naphmethonium-besetzten Rezeptor wieder. Der Quotient aus der Affinität des Orthosters zum Alloster-besetzten Rezeptor und zum freien Rezeptor bzw. die Differenz der logarithmierten Affinitätswerte entspricht dem Kooperativitätsfaktor (bzw. seinem Logarithmus; Ellis, 1997).

Abbildung 33 zeigt die Auftragung der negativen dekadischen Logarithmen der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven ( $\text{pEC}_{50}$ ) in Abhängigkeit von der Alloster-Konzentration. Das untere Plateau zeigt den negativen dekadischen Logarithmus des Wendepunktes der Pilocarpin-Kontrollkurve (und damit die Affinität von Pilocarpin zum  $\text{M}_2$ -Rezeptor). Das obere Plateau wird gebildet durch die negativen dekadischen Logarithmen der Wendepunkte der Pilocarpin-Kontrollkurven in Anwesenheit von hohen Naphmethonium-Konzentrationen (entsprechend der Affinität von Pilocarpin zum Naphmethonium-besetzten Rezeptor). Anhand der Differenz zwischen oberem und unterem Plateau kann eine Abschätzung des logarithmierten Wertes des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$  vorgenommen werden.



**Abb. 33:**  $\text{pEC}_{50}$ -Werte (zur Definition von  $\text{pEC}_{50}$  siehe Tabelle 11) der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin in Abhängigkeit von der Naphmethonium (MM3a)-Konzentration an Membranen aus CHO- $\text{M}_2$ -Zellen.

*Ordinate:*  $\text{pEC}_{50}$ -Werte; es liegen die Daten aus Tabelle 24 zu Grunde.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Naphmethonium.

*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-4$  (Kontrollwert:  $n = 16$ ) Experimenten in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* nichtlineare Regressionsanalyse anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung mit auf  $n_H = 1$  konstant gesetztem Hill-Koeffizienten. Es sei angemerkt, dass das untere Plateau nicht konstant gesetzt wurde.

Das untere Plateau der Kurve liegt bei  $\text{pEC}_{50} = 6,6 \pm 0,10$ . Dies entspricht dem negativen dekadischen Logarithmus der halbmaximal effektiven Pilocarpin-Konzentration. Das obere Plateau der Kurve liegt bei  $7,2 \pm 0,12$ . Dies entspricht der halbmaximal effektiven Pilocarpin-Konzentration in Anwesenheit

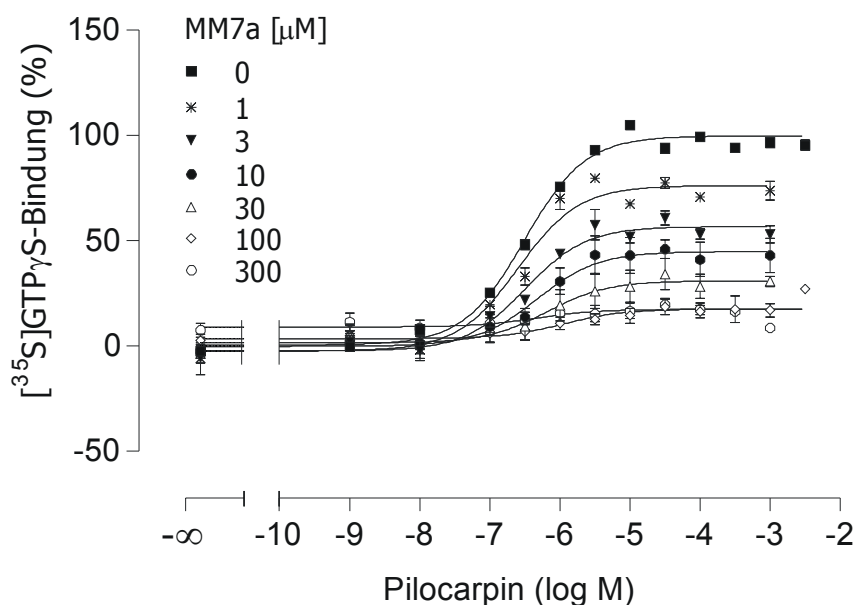
von sättigenden Konzentrationen Naphmethonium. Bildet man die Differenz aus oberem und unterem Plateau der Kurve in Abbildung 33, so erhält man den Wert  $p\alpha = 0,6$  für die Kooperativität zwischen Naphmethonium und Pilocarpin.

### 3.2.3.4.4 MM7a

MM7a als „halbiertes“ Naphmethonium besitzt ebenfalls einen lateralen Naphthalimid-Substituenten, der bei Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen eine hohe Affinität zum Antagonist-(NMS-)besetzten Rezeptor bedingt (Holzgrabe et al., 2000). Es ruft eine Dissoziationsverzögerung von NMS hervor und verändert dessen Gleichgewichtsbindung nicht (persönliche Mitteilung Matthias Sennwitz).

Es wurde der konzentrationsabhängige Effekt von MM7a auf die durch Pilocarpin induzierte Bindung von  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  gemessen. Gezeigt wird der Einfluss steigender MM7a-Konzentrationen auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (Abb. 34, pharmakologische Kennwerte in Tab. 25) sowie auf den Pilocarpin-Maximaleffekt (intrinsische Aktivität von Pilocarpin, Abb. 35).

Alle Kurven in Abbildung 34 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 25 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.



**Abb. 34:** Einfluss von MM7a auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen.  
*Ordinate:*  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-6$  (Kontrolle:  $n = 16$ ) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 9.

## Ergebnisse

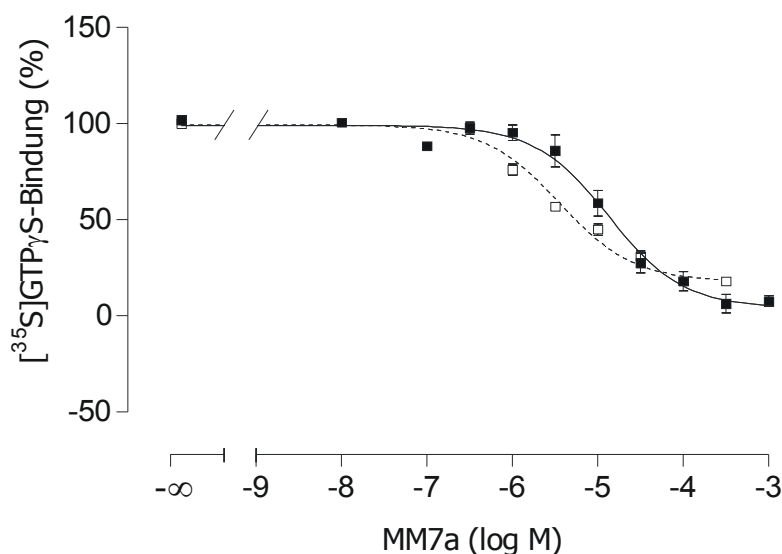
	Kontrolle	MM7a 1 $\mu$ M	MM7a 3 $\mu$ M	MM7a 10 $\mu$ M	MM7a 30 $\mu$ M	MM7a 100 $\mu$ M	MM7a 300 $\mu$ M
pEC <sub>50</sub>	6,50 ± 0,02	6,59 ± 0,11	6,49 ± 0,10	6,32 ± 0,18	6,18 ± 0,29	5,94 ± 0,35	5,34 ± 0,59
E <sub>max</sub> (%)	100 ± 1	76 ± 3 <sup>◊</sup>	57 ± 2 <sup>◊</sup>	45 ± 3 <sup>◊</sup>	31 ± 3 <sup>◊</sup>	18 ± 2 <sup>◊</sup>	18 ± 2 <sup>◊</sup>
n	16	2	2	3	3	6	5
n <sub>H</sub> (freilaufend)	1,04 ± 0,05	1,45 ± 0,35	1,17 ± 0,28	1,28 ± 0,51	0,87 ± 0,52	0,60 ± 0,40	1,10 ± 1,41

**Tabelle 25:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von MM7a (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, E<sub>max</sub>, n<sub>H</sub>: siehe Tab. 11.

◊ Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, ◊ p < 0,001).

MM7a zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Lage des Wendepunktes der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve ( $p\alpha = 0$ , neutrale Kooperativität), reduzierte jedoch den Maximaleffekt von Pilocarpin konzentrationsabhängig. Der allosterische Modulator rief eine Verminderung der intrinsischen Aktivität hervor, ohne die Wirksamkeit von Pilocarpin zu verändern.

Da die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven bei allen untersuchten MM7a-Konzentrationen ein oberes Plateau erreichten (Abb. 34), konnte der Einfluss von MM7a auf den Maximaleffekt von Pilocarpin bestimmt werden, indem die G Protein-Aktivierung durch 1 mM Pilocarpin in Anwesenheit steigender Konzentrationen MM7a vermessen wurde (Abb. 35). Um zu zeigen, dass die Daten mit den Befunden der kompletten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 34 übereinstimmen, wurden die E<sub>max</sub>-Werte von Pilocarpin für die einzelnen Alloster-Konzentrationen (Abb. 34 / Tab. 25) in Abbildung 35 ergänzt (offene Symbole).



**Abb. 35:** Einfluss von MM7a auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM).

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von MM7a.

*Datenpunkte:* Geschlossene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2 Experimenten in Vierfachbestimmung. Offene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler der E<sub>max</sub>-Werte aus Abb. 34 bzw. Tab. 25.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 10.

Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der Hill-Steigung  $n_H = -1$  (siehe Kapitel 3.2.1). Die freilaufende Hill-Steigung betrug  $-1,28 \pm 0,22$  (geschlossene Symbole) bzw.  $-0,68 \pm 0,12$  (offene Symbole) und führte in beiden Fällen laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung.

Bei der experimentellen Bestimmung des Einflusses steigender MM7a-Konzentrationen auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Maximaleffekt (Abb. 35, geschlossene Symbole) wurde ein halbmaximaler Effekt von MM7a ( $pIC_{50}$ -Wert) von  $4,87 \pm 0,08$  ( $n = 2$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 4 \pm 3\%$  gefunden. MM7a hob die intrinsische Aktivität von Pilocarpin also vollständig auf. Anhand der Auftragung der oberen Plateaus der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit von bestimmten MM7a-Konzentrationen (Abb. 35, offene Symbole) berechnete sich ein  $pIC_{50}$ -Wert von  $5,45 \pm 0,10$  ( $n = 2-16$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 18 \pm 3\%$ . Dieser Wert unterscheidet sich signifikant von 0% ( $p < 0,0001$ ). Die  $pIC_{50}$ -Werte und  $E_{min}$ -Werte aus beiden Auftragungen unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test,  $p = 0,19$  für die  $pIC_{50}$ -Werte und  $p = 0,29$  für die  $E_{min}$ -Werte).

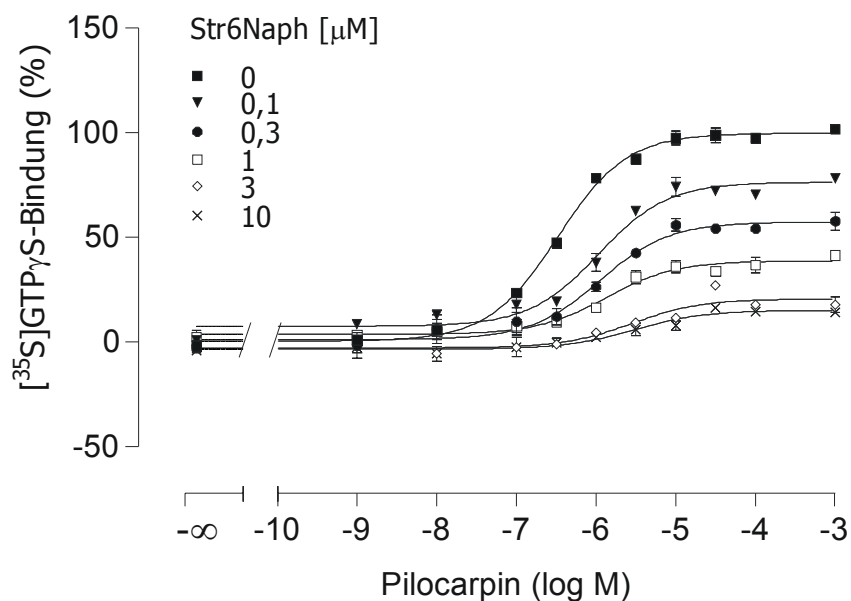
#### 3.2.3.4.5 Str6Naph

Str6Naph enthält ein Strychnin-Molekül, das unter Quaternisierung eines Stickstoffatoms über eine Alkylkette mit einem MM7a-Molekül verknüpft ist. Das Molekül Str6Naph vereint somit zwei Strukturelemente, die eine hohe Affinität zu dem mit dem Antagonisten *N*-Methylscopolamin (NMS) besetzten  $M_2$ -Rezeptor bedingen: einen Strychnin-Rest (Zlotos et al., 2003) sowie einen lateralen Naphthalimid-Rest (Holzgrave et al., 2000). In Radioligandbindungsstudien zeigte sich erwartungsgemäß eine hohe Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor ( $pEC_{50,diss} = 7,81$ ), aber auch eine ungewöhnlich ausgeprägte Steigerung der NMS-Bindung ( $\alpha = 1,88$ ). Die Konzentrations-Effekt-Kurve von Str6Naph fiel durch eine hohe Steilheit auf, was auf einen atypischen Wirkungsmechanismus hindeutet (Dancila, 2004).

Im Folgenden wird der konzentrationsabhängige Effekt von Str6Naph auf die durch Pilocarpin induzierte G Protein-Aktivierung (gemessen anhand der Bindung von  $[^{35}S]GTP\gamma S$ ) gezeigt. Dargestellt ist der Einfluss steigender Str6Naph-Konzentrationen auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (Abb. 36, pharmakologische Kennwerte in Tab. 26), auf den Pilocarpin-Maximaleffekt (intrinsische Aktivität von Pilocarpin, Abb. 37) sowie auf den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve (Affinität von Pilocarpin, Abb. 38).

Alle Kurven in Abbildung 36 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 26 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.

## Ergebnisse



**Abb. 36:** Einfluss von Str6Naph auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen.  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2-3 (Kontrolle: n = 12) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 9.

	Kontrolle	Str6Naph 0,1 μM	Str6Naph 0,3 μM	Str6Naph 1 μM	Str6Naph 3 μM	Str6Naph 10 μM
pEC <sub>50</sub>	6,48 ± 0,03	5,97 ± 0,08 <sup>°</sup>	5,95 ± 0,10 <sup>°</sup>	5,88 ± 0,11 <sup>°</sup>	5,63 ± 0,22	5,61 ± 0,17 <sup>†</sup>
Emax (%)	100 ± 1	76 ± 2 <sup>°</sup>	57 ± 2 <sup>°</sup>	39 ± 1 <sup>°</sup>	23 ± 3 <sup>°</sup>	15 ± 1 <sup>°</sup>
n	12	2	2	2	3	3
η <sub>H</sub> (freilaufernd)	0,99 ± 0,06	1,26 ± 0,22	1,00 ± 0,21	1,18 ± 0,29	1,12 ± 0,41	0,78 ± 0,28

**Tabelle 26:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Str6Naph (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, Emax, η<sub>H</sub>: siehe Tab. 11.

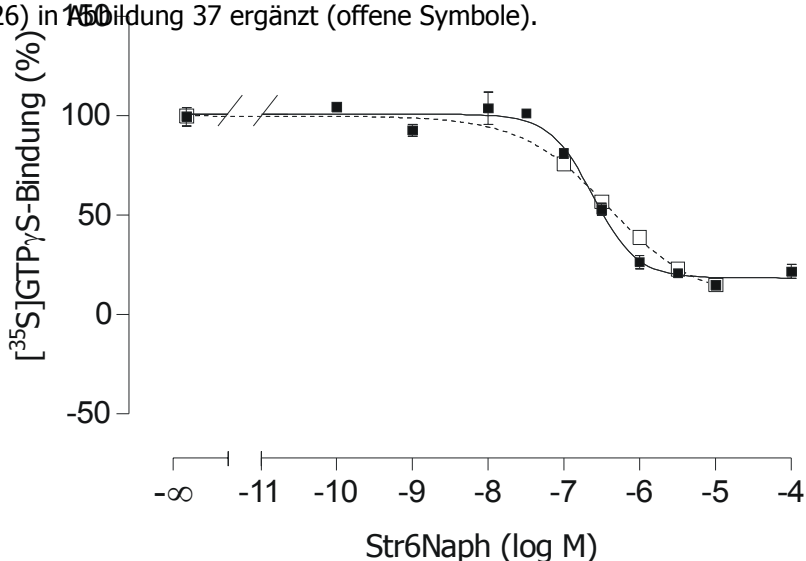
†; ° Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, † p < 0,05; ‡ p < 0,01; ° p < 0,001).

Str6Naph in den Konzentrationen 100 nM bis 1 μM sowie 10 μM verschob den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve statistisch signifikant nach rechts. Der Maximaleffekt von Pilocarpin wurde konzentrationsabhängig durch Str6Naph gesenkt. Str6Naph vermindert die Affinität und die intrinsische Aktivität von Pilocarpin.

Da die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven bei allen untersuchten Str6Naph-Konzentrationen ein oberes Plateau erreichten (Abb. 36), konnte der Einfluss von Str6Naph auf den Maximaleffekt von Pilocarpin bestimmt werden, indem die G Protein-Aktivierung durch 1 mM Pilocarpin unter dem Einfluss von steigenden Konzentrationen Str6Naph vermessen wurde (Abb. 37). Um zu zeigen, dass die Daten mit den Befunden der kompletten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 36

## Ergebnisse

übereinstimmen, wurden die Emax-Werte von Pilocarpin für die einzelnen Alloster-Konzentrationen (Abb. 36 / Tab. 26) in Abbildung 37 ergänzt (offene Symbole).



**Abb. 37:** Einfluss von Str6Naph auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM).  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Str6Naph.  
*Datenpunkte:* Geschlossene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2 Experimenten in Vierfachbestimmung. Offene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler der Emax-Werte aus Abb. 36 bzw. Tab. 26.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 10.

Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung (Kapitel 3.2.1). Die freilaufende Hill-Steigung betrug  $-1,52 \pm 0,25$  (geschlossene Symbole) bzw.  $-0,75 \pm 0,03$  (offene Symbole) und führte in beiden Fällen laut F-Test im Vergleich zu der auf  $n_H = -1$  festgesetzten Steigung zu einer signifikant besseren Kurvenanpassung. Die Kurven in Abbildung 37 werden deshalb jeweils durch den freilaufenden Hill-Koeffizienten beschrieben.

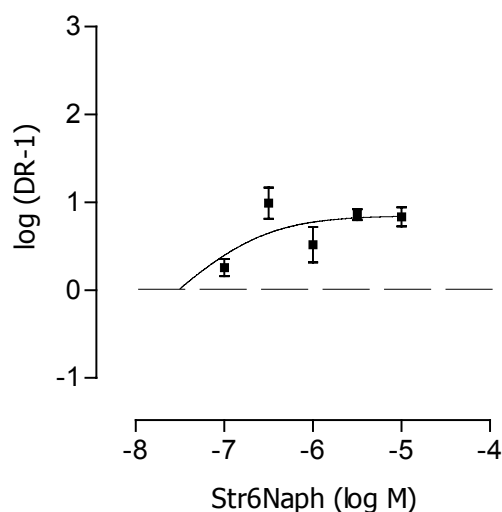
Bei der experimentellen Bestimmung des Einflusses steigender Str6Naph-Konzentrationen auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Maximaleffekt (Abb. 37, geschlossene Symbole) wurde ein halb-maximaler Effekt von Str6Naph ( $pIC_{50}$ -Wert) von  $6,61 \pm 0,05$  ( $n = 2$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 19 \pm 2\%$ ; gefunden. Dieser Wert weicht nicht signifikant von 0% ab ( $p = 0,07$ ). Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs ( $n = 2$ ) und des niedrigen Signifikanzniveaus ( $p = 0,07$ ) ist es jedoch wahrscheinlich, dass Str6Naph die intrinsische Aktivität von Pilocarpin nicht vollständig unterbindet.

Anhand der Auftragung Emax-Werte aus Abbildung 36 (Abb. 37, offene Symbole) berechnete sich ein  $pIC_{50}$ -Wert von  $6,40 \pm 0,03$  ( $n = 2-12$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin auf  $E_{min} = 7 \pm 2\%$ . Die  $E_{min}$ -Werte, nicht jedoch die  $pIC_{50}$ -Werte aus beiden Auftragungen, unterscheiden sich signifikant (t-Test,  $p = 0,02$  für die  $E_{min}$ -Werte und  $p = 0,06$  für die  $pIC_{50}$ -Werte). Allerdings erscheint die Beschreibung der Kurve aus den Emax-Werten aufgrund der vergleichsweise geringeren Anzahl der bestimmten Datenpunkte als ungenauer.



## Ergebnisse

Die identische Steigung aller Konzentrations-Effekt-Kurven (Abb. 36) ermöglichte die Analyse der Str6Naph-abhängigen Verschiebung der Wendepunkte nach dem allosterischen Modell (Lanzafame et al., 1996) in Abb. 38 (siehe Kapitel 3.2.3.2.1).



**Abb. 38:** Verschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Abhängigkeit von der Str6Naph-Konzentration.

*Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) minus eins:  $DR = EC_{50, \text{Pilocarpin}}$  in Anwesenheit von Str6Naph dividiert durch  $EC_{50, \text{Pilocarpin}}$  in Abwesenheit von Str6Naph.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Str6Naph.

*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-3$  Experimenten pro Str6Naph-Konzentration in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 13; es liegen die Daten aus Abb. 36 zu Grunde.

Die Analyse der Daten aus Abbildung 36 nach Lanzafame et al. (1996) ergab eine Affinität zum freien Rezeptor von  $pK_A = 7,64 \pm 0,27$  und einen Kooperativitätsfaktor  $p\alpha = -0,91 \pm 0,09$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 12$ ). Die berechnete Affinität von Str6Naph  $p(\alpha \cdot K_A)$  zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor beträgt 6,73.

### 3.2.3.4.6 Kenndaten der Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen

Substanz	E <sub>min</sub> (%)	$p\alpha$	$pK_A$	$p(\alpha \cdot K_A)$	$pIC_{50}$
W84	$-1 \pm 4$ ( $n = 5$ )	$-1,68 \pm 0,21$ ( $n = 11$ )	$6,46 \pm 0,10$ ( $n = 11$ )	4,78	$5,02 \pm 0,07$ ( $n = 5$ )
SH28 ( $\frac{1}{2}$ W84)	$31 \pm 6$ ( $n = 3$ )	$-3,37 \pm 0,33$ ( $n = 19$ )	$5,60 \pm 0,07$ ( $n = 19$ )	2,23	$4,01 \pm 0,13$ ( $n = 3$ )
MM3a (Naphmethonium)	$7 \pm 3$ ( $n = 4$ )	$\sim 0,6$	$\sim 7,07^{**}$	7,67*	$7,67 \pm 0,09$ ( $n = 4$ )
MM7a ( $\frac{1}{2}$ Naphmethonium)	$4 \pm 3$ ( $n = 2$ )	0	4,87**	4,87*	$4,87 \pm 0,08$ ( $n = 2$ )
Str6Naph	$19 \pm 2$ ( $n = 2$ )	$-0,91 \pm 0,09$ ( $n = 12$ )	$7,64 \pm 0,27$ ( $n = 12$ )	6,73	$6,61 \pm 0,05$ ( $n = 2$ )

**Tabelle 27:** Kennwerte des Effektes der Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen auf die Affinität und intrinsische Aktivität von Pilocarpin (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler). Definitionen von E<sub>max</sub>,  $p\alpha$ ,  $pK_A$ ,  $p(\alpha \cdot K_A)$ ,  $pIC_{50}$ : siehe Tabelle 18.

\* Da  $p(\alpha \cdot K_A)$  und  $pIC_{50}$  übereinstimmen (siehe Kapitel 4.6.2.1.1), gilt:  $pIC_{50} = p(\alpha \cdot K_A)$ .

\*\* Nach Ellis (1997) ist  $pK_A$  die Differenz aus  $p(\alpha \cdot K_A)$  und  $p\alpha$ .

Auch bei den Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen findet man eine höhere Affinität der großen, „dimeren“ im Vergleich zu den entsprechenden kleinen, „monomeren“ Modulatoren zum freien und Pilocarpin-besetzten Rezeptor. Das Ausmaß der Senkung der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung ist unabhängig von der Größe des allosterischen Modulators.

In der Gruppe der Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen finden sich Allosterie, die die Wirksamkeit von Pilocarpin erhöhen (Naphmethonium;  $\rho\alpha > 0$ ), sie vermindern (W84, SH28, Str6Naph;  $\rho\alpha < 0$ ) und die sie unverändert lassen (MM7a;  $\rho\alpha = 0$ ).

### 3.2.3.5 Bispyridinium-Verbindung: Duo3

Ogleich der allosterische Modulator Duo3 strukturell den Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen ähnlich ist (s. Kapitel 2.5), zeigt er ein atypisches Verhalten: in Radioligandbindungsexperimenten ist die Hill-Steigung seiner Konzentrations-Effekt-Kurven steiler als 1 und die Affinität zum  $M_2$ -Rezeptor ist wenig von dem verwendeten Puffer abhängig (Tränkle und Mohr, 1997; Schröter et al., 2000). Tränkle und Mohr (1997) stellten fest, dass Duo3 sich nicht kompetitiv gegenüber dem an die „common allosteric site“ bindenden allosterischen Modulator Obidoxim verhält, und postulierten für Duo3 abweichende Bindungsareale am  $M_2$ -Rezeptor.

Im Folgenden wird der konzentrationsabhängige Effekt von Duo3 auf die durch Pilocarpin induzierte G Protein-Aktivierung (gemessen anhand der Bindung von [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S) gezeigt. Dargestellt ist der Einfluss steigender Duo3-Konzentrationen auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (Abb. 39, pharmakologische Kennwerte in Tab. 28), auf den Pilocarpin-Maximaleffekt (intrinsische Aktivität von Pilocarpin, Abb. 40) sowie auf den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve (Affinität von Pilocarpin, Abb. 41). Alle Kurven in Abbildung 39 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 28 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.

## Ergebnisse

1% DMSO im Ansatz veränderte weder den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve ( $p = 0,37$ ) noch den Maximaleffekt statistisch signifikant ( $p = 0,31$ ).

	Kontrolle	DMSO 10%	DMSO 3%	DMSO 1%
pEC <sub>50</sub>	6,13 ± 0,07	5,37 ± 0,16 <sup>°</sup>	5,76 ± 0,09 <sup>†</sup>	6,00 ± 0,11
E <sub>max</sub> (%)	38 ± 2	73 ± 5 <sup>°</sup>	47 ± 2 <sup>†</sup>	42 ± 2
n	9	3	3	3
n <sub>H</sub> (freilaufend)	11,24 ± 17662	1,24 ± 0,45	0,81 ± 0,13	0,85 ± 0,19

**Tabelle 32:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin in Anwesenheit von 3 µM Alcuronium unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von DMSO (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, E<sub>max</sub>, n<sub>H</sub>: siehe Tab. 12.

<sup>†</sup>; <sup>°</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>†</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>°</sup>  $p < 0,001$ ).

Entsprechend dieser Ergebnisse wurden die Substanzen Caracurin V, Caracurin VII, Di-WGA 6, Di-Strychnin 6, Str6Naph und Duo3 nur in Konzentrationen eingesetzt, mit denen maximal 1% DMSO im Versuchsansatz resultierte.

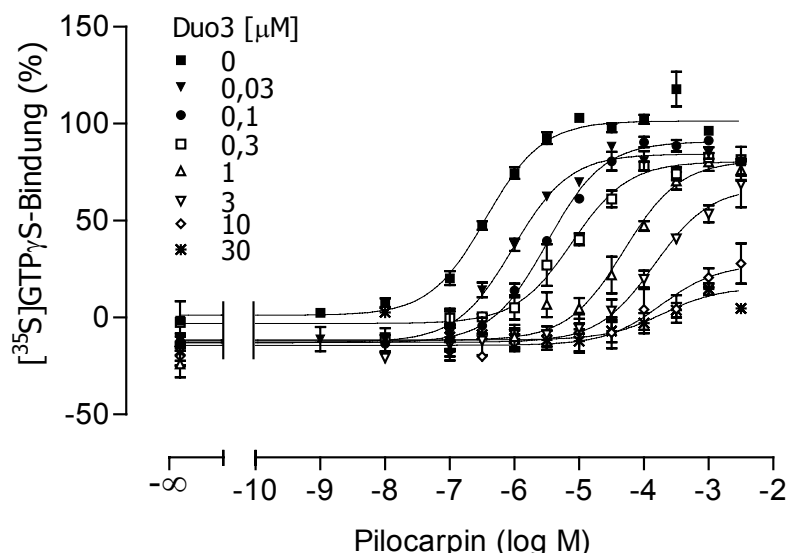
### 3.3 Versuche mit CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen

Es sollte geprüft werden, ob die allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten intrinsischen Aktivität an CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen ebenso wie an CHO-M<sub>2</sub>-Zellmembranen möglich ist. Dazu wurde zunächst eine Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve aufgenommen und der Einfluss des kompetitiven Antagonisten bestimmt, bevor die allosterischen Leitsubstanzen Alcuronium, W84 und Gallamin untersucht wurden. Um festzustellen, ob die Allosterie die Wirksamkeit von Pilocarpin an beiden Rezeptorsubtypen gleichermaßen beeinflussen, wurde zusätzlich das die Affinität von Pilocarpin an CHO-M<sub>2</sub>-Zellmembranen erhöhende Naphmethonium betrachtet.

#### 3.3.1 Konzentrationsabhängiger Effekt von Pilocarpin

Zunächst wurde an CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen eine Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve aufgenommen, und deren Kennwerte wurden den Literaturdaten gegenübergestellt. Die Kurve (Abbildung 47) wurde ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Der nicht konstant gesetzte Hill-Koeffizient  $n_H = 0,91 ± 0,26$  führte laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung.

