

**Interaktion orthosterisch/allosterischer
Antagonist-Hybride mit muskarinischen
M₂-Acetylcholinrezeptoren**

Dissertation

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

vorgelegt von

Dorina Kaufel

aus Bergisch Gladbach

Bonn 2010

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

1. Referent: Prof. Dr. med Klaus Mohr

2. Referent: Prof. Dr. med. Kurt Racké

Tag der mündlichen Prüfung: 29. April 2011

Erscheinungsjahr: 2011

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2007 bis Oktober 2010 in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Instituts der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med Klaus Mohr angefertigt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren	1
1.2	Allosterische Modulation.....	5
1.3	Orthosterisch/allosterische Hybrid-Liganden.....	8
1.3.1	Experimentelle Ansätze zum Nachweis der dualsterischen Bindung	10
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	13
2	Methoden und Materialien	17
2.1	Zellbiologische Arbeiten	17
2.1.1	Kultivierung von CHO-Zellen	18
2.1.2	Membranpräparation	19
2.2	Molekularbiologische Arbeiten	20
2.2.1	Zielgerichtete Mutagenese	20
2.2.2	Plasmid-DNA-Gewinnung	22
2.2.3	Transfektion	24
2.2.3.1	Transfektionsmethoden.....	24
2.2.3.2	Stabile Transfektion	25
2.2.3.3	Transiente Transfektion	26
2.3	Proteinbestimmung nach Lowry.....	27
2.4	Radioligand-Bindungsstudien.....	28
2.4.1	Filtrationsmethode.....	28
2.4.2	Zentrifugationsverfahren	28
2.4.3	Szintillationsverfahren	29

2.4.4	Bestimmung der Radioligandkonzentration.....	30
2.4.5	Theoretische Grundlagen der orthosterischen Ligand-Rezeptor-Interaktion.....	31
2.4.6	Homologe Konkurrenzexperimente	33
2.4.6.1	Versuchsdurchführung von homologen Konkurrenzexperimenten	37
2.4.7	Heterologe Interaktionsexperimente	40
2.4.7.1	Heterologe Konkurrenzexperimente mit orthosterischen Liganden	40
2.4.7.2	Heterologe Interaktionsexperimente mit Allosteren.....	41
2.4.7.3	Heterologe Interaktionsexperimente mit orthosterisch/allosterischen Hybridsubstanzen.....	43
2.4.7.4	Versuchsdurchführung von heterologen Inhibitionsexperimenten.....	44
2.4.8	Kinetische Experimente	46
2.4.8.1	Durchführung von Zweipunkt-Kinetik-Experimenten	48
2.4.8.2	Bestimmung der Dissoziationshalbwertszeit des Radioliganden	50
2.4.8.3	Assoziationsexperimente	51
2.5	Funktionelle Untersuchungen.....	53
2.5.1	Theoretischer Hintergrund von [³⁵ S]GTPγS-Experimenten	53
2.5.2	Durchführung von [³⁵ S]GTPγS-Bindungsexperimenten mit Agonisten.....	54
2.5.3	Durchführung von [³⁵ S]GTPγS-Bindungsexperimenten mit inversen Agonisten	56
2.5.4	GTPγS-Inhibitionsexperimente zur Erfassung des Einflusses von Antagonisten auf die Rezeptoraktivierung.....	56
2.5.5	Funktionelle Experimente auf Ganzzell-Ebene: dynamische Massenumverteilung	58
2.5.5.1	Theoretischer Hintergrund.....	58
2.5.5.2	Praktische Durchführung	60
2.6	Statistik	61

2.7	Strukturformeln der eingesetzten Verbindungen.....	64
2.7.1	Radioliganden.....	64
2.7.2	Orthosterische Liganden	65
2.7.3	Allosterische Modulatoren	69
2.7.4	Orthosterisch/allosterische Hybridsubstanzen	70
2.8	Materialien	73
2.8.1	Herstellung von Puffern, Lösungen und Nährmedien.....	73
2.8.2	Reagenzien	78
2.8.3	Verbrauchsmaterialien	80
2.8.4	Geräte und Apparaturen	82
2.8.5	Auflistung der Herstellerfirmen	83
2.8.6	Verwendete Computerprogramme	85
3	Ergebnisse	87
3.1	Wege zu dualsterischen Liganden: Bindungseigenschaften neuartiger Hybridliganden	87
3.1.1	Subtypselektivität der Hybridliganden in [³ H]NMS-Bindungsstudien an Muskarinrezeptoren	87
3.1.1.1	Bindungseigenschaften orthosterischer Antagonistbausteine an Wildtyprezeptoren.....	89
3.1.1.2	Bindungseigenschaften allosterischer Ausgangssubstanzen an Wildtyprezeptoren.....	91
3.1.1.3	Bindungseigenschaften allo-/orthosterischer Hybridliganden antagonistischer Struktur an Wildtyprezeptoren.....	94
3.1.1.4	Bindungseigenschaften agonistischer Hybridliganden im Vergleich zu Iperoxo und zu Acetylcholin.....	98
3.1.2	Struktur-Wirkungsbeziehungen der Interaktion schrittweise verlängerter Derivate orthosterischer Liganden mit [³ H]NMS am M ₂ -Rezeptor.....	104

3.1.3	Nachweis der orthosterischen Interaktion durch Bindungsuntersuchungen an der Mutante M ₂ ¹⁰⁴ Tyrosin zu Alanin	108
3.1.3.1	Einfluss der Mutation M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala auf orthosterische Antagonisten...	108
3.1.3.2	Einfluss der Mutation M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala auf allosterische Modulatoren.....	112
3.1.3.3	Einfluss der Mutation M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala auf allo-/orthosterische Hybridliganden antagonistischer Struktur	115
3.1.3.4	Einfluss der Mutation M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala auf agonistische Verbindungen....	118
3.1.4	Detektion allosterischer Bindung durch Untersuchungen an allosterischen M ₂ -Rezeptormutanten	124
3.1.4.1	Folgen des gemeinsamen Austauschs der M ₂ -Subtypselektivität- gebenden Epitope ¹⁷⁷ Tyrosin und ⁴²³ Threonin zu den korrespondierenden Aminosäuren des M ₅ -Rezeptors.....	125
3.1.4.2	Abhängigkeit der Ligandbindung vom allosterischen Epitop M ₂ ¹⁷⁷ Tyrosin	135
3.1.4.3	Abhängigkeit vom allosterischen Epitop ⁴²³ Threonin	145
3.1.4.4	Abhängigkeit der Bindung allosterischer Modulatoren und Antagonist-Hybriden von den beiden Glutamat-Resten 172 und 175 der EDGE-Sequenz des M ₂ -Rezeptors	152
3.1.4.5	Abhängigkeit vom Epitop ⁴²² Tryptophan	157
3.1.5	Einfluss der M ₂ -Rezeptormutationen auf die Biphasizität von agonistischen Testsubstanzen	167
3.1.6	Charakterisierung der rein allosterischen Interaktion durch Untersuchungen am [³ H]NMS-besetzten Rezeptor	169
3.1.6.1	Interaktion orthosterischer Antagonisten mit [³ H]NMS-besetzten M- Rezeptoren	170
3.1.6.2	Interaktion allosterischer Modulatoren mit [³ H]NMS-besetzten M- Rezeptoren	172
3.1.6.3	Interaktion antagonistischer Hybridliganden mit [³ H]NMS-besetzten M-Rezeptoren	175

3.1.6.4	Einfluss allosterischer Rezeptormutationen auf die dissoziationsverzögernden Eigenschaften von Atr-Naph und von Naphmethonium.....	179
3.1.6.5	Interaktion agonistischer Hybridliganden mit [³ H]NMS-besetzten M- Rezeptoren	182
3.1.6.6	Vergleich der Affinitäten am freien und [³ H]NMS-besetzten M ₂ -Rezeptor	184
3.1.7	Kinetik der Rezeptorinteraktion von ausgewählten Substanzen	187
3.1.8	Nachweis des invers agonistischen Verhaltens der allo-/orthosterischen Hybridliganden.....	191
3.1.8.1	Einfluss von Atr-Naph auf die Acetylcholin-vermittelte M ₂ -Aktivierung	191
3.1.8.2	Bestimmung der invers agonistischen Eigenschaften der Hybridliganden in modifizierten [³⁵ S]GTPγS-Experimenten	194
3.1.8.3	DMR-Messungen.....	197
3.2	Beeinflussung der Agonistbindung durch Anwesenheit von Guanosindiphosphat.....	214
3.2.1	Einfluss von GDP auf die Testsubstanzaffinität an Wildtyprezeptoren.....	215
3.2.2	Einfluss von GDP auf die Testsubstanzaffinität an der Mutante M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	220
3.3	Einfluss der Mutation M ₂ ¹⁰⁴ Tyrosin zu Alanin auf die Rezeptoraktivierbarkeit.....	225
4	Diskussion	229
4.1	Evidenz für eine dualsterische Bindung von Antagonist-Hybriden	231
4.1.1	Parallele Strukturwirkungsbeziehungen bei agonistischen und antagonistischen Hybridliganden	231
4.1.2	Subtypselektivität bei Atropin-haltigen Hybridliganden	232

4.1.3	Abhängigkeit der Bindungsaffinität ortho-/allosterischer Hybridliganden von allosterischen und orthosterischen Rezeptorepitopen	233
4.2	Einfluss unterschiedlicher Substituenten am Stickstoff von Atropinderivaten auf die M ₂ -Affinität	236
4.3	Bindungseigenschaften von Iper-Hex	237
4.4	Subtypselektivitätsbestimmung in Radioligandbindungsstudien	239
4.4.1	Einfluss von Guanylnukleotiden auf die Subtypselektivität von Agonisten in Radioligandbindungsexperimenten.....	241
4.5	Komplexität der Begriffe „orthosterisch“ und „allosterisch“	243
5	Zusammenfassung	247
6	Literaturverzeichnis	251
7	Anhang	261
7.1	Homologe Konkurrenzexperimente	261
7.2	Bestimmung der Dissoziationshalbwertszeit.....	265
7.2.1	Kinetik der [³ H]NMS-Dissoziation an der Rezeptormutante M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	267
7.3	Vergleich der Bindungsparameter von M ₂ -Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen.....	268
7.4	Vergleich von Zentrifugation und Filtration für Radioligand-Bindungsuntersuchungen bei rascher Bindungskinetik.....	269
7.5	Messung des Effektes inverser Agonisten mit modifizierten [³⁵ S]GTPγS-Bindungsexperimenten.....	272
7.6	Normierung von Ergebnissen der G-Protein-Aktivierung: Rezeptorkonzentration vs. Membranproteingehalt.....	275

7.7	Tabellarische Zusammenfassung der erhobenen Bindungsdaten.....	277
7.8	Abkürzungsverzeichnis.....	297
8	Abstrakta/Kongressbeiträge.....	299
	Danksagung	301
	Lebenslauf.....	303

1 Einleitung

1.1 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Aufbau und Funktion muskarinischer Acetylcholinrezeptoren

Bei der Erregung einer Nervenzelle werden Botenstoffe freigesetzt, die mittels eines Rezeptors das Signal an die Zielzelle übermitteln. In der Pharmakologie werden fünf Arten von Rezeptoren unterschieden. Es gibt ligandgesteuerte Ionenkanäle auf der Zelloberfläche, die sich bei der Ligandbindung für bestimmte Ionen öffnen. Der nikotinische Acetylcholinrezeptor gehört zu dieser Gruppe. Daneben gibt es ligandgesteuerte Enzyme wie z. B. den Insulinrezeptor, welche ebenfalls in der Zellmembran lokalisiert sind. Transkriptionsregulierende Rezeptoren wie der Steroidrezeptor besitzen keine Verbindung zum Extrazellulärraum und befinden sich im Zellkern, wo sie nach Aktivierung die Transkription beeinflussen. Desweiteren gibt es Toll-like-Rezeptoren, die als Bestandteil des Immunsystems spezifisch Oberflächenstrukturen von Bakterien oder Viren binden (aus Lüllmann et al., 2010).

Die größte Gruppe von Rezeptoren bilden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (G protein-coupled receptors, GPCR, G-Protein: Guanylnucleotid-bindendes Protein). Diese bestehen aus einem unverzweigten Proteinstrang, der sich mit hydrophoben α -Helices siebenmal in ringförmiger Anordnung durch die Plasmamembran windet (Caulfield und Birdsall, 1998; Jensen und Spalding, 2004). Der Aminoterminus befindet sich extrazellulär und das carboxyterminale Ende intrazellulär (Hulme et al., 1990; Wess, 1993). Der muskarinische Acetylcholinrezeptor gehört zur Familie A dieser Rezeptorklasse. Die Familie A zeichnet sich dadurch aus, dass sich die Bindungstasche für den endogenen Liganden im Bereich der transmembranären Domänen befindet (siehe Abb. 1.2, Seite 5).

Die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mACh-Rezeptoren) sind Bestandteil des Parasympathikus. Dieser bildet gemeinsam mit dem Sympathikus das vegetative Nervensystem. Der physiologische Ligand Acetylcholin leitet die Reize über nikotinische ACh-Rezeptoren

(ligandgesteuerte Ionenkanäle) von prä- auf postganglionäre Neurone weiter. Die Stimulation der Erfolgsorgane erfolgt über muskarinische ACh-Rezeptoren, die neben der Peripherie auch im zentralen Nervensystem vorkommen. Dort dienen sie postsynaptisch der Reizweiterleitung und präsynaptisch als inhibitorische Auto- oder Heterorezeptoren der Kontrolle der Ausschüttung von Neurotransmittern (Eglen, 2006).

Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

Die dritte intrazelluläre Schleife des GPCR kann nach Stimulation durch einen Agonisten Kontakt mit einem ebenfalls in der Zytoplasmamembran lokalisierten heterotrimeren G-Protein aufnehmen, welches aus einer α -, β - und γ -Untereinheit zusammengesetzt ist. In Folge dessen wird GDP (Guanosindiphosphat), welches an die α -Untereinheit des G-Proteins gebunden ist, gegen GTP (Guanosintriphosphat) ausgetauscht. Dabei löst sich die α -Untereinheit von der β/γ -Untereinheit und kann nachgeschaltete Signalwege beeinflussen. Das β/γ -Heterodimer führt ebenfalls zu zellulären Effekten. Durch die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit wird das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert. Dadurch kommt es zur Reassoziierung des Heterotrimeren und der Terminierung der Aktivierung.

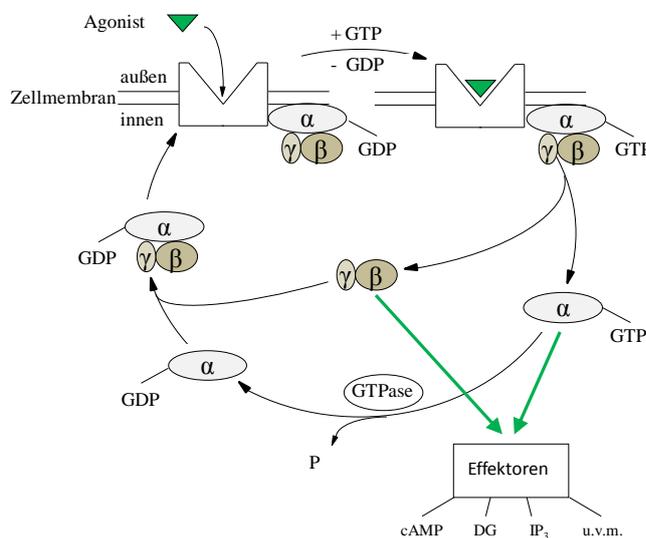


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch Agoniststimulation.

GDP bzw. GTP: Guanosindi- bzw. -triphosphat, cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat, DG: Diacylglycerol, IP₃: Inositoltriphosphat. Modifiziert nach Milligan und Kostenis (2006).

Subtypen der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren

Es gibt fünf verschiedene Subtypen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren (M_1 - M_5), die durch fünf verschiedene, intronlose Gene codiert werden (Kubo et al., 1986; Bonner et al., 1987; Peralta et al., 1988). Die Bindungsstelle für Acetylcholin ist bei allen Subtypen konserviert (Hulme et al., 1990), Unterschiede finden sich vor allem in den extrazellulären Schleifen. Acetylcholin erreicht sein Bindungsareal von extrazellulär und bindet mit seiner polaren Aminogruppe an einen Asparaginrest (Asp 3.32, Nomenklatur nach Ballesteros und Weinstein, 1992) in der dritten transmembranären Domäne (Spalding et al., 1994; Pogozheva et al., 1997; Palczewski et al., 2000).

Die unterschiedlichen Subtypen koppeln mit verschiedenen G_α -Proteinen. $M_{1/3/5}$ stimulieren über $G_{q/11}$ -Proteine bevorzugt die Phospholipase C und erhöhen so die Konzentration von Diacylglycerol und Inositoltriphosphat, wodurch der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel ansteigt (Eglen, 2006). Die Subtypen M_2 und M_4 binden sich vorwiegend an inhibitorische $G_{i/o}$ -Proteine, können sich bei hohen Agonistkonzentrationen jedoch auch an stimulierende G_s -Proteine binden (Antony et al., 2009). Durch G_i -Aktivierung wird die Adenylylcyclase gehemmt, es wird also weniger cAMP gebildet.

Die Gewebeverteilung der verschiedenen Subtypen lässt sich durch Quantifizierung von mRNA (Krejčí und Tuček, 2002) oder mittels Immunoassays bestimmen (Dorje et al., 1991). Der M_1 -Rezeptor befindet sich vornehmlich im Gehirn in Bereichen des Vorderhirns, des Hippocampus, des Striatum und des Cortex. Der M_2 -Rezeptor ist sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem lokalisiert, in der Peripherie findet er sich an glatter Muskulatur und am Herzen. An der glatten Muskulatur z. B. der Bronchien oder des Darms liegen neben M_2 -bevorzugt M_3 -Rezeptoren vor. Diese gibt es auch an sekretorischen Drüsen und im zentralen Nervensystem. Die Rezeptoren der Subtypen M_4 und M_5 kommen hauptsächlich im Gehirn vor, M_4 im basalen Vorderhirn und im Striatum, M_5 in der Substantia nigra (Caulfield und Birdsall, 1998; Eglen, 2005).

Neben diesen hier aufgeführten neuronalen Muskarinrezeptoren ist auch nicht-neuronales Acetylcholin zusammen mit seinen Rezeptoren in verschiedenen Geweben nachgewiesen worden. So reguliert Acetylcholin unabhängig vom Parasympathikus u.a. in der Placenta oder in Tumorgewebe die Zellproliferation (Landgraf et al., 2010). In Epithelien der luftleitenden Organe oder in glatter Muskulatur der Blutgefäße dient es als autokrines Hormon (Wessler et al., 1999; Eglen, 2006).

Therapeutische Einsatzgebiete für muskarinerge Liganden

Als Liganden des Parasympathikus gibt es eine Vielzahl von möglichen Indikationen, einige Arzneistoffe werden im Folgenden beschrieben. Pilocarpin (z.B. Piloman[®]) als muskarinischer Agonist kann als Mittel der zweiten Wahl bei Glaukom eingesetzt werden, um durch eine Kontraktion des Ziliarmuskels den Kammerwasserabfluss zu verbessern. Die quartären Antagonisten Ipratropium (z.B. Atrovent[®]) und Tiotropium (Spiriva[®]) werden bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) zur Bronchodilatation verwendet. N-Butylscopolamin (z.B. Buscopan[®]) bewirkt als Parasympatholytikum eine Muskelerschlaffung bei gastrointestinalen Krämpfen. Diese Antagonisten sind permanent positiv geladen und können dadurch nicht in das zentrale Nervensystem (ZNS) gelangen. Atropin (z.B. Dysurgal[®]) ist ZNS-gängig und dient als Antidot bei Organophosphatvergiftungen.

Da die Behandlung mit unselektiven Arzneistoffen auf Grund der weiten Verbreitung von Muskarinrezeptoren zu vielen Nebenwirkungen führen kann (z.B. Mundtrockenheit oder Gastrointestinale Beschwerden), gibt es Bestrebungen, einzelne Subtypen gezielt anzusprechen. In der Therapie befinden sich zur Zeit Darifenacin (Emsalex[®]), Solifenacin (Vesikur[®]) und Fesoferdin (Toviaz[®]) als M₃-prävalente Antagonisten zur Behandlung der Reizblase, sowie Pirenzepin (Gastrozepin[®]) als M₁-Antagonist gegen peptische Erkrankungen. Diese Substanzen bevorzugen zwar einen Rezeptorsubtyp, bei steigenden Konzentrationen beeinflussen sie jedoch auch andere Subtypen und rufen somit unerwünschte Arzneimittelwirkungen hervor.

Mögliche therapeutische Einsatzgebiete für Liganden am in dieser Arbeit hauptsächlich bearbeiteten M₂-Rezeptor sind Antinozizeption, psychische Erkrankungen wie Schizophrenie oder Morbus Alzheimer und Probleme des vegetativen Nervensystems wie eine überaktive Blase oder das Reizdarmsyndrom. M₂-Agonisten wird in Kombination mit einer Stimulation von M₄-Rezeptoren eine analgetische Wirkung zugesprochen (Duttaroy et al., 2002; Wess et al., 2007). Ein Acetylcholinmangel im zentralen Nervensystem ist an der Pathogenese von Morbus Alzheimer beteiligt. Eine Blockade von präsynaptischen M₂-Autorezeptoren könnte hier einen therapeutischen Ansatz darstellen (Eglen, 2006; Wess et al., 2007).

1.2 Allosterische Modulation

Körpereigene Agonisten binden an die so genannte orthosterische Bindungsstelle eines Rezeptors (griech.: orthós = recht, stereós = räumlich). Einige synthetisch hergestellte Agonisten oder auch kompetitive Antagonisten fungieren ebenfalls als Orthostere. Daneben gibt es jedoch bei vielen Rezeptoren ein weiteres, räumlich getrenntes Haftareal, welches als allosterische Bindungsstelle bezeichnet wird (griech.: allos = anders, verschieden) (Monod et al., 1963; Christopoulos et al., 2004). Im Fall von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren können durch eine allosterische Modulation sowohl die Bindungseigenschaften als auch die Signalübertragung eines Orthosters am Rezeptor beeinflusst werden. Diese Effekte sind abhängig vom eingesetzten allosterischen Modulator, der orthosterischen Testsubstanz, sowie vom Rezeptor selbst. Bei Muskarinrezeptoren befindet sich das allosterische Haftareal auf der extrazellulären Seite im Eingang zur orthosterischen Bindungstasche.

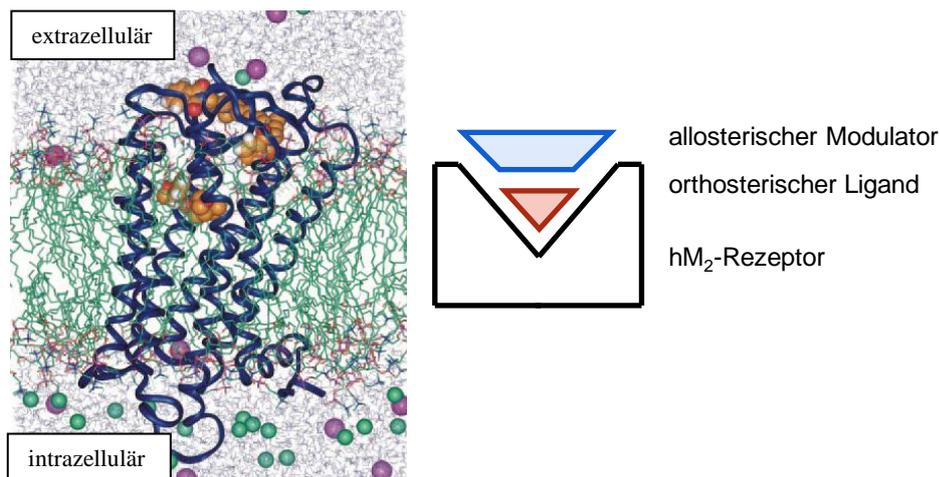


Abb. 1.2: Modellhafte Abbildung des hM₂-Rezeptors mit einem orthosterischen Liganden und einem allosterischen Modulator.

links: Moleküldynamik-Simulation der Interaktion des M₂-Rezeptors mit dem orthosterischen Antagonisten N-Methylscopolamin und dem allosterischen Modulator W84 (modifiziert nach Prilla et al., 2006). Der Rezeptor ist als blaues Band in einer Phospholipiddoppelschicht (grün) dargestellt, die beiden Liganden sind als orangefarbene Charlottenmodelle abgebildet.

rechts: Schematisches Rezeptormodell.

Das ternäre Komplexmodell nach Ehlert (1988, siehe Abb. 1.3 A) beschreibt die Veränderung der Bindungseigenschaften des orthosterischen Liganden durch einen allosterischen Modulator. Hierbei werden vier verschiedene Zustände beschrieben, die sich miteinander im Gleichgewicht befinden. Die Situation, bei der beide Liganden simultan binden, wird als ternärer Komplex bezeichnet.

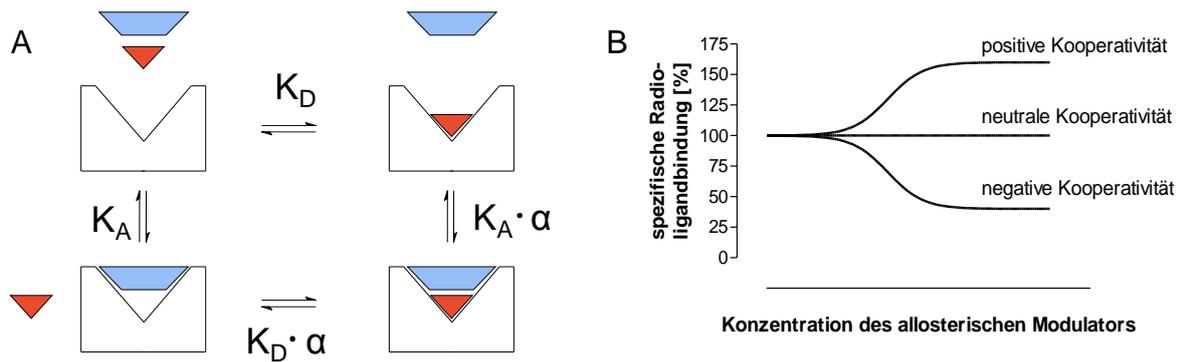


Abb. 1.3: A: Ternäres Komplexmodell nach Ehlert (1988) in schematischer Darstellung, Erläuterungen siehe Text.
 B: Skizzierung der Interaktion allosterischer Modulatoren mit unterschiedlicher Kooperativität und einem orthosterischen Radioliganden.

Da sich zeitgleich ein orthosterischer und ein allosterischer Ligand an den Rezeptor binden können, handelt es sich nicht um eine kompetitive, sondern um eine kooperative Interaktion (Christopoulos und Kenakin, 2002). Der Begriff der Kooperativität beschreibt das Ausmaß und die Richtung der gegenseitigen Beeinflussung (siehe Abb. 1.3 B). Die Bindung eines allosterischen Liganden mit der Affinität K_A verändert die Affinität des orthosterischen Liganden (K_D) im reziproken Maß wie die Bindung eines orthosterischen Liganden die weitere Bindung eines Allostere moduliert (Lazareno und Birdsall, 2005). Der Kooperativitätsfaktor α stellt den Proportionalitätsfaktor zwischen den Affinitäten des Orthosters und des Allostere in einem gegebenen System dar. Bei positiver Kooperativität steigert die Bindung eines allosterischen Modulators die Affinität des Orthosters zum Rezeptor. Negative Kooperativität liegt vor, wenn ein Alloster die Affinität eines bestimmten orthosterischen Liganden zum Rezeptor herabsetzt. Meistens kann die Bindung eines Orthosters durch einen negativ kooperativen Modulator nicht vollständig verhindert werden. Bei einem kompetitiven Antagonisten ist bei ausreichend hohen Konzentrationen eine vollständige Inhibition der spezifischen Orthoster-Bindung möglich. Ein neutral kooperativer allosterischer Ligand bindet in gleichem Maß an den freien und an den orthosterisch besetzten Rezeptor, folglich verändert er nicht die spezifische Bindung des orthosterischen Liganden, beeinflusst jedoch dessen Bindungskinetik.

Erste Befunde zur allosterischen Modulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zeigten sich in Organbadversuchen an Herz- und Ileumgewebe (Lüllmann et al., 1969; Clark und Mitchelson, 1976). Beide Gewebe sind reich an Muskarinrezeptoren. Unter Zusatz von Hexamethonium-Derivaten zeigte sich eine sättigbare Rechtsverschiebung der Agonist-induzierten Konzentrations-Effekt-Kurven. Diese Sättigung ist ein Hinweis, dass es sich bei

den getesteten Substanzen um allosterische Modulatoren handelt. Durch Bindungsstudien an gentechnisch veränderten Muskarinrezeptoren konnte gezeigt werden, dass auch strukturell unterschiedliche Modulatoren wie Alcuronium, Gallamin oder W84 dasselbe allosterische Haftareal besetzen (Tränkle et al., 2005), dieses wird „common allosteric site“ genannt (Ellis et al., 1993; Buller et al., 2002; Voigtländer et al., 2003; Prilla et al., 2006). Bei den in dieser Arbeit untersuchten allosterischen Modulatoren vom Alkanbisammonium-Typ ist die Affinität zum M₂-Rezeptor am größten und zum M₅-Rezeptor am geringsten (Ellis et al., 1991; Holzgrabe und Mohr, 1998; Buller et al., 2002).

Therapeutischer Einsatz allosterischer Modulatoren

Die bekanntesten allosterischen Modulatoren in der Arzneimitteltherapie sind die Benzodiazepine. Sie binden an den GABA_A-Rezeptor, einen ligandgesteuerten Ionenkanal, und verstärken durch ihre positive Kooperativität (Sieghart, 1992) die Wirkung von GABA (γ-Aminobuttersäure). Auch für Barbiturate und weitere Narkotika wird ein ähnlicher Wirkungsmechanismus postuliert. Galantamin (Reminyl[®]) weist neben der Acetylcholinesterase-Inhibition eine positive Kooperativität gegenüber Acetylcholin an nicotischen ACh-Rezeptoren auf (Maelicke et al., 2000; Santos et al., 2002). Es wird als Antidementivum gegen Morbus Alzheimer eingesetzt.