## Ergebnisse



**Abb. 39:** Einfluss von Duo3 auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen.  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2-4 (Kontrolle: n = 16) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 9.

	Kontr.	Duo3 0,03 μM	Duo3 0,1 μM	Duo3 0,3 μM	Duo3 1 μM	Duo3 3 μM	Duo3 10 μM	Duo3 30 μM
pEC <sub>50</sub>	6,44 ± 0,04	6,02 ± 0,08 <sup>†</sup>	5,49 ± 0,05 <sup>◇</sup>	5,11 ± 0,10 <sup>◇</sup>	4,31 ± 0,12 <sup>◇</sup>	3,84 ± 0,10 <sup>◇</sup>	3,23 ± 0,31 <sup>‡</sup>	3,44 ± 0,48 <sup>‡</sup>
Emax (%)	101 ± 1*	84 ± 3 <sup>◇</sup>	91 ± 2 <sup>‡</sup>	80 ± 3 <sup>◇</sup>	81 ± 5 <sup>◇</sup>	67 ± 4 <sup>◇</sup>	27 ± 7 <sup>◇</sup>	24 ± 15 <sup>◇</sup>
n	16	3	2	2	3	3	4	4
n <sub>H</sub> (freilaufernd)	1,11 ± 0,09	1,00 ± 0,16	0,91 ± 0,08	0,85 ± 0,17	0,71 ± 0,17	0,63 ± 0,13	0,30 ± 0,28	1,24 ± 0,28

**Tabelle 28:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Duo3 (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, Emax, n<sub>H</sub>: siehe Tab. 12.

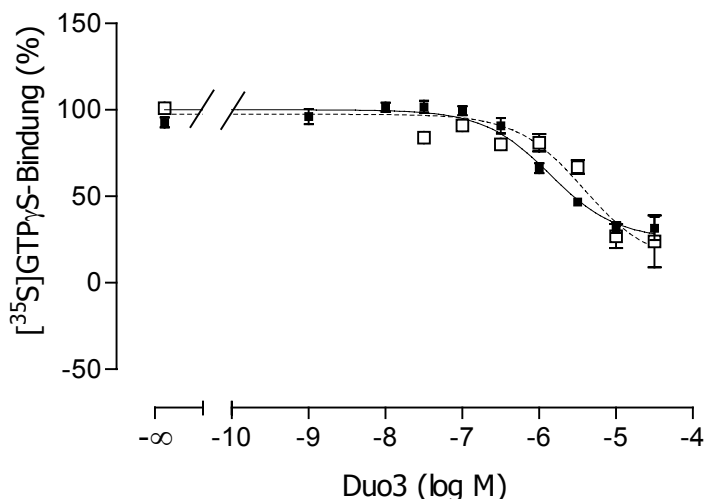
<sup>†</sup>, <sup>‡</sup>, <sup>◇</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>†</sup> p < 0,05; <sup>‡</sup> p < 0,01; <sup>◇</sup> p < 0,001).

\* Die Abweichung von 100% beruht auf Rundungsungenauigkeiten.

Duo3 ruft eine konzentrationsabhängige Rechtsverschiebung des Wendepunktes und eine Senkung des oberen Plateaus der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve hervor. Die intrinsische Aktivität von Pilocarpin wird jedoch im untersuchten Konzentrationsbereich durch Duo3 nicht vollständig unterbunden. Demnach vermindert Duo3 nicht nur die Affinität, sondern auch die intrinsische Aktivität von Pilocarpin.

Der Einfluss von Duo3 auf den Maximaleffekt von Pilocarpin wurde bestimmt, indem die G Protein-Aktivierung durch 1 mM Pilocarpin unter dem Einfluss von steigenden Konzentrationen Duo3 vermessen wurde (Abb. 40). Um zu zeigen, dass die Daten mit den Befunden der kompletten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 39 übereinstimmen, wurden die Emax-Werte von Pilocarpin für die einzelnen Alloster-Konzentrationen (Abb. 39 / Tab. 28) in Abbildung 40 ergänzt (offene Symbole, gestrichelte Linie).

## Ergebnisse



**Abb. 40:** Einfluss von Duo3 auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM).

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Duo3.

*Datenpunkte:* Geschlossene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 4 Experimenten in Vierfachbestimmung. Offene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler der Emax-Werte aus Abb. 39 bzw. Tab. 28.

*Kurvenanpassung:* anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung mit einer Hill-Steigung  $n_H = -1,45$  (geschlossene Symbole, siehe Text) bzw. mit einer Hill-Steigung  $n_H = -1,45$  (offene Symbole, siehe Text).

Durch einen F-Test wurde überprüft, ob die Kurven ausreichend mit einer auf  $n_H = -1$  festgesetzten Steigung beschrieben wurden. Für die experimentell bestimmten Datenpunkte führte der nicht festgesetzte Hill-Koeffizient  $n_H = -1,45 \pm 0,30$  zu einer signifikant besseren Kurvenanpassung. Die hohe Steilheit der Duo3-Konzentrations-Effekt-Kurve steht im Einklang mit den in Radioligandbindungsexperimenten mit [<sup>3</sup>H]NMS erhobenen Befunden und dem postulierten „atypischen“ Wirkungsmechanismus von Duo3 (s. o.). Die Emax-Werte aus Tabelle 28 wurde jedoch ausreichend anhand einer Kurve mit der Hill-Steigung  $n_H = -1$  beschrieben; die freilaufende Hill-Steigung  $n_H = -0,67 \pm 0,42$  führte zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung.

Bei der Bestimmung des Einflusses steigender Duo3-Konzentrationen auf die durch 1 mM Pilocarpin induzierte [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung (Abb. 40, geschlossene Symbole) wurde ein halbmaximaler Effekt von Duo3 ( $pIC_{50}$ -Wert) von  $5,93 \pm 0,07$  ( $n = 4$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 31 \pm 2\%$ ; gefunden. Dieser Wert weicht statistisch signifikant von 0% ab ( $p = 0,0006$ ). Duo3 senkt die intrinsische Aktivität von Pilocarpin also nicht vollständig.

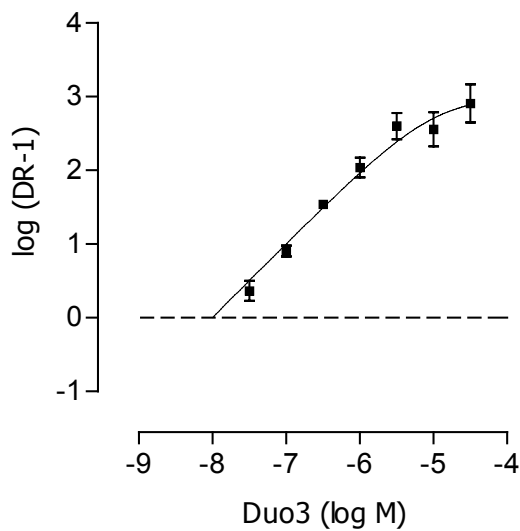
Anhand der Auftragung der Emax-Werte (Abb. 40, offene Symbole) berechnete sich ein  $pIC_{50}$ -Wert von  $5,42 \pm 0,23$  ( $n = 2-16$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 11 \pm 12\%$ . Dieser  $E_{min}$ -Wert unterscheidet sich nicht signifikant von 0% (t-Test,  $p = 0,37$ ). Die  $pIC_{50}$ -Werte und  $E_{min}$ -Werte aus beiden Auftragungen unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test,  $p = 0,61$  für die  $pIC_{50}$ -Werte und  $p = 0,51$  für die  $E_{min}$ -Werte).

Zu beachten ist, dass die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit von Duo3 1  $\mu$ M ihr Maximum bei 1 mM Pilocarpin noch nicht vollständig erreicht hatten (Abb. 39). Möglicherweise wird deshalb bei einer Messung des Einflusses steigender Konzentrationen Duo3 auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Maximaleffekt der Effekt von Duo3 überschätzt. Die Auftragung der Emax-Werte

## Ergebnisse

der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit von Duo3 bestätigt jedoch das Ausmaß der Senkung des Pilocarpin-Maximaleffektes durch Duo3. Die maximale Senkung der durch 1 mM Pilocarpin induzierten [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung (Emin, Abb. 40) dürfte dem Maximaleffekt von Duo3 entsprechen.

Die identische Steigung aller Konzentrations-Effekt-Kurven (Abb. 38) ermöglichte die Analyse der Duo3-abhängigen Verschiebung der Wendepunkte nach dem allosterischen Modell (Lanzafame et al., 1996) in Abbildung 41 (siehe Kapitel 3.2.3.2.1).



**Abb. 41:** Verschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Abhängigkeit von der Duo3-Konzentration.

*Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) minus eins:  $DR = EC_{50, \text{Pilocarpin}}$  in Anwesenheit von Duo3 dividiert durch  $EC_{50, \text{Pilocarpin}}$  in Abwesenheit von Duo3.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Duo3.

*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-4$  Experimenten pro Duo3-Konzentration in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 13; es liegen die Daten aus Abb. 39 zu Grunde.

Die Analyse der Daten aus Abbildung 39 nach Lanzafame et al. (1996) ergab eine Affinität zum freien Rezeptor von  $pK_A = 8,00 \pm 0,09$  und einen Kooperativitätsfaktor  $p\alpha = -3,01 \pm 0,19$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 18$ ). Die rechnerisch ermittelte Affinität von Duo3  $p(\alpha \cdot K_A)$  zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor beträgt 4,99. In Radioligandbindungsexperimenten wurde in einem Mg-Tris-Puffer eine Affinität zum freien  $M_2$ -Rezeptor von  $pK_A = 7,30 \pm 0,05$  ( $n = 5$ ) ermittelt (Schröter et al., 2000). Der in dieser Arbeit bestimmte Wert liegt also in der gleichen Größenordnung.

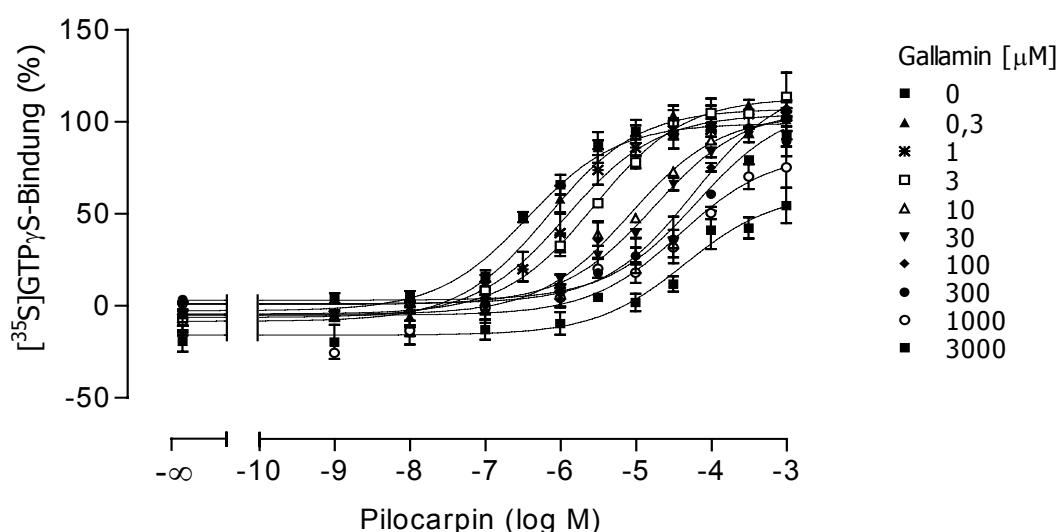
### 3.2.3.6 Gallamin

Bereits 1976 stellten Clark und Mitchelson eine nichtkompetitive Interaktion zwischen Gallamin und Atropin fest. Gallamin vermindert die Gleichgewichtsbindung von Antagonisten wie z. B. *N*-Methylscopolamin und Atropin, aber auch von Agonisten wie Acetylcholin, Oxotremorin M und Pilocarpin am  $M_2$ -Rezeptor (Stockton et al., 1982).

## Ergebnisse

Im Folgenden wird der konzentrationsabhängige Effekt von Gallamin auf die durch Pilocarpin induzierte G Protein-Aktivierung (gemessen anhand der Bindung von [<sup>35</sup>S]GTPγS) gezeigt. Dargestellt ist der Einfluss steigender Gallamin-Konzentrationen auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (Abb. 42, pharmakologische Kennwerte in Tab. 29) sowie auf den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve (Affinität von Pilocarpin, Abb. 43).

Alle Kurven in Abbildung 42 wurden zum Teil ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1), bei einigen führte jedoch ein nicht festgesetzter Hill-Koeffizient zu einer signifikant besseren Kurvenanpassung. Nach einer Datenanalyse nach Lew und Angus (1997) konnte die Hill-Steigung aller Kurven auf  $n_H = 0,725$  konstant gesetzt werden. Die in Tabelle 29 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 0,725$  festgesetzten Steigung; zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt.



**Abb. 42:** Einfluss von Gallamin auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen.  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2-4 (Kontrolle: n = 16) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 9; die Hill-Steigung aller Kurven beträgt 0,725.

	Kontr.	Gall. 0,3 μM	Gall. 1 μM	Gall. 3 μM	Gall. 10 μM	Gall. 30 μM	Gall. 100 μM	Gall. 300 μM	Gall. 1000 μM	Gall. 3000 μM
pEC <sub>50</sub>	6,43 ± 0,08	6,15 ± 0,11	5,91 ± 0,10 <sup>‡</sup>	5,55 ± 0,10 <sup>◊</sup>	5,08 ± 0,10 <sup>◊</sup>	4,76 ± 0,06 <sup>◊</sup>	4,22 ± 0,19 <sup>†</sup>	4,19 ± 0,16 <sup>◊</sup>	4,41 ± 0,20 <sup>◊</sup>	4,34 ± 0,21 <sup>◊</sup>
E <sub>max</sub> (%)	100 ± 2	107 ± 3	104 ± 3	113 ± 3 <sup>†</sup>	104 ± 3	107 ± 3	122 ± 11	109 ± 8	83 ± 8	61 ± 8 <sup>◊</sup>
n	16	3	3	3	2	3	4	2	4	2
n <sub>H</sub> (frei- laufend)	1,03 ± 0,13	1,08 ± 0,19	0,85 ± 0,13	0,71 ± 0,12	0,60 ± 0,12	0,47 ± 0,17	0,30 ± 0,28	0,81 ± 0,22	0,42 ± 0,83	0,67 ± 0,26

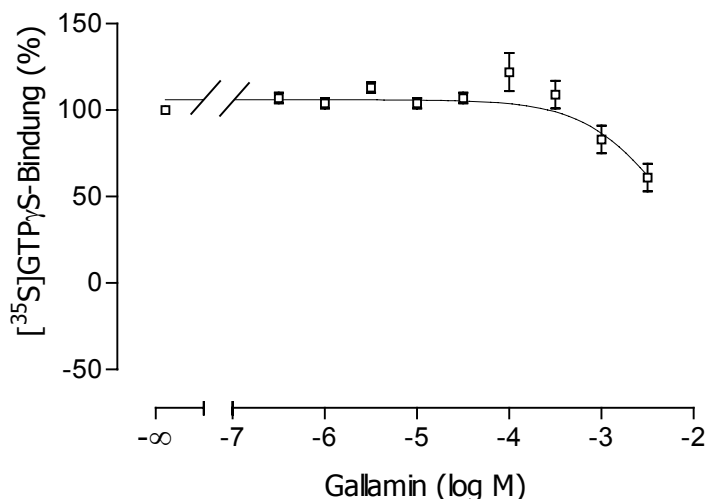
**Tabelle 29:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Gallamin (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, E<sub>max</sub>: siehe Tab. 12.

<sup>†</sup>; <sup>‡</sup>; <sup>◊</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>†</sup> p < 0,05; <sup>‡</sup> p < 0,01; <sup>◊</sup> p < 0,001).

## Ergebnisse

Gallamin in Konzentrationen ab 1  $\mu\text{M}$  verschob den Wendepunkt statistisch signifikant nach rechts. Der Maximaleffekt von Pilocarpin bleibt über einen weiten Konzentrationsbereich unbeeinflusst. Erst in Konzentrationen ab 1 mM kommt es zu einer deutlichen Verminderung des Pilocarpin-Maximaleffektes.

Zur Bestimmung der Gallamin-Konzentration, die den Pilocarpin-Effekt halbmaximal reduziert ( $\text{pIC}_{50}$ ), wurden die  $\text{Emax}$ -Werte aus Tabelle 29 gegen die entsprechenden Gallamin-Konzentration aufgetragen (Abb 43).



**Abb. 43:** Einfluss von Gallamin auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM).

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt ([<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung in Anwesenheit von 1 mM Pilocarpin) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Gallamin.

*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-4$  Experimenten in Vierfachbestimmung, es liegen die Daten aus Tab. 29 zu Grunde.

*Kurvenanpassung:* anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung, der Hill-Koeffizient beträgt in der gezeigten Kurve  $n_H = -1$ ; das untere Plateau wurde in dieser Abbildung auf 0% konstant gesetzt.

Die Kurve in Abbildung 43 wurde nicht vollständig beschrieben. Das untere Plateau der Kurve kann also zwischen dem  $\text{Emax}$ -Wert der höchsten untersuchten Gallamin-Konzentration (61%) und ca. 0% liegen. Die vier Parameter enthaltende logistische Gleichung wurde zur Kurvenanpassung verwendet, wobei das untere Plateau auf 0% bzw. auf 61% konstant gesetzt wurde. Für beide Fälle wurde anhand eines F-Tests festgestellt, dass ein Hill-Koeffizient  $n_H = -1$  zu einer ausreichend genauen Kurvenanpassung führt. Tabelle 30 zeigt die Wendepunkte mit den entsprechenden Hill-Koeffizienten und unteren Plateaus der Kurven.

		Hill-Koeffizient	
		-1	nicht festgesetzt
Unteres Plateau, festgesetzt auf	0%	$\text{pIC}_{50} = 2,35 \pm 0,16$	$\text{pIC}_{50} = 2,45 \pm 0,18$ ( $n_H = -1,34$ )
	61%	$\text{pIC}_{50} = 2,88 \pm 0,31$	$\text{pIC}_{50} = 3,00 \pm 46,9$ ( $n_H = -14,07$ )

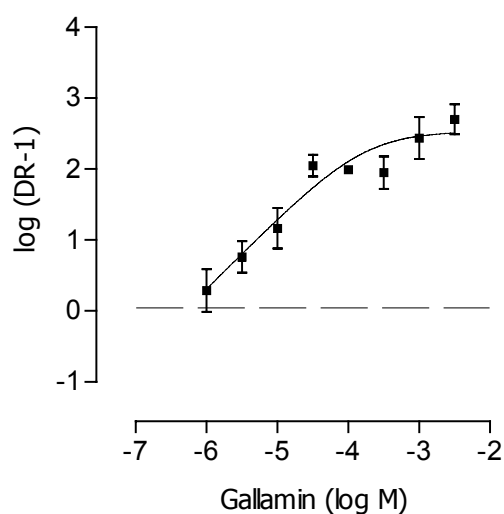
**Tabelle 30:** Wendepunkte ( $\text{pIC}_{50}$ ) der Konzentrations-Effekt-Kurven von Gallamin in Anwesenheit von 1 mM Pilocarpin (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler).



## Ergebnisse

Der negative dekadische Logarithmus der Gallamin-Konzentration, der auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Effekt halbmaximal hemmend wirkt ( $pIC_{50}$ , Maß für die Affinität von Gallamin zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor), liegt also in der Größenordnung zwischen 2,35 und 3,00.

Für die Analyse der Verschiebefaktoren nach dem allosterischen Modell ist eine Voraussetzung, dass die Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve ohne Veränderung der Steilheit der Kurven rechtsverschoben sind. Einige der Konzentrations-Effekt-Kurven wurden ausreichend durch eine Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben, bei anderen führte ein nicht festgesetzter Hill-Koeffizient zu einer signifikant besseren Darstellung der Daten. Nach Lew und Angus (1997, Kapitel 2.3.3.3) wurde jedoch per F-Test festgestellt, dass die *Gesamtheit* der Kurven ausreichend durch den gemittelten Hill-Koeffizienten  $n_H = 0,725$  beschreibbar ist.



**Abb. 44:** Verschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Abhängigkeit von der Gallamin-Konzentration.

*Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) minus eins:  $DR = \frac{EC_{50, \text{Pilocarpin}} \text{ in Anwesenheit von Gallamin}}{EC_{50, \text{Pilocarpin}} \text{ in Abwesenheit von Gallamin}}$ .

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Gallamin.

*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-4$  Experimenten pro Gallamin-Konzentration in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 13; es liegen die Daten aus Abb. 42 zu Grunde.

Die Analyse der Daten nach dem allosterischen Modell ergab eine Affinität zum freien Rezeptor  $pK_A = 6,31 \pm 0,13$  und einen Kooperativitätsfaktor  $p\alpha = -2,53 \pm 0,16$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler,  $n = 22$ ). Die rechnerisch ermittelte Affinität von Gallamin ( $p(\alpha \cdot K_A)$ ) zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor beträgt 3,78. Auch Lazareno et al. (1995) fanden in  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimenten an CHO- $M_2$ -Zellmembranen einen  $pK_A$ -Wert von 6,30. Die in dieser Arbeit gefundene Affinität von Gallamin zum freien  $M_2$ -Rezeptor stimmt mit der in der Literatur vorgefundenen überein.

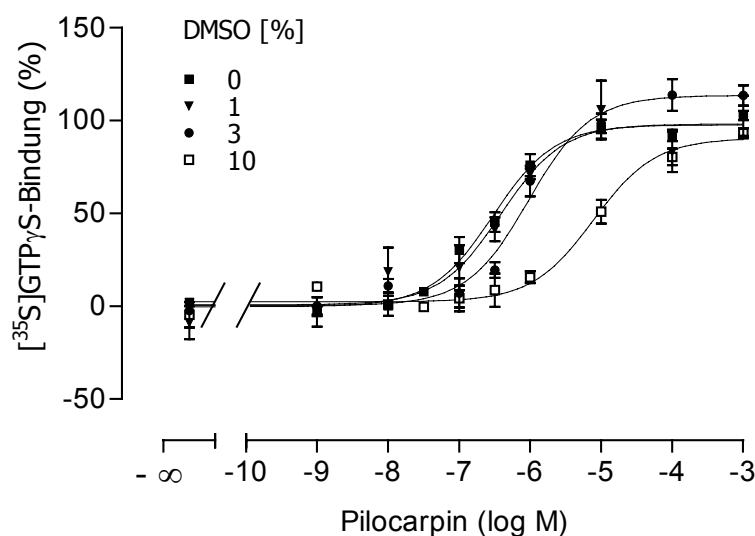
### 3.2.4 Einfluss des Lösungsmittels DMSO

Die Substanzen Caracurin V, Caracurin VII, Di-WGA 6, Di-Strychnin 6, Str6Naph und Duo3 konnten in hohen Konzentrationen nur mithilfe des Lösungsvermittlers DMSO (Dimethylsulfoxid) in wässrige Lösung gebracht werden. Es sollte an CHO-M<sub>2</sub>-Membransuspensionen geprüft werden, ob DMSO den Wendepunkt und das obere Plateau der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve bzw. den Effekt von Allosteren auf diese Kenngrößen verändert. Dazu wurde der allosterische Modulator Alcuronium beispielhaft in einer definierten Konzentration eingesetzt.

#### 3.2.4.1 Einfluss von DMSO auf den Effekt von Pilocarpin

Im Folgenden ist der Einfluss von DMSO auf die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt (Abb. 45, die pharmakologischen Kenngrößen zeigt Tabelle 31).

Alle Kurven in Abbildung 45 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 31 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.



**Abb. 45:** Einfluss von DMSO auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen.  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 3-4 (Kontrolle: n = 7) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 9.

DMSO in Konzentrationen von 10% und 3% im Ansatz riefen eine signifikante Rechtsverschiebung des Wendepunktes der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve hervor. 1% DMSO im Ansatz veränderte weder den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve ( $p = 0,47$ ) noch den Maximaleffekt statistisch signifikant ( $p > 0,99$ ).

## Ergebnisse

	Kontrolle	DMSO 1%	DMSO 3%	DMSO 10%
pEC <sub>50</sub>	6,52 ± 0,07	6,41 ± 0,16	6,05 ± 0,08 <sup>‡</sup>	5,12 ± 0,10 <sup>°</sup>
E <sub>max</sub> (%)	98 ± 2*	98 ± 6	114 ± 4 <sup>‡</sup>	90 ± 4
n	7	3	4	4
n <sub>H</sub> (freilaufend)	0,92 ± 0,14	0,98 ± 0,39	1,64 ± 0,39	0,71 ± 0,17

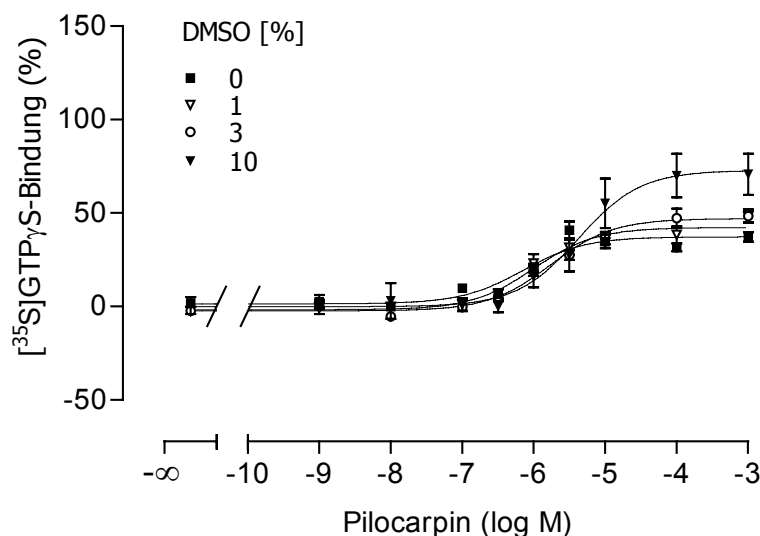
**Tabelle 31:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von DMSO (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, E<sub>max</sub>: siehe Tab. 12.

<sup>‡</sup>, <sup>°</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>‡</sup> p < 0,01; <sup>°</sup> p < 0,001).

\* Die Abweichung von 100% beruht auf Rundungsungenauigkeiten.

### 3.2.4.2 Einfluss von DMSO auf die allosterische Wirksamkeit von Alcuronium

Abbildung 46 zeigt den Einfluss von DMSO auf die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve in Anwesenheit von 3 µM Alcuronium (Kontrolle). Die pharmakologische Kenndaten sind in Tabelle 32 dargestellt. Alle Kurven in Abbildung 46 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung n<sub>H</sub> = 1 beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 32 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf n<sub>H</sub> = 1 festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.



**Abb. 46:** Einfluss von DMSO auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin in Anwesenheit von 3 µM Alcuronium an Membranen aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen.

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung in Prozent: Basalaktivität = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt = 100%.

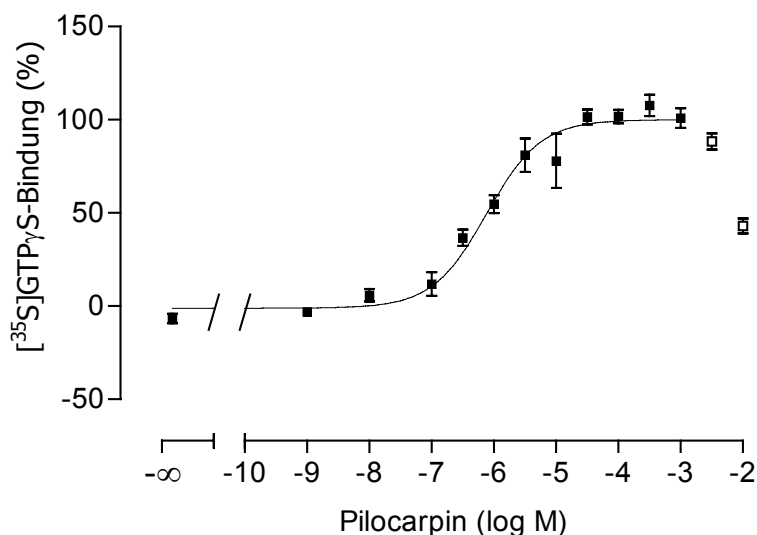
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.

*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 3 (Kontrolle: n = 9) Experimenten in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 9.

DMSO in Konzentrationen von 10% und 3% im Ansatz rief eine signifikante Rechtsverschiebung des Wendepunktes und Erhöhung des oberen Plateaus der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve in Anwesenheit von 3 µM Alcuronium hervor. Der Lösungsvermittler DMSO senkte die Wirksamkeit von Pilocarpin und antagonisierte den Effekt von Alcuronium auf die intrinsische Aktivität von Pilocarpin.

## Ergebnisse



**Abb. 47:** Effekt von Pilocarpin auf die [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung an CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen.

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.

*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 4 Experimenten in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* nichtlineare Regressionsanalyse anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung mit auf  $n_H = 1$  konstant gesetztem Hill-Koeffizienten (siehe Kapitel 3.2.1). Die mit offenen Symbolen bezeichneten Datenpunkte gingen in die Datenanalyse nicht mit ein.

Die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin erreicht ein oberes Plateau, das in hohen Pilocarpin-Konzentrationen abfällt. Möglicherweise beruht dies auf unspezifischen Effekten von Pilocarpin. Zur Bestimmung der pharmakologischen Kenndaten wurden in diesen Versuchen die Konzentrationen 3 mM und 10 mM Pilocarpin nicht einbezogen, ebenso diente die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve in späteren Versuchen an CHO-M<sub>4</sub>-Membransuspensionen nur im Konzentrationsbereich von 1 nM bis 1 mM als Referenzkurve. Alle in dieser Arbeit an CHO-M<sub>4</sub>-Membranen bestimmten Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven wurden gemittelt und der erhaltene Wert in Tabelle 33 den Literaturwerten gegenübergestellt.