Der im Jahr 2004 zugelassene Arzneistoff Cinacalcet (Mimpara[®]) war der erste in die Therapie eingeführte allosterische Modulator an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Er ist ein positiv kooperativer Modulator des Ca²⁺-Rezeptors (GPCR der Klasse C) in der Nebenschilddrüse (Kebig und Mohr, 2008). Ein weiterer allosterischer Modulator an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist Maraviroc (Celsentri[®]), der als Antagonist am Chemokinrezeptor CCR5 bei HIV eingesetzt wird.

Allosterische Modulatoren können in der medikamentösen Therapie mehrere Vorteile aufweisen. Wie bereits erwähnt, ist der Effekt von Allosteren sättigbar (Lüllmann et al., 1969). Dadurch ist die Gefahr einer Überdosierung reduziert, was die therapeutische Sicherheit erhöht (Holzgrabe und Mohr, 1998). Im Übrigen entfaltet ein allosterischer Modulator seine Wirkung oft nur in Anwesenheit des orthosterischen Liganden.

Im Bereich des allosterischen Haftareals finden sich bei Muskarinrezeptoren stärkere strukturelle Unterschiede als in der orthosterischen Bindungsstelle, so dass hier die gezielte Modulation eines bestimmten Rezeptorsubtyps möglich ist. Besitzt ein Ligand zu einem Subtyp eine höhere Affinität als zu den anderen Subtypen, so handelt es sich um „relative

Subtypselektivität“. „Absolute Subtypselektivität“ kann gewährleistet werden, wenn ein allosterischer Modulator nur an einem bestimmten Subtyp einen Effekt ausübt und sich an den anderen neutral kooperativ verhält (Birdsall et al., 1997). Von Lazareno et al. (2004) ist ein solches Verhalten für die Substanz Thiochrom beschrieben worden, die sich nur am M₄-Rezeptor mit Acetylcholin positiv kooperativ verhält.

1.3 Orthosterisch/allosterische Hybrid-Liganden

Ein neuartiger Ansatz zur Gewinnung subtypselektiver Liganden an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besteht in der kovalenten Verknüpfung eines orthosterischen Liganden mit einem allosterischen Baustein (Disingrini et al, 2006; Antony et al., 2009). Die so strukturierten Hybridverbindungen sollen den Rezeptor über den orthosterischen Molekülteil aktivieren bzw. inhibieren (*message*), und über den allosterischen Anker eine Subtypselektivität vermitteln (*address*) (*message-address concept*). Damit die Liganden beide Bindungsstellen simultan erreichen können, müssen sich diese im Rezeptor in räumlicher Nähe zueinander befinden bzw. die Kettenlänge des Verbindungsstücks muss optimal sein. Somit kann mit Hilfe von ortho-/allosterischen Hybridmolekülen auch auf die räumliche Anordnung der verschiedenen Bindungsstellen zueinander geschlossen werden.

Die Hybridliganden können neben den in Abb. 1.3 (Seite 6) dargestellten vier Zuständen noch einen weiteren Bindungsmodus eingehen, in dem das Hybridmolekül die orthosterische Bindungsstelle und das allosterische Haftareal zeitgleich besetzt (siehe Abb. 1.4). Dieser Bindungsmodus wird dualsterisch genannt (Antony et al., 2009). Im Gegensatz zu einer bitopischen Bindung, die allgemein die Interaktion mit zwei verschiedenen Haftarealen bedeutet, vereint die dualsterische Bindung spezifische Eigenschaften der beiden Epitope. Im Fall der hier dargestellten Hybridliganden führt eine dualsterische Bindung über den orthosterischen Molekülteil zu einer Rezeptor Aktivierung oder Inaktivierung und über den allosterischen Baustein wird eine M₂/M₅-Subtypselektivität erreicht.

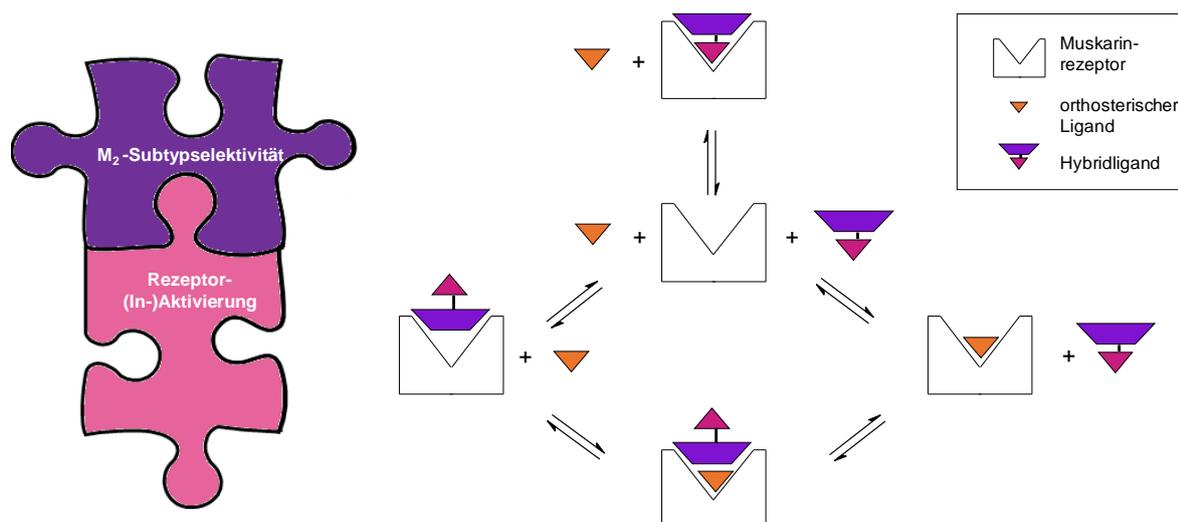


Abb. 1.4: Schematische Darstellung eines Hybridliganden (links) und dessen möglicher Bindungsmodi (rechts).

Links: Durch die Hybridbildung werden die pharmakologischen Eigenschaften der einzelnen Bauteile miteinander verbunden. *Rechts:* Erweitertes Allosterie-Modell für Hybridliganden (modifiziert nach Mohr et al., 2010); oben: dualistischer Modus, unten: ternärer Komplex im rein allosterischen Bindungsmodus.

Durch ein rationales Wirkstoffdesign wurden von de Amici und Holzgrabe Hybridagonisten konzipiert, bei denen der hochpotente Muskarinrezeptoragonist Iperoxo (Dallanoce et al., 1999) über eine C₆-Kohlenstoffkette mit je einem Teil der allosterischen Modulatoren W84 oder Naphmethonium -beide M₂ selektiv- verbunden worden ist (siehe Abb. 1.5, weitere Strukturformeln siehe Kapitel 2.7.4, ab Seite 70) (Antony et al.; 2009). Diese Hybridliganden wiesen eine ungefähr um den Faktor 100 höhere Affinität zum M₂- als zum M₅-Rezeptor auf, waren Agonisten am M₂-Rezeptor und zeigten eine Signalwegsspezifität für den G₁-Weg.

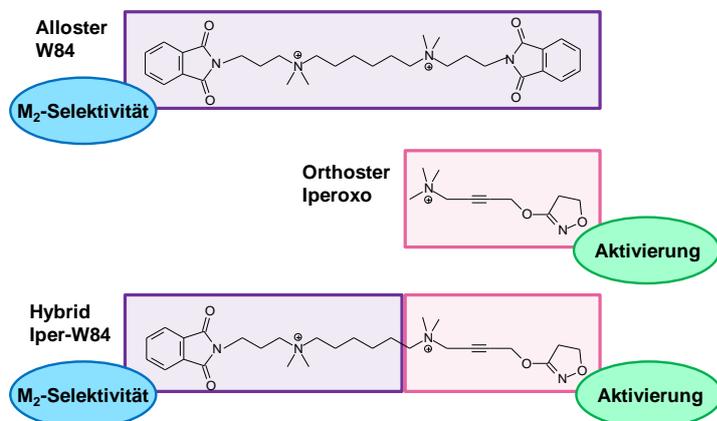


Abb. 1.5: Schematischer Bauplan der Hybridliganden aus Antony et al. (2009).

Der orthosterische Agonist Iperoxo wurde kovalent mit einem Teil des M₂-selektiven allosterischen Modulators W84 zu dem Hybridliganden Iper-W84 verbunden (modifiziert nach Mohr et al., 2010).

Neben den hier vorgestellten dualsterischen Agonisten sind in der Literatur strukturell verschiedene ortho-/allosterische Hybridliganden für Muskarinrezeptoren beschrieben (Valant et al., 2009; Mohr et al., 2010). Die meisten der dort vorgestellten Verbindungen sind nicht systematisch als dualsterische Verbindungen geplant worden, sondern wiesen in Untersuchungen ein komplexes Wirkprofil auf. Narlawar et al. stellten 2010 den ersten ortho-/allosterischen Hybridagonisten am Adenosin A₁-Rezeptor vor. Für Opioidrezeptoren gibt es eine Reihe bitopischer Substanzen (z.B. Portoghese et al, 1982).

1.3.1 Experimentelle Ansätze zum Nachweis der dualsterischen Bindung

Um nachzuweisen, dass eine Hybridsubstanz ortho- und allosterische Epitope zeitgleich nutzen kann, sind verschiedene methodische Ansätze möglich. Im Folgenden werden die Verfahren beschrieben, die in der vorliegenden Arbeit zur Überprüfung eines dualsterischen Bindungsmodus verwendet worden sind.

Bestimmung der Subtypselektivität

Durch die Hybridbildung soll eine Unterscheidung der Subtypen ermöglicht werden. Folglich kann eine Verstärkung der Subtypprävalenz beim Hybridliganden im Verhältnis zur unselektiven orthosterischen Ausgangsverbindung ein Hinweis für die Nutzung allosterischer Epitope sein. Auch die Affinitätsreihenfolge der einzelnen Subtypen (M₁-M₅) kann für die verschiedenen Bausteine bestimmt und anschließend mit der Affinität der zu testenden Hybridverbindung verglichen werden. Radioligandbindungsstudien mit klonierten Rezeptoren aus stabil transfizierten Zelllinien bilden eine gute Möglichkeit, die Affinität zu einzelnen Rezeptorsubtypen zu bestimmen. Die physiologische Relevanz der Selektivität zwischen verschiedenen Subtypen lässt sich mit Experimenten an isolierten Organen überprüfen (Disingrini et al., 2006), was aber kein Bestandteil der vorliegenden Arbeit war.

Für die allosterischen Modulatoren war die höchste Affinität zum M₂- und die niedrigste Affinität zum M₅-Rezeptor bekannt (Prilla et al., 2006; Mohr et al., 2010), folglich wurden die meisten Hybridliganden an diesen beiden Subtypen untersucht. Für einige wurde auch die Affinität zum M₃-Rezeptor gemessen, um die Affinitätsreihenfolge zu bestimmen.

Erfassung der Bindungstopographie

Der Nachweis der Interaktion mit bestimmten Epitopen kann durch den Einsatz punktmutierter Rezeptoren erfolgen. Die in dieser Arbeit untersuchten Aminosäuren des M_2 -Rezeptors sind in Abb. 1.6 schematisch dargestellt.

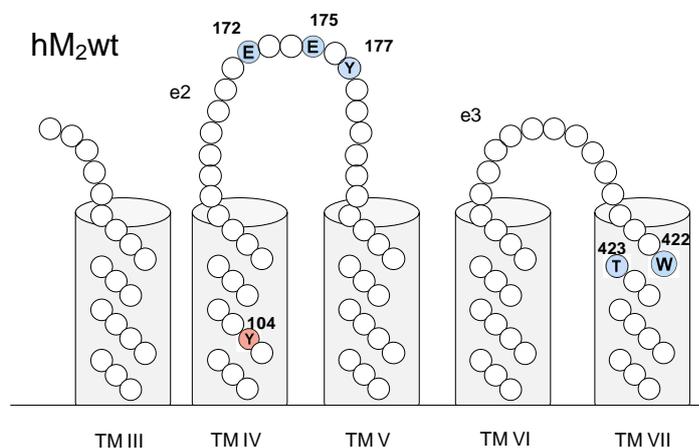


Abb. 1.6: Schematische Darstellung eines Ausschnitts der Aminosäuresequenz der dritten bis siebten transmembranären Domäne des humanen M_2 -Rezeptors, sowie der zweiten und dritten extrazellulären Schleife.

Die transmembranären Abschnitte sind als graue Säulen dargestellt, die durch die extrazellulären Schleifen (e2 + e3) verbunden sind. Farblich hervorgehoben sind die in der vorliegenden Arbeit genauer betrachteten Aminosäuren: orthosterisches Epitop (rot): 104 Tyrosin (Y), allosterische Epitope (blau): $^{172, 175}$ Glutamat (E), 177 Tyrosin (Y), 422 Tryptophan (W), 423 Threonin (T). (Modifiziert nach Prilla et al., 2006)

Die Aminosäure M_2 104 Tyrosin (3.33, Nomenklatur nach Ballesteros und Weinstein; 1992) befindet sich im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle neben Asparagin103 (3.32), welches ein essentielles Epitop für die Rezeptoraktivierung darstellt (Lu et al., 2002). Die sauren Glutamate 172 und 175 befinden sich im Bereich des allosterischen Haftareals und sind Bestandteil der EDGE-Sequenz (M_2 172-175), die ein wichtiges Epitop für allosterische Modulatoren am M_2 -Rezeptor darstellt (Ellis, 1997). Die beiden allosterischen Aminosäuren M_2 177 Tyrosin und 423 Threonin sind von Prilla et al. (2006) bzw. von Buller et al. (2002) als M_2/M_5 subtypselektivitätsgebend identifiziert worden. In der vorliegenden Arbeit sind sie sowohl gegen die korrespondierenden Aminosäuren des M_5 -Rezeptors (Glutamin bzw. Histidin) als auch gegen Alanin ausgetauscht worden. Das Epitop M_2 422 Tryptophan (7.35) ist am inaktiven Rezeptor funktionell allosterisch (Prilla et al., 2006), am aktiven Rezeptor ist es an der Affinität orthosterischer Agonisten und an der Rezeptoraktivierung beteiligt (Jäger et al., 2007).

Wenn eine Testsubstanz sowohl beim Austausch ortho- als auch allosterischer Epitope ihre Bindungseigenschaften verändert, so ist dies ein Nachweis dafür, dass die Substanz mit beiden Bindungsstellen interagiert. Ob diese Interaktionen simultan stattfinden, ist durch den Einsatz von punktmutierten Rezeptoren nicht eindeutig detektierbar.

Bindungskinetische Charakterisierung

Durch die Hybridbildung kann die Bindungskinetik der Testsubstanz verändert sein. Da allosterische Modulatoren an Muskarinrezeptoren die Dissoziation orthosterischer Liganden verzögern, wäre es möglich, dass der allosterische Molekülteil des Hybridliganden die Dissoziation des orthosterischen Bausteins verlangsamt. Eine veränderte Bindungskinetik kann folglich ein Hinweis auf einen komplexen Bindungsmodus darstellen.

Funktionalität der Hybridliganden

Es ist das Ziel der Hybridbildung, dass der orthosterische Baustein innerhalb eines Hybridliganden seine Botschaft (*message*) unverändert an den Rezeptor übermitteln kann, sich seine funktionellen Eigenschaften also nicht verändern. Um diese zu erfassen, wurden funktionelle Experimente durchgeführt ($[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ bzw. zelluläre dynamische Massenumverteilung). Auf diese Weise konnte festgestellt werden, ob es sich bei den Testsubstanzen um den Rezeptor aktivierende Agonisten, neutrale Antagonisten oder um inhibierende inverse Agonisten handelt. Da native Rezeptoren oft keine konstitutive Aktivität zeigen, sind Antagonisten und inverse Agonisten nur durch vorherige Stimulation der Rezeptoren zu unterscheiden. Aus diesem Grund werden auch inverse Agonisten in der vorliegenden Arbeit teilweise als Antagonisten bezeichnet.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Hybridliganden antagonistischer Struktur

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob sich das Konstruktionsprinzip agonistischer Hybridliganden (siehe Kapitel 1.3, Seite 8, Antony et al., 2009) aus einem orthosterischen und einem allosterischen Baustein auf antagonistische Verbindungen übertragen lässt. Es sollte geklärt werden, ob analog strukturierte Hybridliganden, bei denen der agonistische Iperoxo-Teil gegen einen der beiden invers agonistischen Liganden Atropin (Atr) oder Scopolamin (Sco) (siehe Abb. 1.7) ausgetauscht ist, sich ähnlich wie die Hybridagonisten dualsterisch an den M_2 -Rezeptor binden und somit eine analoge Orientierung der beiden Bindungsstellen im aktiven und im inaktiven Rezeptor vorliegt. Diese neuartigen Verbindungen wurden von Dipl.-Chem. Jessica Klöckner und Dr. Jens Schmitz im Arbeitskreis von Frau Prof. Holzgrabe synthetisiert und freundlicher Weise zu Verfügung gestellt.

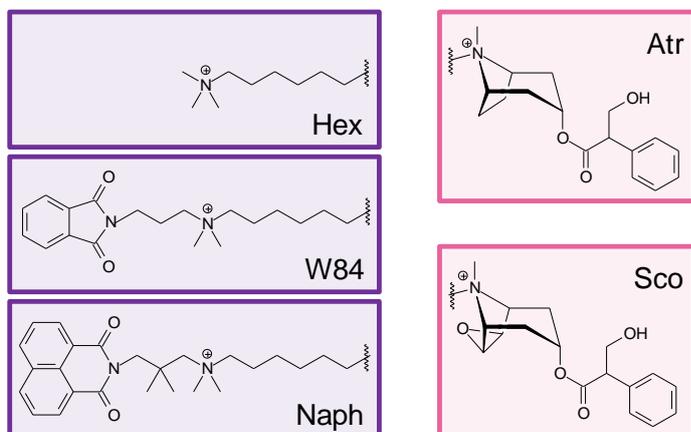


Abb. 1.7: Schematischer Aufbau der untersuchten Antagonist-Hybride.

Die Testsubstanzen sind jeweils aus einem allosterischen (blau) und einem orthosterischen (rot) Baustein zusammengesetzt. Hex: Hexamethonium-Rest, W84: W84-Rest, Naph: Naphmethonium-Rest, Atr: Atropin-Rest, Sco: Scopolamin-Rest. Komplette Strukturformeln siehe Kapitel 2.7, Seite 64.

Im Rahmen der Überprüfung des dualsterischen Bindungsmodus der Hybridliganden ergaben sich folgende Fragestellungen, die mit den in Kapitel 1.3.1 (Seite 10) vorgestellten Methoden beantwortet werden sollten:

1. Es sollte überprüft werden, ob durch die Hybridbildung eine M_2/M_5 -Subtypselektivität erreicht werden kann.
2. Die Bindungstopographie der Hybridliganden antagonistischer Struktur sollte bestimmt werden, in dem die Abhängigkeit von ortho- und allosterischen Epitopen in Bezug auf die Affinität untersucht wurde.
3. Essentielle Strukturmerkmale für die Hybridbindung sollten erfasst werden. Hierfür wurden Versuche mit unterschiedlich großen Hybridverbindungen, sowie mit aliphatisch verlängerten Orthoster-Derivaten durchgeführt.
4. Die Bindungskinetik der Hybridliganden sollte abgeschätzt werden. Möglich wäre zum einen eine verzögerte Assoziation durch die Größe und flexible Gestalt der Hybridmoleküle, und zum anderen eine Dissoziationsverzögerung des orthosterischen Bausteins durch den allosterischen Anker.
5. Funktionell sollte die Erwartung geprüft werden, dass eine Hybridverbindung aus zwei inversen Agonisten wieder einen inversen Agonisten ergibt.

Bindungsverhalten der Ausgangssubstanzen

Zum Vergleich der Hybridantagonisten mit den Muttersubstanzen (Strukturformeln siehe Kapitel 2.7.2 und 2.7.3, ab Seite 65) wurden diese in Kontrollversuchen eingesetzt. Auch wenn deren pharmakologische Eigenschaften in der Literatur bereits beschrieben sind, gab es auch hier noch offene Fragen:

1. Die Subtypselektivität und die Bindungstopographie von Scopolamin sollte charakterisiert werden, denn in der Literatur wird fast ausschließlich über N-Methylscopolamin berichtet.
2. Welche Strukturvariationen an den orthosterischen Liganden vorgenommen werden können und wie sich diese auf die Affinität auswirken, sollte durch den Einsatz modifizierter orthosterischer Derivate untersucht werden.
3. Es sollte überprüft werden, ob die orthosterischen Liganden -sowohl die klassischen wie Atropin und Scopolamin als auch deren am Stickstoff verlängerten Derivate (Strukturformeln siehe Kapitel 2.7, Seite 64)- mit allosterischen Epitopen interagieren.

Orthosterische und dualsterische Agonisten

Weiterhin wurden als Kontrollen die bereits als dualsterisch erkannten Hybridagonisten mitgeführt (Antony et al.; 2009), um zu überprüfen, ob auch unter den in dieser Arbeit verwendeten Inkubationsbedingungen eine dualsterische Interaktion detektiert werden kann. Darüber hinaus sollte Folgendes geklärt werden:

1. Die Ausgangsverbindung Iperoxo zeigte sich in Organbadversuchen als unselektiv, die Hybridliganden hingegen erwiesen sich als M_2 -prävalent (Antony et al., 2009). Es sollte untersucht werden, ob sich dieses Verhalten von Iperoxo in Radioligandbindungsstudien widerspiegelt.
2. Im Rahmen dieser Arbeit stand der verkürzte Hybridagonist Iper-Hex zur Verfügung. Diese Strukturvariation von Hybrid 1 und 2 (Antony et al., 2009) könnte für die Entwicklung potentieller Arzneistoffe hilfreich sein. Es sollte untersucht werden, ob er wie seine längeren Analoga in der Lage ist, beide Epitope zeitgleich zu erreichen.
3. Agonisten besitzen ein komplexes Affinitätsmuster, das sich meist in einer biphasischen Inhibitionskurve in [3H]NMS-Bindungsversuchen an Membransuspensionen äußert. Der Einfluss eines Zusatzes von Guanosindiphosphat (GDP) auf die Affinität der Agonisten zum M_2 -Rezeptor und auf die Kurvensteilheit der Konzentrations-Effekt-Kurven sollte untersucht werden.
4. Der Einfluss des Austauschs der Aminosäure M_2 104 Tyrosin zu Alanin auf die Rezeptoraffinität und Aktivierbarkeit durch die Agonisten sollte bestimmt werden.

2 Methoden und Materialien

2.1 Zellbiologische Arbeiten

Die in dieser Arbeit erfolgten Radioligandbindungsstudien wurden an Membransuspensionen aus Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) durchgeführt. Für verschiedene Fragestellungen sind unterschiedliche CHO-Zelllinien (chinese hamster ovary cells) verwendet worden.

Die Wildtyprezeptoren der humanen muskarinischen Acetylcholinrezeptoren M_1 bis M_5 wurden freundlicher Weise von Prof. Dr. G. Lambrecht aus der Abteilung Pharmakologie des Biozentrums Niederursel, Universität Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt. Diese Zellen sind stabil mit der entsprechenden cDNA transfiziert. Im Folgenden werden sie als CHO- M_1 bis CHO- M_5 bezeichnet. Zusätzlich zu der entsprechenden Rezeptor-cDNA verfügen die Zellen über das „neo“-Reportergen als dominanten Selektionsmarker. Dieses codiert für die Aminoglykosid-Phosphotransferase. Daher können bei Zusatz des zytotoxischen Aminoglykosidantibiotikums G418 (Geneticin) zum Nährmedium nur transfizierte Zellen überleben.

Zur Erzeugung von punktmutierten M_2 -Analoga wurde das FlpIn-System der Firma Invitrogen (R 12) verwendet (siehe 2.2.3.2). Dieses System ermöglicht ebenfalls eine stabile Transfektion. Der Vorteil gegenüber klassischer Transfektion ist, dass der Einbau der neuen DNA an einer definierten Stelle erfolgt. Als Parentalzelllinie dienten FlpIn CHO-Zellen, die freundlicher Weise von Frau Prof. Dr. E. Kostenis (Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellen, die mit diesem System erzeugt wurden, werden im Folgenden als CHO Flp-Zellen bezeichnet.

Ist eine stabile Transfektion nicht erforderlich, so können Zellen auch transient transfiziert werden (siehe 2.2.3.3). Bei dieser Methode exprimieren die Zellen das Zielprotein nur für eine kurze Zeit. Für transiente Transfektionen wurden CHO-K1-Zellen verwendet, die uns

freundlicher Weise von Herrn Dr. M. Eckhardt (Institut für Physiologische Chemie, Universität Bonn) überlassen wurden.

2.1.1 Kultivierung von CHO-Zellen

Alle Arbeitsschritte mit lebenden Zellen erfolgten unter aseptischen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 mit laminarem Luftstrom (G 16). Die Zellen wurden im Brutschrank (G 15) bei 37°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 96% und einem CO₂-Gehalt von 5% in Zellkulturschalen (M 9) im entsprechenden Nährmedium (L 18 bis L 20, Linsel, Dissertation 2008) inkubiert.

Alle 2-3 Tage erreichten die Zellen eine Konfluenz von 80-90%, so dass sie vermehrt werden konnten. Dazu wurde das alte Nährmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml Phosphatpuffer (L 3) gespült.

Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (R 49) für ca. 3 min im Brutschrank inkubiert. Dadurch wurde die Ablösung der adhärenen Zellen von der Kulturschale erreicht. Festsitzende Zellen wurden durch leichtes Klopfen der Kulturschale abgelöst. Direkt im Anschluss wurde die Zellsuspension mit je 10 ml des entsprechenden Nährmediums abgespült. Die Zellsuspensionen einer Charge wurden vereinigt und bei 900 rpm für 4 min bei 4°C zentrifugiert (Rotor JS 4.3, G 3). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in frischem Nährmedium (L 18 bis L 20) resuspendiert. Das Zellkonzentrat einer Ausgangschale wurde auf fünf neue Zellkulturschalen, in die 15-18 ml Nährmedium vorgelegt worden waren, verteilt.

Kryokonservierung von CHO-Zellen

Um die CHO-Zellen dauerhaft lagern zu können, wurden sie in Nährmedium mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, R 7) in flüssigem Stickstoff (G 31) aufbewahrt. Das DMSO dient den Zellen als Gefrierschutz. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit Phosphatpuffer gespült, mittels Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und zentrifugiert. Das Pellet einer Kulturschale wurde in 900 µl des entsprechenden Nährmediums resuspendiert und in ein Kryovial (M 12) überführt, in das vorher 100 µl DMSO vorgelegt worden waren. Die Zellen wurden nun in MisterFrosty[®] (G 22) mit 1°C pro Minute bis auf -80°C abgekühlt und einige Tage später in den Stickstofftank (G 31) überführt.

Auftauen und Revitalisieren von CHO-Zellen

Wenn eine Zelllinie neu in Kultur gebracht werden sollte, wurde ein entsprechendes Kryovial aus dem Stickstofftank entnommen und rasch aufgetaut. Die DMSO-haltige Zellsuspension wurde möglichst schnell mit 10 ml des entsprechenden Nährmediums verdünnt und für 4 min bei 4°C und 900 rpm zentrifugiert (G 3), um die Zellen vor dem toxischen Einfluss des DMSO zu schützen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 2 ml frischem Nährmedium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf eine Zellkulturschale (M 9) mit ca. 15 ml Nährmedium überführt.

2.1.2 Membranpräparation

Die Radioligand-Bindungsexperimente wurden nicht an lebenden Zellen, sondern mit Membranen zerkleinerter Zellen durchgeführt. Wenn 40 Platten eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten, wurde das alte Nährmedium abgesaugt und durch frisches Nährmedium mit 5 mM Butyrat (L 2) ersetzt. Das Butyrat steigert die Proteinbiosynthese und damit die Expressionsrate der Muskarinrezeptoren. Die Zellen wurden 18 Stunden in diesem Medium inkubiert, anschließend fand die Präparation statt.

Am Tag der Membranpräparation wurde von je fünf Schalen das alte Nährmedium abgesaugt und die Zellen wurden mit 2,4 ml eisgekühltem Homogenisationspuffer (L 9) benetzt. Mittels eines Zellschabers (M 27) wurden die Zellen von den Kulturschalen abgelöst. Die Zellsuspension von je fünf Platten wurde in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt und auf Eis gelagert. Die erste Platte wurde mit 6 ml eisgekühltem Homogenisationspuffer (L 9) gespült. Der Puffer wurde auf weitere vier Platten überführt und anschließend ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Mit den anderen Schalen wurde ebenso verfahren. Die abgelösten Zellen wurden zweimal im Abstand von ca. 2 min für je 20 s mit Hilfe eines Polytron-Homogenisators (Stufe 6, G 28) zerkleinert. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 2°C mit 40000 g zentrifugiert (Rotor JA 25.5, G 3). Der Überstand wurde verworfen, die Pellets wurden in je 15 ml eisgekühltem Zentrifugationspuffer (L 27) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Anschließend wurden alle Pellets in insgesamt 40 ml Inkubationspuffer (L 10) aufgenommen und in PP-Röhrchen (M 19) zu 500 bzw. 1000 µl bei -80°C eingefroren.

2.2 Molekularbiologische Arbeiten

Die in dieser Arbeit verwendeten CHO-Zelllinien und Rezeptormutanten wurden über molekularbiologische Verfahren erzeugt. Wie bereits in Kapitel 2.1 (Seite 17) erwähnt, standen die Wildtypzelllinien der humanen Muskarinrezeptoren bereits zur Verfügung. Die meisten der verwendeten Zelllinien zur Expression von Rezeptormutanten im FlpIn-System waren zuvor von Frau Dr. Anna Kebig und Frau Dr. Marion Mohr-Andrä hergestellt worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die allosterische Doppelmutante $M_2^{177\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + 423\text{Thr}\rightarrow\text{His}}$ erzeugt, bei der subtypelektivitätsgebende Aminosäuren der allosterischen Bindungsstelle des M_2 -Rezeptors gegen die korrespondierenden Aminosäuren des M_5 -Rezeptors ausgetauscht sind. Eine graphische Darstellung der Lokalisation der einzelnen Aminosäuren findet sich in Abb. 1.6 (Seite 11).