Quelle	Gewebe	Methode	pEC <sub>50</sub>	n
diese Arbeit	CHO M <sub>4</sub> -Zellhomogenate	[ <sup>35</sup> S]GTP <sub>γ</sub> S-Bindungsexperiment	6,23 ± 0,03	6
McKinney et al., 1991	N1E-115 Zellen (M <sub>4</sub> -Rezeptoren exprimierend)	Messung der cAMP-Bildung	5,85	4
McKinney et al., 1991	Ratten Striatum (M <sub>4</sub> -Rezeptoren enthaltend)	Messung der cAMP-Bildung	5,00	4

**Tabelle 33:** Mittelwerte und Standardfehler der Wendepunkte der Oxotremorin M- und Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven an CHO- M<sub>4</sub>-Zellhomogenaten.

pEC<sub>50</sub> Negativer dekadischer Logarithmus der Pilocarpin-Konzentration, die eine halbmaximale [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung hervorruft (Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Der in dieser Arbeit bestimmte Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve und der durch McKinney et al. (1991) in N1E-115-Zellen ermittelten liegen in der gleichen Größenordnung. Die von McKinney et al. (1991) an Rattenstriatum bestimmte halbmaximal effektive Konzentration

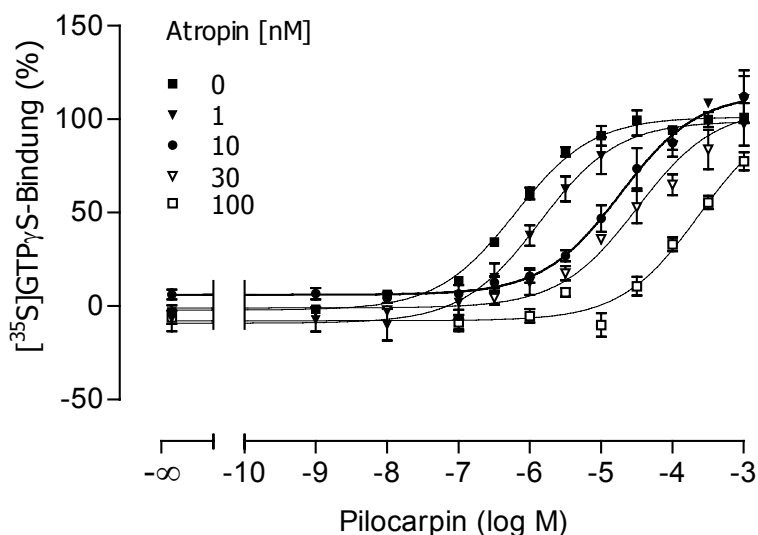
unterscheidet sich von der dieser Arbeit um etwa eine Dekade. Die  $pEC_{50}$ -Werte von Pilocarpin an CHO-M<sub>2</sub>-Homogenaten ( $6,49 \pm 0,14$ ;  $n = 4$ , siehe Kapitel 3.2.1) und M<sub>4</sub>-Homogenaten (Tab. 33) unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (t-Test,  $p = 0,07$ ).

### 3.3.2 Interaktion des kompetitiven Antagonisten Atropin mit der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung

Analog zu den Experimenten an CHO-M<sub>2</sub>-Membranen sollte auch für den M<sub>4</sub>-Rezeptor der Einfluss des orthosterischen Antagonisten Atropin auf die Kenngrößen der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve untersucht werden, um eine Abgrenzung zwischen kompetitiven Antagonisten und allosterischen Modulatoren der Pilocarpin-vermittelten G Protein-Aktivierung vorzunehmen.

Im Folgenden wird der konzentrationsabhängige Effekt von Atropin auf die durch Pilocarpin induzierte G Protein-Aktivierung, gemessen anhand der Bindung von [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S, gezeigt (Abb. 48, pharmakologische Kennwerte in Tab. 34).

Alle Kurven in Abbildung 48 wurden zum Teil ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1), bei einigen führte jedoch ein nicht festgesetzter Hill-Koeffizient zu einer signifikant besseren Kurvenanpassung. Nach einer Datenanalyse nach Lew und Angus (1997) konnte die Hill-Steigung aller Kurven auf  $n_H = 0,795$  konstant gesetzt werden (siehe unten). Die in Tabelle 34 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 0,795$  festgesetzten Steigung; zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt.



**Abb. 48:** Einfluss von Atropin auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>4</sub>-Zellen.  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 3-5$  (Kontrolle:  $n = 15$ ) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* nichtlineare Regressionsanalyse anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung mit auf  $n_H = 0,795$  konstant gesetztem Hill-Koeffizienten.

## Ergebnisse

	Kontrolle	Atropin 1 nM	Atropin 10 nM	Atropin 30 nM	Atropin 100 nM
pEC <sub>50</sub>	6,21 ± 0,04	5,88 ± 0,12 <sup>†</sup>	4,73 ± 0,12 <sup>◊</sup>	4,50 ± 0,14 <sup>◊</sup>	3,80 ± 0,11 <sup>◊</sup>
E <sub>max</sub> (%)	101 ± 1*	100 ± 4	114 ± 6 <sup>†</sup>	105 ± 7	105 ± 11
n	15	3	4	3	5
n <sub>H</sub> (freilaufend)	0,93 ± 0,07	0,88 ± 0,18	0,74 ± 0,14	0,41 ± 0,11	1,03 ± 0,26

**Tabelle 34:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Atropin (Mittelwerte ± Standardfehler).

pEC<sub>50</sub> Negativer dekadischer Logarithmus der Pilocarpin-Konzentration, die eine halbmaximale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung hervorruft, beruhend auf dem Hill-Koeffizienten n<sub>H</sub> = 1.

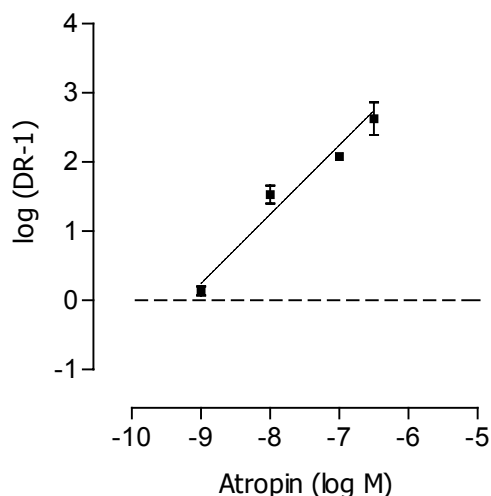
E<sub>max</sub> Maximaleffekt von Pilocarpin (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve), beruhend auf dem Hill-Koeffizienten n<sub>H</sub> = 1.

n<sub>H</sub> Hill-Koeffizient.

<sup>†</sup>, <sup>◊</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>†</sup> p < 0,05; <sup>◊</sup> p < 0,001).

\* Die Abweichung von 100% beruht auf Rundungsungenauigkeiten.

Atropin verschob den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve konzentrationsabhängig nach rechts, der Pilocarpin-Maximaleffekt blieb unverändert. Die statistisch signifikante Erhöhung des Pilocarpin-Maximaleffektes durch 10 nM Atropin ist mit hoher Wahrscheinlichkeit zufällig, da alle höheren eingesetzten Atropin-Konzentrationen den Maximaleffekt nicht veränderten. Atropin verminderte die Wirksamkeit, ohne die intrinsische Aktivität von Pilocarpin zu beeinflussen.



**Abb. 49:** Verschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Abhängigkeit von der Atropin-Konzentration an CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen.

*Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) minus eins: DR = EC<sub>50,Pilocarpin</sub> in Anwesenheit von Atropin dividiert durch EC<sub>50,Pilocarpin</sub> in Abwesenheit von Atropin.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Atropin.

*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 3-5 Experimenten pro Atropin-Konzentration in Vierfachbestimmung.

*Anpassung der Geraden:* anhand der Gleichung nach Arunlakshana und Schild (1959); es liegen die Kurven aus Abb. 48 zu Grunde.

Für die Analyse der Verschiebefaktoren nach dem allosterischen Modell ist eine Voraussetzung, dass die Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve ohne Veränderung der Steilheit der Kurven rechtsverschoben sind. Einige der Konzentrations-Effekt-Kurven wurden ausreichend durch eine Hill-Steigung n<sub>H</sub> = 1 beschrieben, bei anderen führte ein nicht festgesetzter Hill-Koeffizient zu

einer signifikant besseren Darstellung der Daten. Nach Lew und Angus (1997, Kapitel 2.3.3.3) wurde jedoch per F-Test festgestellt, dass die *Gesamtheit* der Kurven ausreichend durch den gemittelten Hill-Koeffizienten  $n_H = 0,795$  beschreibbar sind. Die Schild-Gerade wurde, wie bei einem kompetitiven Verhalten zweier Substanzen zu erwarten, durch die Schild-Steigung  $s = 1$  beschrieben. Eine freilaufende Steigung ebenso wie die Gleichung nach Lanzafame et al. (1996) führte zu keiner signifikant besseren Anpassung der Kurve an die Daten (F-Test,  $p > 0,05$ ).

Die Analyse der Daten nach Arunlakshana und Schild (1959) ergab eine Affinität von Atropin zum freien Rezeptor von  $pK_A = 9,34 \pm 0,10$  ( $n = 15$ ). Damit weicht der  $pK_A$ -Wert von Atropin am  $M_4$ -Rezeptor signifikant von dem am  $M_2$ -Rezeptor ermittelten ab (t-Test,  $p = 0,0001$ ). Atropin bindet demnach mit höherer Affinität an den muskarinischen  $M_4$ -Rezeptor als an den  $M_2$ -Rezeptor. Dong et al. (1995) bestimmten in [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Experimenten eine Affinität zum freien  $M_4$ -Rezeptor von  $9,23 \pm 0,01$  ( $n = 5$ ), Lazareno et al. (1993) fanden in Radioligandbindungsstudien mit [ $^3$ H]*N*-Methylscopolamin  $pK_A$ -Werte zwischen 9,14 und 9,20. Alle diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant von dem in dieser Arbeit gefundenen  $pK_A$ -Wert (t-Test,  $p > 0,05$ ); weiterhin beobachteten beide Autoren ebenfalls eine signifikant höhere Affinität von Atropin zum  $M_4$ -Rezeptor als zum  $M_2$ -Rezeptor.

### **3.3.3 Interaktion von allosterischen Modulatoren mit der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung**

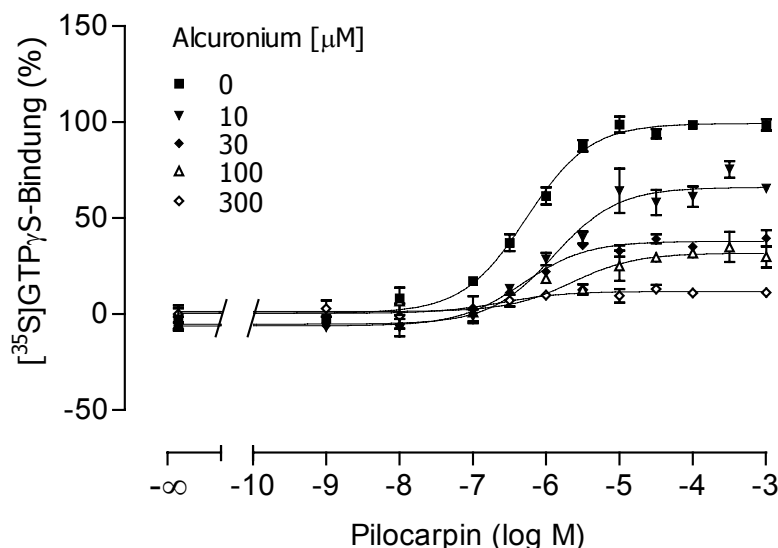
#### **3.3.3.1 Alcuronium**

An muskarinischen  $M_4$ -Acetylcholin-Rezeptoren ist Alcuronium ein allosterischer Förderer der Bindung des Antagonisten *N*-Methylscopolamin (Jakubík et al., 1995); die Gleichgewichtsbindung von Pilocarpin an den  $M_4$ -Rezeptor wurde in Radioligandbindungsstudien jedoch gesenkt (Jakubík et al., 1997).

Im Folgenden wird der konzentrationsabhängige Effekt von Alcuronium auf die durch Pilocarpin induzierte G Protein-Aktivierung (gemessen anhand der Bindung von [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S) gezeigt. Dargestellt ist der Einfluss steigender Alcuronium-Konzentrationen auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (Abb. 50, pharmakologische Kennwerte in Tab. 35), sowie auf den Pilocarpin-Maximaleffekt (Abb. 51).

Alle Kurven in Abbildung 50 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 35 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.

## Ergebnisse



**Abb. 50:** Einfluss von Alcuronium auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>4</sub>-Zellen.  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2-3 (Kontrolle: n = 9) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* nichtlineare Regressionsanalyse anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung mit auf n<sub>H</sub> = 1 konstant gesetztem Hill-Koeffizienten (siehe Kapitel 3.2.1).

	Kontrolle	Alcuronium 10 μM	Alcuronium 30 μM	Alcuronium 100 μM	Alcuronium 300 μM
pEC <sub>50</sub>	6,27 ± 0,05	5,90 ± 0,12 <sup>†</sup>	6,32 ± 0,07	5,65 ± 0,25	6,59 ± 0,41
Emax (%)	99 ± 2*	66 ± 3 <sup>◊</sup>	38 ± 1 <sup>◊</sup>	32 ± 3 <sup>◊</sup>	12 ± 1 <sup>◊</sup>
n	9	3	2	2	2
n <sub>H</sub> (freilaufend)	0,98 ± 0,09	0,91 ± 0,23	1,00 ± 0,15	0,47 ± 0,23	1,55 ± 1,50

**Tabelle 35:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Atropin (Mittelwerte ± Standardfehler).

pEC<sub>50</sub> Negativer dekadischer Logarithmus der Pilocarpin-Konzentration, die eine halbmaximale [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung hervorruft.

Emax Maximaleffekt von Pilocarpin (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n<sub>H</sub> Hill-Koeffizient.

<sup>†</sup>; <sup>◊</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>†</sup> p < 0,01; <sup>◊</sup> p < 0,001).

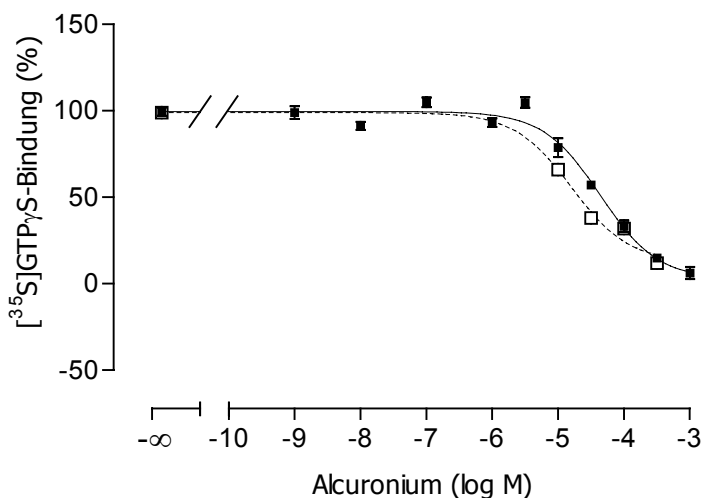
\* Die Abweichung von 100% beruht auf Rundungsungenauigkeiten.

Alcuronium zeigte keinen signifikanten Einfluss auf den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve, senkte jedoch den Maximaleffekt von Pilocarpin konzentrationsabhängig. Bei der signifikanten Rechtsverschiebung der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve durch 10 μM Alcuronium handelt es sich wahrscheinlich um eine zufällig signifikante Veränderung, da sämtliche höheren Konzentrationen Alcuronium den Wendepunkt unbeeinflusst ließen. Der allosterische Modulator rief eine Verminderung der intrinsischen Aktivität hervor, ohne die Wirksamkeit von Pilocarpin zu verändern.



## Ergebnisse

Da sämtliche Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven ein oberes Plateau erreichten (Abb. 50), konnte der Einfluss von Alcuronium auf den Maximaleffekt von Pilocarpin bestimmt werden, indem die G Protein-Aktivierung durch 1 mM Pilocarpin in Anwesenheit von steigenden Alcuronium-Konzentrationen vermessen wurde (Abb. 51). Um zu zeigen, dass die Daten mit den Befunden der kompletten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 50 übereinstimmen, wurden die  $E_{max}$ -Werte von Pilocarpin für die einzelnen Alloster-Konzentrationen (Abb. 50 / Tab. 35) in Abbildung 51 ergänzt (offene Symbole). Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Hill-Koeffizienten  $n_H = -1$  (siehe Kapitel 3.2.1). Der freilaufende Hill-Koeffizient betrug  $-1,08 \pm 0,17$  (geschlossene Symbole) bzw.  $-0,76 \pm 0,53$  und führte laut F-Test in keinem der beiden Fälle zu einer signifikant besseren Kurvenanpassung.



**Abb. 51:** Einfluss von Alcuronium auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM) an CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen.

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Alcuronium.

*Datenpunkte:* Geschlossene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 3 Experimenten in Vierfachbestimmung. Offene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler der  $E_{max}$ -Werte aus Abb. 50 bzw. Tab. 35.

*Kurvenanpassung:* nichtlineare Regressionsanalyse anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung mit auf  $n_H = -1$  konstant gesetztem Hill-Koeffizienten (siehe Kapitel 3.2.1).

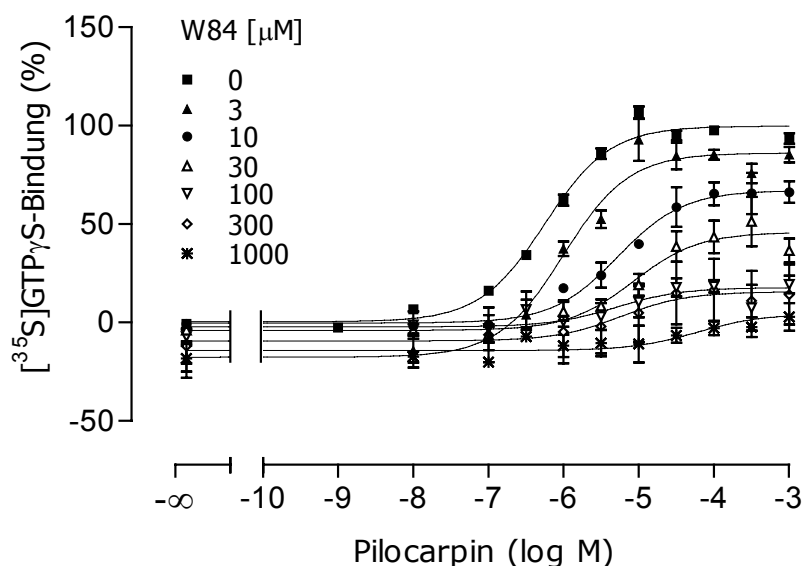
Bei der experimentellen Bestimmung des Einflusses steigender Alcuronium-Konzentrationen auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Maximaleffekt (Abb. 51, geschlossene Symbole) wurde ein halb-maximaler Effekt von Alcuronium ( $pIC_{50}$ -Wert) von  $4,36 \pm 0,07$  ( $n = 3$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 3 \pm 4\%$  gefunden. Alcuronium hob die M<sub>4</sub>-Rezeptor-vermittelte intrinsische Aktivität von Pilocarpin also vollständig auf. Anhand der Auftragung der oberen Plateaus der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit von bestimmten Alcuronium-Konzentrationen (Abb. 51, offene Symbole) berechnete sich ein  $pIC_{50}$ -Wert von  $4,80 \pm 0,13$  ( $n = 2-9$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 12 \pm 7\%$ . Dieser Wert unterscheidet sich nicht signifikant von 0% (t-Test,  $p = 0,10$ ). Die  $E_{min}$ -Werte aus beiden Auftragungen unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test,  $p = 0,61$ ), wohl aber die  $pIC_{50}$ -Werte (t-Test,  $p = 0,01$ ). Die Differenz beider  $pIC_{50}$ -Werte beträgt jedoch etwa eine halbe Dekade; beide  $pIC_{50}$ -Werte liegen also dennoch in der gleichen Größenordnung.

### 3.3.3.2 Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen

#### 3.3.3.2.1 W84

Im Folgenden wird der konzentrationsabhängige Effekt von W84 auf die durch Pilocarpin induzierte G Protein-Aktivierung (gemessen anhand der Bindung von [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S) gezeigt. Dargestellt ist der Einfluss steigender W84-Konzentrationen auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (Abb. 52, pharmakologische Kennwerte in Tab. 36), auf den Pilocarpin-Maximaleffekt (intrinsische Aktivität von Pilocarpin, Abb. 53) sowie auf den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve (Affinität von Pilocarpin, Abb. 54).

Alle Kurven in Abbildung 52 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 36 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.



**Abb. 52:** Einfluss von W84 auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>4</sub>-Zellen.  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-4$  (Kontrolle:  $n = 16$ ) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb.50

## Ergebnisse

	Kontrolle	W84 3 $\mu\text{M}$	W84 10 $\mu\text{M}$	W84 30 $\mu\text{M}$	W84 100 $\mu\text{M}$	W84 300 $\mu\text{M}$	W84 1000 $\mu\text{M}$
pEC <sub>50</sub>	6,25 ± 0,04	6,00 ± 0,10 <sup>†</sup>	5,28 ± 0,11 <sup>◊</sup>	5,07 ± 0,20 <sup>◊</sup>	5,29 ± 0,46	5,23 ± 0,83	4,22 ± 0,46 <sup>†</sup>
Emax (%)	100 ± 1	86 ± 3 <sup>◊</sup>	67 ± 3 <sup>◊</sup>	46 ± 4 <sup>◊</sup>	18 ± 4 <sup>◊</sup>	16 ± 6 <sup>◊</sup>	4 ± 4 <sup>◊</sup>
n	16	3	2	3	4	4	3
n <sub>H</sub> (freilaufend)	1,11 ± 0,09	1,14 ± 0,25	0,82 ± 0,20	1,13 ± 0,49	0,46 ± 0,41	1,27 ± 2,32	0,20 ± 0,25

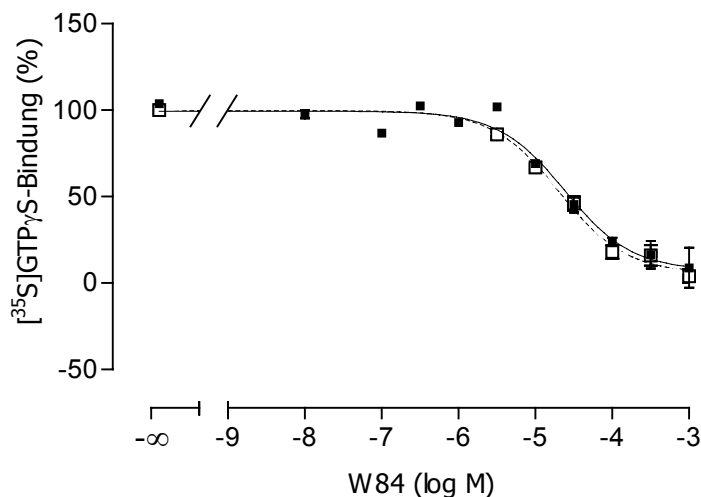
**Tabelle 36:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von W84 (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, Emax, n<sub>H</sub>: siehe Tab. 35.

<sup>†</sup>; <sup>◊</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>†</sup> p < 0,05; <sup>◊</sup> p < 0,001).

W84 verschob den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve nach rechts und senkte den Maximaleffekt von Pilocarpin. Die Rechtsverschiebungen durch W84 in den Konzentrationen 100  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$  sind gegenüber der Kontrolle trotz der großen Differenz statistisch nicht signifikant. Dies lässt sich leicht durch das kleine Messfenster (Abb. 52) und die daraus resultierende große Streuung (Tab. 36) erklären. W84 vermindert also die intrinsische Aktivität sowie die Affinität von Pilocarpin zum M<sub>4</sub>-Rezeptor.

Da die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven bei allen untersuchten W84-Konzentrationen ein oberes Plateau erreichten (Abb. 52), konnte der Einfluss von W84 auf den Maximaleffekt von Pilocarpin bestimmt werden, indem die G Protein-Aktivierung durch 1 mM Pilocarpin unter dem Einfluss von steigenden Konzentrationen W84 vermessen wurde (Abb. 53). Um zu zeigen, dass die Daten mit den Befunden der kompletten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 52 übereinstimmen, wurden die Emax-Werte von Pilocarpin für die einzelnen Alloster-Konzentrationen (Abb. 52 / Tab. 36) in Abbildung 53 ergänzt (offene Symbole). Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Hill-Koeffizienten n<sub>H</sub> = -1 (siehe Kapitel 3.2.1). Der freilaufende Hill-Koeffizient betrug -1,27 ± 0,29 (geschlossene Symbole) bzw. 0,94 ± 0,17 (offene Symbole) und führte laut F-Test in beiden Fällen nicht zu einer signifikant besseren Kurvenanpassung.

## Ergebnisse



**Abb. 53:** Einfluss von W84 auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM) an CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen.

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von W84.

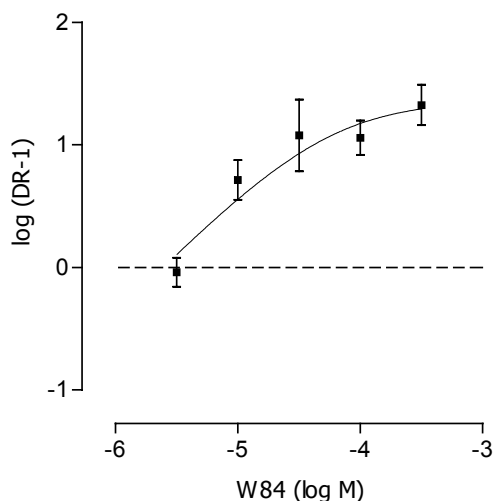
*Datenpunkte:* Geschlossene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2 Experimenten in Vierfachbestimmung. Offene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler der Emax-Werte aus Abb. 52 bzw. Tab. 36.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 51

Bei der experimentellen Bestimmung des Einflusses steigender W84-Konzentrationen auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Maximaleffekt (Abb. 53, geschlossene Symbole) wurde ein halbmaximaler Effekt von W84 (pIC<sub>50</sub>-Wert) von  $4,61 \pm 0,10$  (n = 2) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 7 \pm 5\%$  gefunden. W84 hob die M<sub>4</sub>-Rezeptor-vermittelte intrinsische Aktivität von Pilocarpin also vollständig auf. Anhand der Auftragung der oberen Plateaus der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit von bestimmten W84-Konzentrationen (Abb. 53, offene Symbole) berechnete sich ein pIC<sub>50</sub>-Wert von  $4,69 \pm 0,08$  (n = 2-16) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 6 \pm 3\%$ . Dieser Wert unterscheidet sich nicht signifikant von 0% (t-Test, p = 0,054). Die pIC<sub>50</sub>-Werte und Emin-Werte aus beiden Auftragungen unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test, p = 0,82 für die pIC<sub>50</sub>-Werte und p = 0,94 für die Emin-Werte).

Die identische Steigung aller Konzentrations-Effekt-Kurven (Abb. 52) ermöglichte die Analyse der W84-abhängigen Verschiebung der Wendepunkte nach dem allosterischen Modell (Lanzafame et al., 1996) in Abb. 54 (siehe Kapitel 3.2.3.2.1). Das Messfenster der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit von 1 mM W84 war klein, so dass die Wendepunkte einer großen Streuung unterlagen. Bei einer Einzelkurve war der Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve in Anwesenheit von 1 mM W84 linksverschoben; deshalb konnte keine Verschiebung log(DR-1) berechnet werden. Die Konzentration 1 mM W84 ging deshalb nicht in die Auftragung nach Lanzafame et al. (1996) ein.

## Ergebnisse



**Abb. 54:** Verschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Abhängigkeit von der W84-Konzentration an CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen.

*Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) minus eins:  $DR = EC_{50, \text{Pilocarpin}}$  in Anwesenheit von W84 dividiert durch  $EC_{50, \text{Pilocarpin}}$  in Abwesenheit von W84.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von W84.

*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-4$  Experimenten pro W84-Konzentration in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* anhand der aus dem ternären Modell nach Ehlert (1988) und der Gleichung nach Arunlakshana und Schild (1959) entwickelten Gleichung nach Lanzafame et al. (1996); es liegen die Kurven aus Abb. 52 zu Grunde (außer der für 1 mM W84, siehe Text).