2.2.1 Zielgerichtete Mutagenese

Für die hier dargestellte Mutagenese wurde ein käuflich erwerbliches System von Stratagene (QuickChange™ site-directed mutagenesis kit, R 44) verwendet. Genaue Angaben zum Vorgehen sowie zu den verwendeten Reagenzien befinden sich im Handbuch. Hier soll nur das zu Grunde liegende Prinzip erläutert werden. Für die Mutagenese wurde das pcDNA5/FRT-Plasmid aus dem FlpIn-System verwendet, welches über eine Ampicillin-Resistenz verfügt (weiteres zum FlpIn-System siehe Kap. 2.2.3.2). Diese Resistenz ist wichtig für die Selektionierung der erfolgreich transformierten Bakterien. Das Gen für den M_2 -Rezeptor mit der Mutation $^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ ist bereits zuvor in das Plasmid eingebracht worden. Um eine Aminosäure in einem Protein auszutauschen, muss die Basensequenz im entsprechenden Gen verändert werden. Hierzu wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion ein bis drei Basen im codierenden Triplet ausgetauscht, um die gewünschte Aminosäure zu erhalten. Im vorliegenden Fall wurde das Codon ACA gegen CAT ausgetauscht, um einen Austausch von Threonin gegen Histidin zu erreichen.

Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist ein enzymatisches Verfahren zur Vervielfältigung von DNA.

Um über PCR eine Mutation einzuführen, werden Primer benötigt, die den gewünschten Basenaustausch enthalten. Der Primer sollte 20-35 Basen lang sein, und die zu verändernde Struktur sollte sich mittig befinden. Es wurden sowohl für die Ziel-DNA, als auch für die „anti-sense“-DNA Primer benötigt. Der Guanosin- und Cytosin-Gehalt sollte zwischen 40-60 % betragen, um eine Schmelztemperatur von 55-80°C zu erhalten.

Die zu mutierende DNA wurde mit den entsprechenden Primern und einem Nukleotidmix analog Tab. 2.1 A in dünnwandigen Reaktionsgefäßen (M 14) vermischt. Nach Zusatz von 1 µl PfuTurbo®-DNA-Polymerase wurden die Ansätze in einen Thermocycler gegeben. Das Temperaturprogramm ist in Tab. 2.1 B dargestellt.

A: Reaktionsansatz		B: Temperaturprotokoll			
5 µl	10x Probenpuffer	Anzahl Zyklen	Temperatur	Dauer	Vorgang
2 µl	Plasmid-DNA-Template (5 ng/µl)				
2 µl	Oligonukleotid-Primer 1 (62,5 ng/µl)	1	95°C	30 s	initiale Denaturierung
2 µl	Oligonukleotid-Primer 2 (62,5 ng/µl)				
1 µl	dNTP-Mix	16	95°C	30 s	Denaturierung
38 µl	sterilisiertes Aqua dest.		55°C	60 s	Annealing
1µl	PfuTurbo® DNA-Polymerase		68°C	12 min	Elongation
		1	4°C	∞	Konservierung

Tab. 2.1: A: Pipettierschema für eine Polymerasekettenreaktion mit dem QuickChange site-directed mutagenesis kit (R 44)
B: Temperaturverlauf für eine Polymerasekettenreaktion, bei der drei Basen ausgetauscht werden sollen

Jeder Cyclus beginnt mit einer Denaturierung. Während dieser Phase wird die doppelsträngige DNA aufgeschmolzen. Im darauf folgenden Schritt wird die Temperatur abgesenkt. Nun können sich komplementäre DNA-Strukturen zusammenlagern, es kommt zur Anlagerung der Primer an die entsprechende DNA (Annealing). Bei 68°C hat die thermostabile PfuTurbo® DNA-Polymerase ihr Effektivitätsoptimum. Die DNA wird vom Primer ausgehend in 5'→3'-Richtung verlängert (Elongation). Die eingesetzte Polymerase benötigt 2 min für den Einbau von 1000 Basen. Daher benötigt sie für die Replikation eines Plasmids von 6 kb 12 min. Nach 16 Cyclen ist die DNA ausreichend vervielfältigt.

Um das Ausgangsplasmid im Anschluss zu entfernen, wird nach erfolgter PCR 1 µl der Endonuklease DPN-1 zugesetzt. Diese erkennt methylierte DNA und verdaut sie. Somit befindet sich nur noch die neu gewonnene DNA mit der gewünschten Mutation im Ansatz.

Transformation

Transformation bezeichnet das Einbringen von löslicher DNA in einen Organismus. Im vorliegenden Fall wurde über das Hitze-Schock-Verfahren die erhaltene DNA in *Escherichia coli* (*E. coli*) eingebracht. Dies dient zur weiteren Vermehrung der Plasmide.

Die *E. coli* Zellen (superkompetente XL1-Blue Zellen) wurden aufgetaut und mit 1 µl der zuvor erhaltenen DNA vermischt. Erst wurde die Mischung für 30 min auf Eis gelagert, dann für 45 s in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten und anschließend wieder auf Eis gelagert. Während der Erwärmung auf 42°C weiten sich die Poren und die Zellen können vermehrt DNA aufnehmen. Nach 2 min wurden zu jedem Ansatz 500 µl vorgewärmte NZY⁺-Lösung (L 23) gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen für 1 h bei 37°C im Orbitalschüttler (G 25) inkubiert. Während dieser Zeit exprimierten die erfolgreich transformierten Zellen das Enzym β-Laktamase, so dass diese nachfolgend auf Ampicillin-haltigem Medium selektiert werden konnten.

Um einzelne Zellklone zu erhalten, wurde die Zellsuspension im Anschluss auf Agarplatten (L 16) mit sterilen Impfösen ausplattiert. Über Nacht wurden diese Platten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag konnten einzelne Zellkolonien, die jeweils aus einem einzigen Klon hervorgegangen waren, mit einer sterilen Pipette entnommen werden. Die Bakterien auf den Agarplatten können bei 2-8°C für einige Wochen gelagert werden.

2.2.2 Plasmid-DNA-Gewinnung

Um die zuvor hergestellte Plasmid-DNA aufzureinigen, wurde das Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen (R 43) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Hier soll nur auf die zugrunde liegenden Prinzipien eingegangen werden.

Zur Vervielfältigung der DNA wurde aus den transformierten Bakterien eine Übernachtskultur angesetzt. Dazu wurde eine monoklonale Zellkolonie einer Agarplatte mit einer sterilen Pipette entnommen (siehe 2.2.1) und in 500 ml LB-Medium (L 17) bei 37°C für ca. 17 h im Orbital Shaker (G 25) bei 200 rpm inkubiert. Aus dieser Zellsuspension wurde am Folgetag die DNA gewonnen.

Am nächsten Morgen wurde die Zellsuspension bei 4°C mit 7000 rpm für 15 min abzentrifugiert (Rotor JLA 10.5, G 3). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in RNase A-haltigem Puffer resuspendiert (aus R 43). Im Anschluss wurden die Zellen durch Zugabe von NaOH-Natriumdodecylsulfat-Puffer lysiert. Durch die alkalische Lyse wurden Zellbestandteile freigesetzt und Proteine denaturiert. Die freiwerdende RNA wurde durch die RNase A abgebaut, um die weitere Plasmid-DNA-Gewinnung nicht zu stören. Nach exakt fünf Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von eisgekühlter Kaliumacetatlösung beendet, um eine irreversible Denaturierung der DNA zu verhindern. Bei der Neutralisierung fallen die denaturierten Proteine aus. Die kleine ringförmige DNA bleibt in Lösung und renaturiert. Zur Abtrennung wurde der Ansatz für 30 min bei 4°C mit 16000 rpm zentrifugiert (G 3, Rotor JA 25.5). Der DNA-haltige Überstand wurde vorsichtig in eine zweite Reihe Zentrifugengläser abdekantiert und erneut auf gleiche Weise zentrifugiert.

Im Anschluss wurde der Überstand auf bereits äquilibrierte Anionenaustauschersäulen gegeben. Das positiv geladene Harz retiniert die negativ geladene DNA, die übrigen Proteine können die Säule passieren. Nach zwei Waschschrritten wurde die DNA mit einem Puffer hohen Salzgehalts eluiert. Dieser Durchfluss wurde aufgefangen und mit Isopropanol versetzt. Durch vorsichtiges Schwenken kam es zur Ausfällung der DNA. Dieser Ansatz wurde bei 4°C mit 4300 rpm für 80 min zentrifugiert (Rotor JA 4.3, G 3). Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das DNA-haltige Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, um letzte Salzreste zu entfernen. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (Rotor 4.3, 4300 rpm, 15 min, 4°C, G 3). Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet für 5-10 min an der Luft trocknen gelassen. Die DNA wurde in 600 µl sterilem TE-Puffer (L 26) resuspendiert, in Kryovials überführt (M 12) und bei -20°C gelagert.

DNA-Gehaltsbestimmung

Die Gehaltsbestimmung der gewonnenen DNA erfolgte photometrisch bei 260 nm. Die DNA wurde im Verhältnis 1:50 mit Aqua pro analysi (R 5) verdünnt, so dass die Messung im linearen Bereich erfolgt. Der Gehalt lässt sich nach folgender Gleichung berechnen:

$$\text{Plasmid-DNA-Gehalt } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{260} * 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l} * 50$$

Gleichung 1

0,05 µg/µl: Kehrwert des Extinktionskoeffizienten
50: Verdünnungsfaktor

Zusätzlich wurde die Absorption bei 280 nm vermessen. Bei dieser Wellenlänge haben Proteine ein Absorptionsmaximum. Durch den Quotienten A_{260} / A_{280} kann die Reinheit der gewonnenen DNA bestimmt werden. Der Quotient sollte einen Wert von ca. 2,0 haben.

DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der gewünschten Mutation wurden DNA-Proben zur Sequenzierung an die Firma SeqLab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Verfahren Standard HotShots) geschickt. Dort wurde die Basensequenz mit der Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977) ermittelt. Mit Hilfe des Programms ChromasPro[®] wurde anschließend überprüft, ob die Mutation an der gewünschten Stelle erfolgreich gewesen ist.

Herstellen von Glycerol-Stocks

Für weitere DNA-Präparationen wurde ein Teil der Bakterienübernachtskultur in Form von Glycerol-Stocks bei -80°C konserviert. Hierfür wurden 900 μl der Bakteriensuspension in einem Kryovial (M 12) mit 300 μl Glycerol vermischt und bei -80°C gelagert. Mit diesen eingefrorenen Bakterien kann dann alternativ zur frisch transformierten Kultur von einer Agarplatte (siehe 2.2.1) eine neue Übernachtskultur für eine Plasmid-DNA-Gewinnung angesetzt werden.

2.2.3 Transfektion

2.2.3.1 Transfektionsmethoden

Die Transfektion ist eine Sonderform der Transformation, und beschreibt das Einbringen von löslicher DNA in eukaryotische Zellen. Es wird zwischen transienter und stabiler Transfektion unterschieden. Bei der stabilen Transfektion wird die eingebrachte DNA in die Wirts-DNA eingebaut und verbleibt im Organismus. Im Fall der transienten Transfektion befindet sich die eingebrachte DNA gelöst im Cytosol und wird nach einigen Tagen abgebaut. Der Vorteil dieser letztgenannten Methode ist, dass sie zeitsparend ist, jedoch ist die Transfektion auch für jede Verwendung der Zellen (z.B. Membranpräparation, siehe 2.1.2) erneut nötig.

Das Einbringen der DNA ist auf verschiedenen Wegen möglich. Die Zellen können die DNA über Virensysteme, Mikroinjektion, Diffusion oder in Form von Calciumphosphat-DNA-

Kristallen über Endocytose aufnehmen. Transfektionsreagenzien aus Liposomen können mit der Wirtszellmembran verschmelzen und so die Plasmid-DNA einbringen.

In der vorliegenden Arbeit wurde das käuflich erwerbliche PolyFect[®] (R 41) verwendet. Dieses Reagenz besteht aus Dendrimeren. Das sind komplexe, hochmolekulare Strukturen, deren Oberfläche über eine Vielzahl von funktionellen Gruppen verfügt, welche durch eine große Anzahl von Aminogruppen alkalisch reagieren. Die Polykationen können die negativ geladene DNA einschließen. Diese Komplexe werden von Zellen über Endocytose aufgenommen. Die alkalischen Dendrimere neutralisieren den sauren pH-Wert in den Endosomen und verhindern so den Abbau der DNA. Im Cytosol schließlich wird die DNA freigesetzt.

2.2.3.2 Stabile Transfektion

FlpIn-System

Für die stabile Transfektion wurde das FlpIn-System der Firma Invitrogen (R 12) verwendet. Dieses System hat den Vorteil, dass der Einbau der neuen DNA an einer definierten Position im Genom erfolgt. Bei herkömmlicher stabiler Transfektion ist der Einbau zufällig. Über Einzelzellklonierung muss dann ein geeigneter Klon identifiziert werden, der das gewünschte Gen in ausreichendem Maße exprimiert. Dieses Verfahren entfällt beim FlpIn-System.

Eine FlpIn-Wirtszelllinie verfügt über eine FRT-Schnittstelle (Flp Recombination Target site). Diese Erkennungssequenz ist gemeinsam mit einem Zeocin-Fusionsprotein im Anschluss an den viralen SV40-Promotor lokalisiert. Zeocin ist ein Breitspektrumantibiotikum aus der Bleomycin-Familie. Es interkaliert in der DNA und führt zu Strangbrüchen. Das Fusionsprotein ist in der Lage, Zeocin zu komplexieren und führt daher zu einer Zeocin-resistenz. Folglich konnte die Wirtszelllinie in Zeocin-haltigem Nährmedium selektiert werden (100 µg/ml in L 20).

Neben der geeigneten Wirtszelllinie wurde ein Plasmid (pcDNA5/FRT) benötigt. Dieses verfügt ebenfalls über eine FRT-Schnittstelle. Als Selektionsmarker besitzt es eine Ampicillin- und eine Hygromycin B -Resistenz (β -Laktamase- bzw. Aminoglykosidantibiotikum). In dieses Plasmid lässt sich die gewünschte cDNA (gene of interest) mittels Restriktion und Ligation einbringen.

Die Besonderheit des FlpIn-Systems ist es nun, dass bei der Transfektion das so genannte pOG44-Plasmid cotransfiziert wird, welches die Flp-Rekombinase exprimiert. Dieses Enzym schneidet gezielt an den FRT-Stellen, und verbindet diese beiden Stellen. Durch die

Verknüpfung der beiden DNA-Fragmente wurde die Expression des Zeocin-Fusionsproteins unterbunden und gleichzeitig die Hygromycin B - Resistenz aktiviert. Folglich war die erfolgreich transfizierte Zelllinie sensitiv gegenüber Zeocin, jedoch resistent gegen Hygromycin B (800 µg/ml Nährmedium). Die erwünschte cDNA gelangte an eine definierte Position im Genom und wurde durch den humanen Cytomegalievirus-Promotor (CMV) abgelesen.

Durchführung

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen der Wirtszelllinie mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (G 24) gezählt und auf eine Zelldichte von $1,6 \times 10^6$ Zellen eingestellt.

Für die Transfektion wurde eine DNA-Mischung aus dem Plasmid mit dem gewünschten Gen (pcDNA5/FRT) und dem pOG44-Plasmid im Verhältnis 1:9 hergestellt. 6 µg dieser DNA Mischung wurden mit FKS-freiem Nährmedium auf 300 µl verdünnt und mit 30 µl PolyFect[®] Reagenz (R 41) vermischt.

Die über Nacht angewachsenen Zellen wurden gewaschen und mit neuem Medium versetzt. Der zuvor vorbereitete DNA-Ansatz wurde zum Medium gegeben und die Zellen wurden - wie unter 2.1.1 beschrieben- inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, um das Transfektionsreagenz zu entfernen. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und auf eine Konfluenz unter 25% ausgedünnt. Anschließend wurde mit Hygromycin B-haltigem Medium (800 µg/ml, in L 20) kultiviert, um die erfolgreich transfizierten Zellen zu selektieren. Nun wurde alle 2-3 Tage das Medium gewechselt.

Nach einigen Wochen vermehrten sich die resistenten Zellen und die ohne pcDNA5/FRT-Plasmid transfizierte Kontrolle starb. Die resistenten Zellen wurden nun bei einer Hygromycin-Konzentration von 400 µg/ml weiter kultiviert. Wie unter 2.1 beschrieben wurden einige Zellen zur Verwahrung eingefroren und andere für eine Membranpräparation vermehrt.

2.2.3.3 Transiente Transfektion

Die Durchführung der transienten Transfektion entsprach weitgehend der der stabilen Transfektion. Jedoch wurden die Zellen nach der Transfektion nicht selektiert, sondern 48 h nach dem Einbringen der DNA durch Membranpräparation geerntet. Bei diesem Verfahren wurde das Medium nicht 18 h vor der Membranpräparation gegen Butyrat-haltiges Medium ersetzt.

Auch hier wurde das PolyFect[®]-Reagenz (R 41) verwendet. Die Arbeitsschritte entsprechen denen unter 2.2.3.2 aufgeführten. Es wurde jedoch das reine Plasmid ohne pOG44-Plasmid transfiziert.

2.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Proteingehalt der eingesetzten Membransuspensionen mit der Methode nach Lowry (Lowry et al., 1951) bestimmt. Diese besteht aus zwei Farbreaktionen. Zunächst entsteht eine blaue Farbe aufgrund von quadratisch-planaren Komplexen zwischen Peptidbindungen und Kupfer(II)-Ionen (Biuret-Reaktion) in alkalischer Lösung. Danach wird das gelbe Folin-Ciocalteus-Reagenz (ein Gemisch aus Wolfram- und Molybdän-Heteropolysäuren) durch diesen Komplex reduziert. Es entsteht eine intensive Blaufärbung, die dem Proteingehalt proportional ist und bei 500 nm ausgewertet werden kann.

Hierzu wurde eine Kalibrierreihe mit humanem Serumalbumin im Inkubationspuffer (L 10) in einem Konzentrationsbereich von 0-2 mg/ml erstellt. Die Proben wurden in drei sinnvollen Verdünnungsstufen eingesetzt (meist pur, 1+1 und 1+3, mit Puffer verdünnt). Für jede Konzentration wurden zwei Ansätze vermessen.

Zunächst wurden 200 µl der Kalibrierlösungen bzw. der Proben und 2,0 ml Arbeitslösung (L 14) in ein Reagenzglas gegeben. Nach 10 min Inkubation wurden unter Schütteln 0,2 ml Farblösung (L 15) zugegeben. Die Ansätze wurden unter Lichtausschluss erneut 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden alle Ansätze bei einer Wellenlänge von 500 nm in einem UV/Vis-Spektrometer (G 36) vermessen. Die Eichlösung ohne Albumin diente zum Nullabgleich.

Mit den Daten der Kalibrierlösungen wurde mit Hilfe von Microsoft Excel[®] 2007 eine Kalibriergerade erstellt. Anhand der so bestimmten Geradengleichung wurde der Proteingehalt der Proben berechnet.

2.4 Radioligand-Bindungsstudien

2.4.1 Filtrationsmethode

Die Abtrennung der freien von der membrangebundenen Radioaktivität erfolgte mittels Vakuumfiltration an einem Tomtec[®] Harvester (G 34, G 37). Hierbei handelt es sich um eine halbautomatische Filtrationsanlage. Die Proben wurden manuell in eine Mikrotiterplatte aus Polypropylen mit 96 Vertiefungen pipettiert (M 3). Nach ausreichend langer Inkubationszeit wurden alle Proben einer Platte zeitgleich mit dem Harvester abgesaugt. Anschließend wurde der Filter zweimal möglichst rasch mit eiskaltem Wasser gespült.

Die Membranproteine wurden dabei von einem Glasfaserfilter der Firma Perkin Elmer (M 21) retiniert. Zur Absenkung der unspezifischen Bindung wurde der Filter 10 min vor der Filtration in eiskalter PEI-Lösung 0,1% (R 30) eingelegt. Das positiv geladene Polyethylenimin bindet sich an die negative Oberfläche der Filtermatte.

Nach der Filtration wurde die Filtermatte für 3 min bei 400 Watt in einer Mikrowelle (G 20) getrocknet. Für die Detektion (siehe Kap.2.4.3) wurde ein Szintillationswachs (M 13) auf die getrocknete Filtermatte geschmolzen. Der wieder ausgehärtete und erkaltete Filter wurde in eine Klarsichthülle gegeben (M 23) und in einem Szintillationsmessgerät der Firma Wallac (G 19) vermessen.

2.4.2 Zentrifugationsverfahren

Neben dem oben beschriebenen Filtrationsverfahren kann der gebundene Anteil des Radioliganden auch mittels Zentrifugation von freiem Liganden abgetrennt werden. Dieses Verfahren ist zwar etwas aufwändiger, hat jedoch den Vorteil, dass während des Trennprozesses das Gleichgewicht nicht gestört wird (Massenwirkungsgesetz, Gleichung 3, Kap. 2.4.5). Durch die Zentrifugalkraft werden die Membranproteine mit den enthaltenen Rezeptoren pelletiert. Gebundener Radioligand wird mit dem Rezeptor abzentrifugiert. Da sich im Pellet sowohl freie, als auch besetzte Rezeptoren im gleichen Mengenverhältnis befinden wie vor der Zentrifugation besteht, wird das Reaktionsgleichgewicht nicht beeinflusst.

Im Gegensatz dazu wird bei der Filtration durch die Wasch- und Absaug Schritte freier Radioligand entfernt, so dass vermehrt Radioligand abdissoziiert, um ein neues Gleichgewicht

wieder herzustellen. Bei Rezeptor-Ligand-Komplexen mit einer schnellen Dissoziationskinetik ($HWZ < 1$ min) kann es trotz eisgekühlter Waschflüssigkeit zu einer relevanten Reduktion der spezifischen Bindung kommen. Folglich kann die maximale Bindung solcher Mutanten besser mit dem Zentrifugationsverfahren bestimmt werden.

Die Versuche wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit Sicherheitsverschluss (M 20) durchgeführt, deren Oberflächen zuvor mit Sigmacote[®] (R 47) silanisiert wurden. Diese Behandlung führt zu einem dünnen hydrophoben Film auf Glas – bzw. Polypropylenoberflächen. Die chlorierten Organopolysiloxane des Reagenzes reagieren mit Wassermolekülen und Silanolgruppen auf der Gefäßoberfläche. Im Anschluss wurden die Gefäße mehrmals mit Aqua dest. (R 4) gespült und anschließend im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

Die Versuchsansätze wurden nach ausreichend langer Inkubationszeit in einer Tischzentrifuge (G 5, Rotor F241.5) bei 15°C mit maximaler Geschwindigkeit ($20.937 \text{ g} \hat{=} 15.300 \text{ rpm}$) für 20 min abzentrifugiert. Bei einem Reaktionsansatz von 500 µl wurden 480 µl Überstand abgenommen und verworfen. Anschließend wurden Röhrenwand und Oberfläche der Pellets mit 100 µl gekühltem Inkubationspuffer (L 10) gewaschen. Die Waschlösung wurde direkt wieder abgenommen, um eine Abdissoziation des Radioliganden zu verhindern. Schließlich wurde das Pellet in 80 µl Inkubationspuffer resuspendiert. Von den nun resultierenden 100 µl Probensuspension wurden 50 µl entnommen und in Szintillationsgefäße (M 24) gegeben. Die Proben wurden mit 5 ml Szintillations-Cocktail (R 45) vermischt und im Beckmann Counter (G 4) analog Kap. 2.4.3 vermessen.

Die Zusammensetzung der Proben sowie die Auswertung sind identisch mit den Filtrationsexperimenten und werden in Kap. 2.4.6 und 2.4.7 beschrieben. Lediglich die Versuchsgefäße und die Abtrennung der gebundenen von der freien Radioaktivität unterscheiden sich.

2.4.3 Szintillationsverfahren

Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte nach dem Szintillationsverfahren. Hierbei werden Elektronen, die bei einem β^- -Zerfall emittiert werden, durch geeignete Szintillatorsubstanzen in Lichtblitze umgewandelt. Bei der Flüssigszintillation werden erst Lösungsmittelmoleküle, bei der Feststoffsintillation werden die Szintillatorsubstanzen direkt angeregt. Als Szintillatoren eignen sich bevorzugt voluminöse organische Verbindungen, aber auch einige anorganischen Kristalle. Durch die Energie der Elektronen aus dem radioaktiven Zerfall werden Hüllenelektronen der Szintillatoren in einen angeregten Zustand angehoben. Bei dem

Rückfall zum Grundzustand emittieren sie Photonen. Diese Photonen können mit Hilfe eines Photomultipliers in elektrische Impulse umgewandelt werden. Die Intensität der Impulse ist ein Maß für die Energie der β^- -Teilchen, die Anzahl der Impulse ist proportional zu der Anzahl der radioaktiven Zerfälle.

Sowohl bei Tritium ($[^3\text{H}]$) als auch bei Schwefel-35 ($[^{35}\text{S}]$), die in den Versuchen verwendeten Isotope, handelt es sich um β^- -Strahler. Ein Neutron wandelt sich unter Aussendung eines β^- -Teilchens und eines Antineutrinos (ν) in ein Proton um. Im Fall des Tritiums wandelt sich das Wasserstoffatom in ein Heliumion um.



Für die Vermessung von Lösungen, Proben aus Zentrifugationsexperimenten, sowie von Wischtests auf kleinen Rundfiltern wurde das Verfahren der Flüssigszintillation verwendet. Die Filtermatten des Tomtec Harvesters wurden mit Hilfe der Feststoffsintillation detektiert.

2.4.4 Bestimmung der Radioligandkonzentration

Für die Berechnung der Affinität der Testsubstanzen und der Anzahl der Bindungsstellen (siehe 2.4.5) ist die genaue Konzentration des Radioliganden nötig. Hierfür werden 50 μl der eingesetzten Stammlösung in ein Szintillationsvial (M 24) gegeben und mit 5 ml des Szintillationscocktails ReadyProtein (R 45) vermischt. Nach einer angemessenen Ruhezeit wird die Lösung mittels Flüssigszintillation vermessen. Die erhaltene Radioaktivität wird über die spezifische Aktivität nach Gleichung 2 in die Konzentration (in nmol/l) umgerechnet.

$$[\text{L}] = \frac{A}{A_{\text{spez}} \cdot 2220 \cdot V}$$

Gleichung 2

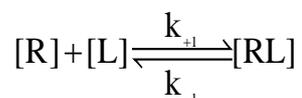
- A: gemessene Aktivität [dpm]
- A_{spez} : spezifische Aktivität [Ci/mmol]
- V: eingesetztes Volumen [ml]
- 2220: Umrechnungsfaktor von nCi nach dpm
 - 1 Bq = 60 dpm
 - 1 Ci = $3,7 \cdot 10^{10}$ Bq
 - 1 nCi = 37 Bq = 2220 dpm

Die Untergrundradioaktivität der Umgebung wurde in zwei Szintillationsvials mit je 5 ml purem Szintillationscocktail bestimmt (Szintillationsmethode siehe Kap.2.4.3). Die Bestimmung der Radioligandkonzentration erfolgte jeweils zweifach.

2.4.5 Theoretische Grundlagen der orthosterischen Ligand-Rezeptor-Interaktion

Membranständige Rezeptoren interagieren zur Signalgenerierung mit extrazellulären Liganden. Diese Interaktion lässt sich durch Radioligandbindungsstudien erfassen. Zu einer rezeptorhaltigen Membransuspension (siehe 2.1.2) wird ein radioaktiv markierter Ligand gegeben. Nach einer festgelegten Inkubationszeit werden die Rezeptoren durch Filtration (oder Zentrifugation) von der übrigen Suspension abgetrennt. Die messbare Radioaktivität des Filtrerrückstands entspricht dem gebundenen Liganden.

Die Interaktion des freien Liganden [L] mit dem freien Rezeptorprotein [R] zu einem Ligand-Rezeptor-Komplex [RL] entspricht dem Massen-Wirkungsgesetz. Es handelt sich um eine reversible Bindung zweier homogener Komponenten.



Gleichung 3

- [R]: freier Rezeptor
- [L]: freier Ligand
- [RL]: Rezeptor-Ligand-Komplex
- k_{+1} : Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
- k_{-1} : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Für die Geschwindigkeiten der Hin- und Rückreaktion ergeben sich folgende Gleichungen:

$$v_{\text{Ass}} = k_{+1} \cdot [\text{R}] \cdot [\text{L}]$$

Gleichung 4

$$v_{\text{Diss}} = k_{-1} \cdot [\text{RL}]$$

Gleichung 5

v_{Ass} : Geschwindigkeit der Assoziation

v_{Diss} : Geschwindigkeit der Dissoziation

Wenn das System aus Rezeptor, Ligand und Rezeptor-Ligand-Komplex im Gleichgewicht ist, so sind die Geschwindigkeiten von Assoziation und Dissoziation identisch. Folglich können sie gleichgesetzt werden. Das dadurch beschriebene Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten liefert die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D . Der reziproke Wert ist die Gleichgewichtsassoziationskonstante K_A .

$$v_{\text{ass}} = v_{\text{diss}} = k_{+1} \cdot [\text{R}] \cdot [\text{L}] = k_{-1} \cdot [\text{RL}]$$

Gleichung 6

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

Gleichung 7

K_D : Gleichgewichtsdissoziationskonstante

K_A : Gleichgewichtsassoziationskonstante

Nach Gleichung 7 ergibt sich, dass K_D der Ligandkonzentration entspricht, bei der die Hälfte aller verfügbaren Rezeptor-Ligand-Komplexe gebildet sind, da in diesem Fall gilt: $[\text{R}] = [\text{RL}]$ und somit $K_D = [\text{L}]$. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ist folglich ein Maß für die Affinität eines Liganden zu dem untersuchten Rezeptor.

In einem realen System gibt es nur eine begrenzte Anzahl an Rezeptoren und somit auch eine maximale Anzahl an Bindungsstellen B_{max} . B_{max} entspricht der Summe der freien Rezeptoren und der Rezeptor-Ligand-Komplexe. Die Reaktion entsprechend Gleichung 3 ist also sättigbar.