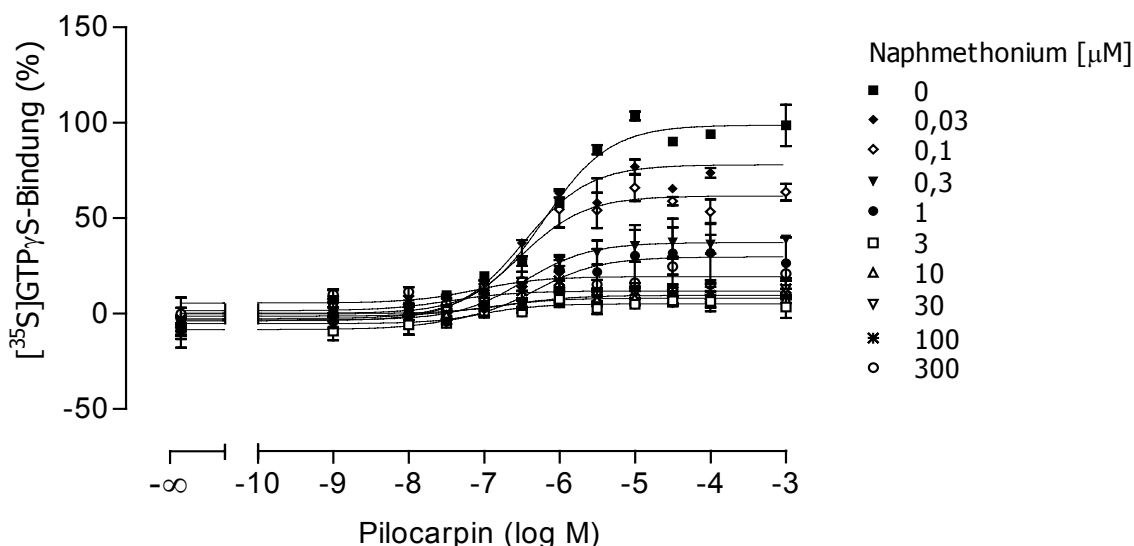
Die Analyse der Daten nach Lanzafame et al. (1996) ergab eine Affinität zum freien Rezeptor von  $pK_A = 5,65 \pm 0,15$  und einen Kooperativitätsfaktor  $p\alpha = -1,38 \pm 0,15$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler).

Die rechnerisch ermittelte Affinität von W84  $p(\alpha \cdot K_A)$  zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor beträgt 4,27.

### 3.3.3.2.2 Naphmethonium (MM3a)

Der konzentrationsabhängige Effekt von Naphmethonium auf die durch Pilocarpin induzierte G Protein-Aktivierung (gemessen anhand der Bindung von [<sup>35</sup>S]GTPγS) wurde untersucht. Dargestellt ist der Einfluss steigender Naphmethonium-Konzentrationen auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (Abb. 55, pharmakologische Kennwerte in Tab. 37) sowie auf den Pilocarpin-Maximaleffekt (intrinsische Aktivität von Pilocarpin, Abb. 56). Alle Kurven in Abbildung 55 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 37 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.

## Ergebnisse



**Abb. 55:** Einfluss von Naphmethonium auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>4</sub>-Zellen.  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2-4 (Kontrolle: n = 16) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 50.

	Kontr.	Naph. 0,03 μM	Naph. 0,1 μM	Naph. 0,3 μM	Naph. 1 μM	Naph. 3 μM	Naph. 10 μM	Naph. 30 μM	Naph. 100 μM	Naph. 300 μM
pEC <sub>50</sub>	6,20 ± 0,03	6,48 ± 0,14 <sup>†</sup>	6,53 ± 0,16 <sup>†</sup>	6,47 ± 0,16 <sup>†</sup>	6,32 ± 0,31	7,21 ± 0,43	6,94 ± 0,48	6,76 ± 0,32	7,45 ± 0,80	7,10 ± 0,38
Emax (%)	99 ± 1*	78 ± 4 <sup>◊</sup>	62 ± 3 <sup>◊</sup>	37 ± 2 <sup>◊</sup>	30 ± 4 <sup>◊</sup>	5 ± 2 <sup>◊</sup>	8 ± 1 <sup>◊</sup>	10 ± 1 <sup>◊</sup>	12 ± 2 <sup>◊</sup>	20 ± 1 <sup>◊</sup>
n	16	2	2	2	3	4	3	4	4	3
n <sub>H</sub> (freilau- fend)	1,06 ± 0,07	1,14 ± 0,25	1,54 ± 0,58	0,85 ± 0,27	1,03 ± 0,66	1,04 ± 0,90	0,40 ± 0,31	0,11 ± 0,29	0,33 ± 0,54	0,26 ± 0,20

**Tabelle 37:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Atropin (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, Emax, n<sub>H</sub>: siehe Tab. 35.

<sup>†</sup>, <sup>‡</sup>, <sup>◊</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>†</sup> p < 0,05; <sup>‡</sup> p < 0,01; <sup>◊</sup> p < 0,001).

\* Die Abweichung von 100% beruht auf Rundungsungenauigkeiten.

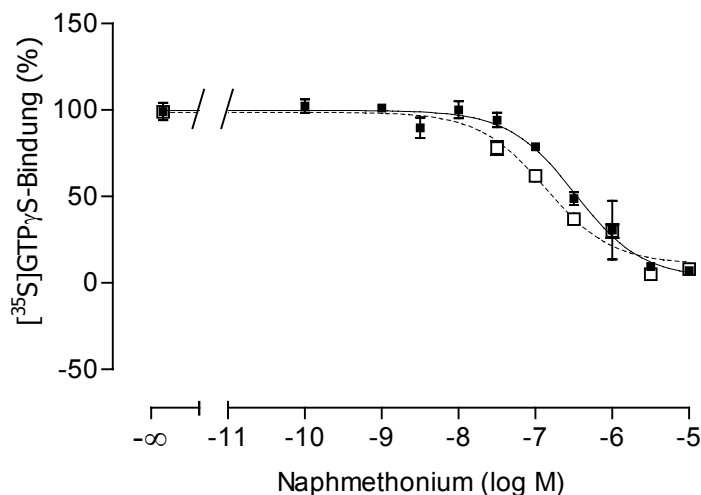
Naphmethonium rief zwar eine Linksverschiebung des Wendepunktes von bis zu einer Dekade hervor, keine dieser Verschiebungen (mit Ausnahme der geringsten Naphmethonium-Konzentrationen) war jedoch statistisch signifikant. Dem liegt zu Grunde, dass durch eine ausgeprägte Senkung des Pilocarpin-Effektes durch Naphmethonium und der resultierenden Verkleinerung des Messfensters den Wendepunkten der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit hoher Naphmethonium-Konzentrationen große Standardfehler anhafteten. Eine signifikante Abweichung vom Kontrollwert liegt nicht vor, obgleich die Wendepunkte durch hohe Konzentrationen Naphmethonium um ungefähr eine Dekade nach links verschoben wurden.

Analog den Befunden an CHO-M<sub>2</sub>-Zellmembranen erhöht Naphmethonium auch an CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen die Affinität von Pilocarpin und senkt dessen intrinsische Aktivität.

Da die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven bei allen untersuchten Naphmethonium-Konzentrationen ein oberes Plateau erreichten (Abb. 55), konnte der Einfluss von Naphmethonium auf

## Ergebnisse

den Maximizeffekt von Pilocarpin bestimmt werden, indem die G Protein-Aktivierung durch 1 mM Pilocarpin unter dem Einfluss von steigenden Konzentrationen Naphmethonium vermessen wurde (Abb. 56). Um zu zeigen, dass die Daten mit den Befunden der kompletten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 55 übereinstimmen, wurden die Emax-Werte von Pilocarpin für die einzelnen Alloster-Konzentrationen (Abb. 55 / Tab. 37) in Abbildung 56 ergänzt (offene Symbole).



**Abb. 56:** Einfluss von Alcuronium auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM) an CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen.

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Naphmethonium.

*Datenpunkte:* Geschlossene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2 Experimenten in Vierfachbestimmung. Offene Symbole: Mittelwerte ± Standardfehler der Emax-Werte aus Abb. 55 bzw. Tab. 37.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 51.

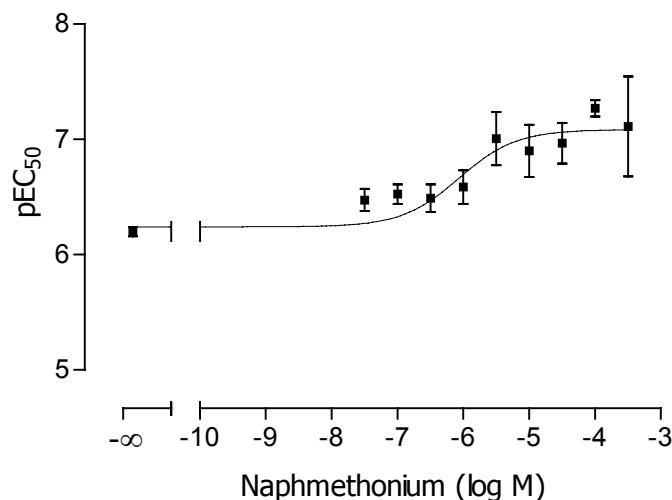
Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Hill-Koeffizienten  $n_H = -1$  (siehe Kapitel 3.2.1). Der freilaufende Hill-Koeffizient betrug  $-1,06 \pm 0,23$  (geschlossene Symbole) bzw.  $-0,95 \pm 0,25$  (offene Symbole) und führte laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung.

Bei der experimentellen Bestimmung des Einflusses steigender Naphmethonium-Konzentrationen auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Maximizeffekt (Abb. 56, geschlossene Symbole) wurde ein halbmaximaler Effekt von Naphmethonium ( $pIC_{50}$ -Wert) von  $6,48 \pm 0,10$  ( $n = 2$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 3 \pm 5\%$  gefunden. Naphmethonium hob die M<sub>4</sub>-Rezeptor-vermittelte intrinsische Aktivität von Pilocarpin also vollständig auf. Anhand der Auftragung der oberen Plateaus der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit von bestimmten Naphmethonium-Konzentrationen (Abb. 56, offene Symbole) berechnete sich ein  $pIC_{50}$ -Wert von  $6,87 \pm 0,12$  ( $n = 2-16$ ) und eine maximale Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin von 100% auf  $E_{min} = 11 \pm 3\%$ . Dieser Wert unterscheidet sich signifikant von 0% (t-Test,  $p = 0,0007$ ). Die  $pIC_{50}$ -Werte und  $E_{min}$ -Werte aus beiden Auftragungen unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test,  $p = 0,49$  für die  $pIC_{50}$ -Werte und  $p = 0,57$  für die  $E_{min}$ -Werte).

Aufgrund der Linksverschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Abbildung 56 konnte eine Auswertung nach dem allosterischen Modell (Lanzafame et al., 1996) nicht durchgeführt werden, da keine Zahlenwerte anhand des Terms  $\log(DR-1)$  berechnet werden konnten.

## Ergebnisse

Statt dessen wurden die negativen dekadischen Logarithmen der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven ( $pEC_{50}$ ) in Abhängigkeit der Konzentration des anwesenden Allosters aufgetragen (Abb. 57). Die Naphmethonium-induzierte Linksverschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven strebt bei hohen Naphmethonium-Konzentrationen einem Maximaleffekt zu. Anhand dieses Maximaleffektes kann eine Abschätzung des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$  vorgenommen werden.



**Abb. 57:**  $pEC_{50}$ -Werte (zur Definition von  $pEC_{50}$  siehe Tabelle 37) der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin in Abhängigkeit von der Naphmethonium (MM3a)-Konzentration an Membranen aus CHO- $M_2$ -Zellen.

*Ordinate:*  $pEC_{50}$ -Werte; es liegen die Daten aus Tabelle 37 zu Grunde.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Naphmethonium.

*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-4$  (Kontrollwert:  $n = 16$ ) Experimenten in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* nichtlineare Regressionsanalyse anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung mit auf  $n_H = 1$  konstant gesetztem Hill-Koeffizienten. Es sei angemerkt, dass das untere Plateau nicht konstant gesetzt wurde.

Das untere Plateau der Kurve liegt bei  $pEC_{50} = 6,2 \pm 0,06$ . Dies entspricht dem negativen dekadischen Logarithmus der halbmaximal effektiven Pilocarpin-Konzentration. Das obere Plateau der Kurve liegt bei  $7,1 \pm 0,08$ . Dies entspricht der halbmaximal effektiven Pilocarpin-Konzentration in Anwesenheit von sättigenden Konzentrationen Naphmethonium. Der Logarithmus des Kooperativitätsfaktors „ $\alpha$ “ sagt aus, um wie viele Dekaden der Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve durch den allosterischen Modulator maximal verschoben wird. Abbildung 57 erlaubt eine Abschätzung von  $\alpha$ : bildet man die Differenz aus oberem und unterem Plateau der Kurve, so erhält man den Wert  $\alpha = 0,9$ .

### 3.3.3.3 Gallamin

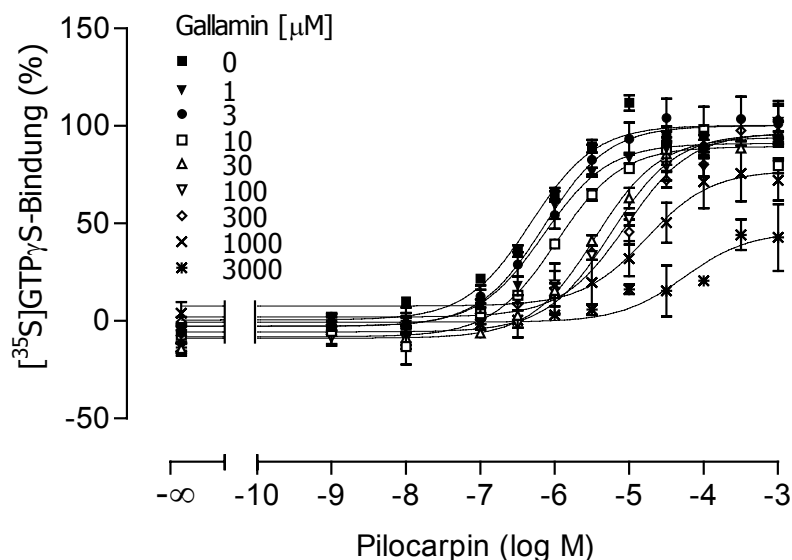
Gallamin ruft gegenüber dem Antagonisten *N*-Methylscopolamin (NMS) am  $M_2$ - sowie am  $M_4$ -Rezeptor eine Dissoziationsverzögerung hervor; dabei hat Gallamin eine höhere Affinität zum NMS-besetzten  $M_2$ - als zum  $M_4$ -Rezeptor (Ellis et al., 1991). Gegenüber dem endogenen Agonisten Acetylcholin verhält sich Gallamin an beiden Rezeptorsubtypen formal kompetitiv (Lazareno und Birdsall, 1993).



## Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der konzentrationsabhängige Effekt von Gallamin auf die durch Pilocarpin induzierte G Protein-Aktivierung (gemessen anhand der Bindung von [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S) untersucht. Dargestellt ist der Einfluss steigender Gallamin-Konzentrationen auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (Abb. 58, pharmakologische Kennwerte in Tab. 38).

Alle Kurven in Abbildung 58 wurden ausreichend mit einer Hill-Steigung  $n_H = 1$  beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1). Die in Tabelle 38 dargestellten Kennwerte (Wendepunkt und Maximaleffekt) beruhen auf der auf  $n_H = 1$  festgesetzten Steigung. Zusätzlich werden die freilaufenden Hill-Koeffizienten gezeigt, die jedoch laut F-Test zu keiner signifikant besseren Kurvenanpassung führten.



**Abb. 58:** Einfluss von Gallamin auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin an Membranen aus CHO-M<sub>4</sub>-Zellen.  
*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%.  
*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin.  
*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2-5 (Kontrolle: n = 16) Experimenten in Vierfachbestimmung.  
*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 50.

	Kontr.	Gall. 1 µM	Gall. 3 µM	Gall. 10 µM	Gall. 30 µM	Gall. 100 µM	Gall. 300 µM	Gall. 1000 µM	Gall. 3000 µM
pEC <sub>50</sub>	6,32 ± 0,05	6,15 ± 0,10	6,20 ± 0,09	6,00 ± 0,09	5,46 ± 0,06 <sup>◊</sup>	5,24 ± 0,09 <sup>◊</sup>	5,03 ± 0,09 <sup>◊</sup>	4,77 ± 0,24 <sup>†</sup>	4,23 ± 0,27 <sup>◊</sup>
Emax (%)	100 ± 2	89 ± 3 <sup>†</sup>	94 ± 2	89 ± 3	94 ± 2	96 ± 4	96 ± 4	77 ± 7 <sup>◊</sup>	46 ± 7 <sup>◊</sup>
n	16	5	5	2	2	2	2	4	2
n <sub>H</sub> (freilaufend)	1,08 ± 0,10	1,40 ± 0,31	0,98 ± 0,20	1,00 ± 0,18	0,86 ± 0,10	0,67 ± 0,10	0,77 ± 0,18	1,01 ± 0,52	0,23 ± 0,21

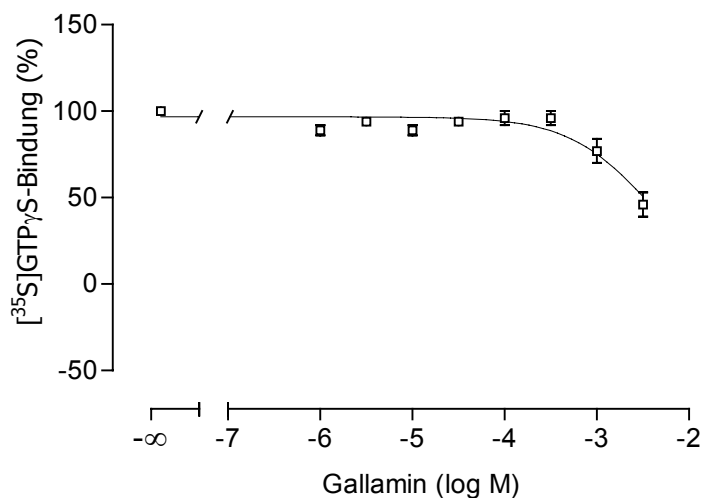
**Tabelle 38:** Kennwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin unter Kontrollbedingungen und unter Einfluss von Atropin (Mittelwerte ± Standardfehler). Zur Definition von pEC<sub>50</sub>, Emax, n<sub>H</sub>: siehe Tab. 34.

<sup>†</sup>; <sup>‡</sup>; <sup>◊</sup> Signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, <sup>†</sup> p < 0,05; <sup>‡</sup> p < 0,01; <sup>◊</sup> p < 0,001).

Gallamin verschob in Konzentrationen ab 30 µM den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve statistisch signifikant nach rechts. Der Maximaleffekt von Pilocarpin wurde in Konzentrationen ab 1000 µM statistisch signifikant gesenkt. Die Senkung des Maximaleffektes von Pilocarpin in Anwesenheit von 1 µM ist vermutlich nicht relevant, da in den nächsthöheren Konzentrationen der Maximaleffekt noch unbeeinflusst blieb.

## Ergebnisse

Zur Bestimmung der Gallamin-Konzentration, die den Pilocarpin-Effekt halbiert ( $pIC_{50}$ ), wurden die  $E_{max}$ -Werte aus Tabelle 27 gegen die entsprechende Gallamin-Konzentration aufgetragen (Abb 59).



**Abb. 59:** Einfluss von Gallamin auf den Effekt von Pilocarpin in einer maximal wirksamen Konzentration (1 mM).

*Ordinate:* [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Prozent: Basalaktivität ([<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung ohne Zusatz von Testsubstanz) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt ([<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindung in Anwesenheit von 1 mM Pilocarpin) = 100%.

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Gallamin.

*Datenpunkte:* Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2-4 Experimenten in Vierfachbestimmung, es liegen die Daten aus Tab. 38 zu Grunde.

*Kurvenanpassung:* anhand der vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung, der Hill-Koeffizient beträgt -1; das untere Plateau wurde in dieser Abbildung auf 0% konstant gesetzt.

Die Kurve in Abbildung 59 ist nicht vollständig beschrieben. Das untere Plateau der Kurve kann zwischen dem  $E_{max}$ -Wert der höchsten untersuchten Gallamin-Konzentration (46%) und ca. 0% liegen. Die vier Parameter enthaltende logistische Gleichung wurde an die Daten angepasst, wobei das untere Plateau jeweils auf 0% und auf 46% konstant gesetzt wurde. Die Kurve mit auf 0% festgesetztem unterem Plateau wurde ausreichend durch einen Hill-Koeffizienten  $n_H = -1$  beschrieben, während die Kurve, bei der das untere Plateau auf 46% konstant gesetzt wurde, signifikant besser durch eine freilaufende Hill-Steigung beschrieben wurde. Tabelle 39 zeigt die Wendepunkte mit den entsprechenden Hill-Koeffizienten und unteren Plateaus der Kurven.

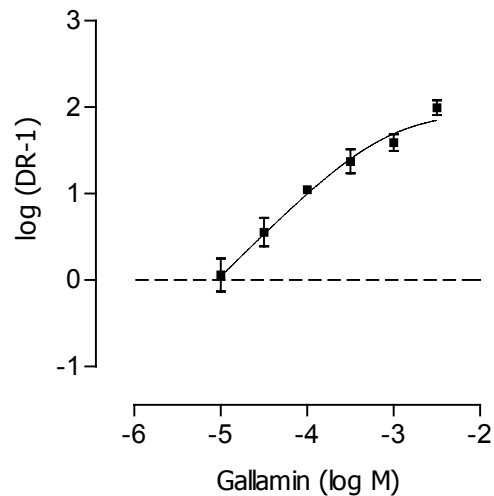
		Hill-Koeffizient	
		-1	nicht festgesetzt
Unteres Plateau, festgesetzt auf	0%	$pIC_{50} = 2,46 \pm 0,10$	$pIC_{50} = 2,54 \pm 0,09$ ( $n_H = -1,37$ )
	46%	$pIC_{50} = 2,90 \pm 0,19$	$pIC_{50} = 2,97 \pm 0,63$ ( $n_H = -7,17$ )

**Tabelle 39:** Wendepunkte ( $pIC_{50}$ ) der Konzentrations-Effekt-Kurven von Gallamin in Anwesenheit von 1 mM Pilocarpin (Mittelwerte ± Standardfehler).

Der negative dekadische Logarithmus der Gallamin-Konzentration, der auf den durch 1 mM Pilocarpin induzierten Effekt halbmaximal hemmend wirkt ( $pIC_{50}$ , Maß für die Affinität von Gallamin zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor), liegt also in der Größenordnung zwischen 2,46 und 2,97.

## Ergebnisse

Die identische Steigung aller Konzentrations-Effekt-Kurven (Abb. 58) ermöglichte die Analyse der Gallamin-abhängigen Verschiebung der Wendepunkte nach dem allosterischen Modell (Lanzafame et al., 1996) in Abb. 60 (siehe Kapitel 3.2.3.2.1).



**Abb. 60:** Verschiebung der Wendepunkte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Abhängigkeit von der Gallamin-Konzentration an CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen.

*Ordinate:* Dekadischer Logarithmus der Verschiebungsfaktoren (dose ratio, DR) minus eins:  $DR = \frac{EC_{50, \text{Pilocarpin}} \text{ in Anwesenheit von Gallamin}}{EC_{50, \text{Pilocarpin}} \text{ in Abwesenheit von Gallamin}}$ .

*Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Gallamin.

*Datenpunkte:* Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus  $n = 2-5$  Experimenten pro Gallamin-Konzentration in Vierfachbestimmung.

*Kurvenanpassung:* siehe Abb. 53; es liegen die Kurven aus Abb. 58 zu Grunde.

Die Analyse der Daten nach Lanzafame et al. (1996) ergab eine Affinität zum freien Rezeptor von  $pK_A = 5,05 \pm 0,08$  und einen Kooperativitätsfaktor  $p\alpha = -1,95 \pm 0,13$  (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler). Die rechnerisch ermittelte Affinität von Gallamin  $p(\alpha \cdot K_A)$  zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor beträgt 3,10. Dong et al. (1995) ermittelten in Radioligandbindungsstudien einen  $pK_A = 5,35 \pm 0,11$  ( $n = 2$ ); dieser Wert und der in der vorliegenden Arbeit weichen nicht statistisch signifikant voneinander ab (t-Test,  $p = 0,21$ ).

# Kapitel 4

## Diskussion

### 4.1 Rezeptoraktivitätszustände und G Protein-Aktivierung

G Protein-gekoppelte Rezeptoren können verschiedene aktive Konformationen einnehmen, die sich in ihrer Fähigkeit zur G Protein-Aktivierung (intrinsische Aktivität) unterscheiden (Kenakin, 2003). Liganden (Voll-, Partialagonisten; Antagonisten) können diese Rezeptorkonformationen entweder stabilisieren („conformational selection“; Spalding et al., 1998; Christopoulos und Kenakin, 2002) oder diese induzieren („conformational induction“; Lefkowitz et al., 1993; Waelbroeck, 2001; Christopoulos und Kenakin, 2002).

Abhängig von der postulierten Anzahl möglicher Rezeptoraktivitätszustände werden das „two-state-model of receptor activation“ (Lefkowitz et al., 1993; Leff, 1995; Spalding et al., 1998) und das „multiple-state-model“ (Watson et al., 2000; Kenakin, 2003) unterschieden. Diesen Theorien zufolge liegen Rezeptoren in einem Gleichgewicht zwischen einem aktiven und einem inaktiven Zustand („two-state-model“) oder in einer Vielzahl an Konformationen mit unterschiedlichen Aktivitäten („multiple-state-model“) vor. Agonisten bilden bevorzugt Komplexe mit aktiven, Antagonisten mit inaktiven Konformationen. Dementsprechend kann das Gleichgewicht zwischen den Rezeptorkonformationen durch Liganden zugunsten des einen oder anderen Aktivitätszustandes verschoben werden. Spalding et al. (1998) postulieren, dass die Rezeptorkonformationen durch unterschiedliche Interaktionen von Agonist und Antagonist mit der transmembranären Domäne TM6 induziert werden. Nicht Ligand-besetzte Rezeptoren können ebenfalls eine aktive Konformation annehmen, worauf die Fähigkeit der Rezeptoren zur spontanen G Protein-Aktivierung beruht (Jakubík et al., 1998).

Bei der Transduktion von Signalen von einem aktivierten Rezeptor zu einem Effektorprotein dienen G Proteine als regulierbare Schalter, die einen Zyklus der Aktivierung und Deaktivierung durchlaufen. Dabei nehmen G Proteine drei Konformationen an: eine inaktive, GDP (Guanosin-5´-Diphosphat)-besetzte; einen Zustand, in dem die Guaninnucleotid-Bindungsstelle leer ist, sowie eine aktive, GTP (Guanosin-5´-Triphosphat)-besetzte Konformation (Conklin und Bourne, 1993). Ligand-stimulierte, aktive Rezeptorkonformationen haben eine hohe Affinität zu GDP-gebundenen, inaktiven G Proteinen (Ghanouni et al., 2001) und reduzieren die Affinität von GDP zu der  $\alpha$ -Untereinheit des G Proteins (Conklin und Bourne, 1993; Breivogel et al., 1998). Nach der Abdissoziation von GDP bindet GTP an

die freie Guaninnucleotid-Bindungsstelle der  $\alpha$ -Untereinheit (Harrison und Traynor, 2003; Offermanns, 2003). Die aktivierte, GTP-besetzte  $\alpha$ -Untereinheit dissoziiert vom Rezeptorprotein und von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit ab (Hepler und Gilman, 1992; Conklin und Bourne, 1993). Beide Untereinheiten können durch die Interaktion mit Effektorproteinen eine zelluläre Antwort induzieren (Higashijima et al., 1987; Hepler und Gilman, 1992; Offermanns, 2003). Eine GTPase im Bereich der  $\alpha$ -Untereinheit hydrolysiert gebundenes GTP zu GDP (Hilf et al., 1989; Hepler und Gilman, 1992), woraufhin eine Reassoziaton unter Rückbildung des inaktiven, GDP-gebundenen G Proteins erfolgt (Hepler und Gilman, 1992; Offermanns, 2003).

Das Molekül GTP $\gamma$ S enthält im Gegensatz zu GTP am gamma-ständigen Phosphatrest ein Schwefelatom, das dem Molekül eine Stabilität gegenüber der GTPase der  $\alpha$ -Untereinheit verleiht (Milligan, 2003). GTP $\gamma$ S bindet langsam reversibel an die  $\alpha$ -Untereinheit und führt zu einer dauerhaften G Protein-Aktivierung. Die Agonist-induzierte GTP $\gamma$ S-Bindung kann durch Einsatz von radioaktiv markiertem [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S gemessen werden, das nach der Inkubationszeit mittels Vakuumfiltration von ungebundenem [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S abgetrennt wird.

Die verschiedenen Rezeptorkonformationen können unterschiedliche Affinitäten zu G Proteinen haben, oder aber mit unterschiedlicher Effizienz („intrinsische Aktivität“, Breivogel et al., 1998) die Dissoziation von GDP und damit den Nucleotid austausch beschleunigen (Tian und Deth, 1993).

Anhand von funktionellen und strukturellen Eigenschaften werden verschiedene Subgruppen der  $G\alpha$ -Untereinheiten differenziert. Kenakin (1997) postuliert, dass die verschiedenen aktiven Rezeptorkonformationen unterschiedliche  $G\alpha$ -Subtypen aktivieren. Nach Manning (2002) binden die  $G\alpha$ -Subtypen GDP unterschiedlich affin, so dass abhängig von der aktivierten  $G\alpha$ -Untereinheit ein unterschiedlich effizienter Nucleotid austausch erfolgt.

## **4.2 Praktische Durchführung der [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindungsexperimente**

### **4.2.1 Reagenzien im Versuchsansatz**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in den [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Experimenten Rezeptoren und G Proteine enthaltende CHO-Zellmembranen zusammen mit Testsubstanzen, GDP und [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S in einem Puffer aus 10 mM HEPES, 10 mM Magnesiumchlorid und 100 mM Natriumchlorid inkubiert.

Die Agonist-induzierte [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindung kann in Membranen mit nativen Rezeptoren (Hilf et al., 1991), Zelllinien (Gierschik et al., 1991), rekombinante Rezeptoren exprimierenden Zellen (Lazareno und Birdsall, 1993), sowie in Systemen aus aufgereinigten Muscarinrezeptoren und G Proteinen (Kurose et al., 1986) untersucht werden. CHO-Zellen besitzen G Proteine, exprimieren jedoch keine

muskarinischen Rezeptoren (Eckstein 2003). Durch Verwendung von Membranen stabil transfizierter CHO-Zellen sind subtypspezifische Messungen möglich. Das Ausmaß der G Protein-Aktivierung ist jedoch abhängig von der Ausstattung der (CHO-)Zelle mit G Proteinen (Yang und Lanier, 1999).

GDP ist essentiell für die Messung Agonist-induzierter Effekte im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Experiment, da es das Messfenster zwischen basaler und Agonist-stimulierter GTPγS-Bindung erweitert (Hilf und Jakobs, 1992). Gα Proteine können GDP mit hoher Affinität (inaktiver Zustand, typischerweise im Komplex aus Gα, Gβγ und GDP) oder mit niedriger Affinität (aktiver Zustand, typischerweise im Komplex aus Ligand-stimuliertem Rezeptor, Gα, Gβγ und GDP) binden. GTPγS bindet jedoch an alle Konformationen mit gleicher Affinität (Hilf und Jakobs, 1992). Extern zugeführtes GDP würde also in niedrigeren Konzentrationen an die hochaffine Bindungsstelle und in höheren Konzentrationen an die niedrigaffine Bindungsstelle binden. Es stabilisiert daher G Proteine im inaktiven Zustand und reduziert die spontane Rezeptor-vermittelte G Protein-Aktivierung in einem größeren Ausmaß als die Agonist-induzierte [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung (Breivogel et al., 1998).

HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure) erhält in Kombination mit ihrem Natriumsalz einen physiologischen pH-Wert aufrecht.

Magnesiumionen sind für die Messung des Maximaleffektes von Agonisten an M<sub>2</sub>-Rezeptoren in einer Konzentration von mindestens 300 μM notwendig (Hilf et al., 1989). In einer Konzentration von 10 mM beschleunigen Magnesiumionen die Assoziation von GTPγS an G Proteine (Bokoch et al., 1983) und verzögern die Dissoziation von GTPγS und α-Untereinheit durch Bildung eines ternären Komplexes (Higashijima et al., 1987b). Magnesiumionen erhöhen die basale GTPγS-Bindung in geringerem Ausmaß als die Agonist-stimulierte GTPγS-Bindung und bewirken so eine Erweiterung des Messfensters (Harrison und Traynor, 2003).

Natriumionen im millimolaren Bereich tragen zur Erweiterung des Messfensters bei, indem sie die spontane G Protein-Aktivierung senken, ohne den Agonist-induzierten Maximaleffekt zu beeinflussen (Hilf et al., 1989; Tian und Deth, 1993). Natriumionen entkoppeln freie Rezeptoren von G Proteinen (Costa et al., 1990). Für verschiedene G<sub>i/o</sub>-gekoppelte Rezeptoren wurde gezeigt, dass die Entkopplung durch die Interaktion von Natriumionen mit einem Aspartatrest innerhalb der zweiten transmembranären Domäne hervorgerufen wird (Tian und Deth, 1993).

### 4.2.2 Vorteile der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Experimente

Der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Assay misst die funktionellen Konsequenzen der Rezeptorbesetzung auf der ersten Ebene der Signaltransduktion. Die Messung des Guaninnucleotid-Austausches unterliegt weniger der Signalverstärkung und -regulation als distale Ereignisse. Das Molekül [<sup>35</sup>S]GTPγS selbst ist weitgehend hydrolyseresistent, hat eine hohe Affinität zur α-Untereinheit sowie eine relativ hohe spezifische Radioaktivität (Manning, 2002). Insbesondere zur Messung partialagonistischer Effekte sind

[<sup>35</sup>S]GTPγS-Experimente geeignet (Niedernberg et al., 2003; Bidlack und Parkhill, 2004). Es kann jeder beliebige (Partial-)Agonist eingesetzt werden, ohne diesen vorher radioaktiv markieren zu müssen. Der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Assay erlaubt eine Messung von Affinität und intrinsischer Aktivität der Agonisten (Harrison und Traynor, 2003) sowie die Bestimmung des Einflusses allosterischer Modulatoren auf diese Parameter (Zahn et al., 2002).

Allerdings erlaubt diese Methode keine Differenzierung zwischen den G Protein-Subtypen, die aktiviert werden (Manning, 2002). Um dies zu erreichen, können spezifische Antikörper gegen unterschiedliche Gα-Untereinheiten eingesetzt werden (Akam et al., 2001).

### 4.3 Ergebnisse der kinetischen [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsexperimente

Die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung gehorcht dem Massenwirkungsgesetz. In kinetischen Experimenten wurde die Assoziation von [<sup>35</sup>S]GTPγS an G Proteine in An- und Abwesenheit des Partialagonisten Pilocarpin in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Aufgrund der Annahme einer 1:1-Wechselwirkung zwischen G Protein und [<sup>35</sup>S]GTPγS-Molekül werden die Daten einer monophasischen Assoziationskinetik erster Ordnung angepasst. Die Geschwindigkeit der Assoziation ist dabei proportional der Konzentration freier G Proteine und nimmt über den Zeitverlauf exponentiell ab. Ziel der kinetischen Experimente war die Bestimmung des Zeitpunktes, an dem der Unterschied zwischen Agonist-induzierter und basaler [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung<sup>2</sup> maximal ist. Dieser Zeitpunkt wurde als Filtrationszeitpunkt für spätere Experimente festgelegt. Zur Messbarkeit eines agonistischen Effektes muss die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung im Vergleich zur basalen [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung entweder beschleunigt oder die insgesamt gebundene Menge erhöht werden.

Unter der Voraussetzung der Irreversibilität der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung liegen zu einem unendlich späten Zeitpunkt alle G Proteine (unabhängig von der Anwesenheit des Agonisten) [<sup>35</sup>S]GTPγS-gebunden vor. Der Unterschied zwischen Agonist-induzierter und basaler Bindung ist kinetischer Art: in Anwesenheit des Agonisten wird der Maximaleffekt schneller erreicht (Senogles et al., 1990; Munshi et al., 1991; Negishi et al., 1993). In anderen Arbeiten verlaufen Agonist-induzierte und basale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Assoziation mit der gleichen Geschwindigkeit und streben unterschiedlichen Maxima zu. In diesem Fall wäre die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung reversibel und es stellte sich ein Gleichgewicht zwischen gebundenem und ungebundenem [<sup>35</sup>S]GTPγS ein (Yang und Lanier, 1999).

Onaran et al. (1993) erklären dieses Phänomen durch ein erweitertes „Ternäres Komplex-Modell“. Dieses allosterische Modell beinhaltet einen Rezeptor, eine G Protein-α- sowie eine βγ-Untereinheit. Der Rezeptor besitzt Bindungsstellen für einen Botenstoff und die α-Untereinheit. Die α-Untereinheit hat Bindungsstellen für ein Guaninnucleotid, den Rezeptor und die βγ-Untereinheit. Die βγ-Untereinheit bindet nur an die α-Untereinheit. Die Eigenschaften dieses Modells sind bestimmt durch die Konzentrationen der Reaktanden, die Affinitätskonstanten und die kooperativen Interaktionen

<sup>2</sup> Die basale Bindung umfasst die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an G Proteine (spontane Aktivierung) und die unspezifische, nicht an G Proteinen stattfindende Bindung (z. B. an den Filter).

zwischen den unterschiedlichen Liganden, die an eine Struktur binden. Sind nun die Konzentrationen der Reaktanden gleichbleibend und der Rezeptor und GTP $\gamma$ S positiv kooperativ zueinander hinsichtlich ihrer Bindung an die  $\alpha$ -Untereinheit, so resultiert eine unter Gleichgewichtsbedingungen erhöhte Bindung von GTP $\gamma$ S an die  $\alpha$ -Untereinheit. Ein Rezeptorprotein kann jedoch viele G Proteine aktivieren (Hilf et al., 1989; Chidiac und Wells, 1992; Breivogel et al., 1998). Chidiac und Wells (1992) postulieren daher, dass Rezeptoren mit dimer oder oligomer angeordneten G Proteinen interagieren. Auch in dieser Arbeit wurden für die basale und Agonist-induzierte [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Assoziation annähernd gleiche Geschwindigkeitskonstanten ermittelt, und die maximal gebundene [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Menge näherte sich asymptotisch unterschiedlichen Maxima an.

## 4.4 Agonismus

Agonismus und Antagonismus kann sich auf Bindungsebene und auf funktioneller Ebene zeigen. Im [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Experiment kann sowohl die Affinität (Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve) als auch die intrinsische Aktivität (Maximaleffekt) bestimmt werden. Nach Onaran et al. (1993) beruht die im [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Experiment gemessene Agonist-induzierte intrinsische Aktivität auf der Effizienz des Nucleotidaustauschs in binären Komplex (Rezeptor / G Protein) bzw. dem ternären Komplex (Orthoster / Rezeptor / G Protein). Die gemessene halbmaximal effektive Konzentration (Wirksamkeit, „potency“) des Agonisten könnte sich theoretisch aus der Affinität zwischen Ligand und Rezeptor, zwischen Rezeptor und G Protein oder zwischen G Protein und GDP zusammensetzen. In Arbeiten von Zahn et al. (2002) wurde jedoch gefunden, dass in Radioligandbindungsuntersuchungen mit dem Antagonisten [ $^3$ H]M-Methylscopolamin die Affinitäten von unterschiedlichen Agonisten um einen konstanten Faktor von der halbmaximal wirksamen Konzentration im [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Experiment abweichen. Die im [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Experiment gemessene Wirksamkeit („potency“) einer Substanz korreliert demnach mit der Affinität der Substanz zum Rezeptor.

### 4.4.1 Voll- und Partialagonismus an M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptoren

Partialagonisten können eine im Vergleich zu Vollagonisten verminderte Wirksamkeit („potency“) und / oder eine verminderte intrinsische Aktivität („efficacy“) besitzen.

#### 4.4.1.1 Vergleich der Affinitäten von Oxotremorin M und Pilocarpin am M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor

In der vorliegenden Arbeit zeigte der Vollagonist Oxotremorin M eine höhere Wirksamkeit am M<sub>2</sub>-Rezeptor als Pilocarpin. Die Wirksamkeit von Oxotremorin M am M<sub>4</sub>-Rezeptor wurde nicht untersucht. Da Oxotremorin M aber ein nichtselektiver Agonist ist (Jakubík et al., 1997; Christopoulos et al., 2001), ist auch am M<sub>4</sub>-Rezeptor ein Unterschied in der Wirksamkeit von Oxotremorin M und Pilocarpin zu erwarten.



Die Wirksamkeit von Pilocarpin an  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptoren unterschied sich nicht signifikant, Pilocarpin zeigte tendenziell eine etwas geringere Wirksamkeit am  $M_4$ -Rezeptor. Es war zu erwarten, dass die Wirksamkeiten von Pilocarpin am  $M_2$ - und am  $M_4$ -Rezeptor in der gleichen Größenordnung liegen, da Pilocarpin auch in Radioligandbindungsexperimenten keine Subtyp-Selektivität aufweist (Jakubík et al., 1997).

#### **4.4.1.2 Vergleich der intrinsischen Aktivitäten von Oxotremorin M und Pilocarpin am $M_2$ - und $M_4$ -Rezeptor**

Der Vollagonist Oxotremorin M hatte am  $M_2$ -Rezeptor und am  $M_4$ -Rezeptor jeweils eine höhere intrinsische Aktivität als der Partialagonist Pilocarpin. Nach dem „two-state-model of receptor activation“ (Leff, 1995) würden Vollagonisten nur an den aktiven, Partialagonisten jedoch an den aktiven und den inaktiven Rezeptor binden. Kenakin (2003) postuliert anhand des „multiple-state-models“, dass Voll- und Partialagonisten aus einem breiten Spektrum unterschiedliche Rezeptorkonformationen selektieren. In fluoreszenzspektroskopischen Studien konnte gezeigt werden, dass Agonisten und Partialagonisten an  $\beta_2$ -Rezeptoren Aktivitätszustände mit unterschiedlichen Konformationen innerhalb der G Protein-Kopplungsdomäne stabilisieren (Ghanouni et al., 2001). Die durch Voll- bzw. Partialagonisten stabilisierten Rezeptorkonformationen können unterschiedliche G Proteine aktivieren (Akam et al., 2001; Ghanouni et al., 2001) bzw. im Komplex mit den G Proteinen unterschiedlich effizient die Dissoziation von GDP fördern (Breivogel et al., 1998).

Der  $M_2$ -Rezeptor-vermittelte Maximaleffekt beider Agonisten (Oxotremorin M und Pilocarpin) war höher als der  $M_4$ -Rezeptor-vermittelte. Die Unterschiede in den Maximaleffekten sind nicht durch Unterschiede in der Rezeptordichte begründet, da die Dichte der  $M_4$ -Rezeptoren in den entsprechenden CHO-Zellen höher war als die der  $M_2$ -Rezeptoren. Akam et al. (2001) fanden, dass der Vollagonist Methacholin und der Partialagonist Pilocarpin  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptor-vermittelt in unterschiedlichem Ausmaß die  $G\alpha$ -Subtypen  $G_{i1/2}$  und  $G_{i3/0}$  aktivieren. In Bezug auf diese Theorie haben nach den Befunden dieser Arbeit  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptoren in Abhängigkeit von dem gebundenen Agonisten unterschiedliche Affinitäten zu den einzelnen  $G\alpha$ -Subtypen, die im Komplex mit Agonist-stimulierten Rezeptoren den Nucleotidaustausch in unterschiedlichem Maße fördern.

#### **4.4.2 Rezeptorreserve**

Der Begriff „Rezeptorreserve“ impliziert eine hohe Rezeptordichte innerhalb der Zellmembran, so dass eine maximale G Protein-Aktivierung schon bei der Besetzung eines Teils der Rezeptoren durch den Agonisten zustande kommt. Ein Maximaleffekt kann in diesem Fall nicht nur durch Vollagonisten, sondern bereits durch Partialagonisten erzielt werden: die [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindung ist kein „1:1-Abbild“ der Rezeptorbesetzung.

Da in dieser Arbeit Voll- und Partialagonist einen unterschiedlichen Maximaleffekt haben, liegt trotz der hohen Expression des jeweiligen muskarinischen Rezeptorsubtyps in den verwendeten CHO-Zellen offenbar keine Rezeptorreserve für den Partialagonisten vor. Die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung ist in der vorliegenden Arbeit also wohl ein direktes Abbild der Rezeptorbesetzung durch Pilocarpin. Demnach entspricht die halbmaximal wirksame Konzentration von Pilocarpin der halbmaximalen Rezeptorbesetzung bzw. seiner Bindungskonstante.

## 4.5 Antagonismus

Antagonistische Effekte können zeitlich vor, während oder nach der Interaktion am Rezeptor auftreten. So kann sich eine Substanz antagonistisch verhalten, indem sie einen agonistischen Liganden komplexiert, bevor er mit dem Rezeptorprotein in Wechselwirkung tritt (chemischer Antagonismus). Auf funktionaler Ebene kann ein Antagonist entgegengesetzte, der Rezeptoraktivierung nachgeschaltete Signaltransduktionswege initiieren.

### 4.5.1 Kompetitiver Antagonismus

Bei kompetitivem Antagonismus konkurrieren Agonist und Antagonist im Sinne des „entweder-oder-Prinzips“ um die Besetzung des Rezeptorproteins. Dementsprechend sinkt nach dem Massenwirkungsgesetz durch steigende Konzentrationen des Antagonisten die Bindungswahrscheinlichkeit bzw. die Affinität des Agonisten. Agonist und Antagonist induzieren bzw. stabilisieren die jeweils von ihnen bevorzugte(n) Rezeptorkonformation(en). Die durch den Agonist-Rezeptor-Komplex initiierte Effizienz der G Protein-Aktivierung (die intrinsische Aktivität) bleibt in Anwesenheit des Antagonisten unbeeinflusst, da dieser nicht an den Agonist-Rezeptor-Komplex binden kann.

Der kompetitive Antagonismus zwischen Atropin und Pilocarpin am M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor zeigte sich im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Experiment durch eine parallele Rechtsverschiebung der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven ohne Veränderung des Maximaleffektes (der intrinsischen Aktivität) von Pilocarpin. Die Auswertung nach dem kompetitiven Modell (Arunlakshana und Schild, 1959) ergab eine Gerade mit der Steigung  $s = 1$ ; dies bedeutet, dass die Verminderung der Wirksamkeit von Pilocarpin proportional der logarithmierten Konzentration von Atropin verläuft.

Anhand der Auswertung nach Arunlakshana und Schild (1959) kann kompetitiver Antagonismus auf mechanistischer Ebene festgestellt werden, eine Aussage über die Nutzung gemeinsamer Bindungsareale am Rezeptorprotein ist jedoch auf diesem Weg nicht möglich. Allerdings weisen die Kontaktpunkte des Agonisten Acetylcholin und der Atropin-artigen Antagonisten wie z. B. NMS am M<sub>1</sub>-Rezeptorprotein eine hohe Homologie auf (Lu et al., 2002). Aufgrund der Konservierung der Ligand-Bindungsdomäne unter den muskarinischen Rezeptorsubtypen ist eine gemeinsame topologische Bindungsstelle am M<sub>2</sub>-Rezeptor demnach wahrscheinlich.

Nach dem Modell der „conformational selection“ bzw. der „conformational induction“ (Christopoulos und Kenakin, 2002) stabilisiert bzw. induziert Pilocarpin eine oder mehrere „aktive“ Rezeptorkonformationen, während die von Atropin selektierte(n) oder induzierte(n) Konformationen keine G Protein-Aktivierung hervorrufen. Der Maximaleffekt wird in Konzentrationen erreicht, in denen Pilocarpin Atropin aus seiner Bindung völlig fernhält und seine favorisierte(n) Rezeptorkonformation(en) stabilisiert bzw. induziert.

#### **4.5.2 Inverser Agonismus**

Ein Antagonist kann sich in Hinblick auf die spontane Rezeptoraktivierung indifferent verhalten (neutraler Antagonist), oder aber diese senken (inverser Agonist; Kenakin, 2003). Legt man das „two-state-model“ bzw. das „multiple-state-model of receptor activation“ zu Grunde, verschiebt ein inverser Agonist das Gleichgewicht zwischen aktiven und inaktiven Rezeptoren zu Gunsten der inaktiven Rezeptorkonformation, während ein neutraler Antagonist dieses Gleichgewicht nicht verändert.

Sowohl bei Überexpression von Rezeptoren als auch von G Proteinen kann inverser Agonismus beobachtet werden. Je höher der Quotient aus Rezeptor- und G Protein-Konzentration (siehe auch: Rezeptorreserve) ist, desto mehr Rezeptoren liegen in einer zufällig auftretenden aktiven Konformation vor, umso weniger wird die Rezeptor-vermittelte [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung durch Agonisten erhöht und desto deutlicher wird sie durch Antagonisten gesenkt (Jakubík et al., 1998). Burstein et al. (1996) beobachteten an Muskarinrezeptoren nach der Überexpression von G Proteinen eine Verminderung des Unterschiedes zwischen partialagonistischem und agonistischem Effekt und eine stärkere Senkung der Basalaktivität durch inverse Agonisten. Hohe G Protein-Konzentrationen begünstigen die Isomerisierung der Rezeptorkonformationen zugunsten des aktiven Zustandes (Azzi et al., 2001). Die Überexpression von Rezeptoren oder von G Proteinen führt also zu einer höheren Dichte an aktiven Rezeptorkonformationen und zu einem höheren spontanen Nucleotidaustausch, der durch inverse Agonisten unterbunden wird.

Der Antagonist Atropin und der allosterische Modulator Alcuronium senkten in dieser Arbeit die M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor-vermittelte [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung geringfügig. Auch Lazareno und Birdsall (1993) beschrieben eine Verminderung der Basalaktivität um 5 - 10 % durch muskarinische Antagonisten im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Experiment. Jakubík et al. (1998) zeigten, dass das Ausmaß der Senkbarkeit der basalen Rezeptoraktivierung und damit des inversen Agonismus von dem Rezeptor/G Protein-Verhältnis abhängt. Die Überexpression von stabil transfizierten Rezeptorsubtypen in den verwendeten CHO-Zellen erklärt die, wenn auch geringe, basale Rezeptoraktivierung. In der Literatur wurde an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren eine negative intrinsische Aktivität von Atropin (Hilf und Jakobs, 1992; Eckstein, 2003) und von Alcuronium (Eckstein, 2003) beschrieben.

## 4.6 Allosterie

### 4.6.1 Theoretische Grundlagen

Nach Ehlert (1988) und Hall (2000) ist Allosterie die gleichzeitige Bindung und gegenseitige Beeinflussung der Affinität und/oder intrinsischen Aktivität zweier Liganden an einer Zielstruktur. Kennzeichen der allosterischen Interaktion ist die Bildung ternärer Komplexe; dabei nutzen beide Liganden *unterschiedliche* Bindungsareale. Nach Christopoulos und Kenakin (2002) können an der allosterischen Interaktion auch mehr als zwei Liganden beteiligt sein.

Das Prinzip der allosterischen Modulation spiegelt sich auf mehreren Ebenen der Rezeptor- und der G Protein-Aktivierung wieder. Ehlert (1988) beschreibt die allosterische Interaktion *zweier Liganden* an ein Rezeptorprotein mit gegenseitiger Veränderung der Affinität und/oder der intrinsischen Aktivität. *Agonist und GDP-gebundenes G Protein* erhöhen ihre Affinität zum Rezeptorprotein gegenseitig (Ehlert et al., 1985; Onaran et al. 1993; Christopoulos und Kenakin, 2002). Nach Hatley et al. (2003) fördern *GTP und Effektorprotein* ihre Bindung an die  $\alpha$ -Untereinheit. Auch *GDP und die  $\beta\gamma$ -Untereinheit* erhöhen gegenseitig ihre Affinität zur  $\alpha$ -Untereinheit (Conklin und Bourne, 1993; Hatley et al., 2003).

Bei der allosterischen Interaktion kann eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins eintreten, die die Ligand-Bindungsstelle und/oder die G Protein-Kopplungsdomäne betrifft. Dies führt zu einer allosterischen Veränderung der Affinität beider Liganden zum Rezeptorprotein bzw. zu einer Veränderung der intrinsischen Aktivität (Hall, 2000). An muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren konnte eine allosterische Modulation der intrinsischen Aktivität erstmals durch Zahn et al. (2002) gezeigt werden. Im [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Experiment können Veränderungen der Affinität wie auch der intrinsischen Aktivität eines Agonisten quantifiziert werden (Harrison und Traynor, 2003).

#### 4.6.1.1 Allosterische Modulation der Affinität

Bei der allosterischen Wechselwirkung zweier Liganden an muskarinischen Rezeptoren kann analog dem Modell von Tränkle et al. (1998) der allosterische Modulator als sterisches Hindernis an der extrazellulären Seite des Rezeptorproteins die Assoziation bzw. die Dissoziation des Orthosters verzögern. Abhängig davon, ob die allosterische Verminderung der Assoziations- oder Dissoziationsgeschwindigkeit überwiegt, resultiert eine Steigerung oder Senkung der *Affinität* des Orthosters zum Rezeptor (Holzgrabe und Mohr, 1998). Jedoch ist auch eine Beschleunigung der Dissoziation möglich; eine solche wurde an Adrenorezeptoren von Bruns und Fergus (1990) beobachtet. Die gegenseitige Beeinflussung der Affinität von Ligand und Modulator zu der Bindungsstelle am Rezeptor wird als „Kooperativität“ bezeichnet (Ehlert, 1988). Der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  quantifiziert das Ausmaß der Affinitätsveränderung. Bei einer gegenseitigen Erhöhung der Affinität zum Rezeptor spricht man von positiver Kooperativität, wobei der negative dekadische Logarithmus des Kooperativitätsfaktors ( $p\alpha$ )

Werte  $> 0$  annimmt; negative Kooperativität ( $\rho\alpha < 0$ ) bezeichnet die gegenseitige Verminderung der Affinität zweier Liganden.

Im [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindungsexperiment repräsentiert die Agonist-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft (Wendepunkt der Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurve), die Wirksamkeit („potency“) des Agonisten. Sofern eine Rezeptorreserve ausgeschlossen werden kann (siehe Kapitel 4.4.2), zeigt die halbmaximal effektive Konzentration des Agonisten dessen Bindungsaffinität im [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindungsexperiment an (Bidlack und Parkhill, 2004). Allosterische Modulatoren der Agonist-Affinität verursachen eine Verschiebung des Wendepunktes seiner Konzentrations-Effekt-Kurve. Diese Verschiebung erreicht in hohen Alloster-Konzentrationen ein Maximum.

In der Literatur konnte bereits eine allosterische Steigerung und eine allosterische Senkung der Wirksamkeit („potency“) und damit der Bindungsaffinität von Agonisten im [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindungsexperiment gezeigt werden (Birdsall et al., 1999; Zahn et al., 2002; Lazareno et al., 2004).

#### 4.6.1.2 Allosterische Modulation der intrinsischen Aktivität

Die im [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindungsexperiment gemessene intrinsische Aktivität eines Agonisten beruht auf der Effizienz des Nucleotidaustausches und damit der Effizienz der G Protein-Aktivierung. Sofern keine Rezeptorreserve vorliegt, korreliert der Maximaleffekt eines Agonisten im [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Experiment mit seiner intrinsischen Aktivität zur Aktivierung des einzelnen Rezeptorproteins (Bidlack und Parkhill, 2004). Ghanouni et al. (2001) beobachteten, dass unterschiedliche Agonisten an Beta-Rezeptoren unterschiedliche Konformationen des Rezeptorproteins innerhalb der G Protein-Kopplungsdomäne stabilisierten. Auch allosterische Modulatoren könnten bestimmte Agonist-Rezeptor-Konformationen stabilisieren (oder induzieren), die eine von den ursprünglichen Agonist-Rezeptor-Konformationen abweichende G Protein-Aktivierung aufweisen. Die allosterische Modulation der *intrinsischen Aktivität* des Agonisten zeigt sich im [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindungsexperiment in einer konzentrationsabhängigen Veränderung des Agonist-Maximaleffektes. Eine konzentrationsabhängige Verminderung der Agonist-induzierten intrinsischen Aktivität an muskarinischen Rezeptoren ist im Falle des Pilocarpins bereits literaturbekannt (Zahn et al., 2002). Eine allosterische Steigerung der intrinsischen Aktivität konnte noch nicht beobachtet werden.

In der Arbeit von Zahn et al. (2002) erfolgte eine konzentrationsabhängige Senkung der basalen und der Pilocarpin-induzierten intrinsischen Aktivität durch allosterische Modulatoren auf das gleiche Niveau. Da bei Zahn et al. (2002) inverser Agonismus vorliegt, setzt sich die Pilocarpin-induzierte G Protein-Aktivierung in Anwesenheit des Agonisten aus der Basalaktivität der unbesetzten Rezeptoren und aus der Aktivität der Agonist-besetzten Rezeptoren zusammen. Durch Zugabe hoher Alloster-Konzentrationen bilden sich ternäre Komplexe, in denen das Rezeptorprotein eine Konformation mit einer geringeren Aktivität als im unbesetzten Zustand annimmt.

In der vorliegenden Arbeit wurde lediglich eine geringfügige, durch Antagonisten senkbare Basalaktivität beobachtet. Die Pilocarpin-induzierte G Protein-Aktivierung wurde durch die Bildung ternärer Kom-

plexe mit allosterischen Modulatoren maximal auf den Basalwert, nicht jedoch darüber hinaus reduziert. In hohen Konzentrationen besetzt Pilocarpin alle Rezeptoren, es bilden sich mit allosterischen Modulatoren ternäre Komplexe, in denen das Rezeptorprotein eine mit dem unbesetzten Zustand vergleichbare (oder im Falle einiger allosterischer Modulatoren auch eine höhere) Aktivität annimmt.

#### **4.6.1.3 Unterschiede zwischen kompetitivem und allosterischem Antagonismus**

Ein allosterischer Antagonismus liegt eindeutig im Falle einer konzentrationsabhängigen Verminderung der Agonist-induzierten intrinsischen Aktivität vor. Moduliert eine Testsubstanz jedoch ausschließlich die Affinität des Agonisten, wird zur Unterscheidung zwischen kompetitivem und allosterischem Antagonismus geprüft, ob die Rechtsverschiebung proportional der logarithmisch steigenden Konzentrationen der Testsubstanz zunimmt (kompetitiver Antagonismus) oder einem Maximum zustrebt (allosterischer Antagonismus).

Die Rechtsverschiebung der Wendepunkte der Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurve in Anwesenheit steigender Konzentrationen des Antagonisten wird quantifiziert anhand der Analyse nach dem kompetitiven (Arunlakshana und Schild, 1959) bzw. allosterischen Modell (Lanzafame et al., 1996). Erhält man bei der Datenauftragung nach Arunlakshana und Schild (1959) eine Gerade mit der Steigung  $s = 1$ , erfolgt die Rechtsverschiebung der Wendepunkte linear zur logarithmisch steigenden Antagonist-Konzentration; es liegt kompetitiver Antagonismus vor. Verläuft die Rechtsverschiebung der Wendepunkte der Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurven nicht proportional zur Konzentration des Antagonisten, so weicht die Schild-Steigung signifikant von dem Wert 1 ab und die Werte bilden in hohen Konzentrationen ein Plateau. Die unter Berücksichtigung des ternären Komplex-Modells nach Ehlert (1988) entwickelte Gleichung nach Lanzafame et al. (1996) wird in diesem Fall für die Auswertung der Verschiebefaktoren angewandt. Aus der Gleichung nach Lanzafame et al. (1996) können der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$ , die Affinität des Allosters zum freien Rezeptor  $pK_A$  sowie zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor  $p(\alpha \cdot K_A)$  berechnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Gleichung nach Arunlakshana und Schild (1959) zur Auswertung der Rechtsverschiebung der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven durch den kompetitiven Antagonisten Atropin angewandt. Der Vollständigkeit halber wurde mittels F-Test ausgeschlossen, dass die Gleichung nach Lanzafame et al. (1996) die Daten signifikant besser beschreibt. Die Auswertung der Verschiebefaktoren aller anderen Testsubstanzen erfolgte anhand der Gleichung nach Lanzafame et al. (1996). Die Anwendung des allosterischen Modells war gerechtfertigt, da alle Substanzen im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Experiment eine nichtkompetitive Wechselwirkung mit Pilocarpin in Form der konzentrationsabhängigen Senkung der intrinsischen Aktivität zeigten. Mit Ausnahme von Di-WGA 6 war zudem für alle Verbindungen bereits die allosterische Wirksamkeit in Form der Dissoziationsverzögerung der NMS-Bindung bekannt (siehe Kapitel 3).