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

Gleichung 8

Die Anzahl der besetzten Bindungsstellen B entspricht der Anzahl der Rezeptor-Ligand-Komplexe [RL].

$$B = [RL] = B_{\max} - [R]$$

Gleichung 9

Wird Gleichung 9 mit der freien Ligandkonzentration multipliziert und ersetzt $[R] \cdot [L]$ durch $K_D \cdot [RL]$ bzw. $K_D \cdot B$ (Gleichung 7) und löst nach B auf, so ergibt sich die Abhängigkeit der ausgebildeten Rezeptor-Ligand-Komplexe von der Ligandkonzentration, dem K_D -Wert und von B_{\max} .

$$B \cdot [L] = B_{\max} \cdot [L] - [R] \cdot [L]$$

$$B \cdot [L] = B_{\max} \cdot [L] - K_D \cdot B$$

$$B \cdot ([L] + K_D) = B_{\max} \cdot [L]$$

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

Gleichung 10

Die oben dargestellten Zusammenhänge sind die mathematischen Grundlagen der im Folgenden beschriebenen Radioligandbindungsversuche. Die Konstanten K_D und B_{\max} sind substanzspezifisch und müssen für jede Charge Membransuspension neu bestimmt werden.

2.4.6 Homologe Konkurrenzexperimente

Um die Parameter K_D und B_{\max} bestimmen zu können, wurden homologe Konkurrenzversuche durchgeführt. Hierbei sind der eingesetzte radioaktiv markierte Ligand sowie der nicht radioaktive Kompetitor strukturell identisch. Die Konzentration des Radioliganden bleibt konstant, während der Kompetitor in steigenden Konzentrationen eingesetzt wird. Für Muskarinrezeptoren wird häufig der orthosterische Antagonist N-Methylscopolamin (NMS) eingesetzt, der im Fall des Radioliganden an einer Methylgruppe tritiiert ist ($[^3\text{H}]\text{NMS}$) (Strukturformel siehe Abb. 2.6, Seite 64).

Die Auswertung eines solchen Inhibitionsexperiments erfolgt unter Verwendung der „**Vier Parameter logistischen Gleichung**“ nach Barlow und Blake (1989). Hierfür wird die gemessene Radioaktivität, die den Rezeptor-Ligand-Komplexen entspricht, gegen den Logarithmus der eingesetzten Konzentrationen des Inhibitors aufgetragen. Es ergibt sich eine sigmoidale Kurve, die durch Gleichung 11 beschrieben wird:

$$B_{\text{ges}} = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{\log \text{IC}_{50} - \log [\text{X}] \cdot n_H}}$$

Gleichung 11

B:	Bindung des Radioliganden
Bottom:	Unteres Kurvenniveau
Top:	Oberes Kurvenniveau
IC ₅₀ :	Konzentration des Kompetitors, der die maximale Bindung des Liganden auf 50% absenkt
[X]:	Konzentration des Kompetitors
n _H :	Kurvensteilheit, Hill-Koeffizient

Das obere Plateau („Top“) entspricht der Gesamtbindung des Radioliganden, welches in Abwesenheit des Kompetitors bestimmt wird. Das untere Plateau („Bottom“) stellt die nicht-sättigbare Fraktion der Bindung des Radioliganden dar, z.B. die unspezifische Adsorption an Zellmembranen oder an Filtermaterial. Wird anstelle der nichtmarkierten Form des Radioliganden ein anderer bekannter spezifischer orthosterischer Rezeptorligand eingesetzt, stellt das untere Plateau die unspezifische Bindung des Radioliganden dar. Diese wird durch einen im Überschuss vorliegenden strukturell verschiedenen orthosterischen Kompetitor bestimmt, der nicht radioaktiv markiert ist. Im Fall der Muskarinrezeptoren wird Atropin verwendet. Die spezifische Bindung [B] entspricht der Gesamtbindung abzüglich der unspezifischen Bindung. Es ergibt sich eine Kurve wie in Abb. 2.1.

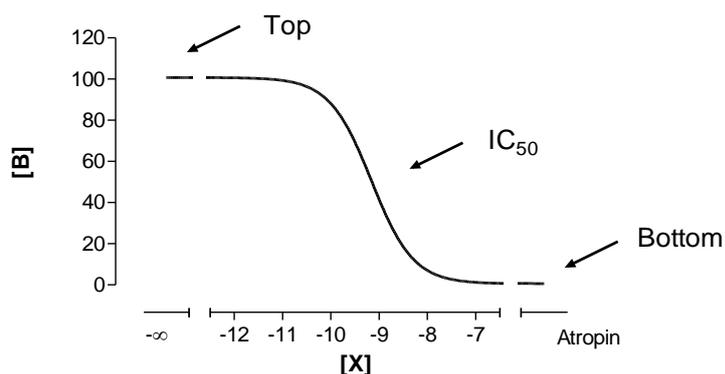


Abb. 2.1: Schematische Darstellung des Kurvenverlaufs eines Konkurrenzexperiments.

Ordinate: Bindung des Radioliganden, Radioaktivität in [dpm] oder Prozent von einer Kontrolle. *Abszisse:* Eingesetzte Konzentration des Kompetitors als Logarithmus der molaren Konzentration.

Der in Gleichung 11 aufgeführte Hill-Koeffizient n_H ist ein Maß für die Kurvensteilheit. Eine Kurvensteilheit von $n_H = 1$ bzw. -1 spricht für eine einfache bimolekulare Interaktion zwischen Ligandmolekülen mit den Rezeptoren eines homogenen Rezeptorverbandes. Flache Kurven ($n_H > -1$) lassen auf ein heterogenes Rezeptorkollektiv schließen. Die nach der Hill-Gleichung (Hill, 1910) berechnete apparente Affinitätskonstante K_D' entspricht im Falle einer bimolekularen Interaktion der wahren Affinitätskonstante K_D .

$$\frac{B}{B_{\max}} = \frac{L^{n_H}}{K_D' + L^{n_H}}$$

Gleichung 12

Verfahren nach Cheng und Prusoff

Der Wendepunkt einer Konkurrenzkurve ist von der Konzentration und von der Affinität des Radioliganden abhängig. Cheng und Prusoff (1973) haben eine Gleichung hergeleitet, die es erlaubt, aus dem Wendepunkt der sigmoiden Kurven (IC_{50}) und aus der Radioligandkonzentration $[L]$ und der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des Radioliganden K_D die Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Kompetitor-Bindung K_i abzuleiten (Gleichung 13).

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}}$$

Gleichung 13

Mit Hilfe dieser Gleichung sind die Affinitätswerte der eingesetzten orthosterischen Liganden in der vorliegenden Arbeit berechnet worden.

Da bei einer homologen Konkurrenz der Sonderfall vorliegt, dass Ligand und Konkurrent strukturell identisch sind, müssen auch K_i und K_D identisch sein. Folglich lässt sich Gleichung 13 zu Gleichung 14 vereinfachen:

$$K_i = K_D = IC_{50} - [L]$$

Gleichung 14

IC_{50} und $[L]$ sind bekannt, so dass K_D berechnet werden kann. K_D stellt wie in Kap. 2.4.5 bereits erwähnt ein spezifisches Maß für die Affinität des Radioliganden zu den Rezeptoren der eingesetzten Membransuspension dar und wird für jede Membrancharge mittels homologer Konkurrenzexperimente bestimmt.

Rezeptordichte

Ein weiteres Charakteristikum, das für jede Membrancharge bestimmt werden muss, ist die Expressionsdichte der Rezeptoren. Diese entspricht dem Maximum der spezifischen Radioligand-Bindung B_{max} . Unter Einbeziehung von Gleichung 10 und Gleichung 14 kann B_{max} mittels der Gleichung von **DeBlasi** (DeBlasi et al., 1989) berechnet werden.

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

Gleichung 15

B_{max} hat die Einheit einer Konzentration und gibt die Anzahl der Bindungsstellen pro Volumen [fmol/ml] bzw. bei bekannter Proteinkonzentration pro Masse [fmol/mg] an.

Für die Anwendung der oben beschriebenen Analyseverfahren müssen folgende Voraussetzungen gegeben sein:

1. Die Bindungsreaktion muss reversibel sein und sich im Gleichgewicht befinden.
2. Es muss sich um eine bimolekulare Interaktion eines Liganden mit einem homogenen Rezeptorkollektiv handeln, die Kurvensteilheit muss also gleich 1/-1 sein. Ansonsten ergeben sich nach Gleichung 12 apparente Affinitätskonstanten K_D' .
3. Maximal 10% des eingesetzten Radioliganden darf in Rezeptor-Ligand-Komplexe gebunden sein, da sonst die Konzentration des Radioliganden mit der eingesetzten Konzentration nicht gleich gesetzt werden darf.

Analyse nach Scatchard

Ein alternatives Verfahren zur Bestimmung von B_{\max} ist die lineare Regressionsanalyse nach Scatchard (1949). Hierbei werden die Datenpunkte eines homologen Kompetitions-experiments so transformiert, dass sie mit Hilfe einer Geradengleichung ausgewertet werden können. Da die nicht-lineare Analyse mit digitalisierten Verfahren kein Problem mehr darstellt, hat die Methode nach Scatchard an Bedeutung verloren. Da hierbei die Parameterwerte für K_D und B_{\max} direkt aus der Graphik ablesbar sind, stellt das Scatchard-Verfahren eine Alternative dar, wenn die Parameter nicht nach Cheng-Prusoff bzw. nach DeBlasi berechnet werden können. Wenn sich z.B. der Wendepunkt der Inhibitionskurve nicht signifikant von der Radioligandkonzentration unterscheidet, kann der K_D -Wert nicht nach Cheng-Prusoff (Gleichung 14) berechnet werden. Das Verfahren nach Scatchard umgeht dieses Problem.

2.4.6.1 Versuchsdurchführung von homologen Kompetitionsexperimenten

Als orthosterischer Radioligand wurde tritiiertes N-Methylscopolamin ($[^3\text{H}]\text{NMS}$) verwendet. Aus Erfahrung hat sich eine Radioligandkonzentration ($[L^*]$) von 0,2 nM in Gleichgewichtsbindungsexperimenten als gut erwiesen (z.B. Antony 2009, Prilla 2006). Für die orthosterische Mutante $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ wurde eine Radioligandkonzentration von 1,0 nM

benötigt, um die geringe Affinität zum Rezeptor zu kompensieren (Antony 2009). Wegen der schnellen Dissoziationskinetik dieser Mutante wurde außerdem das Aqua des. (R 4) zum Spülen des Filters auf Eis gelagert und ein Spülprogramm bei der Filtration mit nur einem Spülvorgang verwendet.

Zur Erstellung einer wie in Abb. 2.1 (Seite 35) dargestellten Inhibitionskurve wurden steigende Konzentrationen von nicht radioaktiv markiertem N-Methylscopolamin (NMS) mit einer fixen Konzentration des Radioliganden in Gegenwart von rezeptorhaltiger Membransuspension inkubiert. Homologe Konkurrenzexperimente wurden in einem Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) mit 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl bei 30°C und einem pH von 7,4 durchgeführt.

Zum Starten eines Versuchs wurden alle Komponenten analog Tab. 2.2 in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (M 3) pipettiert. Die Membransuspension wird mit Inkubationspuffer so verdünnt, dass ein auswertbares Signal erreicht wird, jedoch nicht mehr als 10% des eingesetzten Radioliganden gebunden werden. Die [³H]NMS-Gesamtbindung wird ohne Zusatz von unmarkiertem NMS bestimmt, die unspezifische [³H]NMS-Bindung wird mit Hilfe von 3 µM Atropin im Ansatz erfasst.

Zur Arbeitserleichterung wurde ein Vielfaches der Membransuspension und des Puffers in einem separaten Gefäß vereinigt und mit Hilfe einer Multistepper-Pipette (G 12) in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben, in die bereits Radioligand, Aqua pro analysi (R 5), Atropin bzw. Verdünnungsreihe einzeln vorgelegt worden waren. Einige Versuche wurden unter Gegenwart von Guanosindiphosphat (GDP) durchgeführt. Dieses war in Na,Mg,HEPES-Puffer gelöst (L 4). Bei den übrigen Versuchen wurde das entsprechende Volumen durch Puffer ersetzt, um die ionale Zusammensetzung der Ansätze nicht zu verändern.

	Ansatz zur Messung der			eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
	Gesamt- bindung	unspezifischen Bindung	Homologen Kompetition		
[³ H]NMS	50	50	50	2 nM bzw. 10 nM	0,2 nM bzw. 1 nM
Aqua pro analysi	50				
Atropin		50		30 µM	3 µM
NMS- Verdünnungen			50	1x10 ^{-x} M	1x10 ^{-(x+1)} M
Membran (in Puffer)	50	50	50	ca. 200 µg/ml	ca. 20 µg/ml
GDP (in Puffer) bzw. Puffer	50	50	50	1x10 ⁻⁴ M	M ₂ : 10 µM
Inkubations- puffer	300	300	300	12,5 mM	10 mM
Gesamtvolumen	500	500	500		

Tab. 2.2: Pipettierschema für ein homologes Kompetitionsexperiment.

Alle Volumina sind in µl angegeben. Sofern nicht anders bezeichnet, sind alle Komponenten in Aqua pro analysi (R 5) gelöst, sonst sind sie im Inkubationspuffer gelöst. Der Inkubationspuffer enthält 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 7,4 (L 10), Inkubationstemperatur 30°C. Die Proteinkonzentration der Membransuspension ist in µg Membranprotein pro ml angegeben.

Nach dem Ansetzen wurden die Mikrotiterplatten mit Parafilm (M 15) abgedeckt und kurz auf einem Rotationsmischer (G 23) gemischt. Anschließend wurden sie in einem Wasserbad (G 29) unter ständigem Schütteln für 2 h bei 30°C inkubiert. Die Inkubationszeit ist abhängig von der Dissoziationshalbwertszeit des Liganden vom Rezeptor (siehe 2.4.8.2). Um Gleichgewichtsbedingungen zu erreichen, werden mindestens 5 Halbwertszeiten benötigt. Zur besseren Handhabung und Vergleichbarkeit mit länger zu inkubierenden Substanzen wurde immer 2 h inkubiert. Bei dieser Zeit befanden sich alle untersuchten Rezeptortypen mit NMS im Gleichgewicht.

Zum Beenden des Versuchs wurde der Versuchsansatz mittels Vakuumfiltration am Tomtec®-Harvester abgesaugt (Filtrationsmethode siehe Kap. 2.4.1, Detektion siehe Kap. 2.4.3). Die membrangebundene Aktivität entspricht den Ligand-Rezeptor-Komplexen (siehe 2.4.6).

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism® 4.03 und Gleichung 11. Mit den erhaltenen EC₅₀-Werten wurden die Parameterwerte für K_D und B_{max}

nach Gleichung 14 bzw. Gleichung 15 berechnet. Wenn die Kurvensteilheit n_H nicht signifikant von -1 abwich, so wurden die pK_D -Werte auf Basis der auf $n_H = -1$ fixierten Kurve ermittelt.

Insgesamt wurden K_D und B_{max} aus mindestens drei unabhängigen Versuchen in Dreifachbestimmung bestimmt. Aus den drei Werten wurden Mittelwert und Standardfehler (siehe Kapitel 2.6, Seite 61) errechnet.

2.4.7 Heterologe Interaktionsexperimente

Wird bei einem Inhibitionsexperiment kein strukturell identischer Kompetitor eingesetzt, so handelt es sich um ein heterologes Interaktionsexperiment. Hierbei sind die Bindungseigenschaften der Testsubstanz zu berücksichtigen. Diese kann entweder mit dem Radioliganden um die orthosterische Bindungsstelle konkurrieren (kompetitive Interaktion), sich an das allosterische Haftareal anlagern (siehe 1.2 bzw. 2.4.7.2) oder eine Mischform aus beiden bilden (2.4.7.3).