#### **4.6.1.4 Voraussetzungen für die Auswertung nach dem kompetitiven und dem allosterischen Modell**

Als Bedingung für die Anwendbarkeit der Gleichungen nach Arunlakshana und Schild (1959) und nach Lanzafame et al. (1996) muss der Effekt des Agonisten in An- und in Abwesenheit des Antagonisten (Allosters) eine Funktion der Rezeptorbesetzung sein. Konkretisiert wird dies durch die Forderung nach einer parallelen Rechtsverschiebung (horizontale Rechtsverschiebung mit identischer Steigung und Maximaleffekt) der Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurven durch die Testsubstanz. Die parallele Rechtsverschiebung war in dieser Arbeit im Falle des kompetitiven Antagonisten Atropin erfüllt, die allosterischen Modulatoren riefen jedoch eine Senkung der intrinsischen Aktivität hervor. Da eine Rezeptorreserve ausgeschlossen werden kann (siehe Kapitel 4.4.2), bleibt auch im Falle einer Senkung des Maximaleffektes die Anzahl der involvierten Rezeptoren unverändert. Im Wendepunkt der Kurven für die Pilocarpin-induzierte [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung wird demnach sowohl unter Kontrollbedingungen als auch in Gegenwart allosterischer Modulatoren jeweils eine halbmaximale Rezeptorbesetzung durch Pilocarpin vorgelegen haben. Somit spiegelt die Verschiebung der Wendepunkte die Verschiebung der Pilocarpin-Affinität wieder. Die Anwendung der Gleichung nach Lanzafame et al. (1996) ist also auch im Falle einer allosterischen Verminderung des Pilocarpin-Maximaleffektes zulässig.

#### **4.6.2 Allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung am M<sub>2</sub>-Rezeptor**

Es wurden insgesamt 13 allosterische Modulatoren untersucht. Sie gehörten strukturell unterschiedlichen Gruppen an (Caracurine und Alcuronium, Strychnin und Di-Strychnin 6, Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen, die Bispyridinium-Verbindung Duo3, Gallamin), hatten unterschiedliche Molekülgrößen („Dimere“ / „Monomere“ wie Caracurin V, Di-WGA 6 / Caracurin VII, Di-Strychnin 6 / Strychnin, W84 / SH28, MM3a / MM7a) und unterschieden sich in der Art der Wechselwirkung mit dem Rezeptor (für Duo3 werden „atypische“ Bindungsareale postuliert; Tränkle und Mohr, 1997).

##### **4.6.2.1 Allosterische Modulation der Wirksamkeit („potency“) von Pilocarpin**

##### **4.6.2.1.1 Pharmakologische Kenngrößen der allosterischen Modulation der Pilocarpin-Wirksamkeit am M<sub>2</sub>-Rezeptor**

Die Affinität von Pilocarpin zum M<sub>2</sub>-Rezeptor kann allosterisch erhöht werden (Naphmethonium; positive Kooperativität,  $\rho\alpha > 0$ ), unverändert bleiben (Alcuronium, MM7a, Di-Strychnin 6; neutrale Kooperativität,  $\rho\alpha = 0$ ) oder vermindert werden (alle anderen Substanzen; negative Kooperativität,  $\rho\alpha < 0$ ). Die Kooperativität ist ein Ausdruck der Differenz zwischen der Affinität des Allosters zum Ligand-besetzten und zum freien Rezeptor. Ist die Bindungsneigung des Allosters zum Pilocarpin-besetzten Rezeptorprotein höher als zum freien, so resultiert eine Erhöhung der Bindungsneigung von

## Diskussion

Pilocarpin zum Rezeptor. Im umgekehrten Falle erfolgt eine allosterische Verminderung der Affinität von Pilocarpin zum Rezeptor.

Werden die durch allosterische Modulatoren induzierten Verschiebungen der halbmaximal effektiven Konzentrationen von Pilocarpin nach Lanzafame et al. (1996) aufgetragen, so kann aus den im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsexperiment ermittelten funktionellen Daten auf die Bindungsaffinitäten der allosterischen Modulatoren zum unbesetzten ( $pK_A$ ) und zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor ( $p(\alpha \cdot K_A)$ ) sowie auf die Kooperativität ( $p\alpha$ ) zwischen Alloster und Pilocarpin rückgeschlossen werden. Der  $pIC_{50}$ -Wert ist die Alloster-Konzentration, die eine halbmaximale Reduktion der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin hervorruft bzw. die mit der Hälfte der Pilocarpin-besetzten Rezeptoren einen ternären Komplex bildet und stellt damit ebenfalls ein Maß für die Affinität des Allosters zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor dar. Tabelle 40 zeigt eine Übersicht über die Kenndaten der allosterischen Modulatoren am  $M_2$ -Rezeptor.



## Diskussion

<b>Alloster</b>	<b>pK<sub>A</sub></b>	<b>pα</b>	<b>p(α · K<sub>A</sub>)</b>	<b>pIC<sub>50</sub></b>
Alcuronium	5,95*	0,00**	5,95*	5,95 ± 0,09 (n = 4)
Caracurin V	5,35 ± 0,32 (n = 11)	-1,00 ± 0,34 (n = 11)	4,35	5,17 ± 0,09 (n = 3)
Caracurin VII	4,31 ± 0,24 (n = 8)	-1,14 ± 0,45 (n = 8)	3,17	3,01 ± 0,43 (n = 3)
Di-WGA 6	6,01 ± 0,29 (n = 10)	-0,65 ± 0,10 (n = 10)	5,36	5,07 ± 0,19 (n = 3)
Di-Strychnin 6	5,71*	0**	5,71*	5,71 ± 0,14 (n = 4)
Strychnin	4,91 ± 0,12 (n = 15)	-0,68 ± 0,06 (n = 15)	4,23	4,04 ± 0,12 (n = 3)
W84	6,46 ± 0,10 (n = 11)	-1,68 ± 0,21 (n = 11)	4,78	5,02 ± 0,07 (n = 5)
SH28 (½ W84)	5,60 ± 0,07 (n = 19)	-3,37 ± 0,33 (n = 19)	2,23	4,01 ± 0,13 (n = 3)
MM3a (Naphmethonium)	~7,07*	~0,6	7,67*	7,67 ± 0,09 (n = 4)
MM7a (½ Naphmethonium)	4,87*	0**	4,87*	4,87 ± 0,08 (n = 2)
Str6Naph	7,64 ± 0,27 (n = 12)	-0,91 ± 0,09 (n = 12)	6,73	6,61 ± 0,05 (n = 2)
Duo3	8,00 ± 0,09 (n = 18)	-3,01 ± 0,19 (n = 18)	4,99	5,93 ± 0,07 (n = 4)
Gallamin	6,31 ± 0,13 (n = 22)	-2,53 ± 0,16 (n = 22)	3,78	Im Bereich zwischen 2,35 und 3,00

**Tabelle 40:** Pharmakologische Kennwerte der allosterischen Modulation des Effektes von Pilocarpin in Experimenten mit CHO-M<sub>2</sub>-Zellmembranen (Mittelwerte ± Standardfehler).

pK<sub>A</sub> Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K<sub>A</sub> des Allosters, Maß für die Affinität des Allosters zum unbesetzten Rezeptor.

pα Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α (pα < 0: Alloster vermindert die Affinität von Pilocarpin zum Rezeptor; pα > 0: Alloster erhöht die Affinität von Pilocarpin zum Rezeptor).

p(α · K<sub>A</sub>) Aus der Wirksamkeitsverschiebung von Pilocarpin abgeleitete Affinität des Allosters zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor.

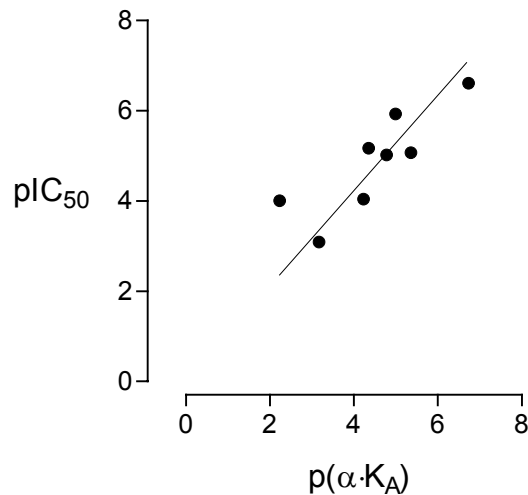
pIC<sub>50</sub> Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Allosters, die eine halbmaximale Reduktion des Pilocarpin-Maximaleffektes verursacht; aus der Senkung der intrinsischen Aktivität abgeleitetes Maß für die Affinität des Allosters zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor.

\* Die Werte wurden anhand der Bedingung pIC<sub>50</sub> = p(α · K<sub>A</sub>) = pα + pK<sub>A</sub> ermittelt (siehe Text).

\*\* Da die allosterischen Modulatoren den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve in dem betrachteten Konzentrationsbereich nicht veränderten, wurde neutrale Kooperativität (pα = 0) abgeleitet.

Um zu prüfen, ob der pIC<sub>50</sub>-Wert und der p(α · K<sub>A</sub>)-Wert entsprechend der theoretischen Erwartung übereinstimmen, d.h. ob in dem Konzentrationsbereich der halbmaximalen Veränderung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin ein „Abknicken“ der Kurve in der Auswertung nach Lanzafame et al. (1996) auftritt, wurden die pIC<sub>50</sub>-Werte und die p(α · K<sub>A</sub>)-Werte gegeneinander aufgetragen und eine Regressionsgerade angelegt (Abb. 61, Tabelle 41 zeigt die zu Grunde liegenden Daten).

## Diskussion



**Abb. 61:** Korrelation zwischen der aus der Wirksamkeitsverschiebung von Pilocarpin  $p(\alpha \cdot K_A)$  und der aus der Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin abgeleiteten Affinität der allosterischen Modulatoren zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor  $pIC_{50}$ .

*Ordinate:*  $p(\alpha \cdot K_A)$ -Werte der allosterischen Modulatoren

*Abszisse:*  $pIC_{50}$ -Werte der allosterischen Modulatoren

*Kurvenanpassung:* lineare Regressionsanalyse

Alloster	Caracurin V	Caracurin VII	Di-WGA 6	Strychnin	W84	SH28	Str6Naph	Duo3
$pIC_{50}$	5,17	3,09	5,07	4,04	5,02	4,01	6,61	5,93
$p(\alpha \cdot K_A)$	4,35	3,17	5,36	4,23	4,78	2,23	6,73	4,99

**Tabelle 41:** Affinität der allosterischen Modulatoren zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor, aus der Verminderung der intrinsischen Aktivität ( $pIC_{50}$ ) und aus den Verschiebungen der halbmaximal effektiven Pilocarpin-Konzentration bestimmt ( $p(\alpha \cdot K_A)$ ).

Die lineare Regressionsgerade hat die Steigung  $1,05 \pm 0,06$ . Bei einer Steigung von 1 entsprechen die  $p(\alpha \cdot K_A)$ - und  $pIC_{50}$ -Werte einander. Da die Steigung nicht signifikant von dem Wert 1 abweicht (t-Test,  $p = 0,005$ ), kann die Affinität der allosterischen Modulatoren zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor im Prinzip durch beide Kenngrößen gleichermaßen erfasst werden. Es liegt eine statistisch signifikante Korrelation ( $p = 0,01$ ) zwischen den  $p(\alpha \cdot K_A)$ - und  $pIC_{50}$ -Werten vor, die mit einem Korrelationskoeffizienten nach Spearman von  $r = 0,86$  beschrieben wird. Eine perfekte positive Korrelation würde bei einem Koeffizienten von  $r = 1$  vorliegen.

Bei genauer Betrachtung der Einzelwerte ist erkennbar, dass die  $pIC_{50}$ -Werte bei Caracurin V, SH28 und Duo3 jedoch deutlich größer als die entsprechenden  $p(\alpha \cdot K_A)$ -Werte sind. Dies lässt sich dadurch erklären, dass der  $p\alpha$ -Wert bei Caracurin V und bei SH28 mit einem relativ großen Standardfehler behaftet ist (siehe Tabelle 40), so dass der entsprechende  $p(\alpha \cdot K_A)$ -Wert ebenfalls einer relativ hohen Streuung unterliegt.

#### 4.6.2.1.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

##### 4.6.2.1.2.1 „Monomer-Dimer-Paare“

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene „Monomer-Dimer-Paare“ der Allosterie eingesetzt. Im Folgenden werden die pharmakologischen Kenndaten der kleinen, „monomeren“ und der großen, „dimeren“ allosterischen Modulatoren gegenübergestellt (Tabelle 42).

Dimer	$p\alpha$	$pK_A$	$pIC_{50}$	Monomer	$p\alpha$	$pK_A$	$pIC_{50}$
Caracurin V	$-1,00 \pm 0,34$ (n = 11)	$5,35 \pm 0,32$ (n = 11)	$5,17 \pm 0,09$ (n = 3)	Caracurin VII	$-1,14 \pm 0,45$ (n = 8)	$4,31 \pm 0,24$ (n = 8)	$3,01 \pm 0,43$ (n = 3)
Di-WGA 6	$-0,65 \pm 0,10$ (n = 10)	$6,01 \pm 0,29$ (n = 10)	$5,07 \pm 0,19$ (n = 3)				
Di-Strychnin 6	0**	5,71*	$5,71 \pm 0,14$ (n = 4)	Strychnin	$-0,68 \pm 0,06$ (n = 15)	$4,91 \pm 0,12$ (n = 15)	$4,04 \pm 0,12$ (n = 3)
W84	$-1,68 \pm 0,21$ (n = 11)	$6,46 \pm 0,10$ (n = 11)	$5,02 \pm 0,07$ (n = 5)	SH28	$-3,37 \pm 0,33$ (n = 19)	$5,60 \pm 0,07$ (n = 19)	$4,01 \pm 0,13$ (n = 3)
Naphmethonium	$\sim 0,6$	7,07*	$7,67 \pm 0,09$ (n = 4)	MM7a	0**	4,87*	$4,87 \pm 0,08$ (n = 2)

**Tabelle 42:** Pharmakologische Kennwerte des Effektes der allosterischen Modulatoren auf die Affinität und intrinsische Aktivität von Pilocarpin in Experimenten mit CHO-M<sub>2</sub>-Zellmembranen (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler).

$p\alpha$  Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$  ( $p\alpha < 0$ : Alloster vermindert die Affinität von Pilocarpin zum Rezeptor;  $p\alpha > 0$ : Alloster erhöht die Affinität von Pilocarpin zum Rezeptor).

$pK_A$  Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_A$  (Maß für die Affinität des Allosters zum unbesetzten Rezeptor).

$pIC_{50}$  Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Allosters, die eine halbmaximale Reduktion des Pilocarpin-Maximaleffektes verursacht; aus der Senkung der intrinsischen Aktivität abgeleitetes Maß für die Affinität des Allosters zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor.

\* Die Werte wurden anhand der Bedingung  $pIC_{50} = p(\alpha \cdot K_A) = p\alpha + pK_A$  ermittelt (siehe Text).

\*\* Da die allosterischen Modulatoren den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve in dem betrachteten Konzentrationsbereich nicht veränderten, wurde neutrale Kooperativität ( $p\alpha = 0$ ) abgeleitet.

Die monomeren allosterischen Modulatoren hatten eine signifikant geringere Affinität zum freien M<sub>2</sub>-Rezeptor ( $pK_A$ ) und zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor ( $pIC_{50}$ )<sup>3</sup> als die dimeren allosterischen Modulatoren (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die dimeren Modulatoren wiesen im Vergleich zu ihren monomeren Gegenstücken eine verminderte Affinitätssenkung ( $p\alpha$ ) in Bezug auf Pilocarpin auf, die im Falle des Naphmethoniums in eine Affinitätsförderung überging. Offenbar geht die Vergrößerung der Moleküle mit einer relativ stärkeren Steigerung der Affinität des allosterischen Modulators zum Pilocarpin-besetzten als zum freien Rezeptor einher.

Portoghese (1989) beschreibt das als „bivalent ligand approach“ bezeichnete Konzept, nach welchem die Dimerisierung von Liganden einen potentiellen Ansatz zur Verbesserung von pharmakologischen

<sup>3</sup> Tabelle 42 zeigt als Indikator für die Affinität des Allosters zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor die  $pIC_{50}$ -Werte, da im Gegensatz zu den  $p(\alpha \cdot K_A)$ -Werten alle  $pIC_{50}$ -Werte auf die gleiche Weise bestimmt wurden (einige  $p(\alpha \cdot K_A)$ -Werte konnten nicht berechnet werden, sondern wurden in Form der  $pIC_{50}$ -Werte übernommen).

Eigenschaften wie Zunahme der Bindungsaffinität oder Selektivität darstellt. Für verschiedene Rezeptorfamilien sind Beispiele gefunden worden, bei denen dimere Liganden eine höhere Bindungsaffinität oder Subtyp-Selektivität zeigten (Perez et al., 1998; Christopoulos et al., 2001). Die Befunde mit dem monomeren Caracurin VII, Strychnin, SH28 und MM7a sowie den korrespondierenden Dimeren Caracurin V, Di-WGA 6, Di-Strychnin 6, W84 und Naphmethonium können als weiteres Beispiel für dieses Konzept aufgefasst werden. Die Dimere Caracurin V und Di-WGA 6 haben eine Affinität zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor von  $pIC_{50} = 5,2$  (Caracurin V) bzw. 5,1 (Di-WGA 6) im Vergleich zu einem  $pIC_{50} = 3,1$  des Monomers Caracurin VII. Die Affinität zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor ist unabhängig davon, ob zwei Moleküle Caracurin VII unter Ringkondensation (Caracurin V) oder über eine Hexamethylenkette (Di-WGA 6) verknüpft sind.

#### **4.6.2.1.2.2 Einfluss des Strychnin-Rings, der Alkan-bis-Ammonium-Struktur und der Caracurin-Struktur auf Affinität und Kooperativität mit Pilocarpin und NMS**

Ein unsubstituierter Strychnin-Ring wird mit positiver Kooperativität gegenüber NMS zum  $M_2$ -Rezeptor in Verbindung gebracht: Strychnin, Di-Strychnin und Str6Naph erhöhen die Affinität von NMS zum  $M_2$ -Rezeptor (Zlotos et al., 2003; Dancila 2004). Mit Pilocarpin verhalten sich diese Substanzen jedoch negativ (Strychnin und Str6Naph) oder neutral kooperativ (Di-Strychnin 6). Das Strukturmerkmal des Strychnin-Rings ist also mit einer positiven Kooperativität gegenüber dem Antagonisten NMS, nicht jedoch gegenüber dem Partialagonisten Pilocarpin assoziiert.

Für die Affinität von Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen zum *NMS*-besetzten  $M_2$ -Rezeptor existieren zahlreiche Struktur-Wirkungs-Beziehungen. Eine Bis-Methylierung der lateralen Propyl-Kette wie in Naphmethonium und MM7a erhöht die Affinität des Allosters zum NMS-besetzten Rezeptor (Raasch et al., 2001; Mohr et al., 2003), ebenso wie der Austausch eines lateralen Phthalimid-Rings durch einen Naphthalimid-Substituenten (Bender et al., 2000; Mohr et al., 2003). Bei der Betrachtung der Affinitäten der Allosteren zum *Pilocarpin*-besetzten Rezeptor ( $pIC_{50}$ -Werte) dieser Arbeit fällt auf, dass die Substitution des lateralen Phthalimid-Ringes gegen einen Naphthalimid-Ring und die Bis-Methylierung der Kohlenstoffkette eine Erhöhung der Affinität zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor um mehr als das 100fache (bei dem „Dimeren“ Naphmethonium im Vergleich zu W84) bzw. um den Faktor 10 (bei dem „Monomeren“ MM7a im Vergleich zu SH28) bewirkt. Der Einfluss dieser Strukturmodifikationen auf die Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor lässt sich also auf die Affinität zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor übertragen.

Entsprechend der durch die Bis-Methylierung und den Phthalimid-Ring sowie die dimere Struktur bedingte erhöhte Affinität verhält sich der allosterische Modulator Naphmethonium positiv kooperativ zu Pilocarpin und zu NMS. Das „Monomere“ MM7a, das ebenfalls einen lateralen Phthalimid-Ring und eine Bis-Methylierung innerhalb der Kohlenstoffkette besitzt, ist mit Pilocarpin und mit NMS neutral kooperativ. W84 und SH28 (jeweils mit Naphthalimid-Ring und ohne Methyl-Substituenten) sind mit Pilocarpin und NMS negativ kooperativ, wobei das „dimere“ W84 gegenüber seinem „monomeren“

Gegenstück SH28 eine höhere Affinität (bzw. geringer ausgeprägte negative Kooperativität) zum Pilocarpin- und NMS-besetzten Rezeptor aufweist. Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen haben gegenüber NMS und Pilocarpin Kooperativitätsfaktoren mit gleichem Vorzeichen. Sie entfalten ähnliche Wechselwirkungen mit dem Pilocarpin- und dem NMS-besetzten Rezeptor, die Affinität zum NMS-besetzten ist jedoch höher als zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor.

Caracurin V ist mit NMS neutral und mit Pilocarpin negativ kooperativ, Alcuronium ist mit NMS positiv und mit Pilocarpin neutral kooperativ. Auch bei diesen Allosteren mit Strukturelementen der Caracurine ist die Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor höher als zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor. Alle Caracurin-Derivate (Caracurin V, Caracurin VII und Di-WGA 6) verhalten sich mit Pilocarpin negativ kooperativ am  $M_2$ -Rezeptor; neutral kooperativ mit Pilocarpin verhält sich Alcuronium.

#### **4.6.2.1.3 Korrelation zwischen den Kooperativitäten der Allosteren mit Pilocarpin und mit NMS**

Auch die Affinität des Antagonisten *N*-Methylscopolamin (NMS) wird durch verschiedene allosterische Modulatoren unterschiedlich beeinflusst: ebenso wie bei dem Partialagonisten Pilocarpin gibt es Förderer ( $\rho\alpha > 0$ ) und Verminderer ( $\rho\alpha < 0$ ) der NMS-Bindung sowie Substanzen, die die NMS-Bindung nicht verändern ( $\rho\alpha = 0$ ). Tabelle 43 zeigt die in dieser Arbeit ermittelten Kooperativitätsfaktoren der Allosteren mit Pilocarpin sowie die den angegebenen Literaturstellen entnommenen Kooperativitätsfaktoren mit NMS.

Die Kooperativität entspricht jeweils der Differenz aus der Affinität zum freien ( $pK_A$ ) und zum Orthoster-besetzten Rezeptor ( $p(\alpha \cdot K_A)$ ). Da die Affinität des Allosters zum freien Rezeptor konstant ist, ist der Unterschied in den Kooperativitäten des Allosters zu Pilocarpin und zu NMS letztlich bedingt durch den Unterschied der Affinitäten zum NMS- bzw. zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor.

Hängen die Kooperativitäten der allosterischen Modulatoren mit dem Antagonisten NMS und dem Partialagonisten Pilocarpin im Sinne einer Korrelation zusammen, so ist eine ähnliche Konformation der allosterischen Bindungsstelle am Antagonist-besetzten (inaktiven)  $M_2$ -Rezeptor und am Partialagonist-besetzten  $M_2$ -Rezeptor denkbar. Deshalb wurde untersucht, ob die Veränderung der Affinität von Pilocarpin mit der Veränderung der Affinität von NMS durch allosterische Modulatoren korreliert. Dazu wurden alle Faktoren der Kooperativität zwischen den allosterischen Modulatoren und Pilocarpin bzw. NMS aus Tabelle 43 in einem Diagramm aufgetragen und eine Regressionsgerade angelegt (Abb. 62).

Die Kooperativitäten zu NMS wurden in unterschiedlichen Puffern untersucht. Der Vergleich der Daten ist dennoch zulässig, da nach Schröter (1999) zwar die Absolut-Werte der Affinität der allosterischen Modulatoren zum freien und zum NMS-besetzten Rezeptor vom Puffermedium abhängen, kaum jedoch die Kooperativitätsfaktoren.

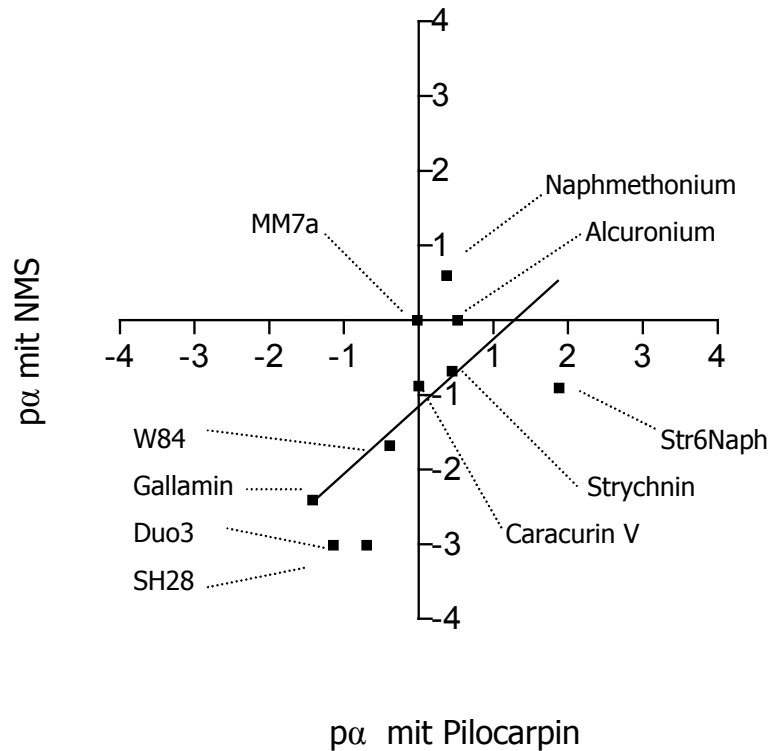
## Diskussion

Allosterischer Modulator	$p\alpha$ (Pilocarpin)	Literaturdaten			
		$p\alpha$ (NMS)	Quelle	Puffer	Gewebe
Alcuronium	0*	0,52	Jakubik et al. 1997	HEPES, GTP	CHO-M <sub>2</sub> -Membranen
		0,42	Jakubik et al. 1995	HEPES	CHO-M <sub>2</sub> -Membranen
		0,62	Proška und Tuček, 1994	Na, K, SO <sub>4</sub> , P <sub>i</sub> , HEPES	Rattenherzatria
		0,51	Proška und Tuček, 1995	Na, K, SO <sub>4</sub> , P <sub>i</sub> , HEPES	Rattenherzatria
Caracurin V	-1,00	0 <sup>†</sup>	Buller, 2002	Na, K, P <sub>i</sub>	Hausschweinherzventrikel
Strychnin	-0,68	0,36	Proška und Tuček, 1995	Na, K, SO <sub>4</sub> , P <sub>i</sub> , HEPES	Rattenherzatria
		0,53	Jakubik et al. 1997	HEPES, GTP	CHO-M <sub>2</sub> -Membranen
Naphmethonium	~0,6	0,37	Muth et al., 2003	Mg, P <sub>i</sub> , Tris	Hausschweinherzventrikel
MM7a	0*	-0,02	M. Sennwitz (persönl. Mitt.)	Mg, P <sub>i</sub> , Tris	Hausschweinherzventrikel
W84	-1,68	-0,38	Tränkle et al., 1998	Mg, P <sub>i</sub> , Tris	Meerschweinchenherz
		-0,24	Gilsbach et al., 2003	Na, K, P <sub>i</sub>	Hausschweinherzventrikel
		-0,48	Raasch et al., 2002	Mg, P <sub>i</sub> , Tris	Hausschweinherzventrikel
		-0,53	Daiss et al., 2002	Mg, P <sub>i</sub> , Tris	Hausschweinherzventrikel
		-0,26	Mohr et al., 2004	Mg, P <sub>i</sub> , Tris	Meerschweinchenherz
		-0,45	Mohr et al., 2004	Mg, P <sub>i</sub> , Tris	Hausschweinherzventrikel
SH28	-3,37	-0,97	Großmüller, 2003	Na, K, P <sub>i</sub>	Hausschweinherzventrikel
		-1,32	Ataie, 2000	Mg, P <sub>i</sub> , Tris	Meerschweinchenherz
Str6Naph	-0,91	1,88	Dancila, 2004	Mg, P <sub>i</sub> , Tris	Hausschweinherzventrikel
Duo3	-3,01	-0,70	Großmüller, 2003	Na, K, P <sub>i</sub>	Hausschweinherzventrikel
Gallamin	-2,41	-1,33	Proška und Tuček, 1995	Na, K, SO <sub>4</sub> , P <sub>i</sub> , HEPES	Rattenherzatria
		-1,32	Ehlert, 1988	HEPES	Rattenherzhomogenate
		-1,87	Leppik et al., 1994	Na, K, P <sub>i</sub>	Fibroblasten A9L Zellen

**Tabelle 43:** Kooperativitätsfaktoren  $p\alpha$  der an CHO-M<sub>2</sub>-Membransuspensionen untersuchten allosterischen Modulatoren mit Pilocarpin im Vergleich zu den Kooperativitätsfaktoren  $p\alpha$  mit NMS aus der Literatur.

\* Aufgrund der neutralen Kooperativität der Substanzen nimmt  $p\alpha$  den Wert 0 an: im [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsexperiment erfolgte keine Verschiebung der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven.

† Aufgrund der neutralen Kooperativität der Substanz nimmt  $p\alpha$  den Wert 0 an: in Radioligandbindungsexperimenten wurde die Gesamtbindung von [<sup>3</sup>H]NMS durch das Alloster nicht signifikant verändert.



**Abb. 62:** Korrelation zwischen den Kooperativitätsfaktoren ( $p\alpha$ ) der Interaktion der in Tabelle 41 aufgeführten allosterischen Modulatoren mit NMS und Pilocarpin.

*Ordinate:* Kooperativitätsfaktoren ( $p\alpha$ ) für die Interaktion mit NMS.

*Abszisse:* Kooperativitätsfaktoren ( $p\alpha$ ) für die Interaktion mit Pilocarpin.

*Datenpunkte:* Mittelwerte aus  $n = 1-6$  Werten.

*Kurvenanpassung:* lineare Regression.

Die Korrelation wird mit einem Spearman's  $r$  von 0,67 beschrieben und ist statistisch signifikant ( $p = 0,04$ ). Der Korrelationskoeffizient beschreibt, inwieweit die Variabilität der Y-Werte (Kooperativitätsfaktoren der Allosterie mit NMS) die Unterschiede der entsprechenden X-Werte (Kooperativitätsfaktoren der Allosterie mit Pilocarpin) erklären kann. Die Kooperativität einer Substanz mit NMS ist jedoch in der Regel weniger negativ als mit Pilocarpin. Steigende Affinitäten der Allosterie zum NMS-besetzten Rezeptor korrelieren also mit steigenden Affinitäten zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor, wobei die Affinität zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor weniger stark zunimmt als die zum NMS-besetzten. Diese Daten deuten auf eine ähnliche Konformation der allosterischen Bindungsstelle am Antagonist (NMS)- und am Partialagonist (Pilocarpin)- besetzten Rezeptorprotein hin.

#### 4.6.2.2 Allosterische Modulation der intrinsischen Aktivität („efficacy“)

##### 4.6.2.2.1 Pharmakologische Kenngrößen der allosterischen Modulation des Pilocarpin-Effektes am $M_2$ -Rezeptor

Bereits Zahn et al. (2002) beobachteten eine allosterische Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin, die auf der Bildung ternärer Komplexe zwischen Alcuronium, Pilocarpin und dem

M<sub>2</sub>-Rezeptor beruhte. Auch alle in dieser Arbeit untersuchten allosterischen Modulatoren verminderten die intrinsische Aktivität von Pilocarpin konzentrationsabhängig.

Im Folgenden wird anhand von Emin illustriert, wie stark sättigende Alloster-Konzentrationen den auf 100% festgesetzten Pilocarpin-Maximaleffekt abzusenken vermochten (Tabelle 44). Anhand eines t-Tests wurde geprüft, ob der erhaltene Emin-Wert signifikant von 0% abweicht. Gehören der Emin-Wert sowie der Wert 0% mit mindestens 95%iger Wahrscheinlichkeit ( $p < 0,05$ ) dem gleichen Wertekollektiv an, so wird angenommen, dass der betreffende allosterische Modulator die intrinsische Aktivität von Pilocarpin vollständig zu unterbinden vermag.

Substanz	Emin (%)	Signifikante Abweichung von 0% (t-Test)	Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert)
Alcuronium	10 ± 3 (n = 4)	ja	0,045
Caracurin V	23 ± 4 (n = 3)	ja	0,029
Caracurin VII	(n. b.)	(n. b.)	(n. b.)
Di-WGA 6	46 ± 7 (n = 3)	ja	0,022
Di-Strychnin 6	27 ± 5 (n = 4)	ja	0,012
Strychnin	2 ± 7 (n = 3)	nein	0,802
W84	-1 ± 4 (n = 5)	nein	0,815
SH28 (½ W84)	31 ± 6 (n = 3)	ja	0,036
MM3a (Naphmethonium)	7 ± 3 (n = 4)	nein	0,102
MM7a (½ Naphmethonium)	4 ± 3 (n = 2)	nein	0,410
Str6Naph	19 ± 2 (n = 2)	nein	0,07
Duo3	31 ± 2 (n = 4)	ja	0,001
Gallamin	(n. b.)	(n. b.)	(n. b.)

**Tabelle 44:** Maximale Absenkung (Emin) der intrinsischen Aktivität von 1 mM Pilocarpin (Mittelwerte ± Standardfehler) durch die allosterischen Modulatoren sowie die Wahrscheinlichkeit (p-Wert), mit der der Emin-Wert und der Wert 0% nicht dem gleichen Wertekollektiv entstammen.

n. b. Nicht bestimmbar: der Effekt des Allostere auf die intrinsische Aktivität von Pilocapin konnte nicht quantifiziert werden.

#### 4.6.2.2.2 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Zwischen der Molekülgröße des allosterischen Modulators und dem Ausmaß seiner Senkung des Pilocarpin-Maximaleffektes besteht kein Zusammenhang, da Vertreter der kleinen als auch der großen Allostere den Pilocarpin-Maximaleffekt nicht systematisch verschieden verminderten. Auffällig ist jedoch, dass Allostere, die ein Molekül Strychnin (oder das dem Strychnin nahe verwandte WGA) in Verbindung mit einer Hexamethylenkette besitzen (Di-Strychnin 6, Di-WGA 6, Str6Naph), die intrinsische Aktivität nicht vollständig verringerten (die intrinsische Aktivität in Anwesenheit von



sättigenden Alloster-Konzentrationen war für Di-Strychnin 6 und Di-WGA 6 signifikant höher als 0%; t-Test,  $p < 0,05$ ; Str6Naph senkte die intrinsische Aktivität auf 19%; dieser Wert entstammt mit einer Wahrscheinlichkeit von 93% nicht dem gleichen Wertekollektiv).

In Konkurrenzexperimenten wurde untersucht, welche allosterischen Modulatoren am NMS-besetzten Rezeptor Obidoxim aus seiner Bindungsstelle verdrängen. Für diese Allosterie wurde eine gemeinsame allosterische Bindungsstelle, die „common allosteric site“, postuliert (Ellis und Seidenberg, 1992; Proška und Tuček, 1995; Tränkle und Mohr, 1997; Lanzafame et al., 1996). Gallamin, W84, Alcuronium und Strychnin, nicht jedoch Duo3 binden an diese „common allosteric site“. Auffälligerweise reduzierten alle an die „common allosteric site“ bindenden Modulatoren (ausgenommen Gallamin, für das die Senkung der intrinsischen Aktivität nicht quantifizierbar war), den Pilocarpin-Maximaleffekt vollständig (bzw. Alcuronium auf 10%), Duo3 senkte den Pilocarpin-Effekt im Gegensatz dazu lediglich auf 31%. Möglicherweise nutzen Modulatoren, die die intrinsische Aktivität von Pilocarpin teilweise vermindern, andere Bindungsareale am  $M_2$ -Rezeptorprotein als diejenigen Allosterie, die die intrinsische Aktivität vollständig aufheben. Ob die Fähigkeit der vollständigen Senkung der intrinsischen Aktivität von der Nutzung bestimmter Epitope am Rezeptorprotein abhängt, ließe sich durch Untersuchungen an chimären Rezeptoren in Mutagenese-Experimenten klären.

### 4.6.2.2.3 Mechanistische Deutung

Die Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin erreichen auch in Anwesenheit sättigender Konzentrationen des allosterischen Modulators ein oberes Plateau. In dem Konzentrationsbereich, der das obere Plateau der Kurve beschreibt, bilden sich ternäre Komplexe aus Rezeptor, Pilocarpin und Alloster, in denen der Rezeptor eine weniger aktive Konformation einnimmt als in binären Komplexen aus Rezeptor und Pilocarpin. Sowohl das Modell der „conformational induction“ als auch der „conformational selection“ (Christopoulos und Kenakin, 2002) ist zur Deutung dieser Befunde anwendbar. Die partialagonistische Wirkung von Pilocarpin könnte darauf beruhen, dass es sowohl aktive wie auch inaktive Rezeptorzustände zu besetzen vermag. Ein Vollagonist würde hingegen nur aktive Rezeptorzustände besetzen. Denkbar wäre, dass die allosterischen Modulatoren bevorzugt inaktive Pilocarpin-Rezeptor-Komplexe „selektieren“ und deshalb konzentrationsabhängig die intrinsische Aktivität von Pilocarpin senken.

Die partialagonistische Wirkung von Pilocarpin könnte auch darauf beruhen, dass es eine solche Rezeptorkonformation stabilisiert, die eine submaximale G Protein-Aktivierung bewirkt. Im Sinne der „conformational induction“ könnte die Anlagerung eines allosterischen Modulators diese Konformation so verändern, dass eine G Protein-Aktivierung nicht mehr möglich ist.

Keiner der allosterischen Modulatoren besitzt selbst die Fähigkeit zur Rezeptorstimulation. Eine negative intrinsische Aktivität wie bei Atropin konnte in anderen Arbeiten für bestimmte allosterische

Modulatoren gezeigt werden (Hilf und Jakobs, 1992; Zahn et al., 2002; Eckstein, 2003). Im binären Komplex mit dem M<sub>2</sub>-Rezeptor selektieren oder induzieren diese Modulatoren also inaktive Konformationen.

#### **4.6.2.2.4 Schlussfolgerungen**

Die allosterische Verminderung der intrinsischen Aktivität des Partialagonisten Pilocarpin scheint ein allgemeines Phänomen zu sein, wobei die Art des allosterischen Modulators bestimmt, wie groß der Maximaleffekt ist. Die generelle Senkbarkeit der intrinsischen Aktivität jedoch scheint abhängig von der Art des Agonisten zu sein. So interferiert Alcuronium zwar mit der intrinsischen Aktivität des Partialagonisten Pilocarpin, nicht jedoch mit der des Vollagonisten Oxotremorin M. Dieser Agonist verhält sich zu dem Alloster Alcuronium (Zahn et al., 2002) sowie zu W84 (Maaß et al., 1995) formal kompetitiv. Ob die allosterische Modulation der intrinsischen Aktivität ein Phänomen partiell agonistischer Substanzen ist, könnte in Versuchen mit weiteren Partialagonisten geklärt werden.

### 4.6.3 Allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung am M<sub>4</sub>-Rezeptor

Die allosterischen Modulatoren Alcuronium, W84, Naphmethonium und Gallamin wurden in Hinblick auf ihre Veränderung der Pilocarpin-Wirksamkeit und des Pilocarpin-Maximaleffektes an CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen untersucht. In Tabelle 45 erfolgt die Darstellung der pharmakologischen Kenndaten im Vergleich zu den an CHO-M<sub>2</sub>-Zellmembranen erhobenen.

Substanz	Emin (%)		p $\alpha$		pK <sub>A</sub>		p( $\alpha \cdot K_A$ )		pIC <sub>50</sub>	
	M <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>4</sub>
Alcuronium	10 ± 3 (n=4)	3 ± 4 (n=3)	0**	0**	5,95 ± 0,09 (n=4)*	4,36 ± 0,07 (n=3)*	5,95*	4,36*	5,95 ± 0,09 (n=4)	4,36 ± 0,07 (n=3)
W84	-1 ± 4 (n=5)	7 ± 5 (n=2)	-1,68 ± 0,21 (n=11)	-1,38 ± 0,15 (n=16)	6,46 ± 0,10 (n = 11)	5,65 ± 0,15 (n = 16)	4,78	4,27	5,02 ± 0,07 (n=5)	4,61 ± 0,10 (n=2)
Naphmethonium (MM3a)	7 ± 3 (n=4)	3 ± 5 (n=2)	~0,6	~0,9	7,07*	5,58*	7,67*	6,48*	7,67 ± 0,09 (n=4)	6,48 ± 0,10 (n=2)
Gallamin	n.b.	n.b.	-2,53 ± 0,16 (n=22)	-1,95 ± 0,13 (n=15)	6,31 ± 0,13 (n = 22)	5,05 ± 0,08 (n = 15)	3,78	3,10	~2,35 - 3,00	~2,46 - 2,97

**Tabelle 45:** Pharmakologische Kennwerte des Effektes der allosterischen Modulatoren auf die Affinität und intrinsische Aktivität von Pilocarpin in Experimenten mit CHO-M<sub>2</sub>- und CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen (Mittelwerte ± Standardfehler).

- p $\alpha$       Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$  ( $p\alpha < 0$ : Alloster vermindert die Affinität von Pilocarpin zum Rezeptor;  $p\alpha > 0$ : Alloster erhöht die Affinität von Pilocarpin zum Rezeptor).
- pK<sub>A</sub>      Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K<sub>A</sub> (Maß für die Affinität des Allosters zum unbesetzten Rezeptor).
- p( $\alpha \cdot K_A$ )      Aus der Wirksamkeitsverschiebung von Pilocarpin abgeleitete Affinität des Allosters zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor.
- pIC<sub>50</sub>      Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Allosters, die eine halbmaximale Reduktion des Pilocarpin-Maximaleffektes verursacht; aus der Senkung der intrinsischen Aktivität abgeleitetes Maß für die Affinität des Allosters zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor.
- \*          Die Werte wurden anhand der Bedingung pIC<sub>50</sub> = p( $\alpha \cdot K_A$ ) = p $\alpha$  + pK<sub>A</sub> ermittelt (siehe Text).
- \*\*         Da die allosterischen Modulatoren den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve in dem betrachteten Konzentrationsbereich nicht veränderten, wurde neutrale Kooperativität (p $\alpha$  = 0) abgeleitet.
- n.b.       Nicht bestimmbar: Gallamin vermindert die intrinsische Aktivität von Pilocarpin, der Effekt konnte jedoch nicht quantifiziert werden.

#### 4.6.3.1 Interaktion mit der Wirksamkeit („potency“) von Pilocarpin

Die Veränderung der Wirksamkeit von Pilocarpin erfolgte an CHO-M<sub>2</sub>-Zellmembranen und an CHO-M<sub>4</sub>-Zellmembranen durch alle betrachteten allosterischen Modulatoren in gleicher Art: Naphmethonium steigerte die aus den funktionellen Daten abgeleitete Bindungsaffinität zum M<sub>2</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptor (p $\alpha$  > 0), W84 und Gallamin senkten sie (p $\alpha$  < 0) und Alcuronium veränderte sie nicht (p $\alpha$  = 0). W84 und Gallamin verminderten die Affinität von Pilocarpin zum M<sub>2</sub>-Rezeptor stärker als die zum M<sub>4</sub>-Rezeptor; dieser Unterschied war jedoch in beiden Fällen nicht statistisch signifikant.

Die Affinität der Allosterie zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor ( $pIC_{50}$ ) bzw. zum unbesetzten Rezeptor ( $pK_A$ ) war für den  $M_2$ -Subtyp jeweils statistisch signifikant höher als für den  $M_4$ -Subtyp (t-Test,  $p < 0,05$ ). Eine Subtyp-Prävalenz der allosterischen Modulatoren kann angenommen werden, da die allosterische Bindungsstelle der muskarinischen Rezeptoren weniger konserviert ist als die orthosterische Bindungsstelle. Tuček und Proška (1995) und Jakubík et al. (1997) zufolge nimmt die Bindungsaffinität von Alcuronium zum unbesetzten Rezeptor in der Reihenfolge  $M_2 > M_4 = M_3 > M_1$  ab. Die Affinität von Gallamin zum NMS-besetzten Rezeptor verringert sich in der Reihenfolge  $M_2 > M_4 > M_1 > M_3 > M_5$  (Ellis et al., 1991). Eine Subtyp-Prävalenz zugunsten des  $M_2$ -Rezeptors von W84 fanden Tränkle et al. (1998).

Die Affinität zum Pilocarpin-besetzten  $M_2$ -Rezeptor war zwar bei allen Substanzen höher als zum  $M_4$ -Rezeptor, aber der Affinitätsabstand zum jeweils freien Rezeptor war bei den  $M_4$ -Rezeptoren weniger groß als bei den  $M_2$ -Rezeptoren, woraus eine geringere negative und stärker ausgeprägte positive Kooperativität am  $M_4$ -Rezeptor resultiert. Die Subtyp-Selektivität ist somit in Hinblick auf den Pilocarpin-besetzten Rezeptor geringer ausgeprägt als am freien Rezeptor. Möglicherweise stellt sich die Entwicklung von bindungsfördernden allosterischen Modulatoren am  $M_4$ -Rezeptor einfacher dar als am  $M_2$ -Rezeptor.

### 4.6.3.2 Interaktion mit der intrinsischen Aktivität

Alle allosterischen Modulatoren senkten den  $M_2$ -Rezeptor- und den  $M_4$ -Rezeptor-vermittelten Pilocarpin-Maximaleffekt. Das Ausmaß (Emin) unterschied sich zwischen den Subtypen nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ).

Ebenso wie am  $M_2$ -Rezeptor scheint auch am  $M_4$ -Rezeptor die allosterische Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin ein allgemeines Phänomen zu sein. Alle betrachteten, in ihrer Struktur unterschiedlichen allosterischen Modulatoren heben die intrinsische Aktivität von Pilocarpin an beiden Rezeptorsubtypen vollständig auf. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Diversität der Allosterie liegt die Vermutung nahe, dass es sich analog zu den Befunden am  $M_2$ -Rezeptor auch am  $M_4$ -Rezeptor bei der Verminderung der intrinsischen Aktivität mehr um eine Eigenschaft des Agonisten als des Allostere handelt. Vergleichende Untersuchungen mit anderen Agonisten, wie z. B. dem endogenen Agonisten Acetylcholin oder weiteren Partialagonisten, können diese Frage klären.

Die Befunde sprechen dafür, dass die Allosterie am Pilocarpin-besetzten  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptor eine ähnliche Orientierung einnehmen. Auch Buller et al. (2002) fanden, dass der  $M_2$ - und der  $M_4$ -Subtyp für die Interaktion mit allosterischen Modulatoren vom Alkan-bis-Ammonium-Typ und der Caracurin-Derivate an der transmembranären Domäne TM7 an einer homologen Position eine essentielle Aminosäure besitzen.

## Kapitel 5

# Zusammenfassung

In einer vorangegangenen Arbeit war gezeigt worden, dass der allosterische Modulator Alcuronium an muscarinischen  $M_2$ -Rezeptoren die intrinsische Aktivität des Partialagonisten Pilocarpin zu senken vermag. In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine allosterische Modulation der intrinsischen Aktivität auch durch andere allosterische Modulatoren und an anderen Subtypen der Muskarinrezeptoren möglich ist.

Die Messung der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung erfolgte anhand der quantitativen Bestimmung der [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung und erlaubte Rückschlüsse auf die Veränderung der Pilocarpin-Wirksamkeit („potency“) und seiner intrinsischen Aktivität durch allosterische Modulatoren. Es wurden strukturell unterschiedliche, zu den Substanzklassen der Caracurine, Strychnin-Derivate und Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen gehörende allosterische Modulatoren, die „Prototyp-Modulatoren“ Alcuronium und Gallamin sowie der „atypisch“ wirksame Modulator Duo3 eingesetzt. Die Experimente wurden an Membranen aus CHO-Zellen durchgeführt, die muskarinische Rezeptoren vom  $M_2$ - bzw.  $M_4$ -Subtyp stabil überexprimierten.

Die allosterischen Modulatoren senkten die intrinsische Aktivität von Pilocarpin an  $M_2$ -Rezeptoren konzentrationsabhängig und in unterschiedlichem Ausmaß. Der allosterische Einfluss auf die Wirksamkeit variierte: es fanden sich Förderer der Pilocarpin-Bindung (Naphmethonium), Substanzen, die die Pilocarpin-Bindung unbeeinflusst ließen (Alcuronium, Di-Strychnin 6, MM7a) sowie allosterische Verminderer der Pilocarpin-Bindung (alle weiteren Substanzen). Analoge Ergebnisse wurden mit den Substanzen Alcuronium, W84, Naphmethonium und Gallamin am  $M_4$ -Rezeptor erhoben.

Es konnte gezeigt werden, dass die allosterische Verminderung der intrinsischen Aktivität in einem Konzentrationsbereich erfolgt, in dem sich ternäre Komplexe zwischen Rezeptor, Pilocarpin und Alloster bilden. Offenbar ist die Rezeptorkonformation im ternären Komplex eine weniger aktive als in dem binären Komplex aus Rezeptor und Pilocarpin.

Die Kooperativitätsfaktoren der Allostere mit Pilocarpin einerseits und mit dem muskarinischen Antagonisten *N*-Methylscopolamin (NMS) andererseits, die die Affinitätsverschiebung dieser Liganden durch die Bindung der allosterischen Modulatoren an Pilocarpin- bzw. an NMS-besetzten  $M_2$ -Rezeptoren angeben, korrelieren miteinander. Substanzen mit einer hohen Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor haben also auch eine relativ hohe Affinität zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor.

## Zusammenfassung

Offenbar nimmt die Bindungsstelle der allosterischen Modulatoren am Pilocarpin- und am NMS-besetzten  $M_2$ -Rezeptorprotein eine ähnliche räumliche Orientierung ein.

Der Einfluss der allosterischen Modulatoren auf die Wirksamkeit wie auch auf die intrinsische Aktivität von Pilocarpin ist am  $M_2$ - und am  $M_4$ -Rezeptor gleicher Art, mit einer höheren Bindungsaffinität der allosterischen Modulatoren für den  $M_2$ -Subtyp. Die Modulierbarkeit der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin ist also nicht auf den  $M_2$ -Subtyp begrenzt. Die ähnlichen Ergebnisse an  $M_2$ - und  $M_4$ -Rezeptorproteinen lassen darauf schließen, dass die allosterischen Modulatoren mit dem  $M_2$ - und am  $M_4$ -Rezeptor in analoger Art interagieren.

## Kapitel 6

### Literaturverzeichnis

Akam EC, Challiss RA, and Nahorski SR (2001)  
G<sub>q/11</sub> and G<sub>i/o</sub> Activation Profiles in CHO Cells Expressing Human Muscarinic Acetylcholine Receptors: Dependence on Agonist As Well As Receptor-Subtype.  
*Br J Pharmacol* **132**: pp 950-958.

Arunlakshana O and Schild HO (1959)  
Some Quantitative Uses of Drug Antagonists.  
*Br J Pharmacol* **14**: pp 48-58.

Asmis H, Schmid H, and Karrer P (1954)  
Über Alkaloide aus einer Strychnos-toxifera-Rinde aus Venezuela.  
*Helv Chim Acta* **37**: pp 1983-1992

Ataie A (2000)  
Sondierung der Überlappung des Haftareals des M<sub>2</sub>-prävalenten Antagonisten AF-DX 384 mit der allosterischen Bindungsstelle von M<sub>2</sub>-Acetylcholinrezeptoren unter Verwendung einseitig verkürzter Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen.  
*Dissertationsschrift*: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Azzi M, Pineyro G, Pontier S, Parent S, Ansanay H, and Bouvier M (2001)  
Allosteric Effects of G Protein Overexpression on the Binding of Beta-Adrenergic Ligands With Distinct Inverse Efficacies.  
*Mol Pharmacol* **60**: pp 999-1007.

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

Bender W, Staudt M, Tränkle C, Mohr K, and Holzgrabe U (2000)  
Probing the Size of a Hydrophobic Binding Pocket Within the Allosteric Site of Muscarinic Acetylcholine M<sub>2</sub>-Receptors.  
*Life Sci* **66**: pp 1675-1682.

Bernauer K, Berlage F, von Philipsborn W, Schmid H, and Karrer P (1959)  
Über die Konstitution der Kalebassen-Alkaloide C-Dihydrotoxiferin und C-Toxiferin-I und des Caracurin-V aus *Strychnos toxifera*. Synthetische Versuche mit Wieland-Gumlich-Aldehyd als Ausgangsstoff.  
*Helv Chim Acta* **41**: pp 2293-2308

Bidlack JM and Parkhill AL (2004)  
Assay of G Protein-Coupled Receptor Activation of G Proteins in Native Cell Membranes Using [<sup>35</sup>S]GTPγS Binding.  
*Methods Mol Biol* **237**: pp 135-143.

- Birdsall NJ, Hulme EC, and Stockton JM (1983)  
Muscarinic Receptor Subclasses: Allosteric Interactions.  
*Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **48 Pt 1**: pp 53-56.
- Birdsall NJ, Farries T, Gharagozloo P, Kobayashi S, Kuonen D, Lazareno S, Popham A, and Sugimoto M (1997)  
Selective Allosteric Enhancement of the Binding and Actions of Acetylcholine at Muscarinic Receptor Subtypes.  
*Life Sci* **60**: pp 1047-1052.
- Birdsall NJ, Farries T, Gharagozloo P, Kobayashi S, Lazareno S, and Sugimoto M (1999)  
Subtype-Selective Positive Cooperative Interactions Between Brucine Analogs and Acetylcholine at Muscarinic Receptors: Functional Studies.  
*Mol Pharmacol* **55**: pp 778-786.
- Birnbaumer L, Abramowitz J, and Brown AM (1990)  
Receptor-Effector Coupling by G Proteins.  
*Biochem Biophys Acta* **1031**: pp 163-224.
- Bokoch GM, Katada T, Northup JK, Hewlett EL, and Gilman AG (1983)  
Identification of the Predominant Substrate for ADP-Ribosylation by Islet Activating Protein.  
*J Biol Chem* **258**: pp 2072-2075.
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, and Brann MR (1987)  
Identification of a Family of Muscarinic Acetylcholine Receptor Genes.  
*Science* **237**: pp 527-532.
- Breivogel CS, Selley DE, and Childers SR (1998)  
Cannabinoid Receptor Agonist Efficacy for Stimulating [<sup>35</sup>S]GTPgammaS Binding to Rat Cerebellar Membranes Correlates With Agonist-Induced Decreases in GDP Affinity.  
*J Biol Chem* **273**: pp 16865-16873.
- Bruns RF and Fergus JH (1990)  
Allosteric Enhancement of Adenosine A<sub>1</sub> Receptor Binding and Function by 2-Amino-3-Benzoylthiophenes.  
*Mol Pharmacol* **38**: pp 939-949.
- Buckley NJ, Bonner TI, Buckley CM, and Brann MR (1989)  
Antagonist Binding Properties of Five Cloned Muscarinic Receptors Expressed in CHO-K1 Cells.  
*Mol Pharmacol* **35**: pp 469-476.
- Buller S (2002)  
Identifizierung von Rezeptorepitopen für die Subtyp-selektive Interaktion allosterischer Modulatoren mit muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren anhand von Mutagenese-Untersuchungen.  
*Dissertationsschrift*: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Buller S, Zlotos DP, Mohr K, and Ellis J (2002)  
Allosteric Site on Muscarinic Acetylcholine Receptors: a Single Amino Acid in Transmembrane Region 7 Is Critical to the Subtype Selectivities of Caracurine V Derivatives and Alkane-Bisammonium Ligands.  
*Mol Pharmacol* **61**: pp 160-168.
- Burstein ES, Spalding TA, and Brann MR (1997)  
Pharmacology of Muscarinic Receptor Subtypes Constitutively Activated by G Proteins.  
*Mol Pharmacol* **51**: pp 312-319.



- Cavalheiro EA (1995)  
The Pilocarpine Model of Epilepsy.  
*Ital J Neurol Sci* **16**: pp 33-37.
- Chidiac P and Wells JW (1992)  
Effects of Adenyl Nucleotides and Carbachol on Cooperative Interactions Among G Proteins.  
*Biochemistry* **31**: pp 10908-10921.
- Christopoulos A, Grant MK, Ayoubzadeh N, Kim ON, Sauerberg P, Jeppesen L, and El Fakahany EE (2001)  
Synthesis and Pharmacological Evaluation of Dimeric Muscarinic Acetylcholine Receptor Agonists.  
*J Pharmacol Exp Ther* **298**: pp 1260-1268.
- Christopoulos A and Kenakin T (2002)  
G Protein-Coupled Receptor Allosterism and Complexing.  
*Pharmacol Rev* **54**: pp 323-374.
- Clark AL and Mitchelson F (1976)  
The Inhibitory Effect of Gallamine on Muscarinic Receptors.  
*Br J Pharmacol* **58**: pp 323-331.
- Conklin BR and Bourne HR (1993)  
Structural Elements of G Alpha Subunits That Interact With G Beta Gamma, Receptors, and Effectors.  
*Cell* **73**: pp 631-641.
- Costa T, Lang J, Gless C, and Herz A (1990)  
Spontaneous Association Between Opioid Receptors and GTP-Binding Regulatory Proteins in Native Membranes: Specific Regulation by Antagonists and Sodium Ions.  
*Mol Pharmacol* **37**: pp 383-394.
- Daiss JO, Duda-Johner S, Burschka C, Holzgrabe U, Mohr K, and Tacke R (2002)  
N<sup>+</sup>/Si Replacement as a Tool for Probing the Pharmacophore of Allosteric Modulators of Muscarinic M<sub>2</sub> Receptors: Synthesis, Allosteric Potency, and Positive Cooperativity of Silicon-Based W84 Derivatives.  
*Organometallics* **21**: pp 803-811.
- Dancila I (2003)  
Untersuchung zur allosterischen Interaktion zwischen der Hybridspezies STR6NAPH und [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin an muskarinischen M<sub>2</sub>-Rezeptoren.  
*Dissertationsschrift*: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- DeBlasi A, O'Reilly K, and Motulsky HJ (1989)  
Calculating Receptor Number From Binding Experiments Using Same Compound As Radioligand and Competitor.  
*Trends Pharmacol Sci* **10**: pp 227-229.
- DeLucchi E (2000)  
Transtympanic Pilocarpine in Tinnitus.  
*Int Tinnitus J* **6**: pp 37-40.
- Dong GZ, Kameyama K, Rinken A, and Haga T (1995)  
Ligand Binding Properties of Muscarinic Acetylcholine Receptor Subtypes (M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub>) Expressed in Baculovirus-Infected Insect Cells.  
*J Pharmacol Exp Ther* **274**: pp 378-384.

- Dörje F, Wess J, Lambrecht G, Tacke R, Mutschler E, and Brann MR (1991)  
Antagonist Binding Profiles of Five Cloned Human Muscarinic Receptor Subtypes.  
*J Pharmacol Exp Ther* **256**: pp 727-733.
- Eckstein N (2003)  
Pharmakologische und biochemische Untersuchungen zur allosterischen Modulation Agonist-induzierter Wirkungen an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren.  
*Dissertationsschrift*: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Ehlert, FJ (1988)  
Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods.  
*Mol Pharmacol* **33**: pp 187-194.
- Ellis J, Huyler J, and Brann MR (1991)  
Allosteric Regulation of Cloned M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub> Muscarinic Receptor Subtypes.  
*Biochem Pharmacol* **42**: pp 1927-1932.
- Ellis J and Seidenberg M (1992)  
Two Allosteric Modulators Interact at a Common Site on Cardiac Muscarinic Receptors.  
*Mol Pharmacol* **42**: pp 638-641.
- Ellis J, Seidenberg M, and Brann MR (1993)  
Use of Chimeric Muscarinic Receptors to Investigate Epitopes Involved in Allosteric Interactions.  
*Mol Pharmacol* **44**: pp 583-588.
- Ellis J (1997)  
Allosteric Binding Sites on Muscarinic Receptors.  
*Drug Development Research* **40**: pp 193-204.
- Ellis J and Seidenberg M (2000)  
Interactions of Alcuronium, TMB-8, and Other Allosteric Ligands With Muscarinic Acetylcholine Receptors: Studies With Chimeric Receptors.  
*Mol Pharmacol* **58**: pp 1451-1460.
- Felder CC, Bymaster FP, Ward J, and DeLapp N (2000)  
Therapeutic Opportunities for Muscarinic Receptors in the Central Nervous System.  
*J Med Chem* **43**: pp 4333-4353.
- Forth W, Henschler D, Rummel W, and Starke K (1998)  
*Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*.  
Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Fox PC (2004)  
Salivary Enhancement Therapies.  
*Caries Res* **38**: pp 241-246.
- Ghanouni P, Gryczynski Z, Steenhuis JJ, Lee TW, Farrens DL, Lakowicz JR, and Kobilka BK (2001)  
Functionally Different Agonists Induce Distinct Conformations in the G Protein Coupling Domain of the Beta 2 Adrenergic Receptor.  
*J Biol Chem* **276**: pp 24433-24436.
- Gierschik P, Moghtader R, Straub C, Dieterich K, and Jakobs KH (1991)  
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**: pp 725-732.

## Literaturverzeichnis

Gilman AG (1987)

G Proteins: Transducers of Receptor-Generated Signals.

*Annu Rev Biochem* **56**: pp 615-649.

Gilsbach R (2003)

Cooperative Interactions at M<sub>2</sub> Muscarinic Acetylcholine Receptors: Structure/ Activity Relationships in Stepwise shortened Bispyridinium- and Bis(Ammonio)Alkane-Type Allosteric Modulators.

*Neurochemical Research* **28**[3/4]: pp 667-673.

Großmüller M (2003)

Interaktion allosterischer Modulatoren mit dem Agonisten [<sup>3</sup>H]Oxotremorin M und dem Antagonisten [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin an muskarinischen M<sub>2</sub>-Rezeptoren.

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

Hall DA (2000)

Modeling the Functional Effects of Allosteric Modulators at Pharmacological Receptors: an Extension of the Two-State Model of Receptor Activation.

*Mol Pharmacol* **58**: pp 1412-1423.

Harrison C and Traynor JR (2003)

The [<sup>35</sup>S]GTPgammaS Binding Assay: Approaches and Applications in Pharmacology.

*Life Sci* **74**: pp 489-508.

Hatley ME, Lockless SW, Gibson SK, Gilman AG, and Ranganathan R (2003)

Allosteric Determinants in Guanine Nucleotide-Binding Proteins.

*Proc Natl Acad Sci USA* **100**: pp 14445-14450.

Hepler JR and Gilman AG (1992)

G Proteins.

*Trends Biochem Sci* **17**: pp 383-387.

Higashijima T, Ferguson KM, Sternweis PC, Smigel MD, and Gilman AG (1987)

Effects of Mg<sup>2+</sup> and the Beta Gamma-Subunit Complex on the Interactions of Guanine Nucleotides With G Proteins.

*J Biol Chem* **262**: pp 762-766.

Higashijima T, Ferguson KM, Sternweis PC, Ross EM, Smigel MD, and Gilman AG (1987)

The Effect of Activating Ligands on the Intrinsic Fluorescence of Guanine Nucleotide-Binding Regulatory Proteins.

*J Biol Chem* **262**: pp 752-756.

Hilf G and Jakobs KH (1989)

Activation of Cardiac G-Proteins by Muscarinic Acetylcholine Receptors: Regulation by Mg<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> Ions.

*Eur J Pharmacol* **172**: pp 155-163.

Hilf G, Gierschik P, and Jakobs KH (1989)

Muscarinic Acetylcholine Receptor-Stimulated Binding of Guanosine 5'-O-(3-Thiotriphosphate) to Guanine-Nucleotide-Binding Proteins in Cardiac Membranes.

*Eur J Biochem* **186**: pp 725-731.

Hilf G and Jakobs KH (1992)

Agonist-Independent Inhibition of G Protein Activation by Muscarinic Acetylcholine Receptor Antagonists in Cardiac Membranes.

*Eur J Pharmacol* **225**: pp 245-252.

Hill AV (1910)

The Possible Effects of the Aggregation of the Molecules of Haemoglobin on its Dissociation Curves.  
*J Physiol (Proc)* **40**:iv-vii.

Holzgrabe U and Mohr K (1998)

Allosteric Modulators of Ligand Binding to Muscarinic Acetylcholine Receptors.  
*Drug Discovery Today* **3**: pp 214-222.

Holzgrabe U, Bender W, Cid HM, Staudt M, Pick R, Pfletschinger C, Balatková E, Tränkle C, and Mohr K (2000)

Ligands for the Common Allosteric Site of Acetylcholine M<sub>2</sub>-Receptors: Development and Application.  
*Pharm Acta Helv* **74**: pp 149-155.

Hulme EC, Birdsall NJ and Buckley NJ (1990)

Muscarinic Receptor Subtypes.  
*Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**: pp 633-673.

Jakubík J and Tuček S (1994)

Two Populations of Muscarinic Binding Sites in the Chick Heart Distinguished by Affinities for Ligands and Selective Inactivation.  
*Br J Pharmacol* **113**: pp 1529-1537.

Jakubík J, Bačáková L, El Fakahany EE, and Tuček S (1995)

Subtype Selectivity of the Positive Allosteric Action of Alcuronium at Cloned M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub> Muscarinic Acetylcholine Receptors.  
*J Pharmacol Exp Ther* **274**: pp 1077-1083.

Jakubík J, Bačáková L, El Fakahany EE, and Tuček S (1995)

Constitutive Activity of the M<sub>1</sub>-M<sub>4</sub> Subtypes of Muscarinic Receptors in Transfected CHO Cells and of Muscarinic Receptors in the Heart Cells Revealed by Negative Antagonists.  
*FEBS Lett* **377**: pp 275-279.

Jakubík J, Bačáková L, El Fakahany EE, and Tuček S (1997)

Positive Cooperativity of Acetylcholine and Other Agonists With Allosteric Ligands on Muscarinic Acetylcholine Receptors.  
*Mol Pharmacol* **52**: pp 172-179.

Jakubík J, Haga T, and Tuček S (1998)

Effects of an Agonist, Allosteric Modulator, and Antagonist on Guanosine-Gamma-[<sup>35</sup>S]Thiotriphosphate Binding to Liposomes With Varying Muscarinic Receptor/G<sub>o</sub> Protein Stoichiometry.  
*Mol Pharmacol* **54**: pp 899-906.

Kenakin T (1997)

Agonist-Specific Receptor Conformations.  
*Trends Pharmacol Sci* **18**: pp 416-417.

Kenakin T (2003)

Ligand-Selective Receptor Conformations Revisited: the Promise and the Problem.  
*Trends Pharmacol Sci* **24**: pp 346-354.

Kords H, Lüllmann H, Ohnesorge FK, and Wassermann O (1968)

Action of Atropine and Some Hexane-1.6-Bis-Ammonium Derivatives Upon the Toxicity of DFP in Mice.  
*Eur J Pharmacol* **3**: pp 341-346.

Kruh J (1982)

Effects of Sodium Butyrate, a New Pharmacological Agent, on Cells in Culture.  
*Mol Cell Biochem* **42**: pp 65-82.

Kurose H, Katada T, Haga T, Haga K, Ichiyama A, and Ui M (1986)

Functional Interaction of Purified Muscarinic Receptors With Purified Inhibitory Guanine Nucleotide Regulatory Proteins Reconstituted in Phospholipid Vesicles.  
*J Biol Chem* **261**: pp 6423-6428.

Lanzafame A, Christopoulos A, and Mitchelson F (1996)

Interactions of Agonists With an Allosteric Antagonist at Muscarinic Acetylcholine M<sub>2</sub> Receptors.  
*Eur J Pharmacol* **316**: pp 27-32.

Lazareno S and Birdsall NJ (1993)

Pharmacological Characterization of Acetylcholine-Stimulated [<sup>35</sup>S]GTPγS Binding Mediated by Human Muscarinic M<sub>1</sub>-M<sub>4</sub> Receptors: Antagonist Studies.  
*Br J Pharmacol* **109**: pp 1120-1127.

Lazareno S and Birdsall NJ (1995)

Detection, Quantitation, and Verification of Allosteric Interactions of Agents With Labeled and Unlabeled Ligands at G Protein-Coupled Receptors: Interactions of Strychnine and Acetylcholine at Muscarinic Receptors.  
*Mol Pharmacol* **48**: pp 362-378.

Lazareno S, Gharagozloo P, Kuonen D, Popham A, and Birdsall NJ (1998)

Subtype-Selective Positive Cooperative Interactions Between Brucine Analogues and Acetylcholine at Muscarinic Receptors: Radioligand Binding Studies.  
*Mol Pharmacol* **53**: pp 573-589.

Lazareno S, Dolezal V, Popham A, and Birdsall NJ (2004)

Thiochrome Enhances Acetylcholine Affinity at Muscarinic M<sub>4</sub> Receptors: Receptor Subtype Selectivity Via Cooperativity Rather Than Affinity.  
*Mol Pharmacol* **65**: pp 257-266.

Leff P (1995)

The Two-State Model of Receptor Activation.  
*Trends Pharmacol Sci* **16**: pp 89-97.

Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, and Costa T (1993)

Constitutive Activity of Receptors Coupled to Guanine Nucleotide Regulatory Proteins.  
*Trends Pharmacol Sci* **14**: pp 303-307.

Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, and Brann MR (1991)

Identification and Localization of Muscarinic Acetylcholine Receptor Proteins in Brain With Subtype-Specific Antibodies.  
*J Neurosci* **11**: pp 3218-3226.

Lew MJ and Angus JA (1995)

Analysis of Competitive Agonist-Antagonist Interactions by Nonlinear Regression.  
*Trends Pharmacol Sci* **16**: pp 328-337.

Liu J, Conklin BR, Blin N, Yun J, and Wess J (1995)

Identification of a Receptor/G-Protein Contact Site Critical for Signaling Specificity and G-Protein Activation.  
*Proc Natl Acad Sci USA* **92**: pp 11642-11646.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951)  
Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent.  
*J Biol Chem* **193**: pp 265-275.
- Lu ZL, Saldanha JW, and Hulme EC (2002)  
Seven-Transmembrane Receptors: Crystals Clarify.  
*Trends Pharmacol Sci* **23**: pp 140-146.
- Lüllmann H, Ohnesorge FK, Schauwecker GC, and Wassermann O (1969)  
Inhibition of the Actions of Carbachol and DFP on Guinea Pig Isolated Atria by Alkane-Bis-Ammonium Compounds.  
*Eur J Pharmacol* **6**: pp 241-247.
- Maass A, Kostenis E, and Mohr K (1995)  
Potentiation by Alcuronium of the Antimuscarinic Effect of *N*-Methylscopolamine in Guinea Pig Left Atria.  
*Eur J Pharmacol* **272**: pp 103-106.
- Maelicke A, Schratzenholz A, Samochocki M, Radina M, and Albuquerque EX (2000)  
Allosterically Potentiating Ligands of Nicotinic Receptors As a Treatment Strategy for Alzheimer's Disease.  
*Behav Brain Res* **113**: pp 199-206.
- Manning DR (2002)  
Measures of Efficacy Using G Proteins As Endpoints: Differential Engagement of G Proteins Through Single Receptors.  
*Mol Pharmacol* **62**: pp 451-452.
- McKinney M, Miller JH, Gibson VA, Nickelson L, and Aksoy S (1991)  
Interactions of Agonists With M<sub>2</sub> and M<sub>4</sub> Muscarinic Receptor Subtypes Mediating Cyclic AMP Inhibition.  
*Mol Pharmacol* **40**: pp 1014-1022.
- Milligan G (2003)  
Principles: Extending the Utility of [<sup>35</sup>S]GTPgammaS Binding Assays.  
*Trends Pharmacol Sci* **24**: pp 87-90.
- Mohr K, Tränkle C, and Holzgrabe U (2003)  
Structure/Activity Relationships of M<sub>2</sub> Muscarinic Allosteric Modulators.  
*Receptors Channels* **9**: pp 229-240.
- Mohr M, Heller E, Ataie A, Mohr K, and Holzgrabe U (2004)  
Development of a New Type of Allosteric Modulator of Muscarinic Receptors: Hybrids of the Antagonist AF-DX 384 and the Hexamethonio Derivative W84  
*J Med Chem* **47**: 3324-3327
- Monod J, Wyman J, and Changeux JP (1965)  
On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model.  
*J Mol Biol* **12**: pp 88-118.
- Motulsky H (1996)  
*The GraphPad guide to analyzing radioligand binding data*. San Diego.
- Munshi R, Pang IH, Sternweis PC, and Linden J (1991)  
A<sub>1</sub> Adenosine Receptors of Bovine Brain Couple to Guanine Nucleotide-Binding Proteins G<sub>i1</sub>, G<sub>i2</sub>, and G<sub>o</sub>.  
*J Biol Chem* **266**: pp 22285-22289.

Muth M, Bender W, Scharfenstein O, Holzgrabe U, Balatková E, Tränkle C, and Mohr K (2003)  
Systematic Development of High Affinity Bis(Ammonio)Alkane-Type Allosteric Enhancers of Muscarinic Ligand Binding.  
*J Med Chem* **46**: pp 1031-1040.

Mutschler E, Moser U, Wess J, and Lambrecht G (1995)  
Muscarinic Receptor Subtypes- Pharmacological, Molecular, Biological and Therapeutical Aspects.  
*Pharm Acta Helv* **69**: pp 243-258.

Negishi M, Namba T, Sugimoto Y, Irie A, Katada T, Narumiya S, and Ichikawa A (1993)  
Opposite Coupling of Prostaglandin E Receptor EP3C With G<sub>s</sub> and G<sub>o</sub>. Stimulation of G<sub>s</sub> and Inhibition of G<sub>o</sub>.  
*J Biol Chem* **268**: pp 26067-26070.

Offermanns S (2003)  
G-Proteins As Transducers in Transmembrane Signalling.  
*Prog Biophys Mol Biol* **83**: pp 101-130.

Onaran HO, Costa T, and Rodbard D (1993)  
Beta Gamma Subunits of Guanine Nucleotide-Binding Proteins and Regulation of Spontaneous Receptor Activity: Thermodynamic Model for the Interaction Between Receptors and Guanine Nucleotide-Binding Protein Subunits.  
*Mol Pharmacol* **43**: pp 245-256.

Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le TI, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, and Miyano M (2000)  
Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor.  
*Science* **289**: pp 739-745.

Perez M, Jorand-Lebrun C, Pauwels PJ, Pallard I, and Halazy S (1998)  
Dimers of 5HT<sub>1</sub> Ligands Preferentially Bind to 5HT<sub>1B/1D</sub> Receptor Subtypes.  
*Bioorg Med Chem Lett* **8**: pp 1407-1412.

Portoghese PS (1989)  
Bivalent Ligands and the Message-Address Concept in the Design of Selective Opioid Receptor Antagonists.  
*Trends Pharmacol Sci* **10**: pp 230-235.

Proška J and Tuček S (1994)  
Mechanisms of Steric and Cooperative Actions of Alcuronium on Cardiac Muscarinic Acetylcholine Receptors.  
*Mol Pharmacol* **45**: pp 709-717.

Proška J and Tuček S (1995)  
Competition Between Positive and Negative Allosteric Effectors on Muscarinic Receptors.  
*Mol Pharmacol* **48**: pp 696-702.

Proška J and Tuček S (1996)  
Positive Allosteric Action of Eburnamonine on Cardiac Muscarinic Acetylcholine Receptors.  
*Eur J Pharmacol* **305**: pp 201-205.

Raasch A, Scharfenstein O, Tränkle C, Holzgrabe U, and Mohr K (2002)  
Elevation of Ligand Binding to Muscarinic M<sub>2</sub> Acetylcholine Receptors by Bis(Ammonio)Alkane-Type Allosteric Modulators.  
*J Med Chem* **45**: pp 3809-3812.

Rote Liste (2004)

*Arzneimittelverzeichnis für Deutschland*. Rote Liste® Service GmbH, Frankfurt/Main.

Schröter A (1999)

Interaktionsmodus allosterischer Modulatoren an freien und [<sup>3</sup>H]-N-Methylscopolamin-besetzten Acetylcholin M<sub>2</sub>-Rezeptoren, abgeleitet aus pufferinduzierten Wirksamkeitsveränderungen.

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

Schröter A, Tränkle C, and Mohr K (2000)

Modes of Allosteric Interactions With Free and [<sup>3</sup>H]-N-Methylscopolamine-Occupied Muscarinic M<sub>2</sub> Receptors As Deduced From Buffer-Dependent Potency Shifts.

*Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**: pp 512-519.

Senogles SE, Spiegel AM, Padrell E, Iyengar R, and Caron MG (1990)

Specificity of Receptor-G Protein Interactions. Discrimination of G<sub>i</sub> Subtypes by the D<sub>2</sub> Dopamine Receptor in a Reconstituted System.

*J Biol Chem* **265**: pp 4507-4514.

Spalding TA, Burstein ES, Henderson SC, Ducote KR, and Brann MR (1998)

Identification of a Ligand-Dependent Switch Within a Muscarinic Receptor.

*J Biol Chem* **273**: pp 21563-21568.

Stockton JM, Birdsall NJ, Burgen AS, and Hulme EC (1983)

Modification of the Binding Properties of Muscarinic Receptors by Gallamine.

*Mol Pharmacol* **23**: pp 551-557.

Tian WN and Deth RC (1993)

Precoupling of G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>-Linked Receptors and Its Allosteric Regulation by Monovalent Cations.

*Life Sci* **52**: pp 1899-1907.

Tränkle C and Mohr K (1997)

Divergent Modes of Action Among Cationic Allosteric Modulators of Muscarinic M<sub>2</sub> Receptors.

*Mol Pharmacol* **51**: pp 674-682.

Tränkle C, Andresen I, Lambrecht G, and Mohr K (1998)

M<sub>2</sub> Receptor Binding of the Selective Antagonist AF-DX 384: Possible Involvement of the Common Allosteric Site.

*Mol Pharmacol* **53**: pp 304-312.

Tuček S and Proška J (1995)

Allosteric Modulation of Muscarinic Acetylcholine Receptors.

*Trends Pharmacol Sci* **16**: pp 205-212.

Voigtländer U, Jöhren K, Mohr M, Raasch A, Tränkle C, Buller S, Ellis J, Höltje HD, and Mohr K (2003)

Allosteric Site on Muscarinic Acetylcholine Receptors: Identification of Two Amino Acids in the Muscarinic M<sub>2</sub> Receptor That Account Entirely for the M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub> Subtype Selectivities of Some Structurally Diverse Allosteric Ligands in N-Methylscopolamine-Occupied Receptors.

*Mol Pharmacol* **64**: pp 21-31.

Voigtländer U, and Mohr K (2004)

Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren als Zielstruktur für Arzneimittel.

*Medizinische Monatszeitschrift für Pharmazeuten* **27**: pp 184-190.



- Waelbroeck M (2001)  
Activation of Guanosine 5'-[Gamma-<sup>35</sup>S]]Thio-Triphosphate Binding Through M<sub>1</sub> Muscarinic Receptors in Transfected Chinese Hamster Ovary Cell Membranes: 2. Testing the "Two-States" Model of Receptor Activation.  
*Mol Pharmacol* **59**: pp 886-893.
- Watson C, Chen G, Irving P, Way J, Chen WJ, and Kenakin T (2000)  
The Use of Stimulus-Biased Assay Systems to Detect Agonist-Specific Receptor Active States: Implications for the Trafficking of Receptor Stimulus by Agonists.  
*Mol Pharmacol* **58**: pp 1230-1238.
- Wess J, Gdula D, and Brann MR (1991)  
Chimeric m2/m5 muscarinic receptors: identification of receptor domains conferring antagonist binding selectivity.  
*Mol Pharmacol* **41**: pp 369-374
- Wess J (1993)  
Molecular Basis of Muscarinic Acetylcholine Receptor Function.  
*Trends Pharmacol Sci* **14**: pp 308-313.
- Wess J (1996)  
Molecular Biology of Muscarinic Acetylcholine Receptors.  
*Crit Rev Neurobiol* **10**: pp 69-99.
- Yang Q and Lanier SM (1999)  
Influence of G Protein Type on Agonist Efficacy.  
*Mol Pharmacol* **56**: pp 651-656.
- Zahn K, Eckstein N, Tränkle C, Sadée W, and Mohr K (2002)  
Allosteric Modulation of Muscarinic Receptor Signaling: Alcuronium-Induced Conversion of Pilocarpine From an Agonist into an Antagonist.  
*J Pharmacol Exp Ther* **301**: pp 720-728.
- Zlotos DP, Buller S, Tränkle C, and Mohr K (2000)  
Bisquaternary Caracurine V Derivatives As Allosteric Modulators of Ligand Binding to M<sub>2</sub> Acetylcholine Receptors.  
*Bioorg Med Chem Lett* **10**: pp 2529-2532.
- Zlotos DP, Buller S, Holzgrabe U, and Mohr K (2003)  
Bisquaternary Dimers of Strychnine and Brucine. A New Class of Potent Enhancers of Antagonist Binding to Muscarinic M<sub>2</sub> Receptors.  
*Bioorg Med Chem* **11**: pp 2627-2634.

# Kapitel 7

## Anhang

### 7.1 Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden

Für die einzelnen CHO-M<sub>2</sub>- und CHO-M<sub>4</sub>-Membranpräparationen wurde in einem Vorversuch das Messfenster bestimmt, das nach 60minütiger Inkubation durch muskarinische Agonisten und Antagonisten aufgeschlossen wird. Es wurden die Effekte der rezeptorsättigenden Konzentrationen 1 mM Oxotremorin M (Agonist), 1 mM Pilocarpin (Partialagonist), 0,1 mM Alcuronium (Alloster) und 0,001 mM Atropin (Antagonist) auf die basale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung ([<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz) ermittelt. Im Folgenden sollen die Effekte der Liganden an den einzelnen Membransuspensionen gezeigt werden (Tabelle 46 für CHO-M<sub>2</sub>- und Tabelle 47 für CHO-M<sub>4</sub>-Zellhomogenate). Die basale [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung wurde in diesen Experimenten auf 100% festgesetzt und die anderen Werte entsprechend prozentualisiert. Die tabellierten Werte sind die prozentualisierten Mittelwerte mit Standardfehlern aus einem Einzelexperiment in sechs- bis siebenfacher Ausführung.

Datum der Membranpräparation	Oxotremorin M 1 mM	Pilocarpin 1 mM	Alcuronium 0,1 mM	Atropin 0,001 mM
22.09.03	303 ± 11	183 ± 4	85 ± 2	83 ± 2
06.10.03	307 ± 12	176 ± 5	87 ± 3	86 ± 5
11.11.03	228 ± 8	165 ± 10	94 ± 7	93 ± 7
18.11.03	232 ± 5	161 ± 11	80 ± 7	94 ± 16
02.12.03	252 ± 11	164 ± 7	96 ± 3	91 ± 5
03.02.04	205 ± 20	201 ± 20		91 ± 4
10.02.04	209 ± 5	237 ± 18		100 ± 3
17.02.04	193 ± 13	183 ± 6		115 ± 9
25.02.04	198 ± 9	179 ± 7		102 ± 4
09.03.04	158 ± 8	148 ± 3		83 ± 2

**Tabelle 46:** Effekt von rezeptorsättigenden Konzentrationen einzelner muskarinischer Liganden auf die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M<sub>4</sub>-Zellen (Mittelwerte ± Standardfehler der Bindung in Prozent der basalen [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung; n = 6 - 7).

## Anhang

Datum der Membranpräparation	Oxotremorin M	Pilocarpin	Alcuronium	Atropin
20.06.02	401 ± 9	317 ± 27	108 ± 9	99 ± 9
28.06.02	309 ± 9	243 ± 15	78 ± 2	87 ± 7
19.07.02	296 ± 25	212 ± 21	74 ± 11	81 ± 9
30.08.02	366 ± 16	261 ± 10	84 ± 4	77 ± 3
05.09.02	384 ± 17	309 ± 15	93 ± 4	93 ± 6
13.09.02	432 ± 12	299 ± 12	87 ± 5	81 ± 4
19.09.02	439 ± 23	306 ± 14	92 ± 4	79 ± 5
26.09.02	426 ± 9	309 ± 14	91 ± 5	82 ± 4
26.09.02-II	460 ± 13	318 ± 14	105 ± 9	87 ± 5
15.10.02	255 ± 22	182 ± 12	81 ± 6	96 ± 6
22.10.02	323 ± 9	271 ± 9	137 ± 31	80 ± 5
22.10.02-II	377 ± 16	278 ± 15	88 ± 6	106 ± 14
31.10.02	278 ± 9	235 ± 10	120 ± 25	78 ± 6
31.10.02-II	314 ± 22	235 ± 10	120 ± 25	78 ± 6
06.12.02	356 ± 42	219 ± 17	106 ± 12	109 ± 13
06.12.02	276 ± 30	201 ± 13	89 ± 6	81 ± 8
12.12.02	454 ± 12	352 ± 13	99 ± 7	98 ± 10
12.12.02-II	367 ± 17	268 ± 10	81 ± 7	75 ± 7
19.12.02	258 ± 13	179 ± 5	65 ± 5	64 ± 6
19.12.02-II	368 ± 15	247 ± 9	87 ± 6	90 ± 6
24.02.03	372 ± 8	238 ± 5	76 ± 2	77 ± 3
28.02.03	325 ± 4	232 ± 5	76 ± 6	84 ± 6
10.03.03	304 ± 16	220 ± 8	71 ± 2	73 ± 3
10.03.03-II	316 ± 15	227 ± 11	70 ± 2	73 ± 1
21.03.03	267 ± 17	222 ± 30	138 ± 22	110 ± 14
31.03.03	250 ± 12	203 ± 11	74 ± 6	78 ± 6
04.04.03	295 ± 11	242 ± 9	90 ± 7	82 ± 6
07.04.03	289 ± 20	223 ± 5	85 ± 6	74 ± 6
10.04.03	330 ± 12	273 ± 13		85 ± 4
14.04.03	297 ± 7	256 ± 13		91 ± 11
14.04.03-II	315 ± 8	269 ± 4		90 ± 7
08.09.03	275 ± 9	230 ± 8	78 ± 3	91 ± 8
22.09.03	293 ± 7	215 ± 4	83 ± 2	84 ± 2
17.05.04	151 ± 6	169 ± 8		99 ± 10
26.05.04	134 ± 8	193 ± 23		89 ± 8
02.06.04	384 ± 41	329 ± 18		107 ± 5
07.06.04	371 ± 26	301 ± 16		95 ± 3
14.06.04	281 ± 13	189 ± 9		83 ± 3

**Tabelle 47:** Effekt von Rezeptorsättigenden Konzentrationen einzelner muskarinischer Liganden auf die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M<sub>2</sub>-Zellen (Mittelwerte ± Standardfehler der Bindung in Prozent der basalen [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung; n = 6 - 7).

## **Danksagung**

Besonders herzlich möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Mohr für die überlassene Thematik und die intensive Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit danken. Die angenehme Atmosphäre der Zusammenarbeit, die ständige Ansprechmöglichkeit und seine rasche Handlungsbereitschaft haben ganz entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. E. Schlicker danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Korreferates.

Frau Prof. Dr. C. E. Müller und Herrn Prof. Dr. V. Gieselmann möchte ich für ihre Mitwirkung in der Prüfungskommission danken.

Allen Arbeitskollegen der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und Unterstützung. Die offene und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre habe ich sehr geschätzt und wird mir auch in Zukunft in schöner Erinnerung bleiben.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes danke ich sehr herzlich für die finanzielle, besonders aber auch für die ideelle Förderung während meiner Arbeit.

## Publikationsliste

### Abstrakta / Kongressmitteilungen

Klemt D, Zlotos DP, and Mohr K (2003)

Modulation of agonist induced G protein activation by mono- and dimeric muscarinic allosteric agents  
DPhG-Tagung, Würzburg (*Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.*, im Druck)

Klemt D, Mohr K (2004)

Allosterische Modulation der Agonist-induzierten G Protein-Aktivierung am muskarinischen  
M<sub>4</sub>-Acetylcholin-Rezeptor

*Naunyn-Schmiedeberg`s Arch. Pharmacol.* **369**:75, R19

Klemt D and Mohr K (2004)

Allosteric modulation of agonist intrinsic efficacy in muscarinic acetylcholine receptors  
Pfizer Drug Discovery Symposium 2004, Sandwich, Kent, UK (invited contribution)