2.4.7.1 Heterologe Kompetitionsexperimente mit orthosterischen Liganden

Infolge des Zusatzes steigender Konzentrationen von orthosterischen Agonisten oder Antagonisten sinkt die Bindung des antagonistischen Radioliganden unter Gleichgewichtsbedingungen ab. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der 4-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 11).

Im Fall von Agonisten, ergeben sich meist Inhibitionskurven deren Kurvensteilheit flacher ist als $n_H = -1$. Dies lässt sich dadurch erklären, dass das Rezeptorkollektiv nicht homogen ist, weil die Rezeptoren entweder an G Proteine gekoppelt oder entkoppelt vorliegen und Agonisten sich an beide Zustände mit einer unterschiedlichen Affinität binden (Hulme et al., 1990). Somit liegt keine einfache 1:1-Interaktion mehr vor, und die Kurven werden flacher. Daher können mit Agonisten erhaltene Ergebnisse eventuell auch biphasisch (Gleichung 16, siehe Abb. 2.2) ausgewertet werden. Dieses Phänomen wird bei Antagonisten nicht beobachtet, da diese sich nur an die inaktive Form der Rezeptoren binden und diese stabilisieren.

$$[B] = \text{Bottom} + \left(\text{Span} \cdot \frac{F1}{1 + 10^{[X] - \log EC_{50}1}} \right) + \left(\text{Span} \cdot \frac{1 - F1}{1 + 10^{[X] - \log EC_{50}2}} \right)$$

Gleichung 16

- [B]: Bindung des Radioliganden
- Span: Bottom + Top
- F1: Fraction 1, Anteil des hochaffinen Kompartiments an der Gesamtbindung
- EC₅₀1: hochaffiner Wendepunkt
- EC₅₀2: niedrigaffiner Wendepunkt

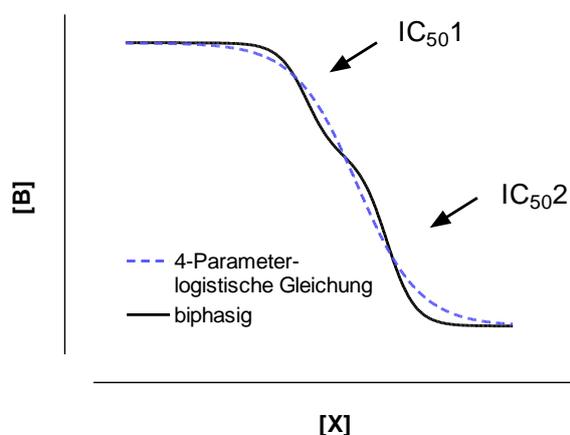


Abb. 2.2: Schematische Darstellung eines Konkurrenzexperiments mit einem Agonisten, nach beiden Verfahren ausgewertet.
Ordinate: Bindung des Antagonist-Radioliganden,
Abszisse: Konzentration des agonistischen Kompetitors als Logarithmus der molaren Konzentration.

Die mit Hilfe von Gleichung 11 oder Gleichung 16 erhaltenen EC₅₀-Werte müssen anschließend noch nach dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) in Affinitätswerte umgerechnet werden, um von der Radioligand- Affinität und –Konzentration unabhängige K_i-Werte zu erhalten.

2.4.7.2 Heterologe Interaktionsexperimente mit Allosteren

Bei einer heterologen Interaktion mit einem allosterischen Modulator binden Radioligand und Modulator an zwei unterschiedliche Haftareale des Rezeptors. (Für weitere Erläuterungen zu allosterischer Modulation siehe auch Kap.1.2). Die in Abb. 1.3 (Seite 6) dargestellten Zustände lassen sich mathematisch mit Hilfe der Gleichung nach Ehlert erfassen (Gleichung 17).

$$B_A = B_0 \cdot \frac{[L] + K_L}{[L] + K_L \cdot \frac{K_A + [A]}{K_A + \frac{[A]}{\alpha}}}$$

Gleichung 17

- B_A : spezifische Radioligandbindung bei entsprechender Allosterkonzentration
 B_0 : spezifische Radioligandbindung in Abwesenheit des Allostere
 $[L]$: Radioligandkonzentration
 $[A]$: Allosterkonzentration
 K_L : Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Radioligand-Bindung ($=K_D$)
 K_A : Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Alloster-Bindung
 α : Kooperativitätsfaktor

K_A gibt die Affinität des allosterischen Modulators zu dem untersuchten Rezeptor an. Da in die Berechnung bereits der K_D -Wert der Radioligand-Bindung sowie die Radioligandkonzentration einfließen, muss bei dieser Auswertung das Cheng-Prusoff-Verfahren nicht angewendet werden.

Bei fast neutral kooperativ wirkenden Allostere muss eine modifizierte Ehlert-Gleichung angewendet werden, bei der die Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor ($EC_{0,5Diss}$, siehe Kap. 2.4.8) einfließt. Der Kooperativitätsfaktor α beschreibt das Verhältnis zwischen der Affinität des allosterischen Modulators zum orthosterisch besetzten und zum freien Rezeptor.

$$\alpha \cdot K_A = EC_{0,5Diss}$$

$$pK_A = pEC_{0,5Diss} - p\alpha$$

Gleichung 18

Gleichung 18 kann in Gleichung 17 integriert werden. So lässt sich die Affinität des Allostere zum freien Rezeptor berechnen, auch wenn das Alloster die Bindung des orthosterischen Radioliganden kaum verändert, sondern nur dessen Bindungskinetik.

$$B_A = B_0 \cdot \frac{[L] + K_L}{[L] + K_L \cdot \frac{\frac{EC_{0,5Diss}}{\alpha} + [A]}{\frac{EC_{0,5Diss}}{\alpha} + \frac{[A]}{\alpha}}}$$

Gleichung 19

Neben diesen beiden Gleichungen, die jeweils eine Kurvensteilheit von 1 bzw. -1 voraussetzen, gibt es eine Gleichung von Lazareno und Birdsall (1995), welche die Kurvensteilheit n_H als Variable enthält. Es ist zu beachten, dass hier die Assoziationskonstanten verwendet werden.

$$B_{LX} = B_0 \cdot \frac{(1 + K_L \cdot [L]) \cdot (1 + \alpha \cdot (K_X \cdot [X]^{n_H}))}{1 + (K_X \cdot [X])^{n_H} + K_L \cdot [L] \cdot (1 + \alpha \cdot (K_X \cdot [X])^{n_H})}$$

Gleichung 20

- B_{LX} : spezifische Radioligandbindung bei entsprechender Allosterkonzentration
- B_0 : spezifische Radioligandbindung in Abwesenheit des Allosters
- $[L]$: Radioligandkonzentration
- $[X]$: Allosterkonzentration
- K_L : Gleichgewichtsassoziationskonstante des Radioliganden ($=1/K_D$)
- K_X : Gleichgewichtsassoziationskonstante des Allosters
- α : Kooperativitätsfaktor
- n_H : Steilheitsmaß

2.4.7.3 Heterologe Interaktionsexperimente mit orthosterisch/allosterischen Hybridsubstanzen

Orthosterisch/allosterische Hybridsubstanzen können drei verschiedene Bindungsmodi eingehen (siehe Kapitel 1.3, Seite 8). Durch die Möglichkeit einer rein allosterischen Bindung am Radioligand-besetzten Rezeptor zeigen muskarinische Hybridsubstanzen einen dissoziationsverzögernden Effekt (siehe 2.4.8, Seite 46). Die Kooperativität mit dem Radioliganden erscheint aber meist negativ, da die dualsterische Bindung wahrscheinlicher ist und diese Radioliganden aus dessen Bindung verdrängt.

Gleichung 21 berücksichtigt alle fünf möglichen Besetzungszustände (May et al., 2007).

$$\frac{B}{B_{\max}} = \frac{A}{A + K_A \cdot \frac{1 + B \cdot \left(\frac{1}{K_{B\text{dual}}} + \frac{1}{K_{B\text{allo}}} \right)}{1 + \alpha \cdot \frac{B}{K_{B\text{allo}}}}}$$

Gleichung 21

- B: gemessene Bindung des Radioliganden
- B_{\max} : maximal mögliche Bindung des Radioliganden
- A: Konzentration des orthosterischen Radioliganden
- B.: Konzentration der dualsterischen Testsubstanz
- K_A : Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Radioligand-Bindung ($=K_D$)
- $K_{B\text{ dual}}$: Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Hybrids substanz im dualsterischen Bindungsmodus
- $K_{B\text{ allo}}$: Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Hybrids substanz im rein allosterischen Bindungsmodus
- α : Kooperationsfaktor der allosterischen Interaktion zwischen A und B

Diese Gleichung erlaubt die Abschätzung von Parameterwerten, wenn eine der Affinitätskonstanten ($K_{B\text{ dual}}$ oder $K_{B\text{ allo}}$) bekannt ist (Antony et al., 2009), was meist und auch bei den hier untersuchten Substanzen nicht der Fall ist. Daher wurden deskriptive Kurvenauswertungen nach Gleichung 11 durchgeführt.

2.4.7.4 Versuchsdurchführung von heterologen Inhibitionsexperimenten

Die Versuchsdurchführung entsprach im Prinzip der von homologen Konkurrenzexperimenten. Es wurden ebenfalls alle Komponenten in eine 96-well Mikrotiterplatte (M 3) gegeben, und mit Zugabe der Membransuspension wurde der Versuch gestartet (analog Tab. 2.3). Die Inkubationsbedingungen sowie die Filtration entsprachen denen aus Kapitel 2.4.6 (Seite 33). GDP wurde nur bei einigen Versuchen mit Agonisten eingesetzt. Bei den übrigen Versuchen wurde es durch Puffer ersetzt. Wie beim homologen Konkurrenzexperiment beschrieben betrug die Radioligandkonzentration 0,2 nM. Nur bei der orthosterischen Mutante $M_2^{104\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}}$ wurde die Konzentration auf 1 nM angehoben (siehe 2.4.6). Bei

dieser Mutante wurde außerdem die Spüllösung auf Eis gelagert und ein Spülprogramm mit nur einem Spülvorgang verwendet.

	Ansatz zur Messung der			eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
	Gesamtbindung	unspezifischen Bindung	Heterologen Interaktion		
[³ H]NMS	50	50	50	2 nM bzw. 10 nM	0,2 nM bzw. 1 nM
Aqua pro analysi	50				
Atropin		50		30 µM	3 µM
Inhibitor-Verdünnungen			50	1x10 ^{-x} M	1x10 ^{-(x+1)} M
Membran (in Puffer)	50	50	50	ca. 200 µg/ml	ca. 20 µg/ml
GDP (in Puffer) bzw. Puffer	50	50	50	1x10 ⁻⁴ M	M ₂ : 10 µM
Inkubationspuffer	300	300	300	12,5 mM	10 mM
Gesamtvolumen	500	500	500		

Tab. 2.3: Pipettierschema für ein heterologes Konkurrenzexperiment.

Alle Volumina sind in µl angegeben. Sofern nicht anders bezeichnet, sind alle Komponenten in Aqua pro analysi (R 5) gelöst, sonst sind sie im Inkubationspuffer gelöst. Der Inkubationspuffer enthält 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 7,4 (L 10), Inkubationstemperatur 30°C. Die Proteinkonzentration der Membransuspension ist in µg Membranprotein pro ml angegeben.

Die Auswertung erfolgt je nach Bindungseigenschaften der Testsubstanz mit Hilfe der in Kapitel 2.4.7.1 - 2.4.7.3 (ab Seite 40) beschriebenen Gleichungen mit Hilfe der Software GraphPad Prism[®] 4.03 und gegebenenfalls anschließender Berechnung der Affinität nach Cheng und Prusoff. Wenn die Kurvensteilheit n_H nicht signifikant von -1 abwich, so wurden die pK_A-Werte auf Basis der auf n_H = -1 fixierten Kurve ermittelt.

Inkubationszeit: Wenn durch die Testsubstanz die Geschwindigkeit der Rezeptor-[³H]NMS-Interaktion verändert ist so muss die Inkubationszeit angepasst werden. Dies ist besonders für allosterische Modulatoren und einige Hybridsubstanzen der Fall. Zu diesem Zweck muss die Dissoziationskinetik von [³H]NMS in Gegenwart der Testsubstanz gemessen werden (siehe Kapitel 2.4.8, Seite 46). Die Inkubationszeit bis zur Einstellung des Reaktionsgleichgewichts

lässt sich dann nach der Gleichung von Lazareno und Birdsall (1995) errechnen, nach fünf Halbwertszeiten hat die Radioligand-Bindung 97 % ihres Gleichgewichtswertes erreicht.

benötigte Inkubationszeit = $5 \cdot t_{0,5\text{obs}}$

$$t_{0,5\text{obs.}} = t_{0,5\text{off}} \cdot \left(1 + \frac{[A]}{EC_{0,5\text{Diss.}}} \right)$$

Gleichung 22

$t_{0,5\text{obs.}}$: Halbwertszeit der Radioliganddissoziation in Anwesenheit der Modulatorkonzentration [A]

$t_{0,5\text{off}}$: Halbwertszeit der Radioliganddissoziation unter Kontrollbedingungen (ohne Modulator)

[A]: eingesetzte Modulatorkonzentration

$EC_{0,5\text{Diss.}}$: Modulatorkonzentration, bei der die Radioliganddissoziation halbmaximal verzögert ist

Analog der homologen Konkurrenzexperimente betrug die Inkubationszeit mindestens zwei Stunden. Da in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von allosterischen Modulatoren und Hybridliganden unter Gleichgewichtsbedingungen im Vordergrund stand, sind die Testsubstanzen nicht an allen [³H]NMS-besetzten Rezeptormutanten untersucht worden. Folglich war nicht für alle Substanz-Rezeptor-Kombinationen der $EC_{0,5\text{Diss.}}$ -Wert bekannt. Weil sich in vorangegangenen Dissertationen (z.B. Antony 2007, Prilla 2006) gezeigt hat, dass die eingesetzten Substanzen mit einer Alkanbisammonium-Struktur sowohl am [³H]NMS-besetzten, als auch am freien Rezeptor die höchste Affinität zum M₂-Rezeptor besaßen, wurde der $EC_{0,5\text{Diss.}}$ -Wert der jeweiligen Testsubstanz zum M₂-Rezeptor für die Berechnung der minimalen Inkubationszeit verwendet.

2.4.8 Kinetische Experimente

Diese Versuche dienten dazu, die Geschwindigkeit der Dissoziation von [³H]NMS in Ab- und Anwesenheit von Testsubstanzen zu bestimmen.

Vor dem Dissoziationsexperiment wurde die Membransuspension mit dem Radioliganden vorinkubiert. Während dieser Zeit lagerte sich dieser an die orthosterische Bindungsstelle an. Zum Starten der Dissoziationsmessung wird dem Versuchsansatz Atropin im Überschuss und gegebenenfalls die Testsubstanz zugegeben. Wenn nun ein Molekül Radioligand vom Rezeptor abdissoziiert, so ist die Wahrscheinlichkeit wesentlich größer, dass sich ein nicht-radioaktives Atropinmolekül bindet, als dass sich erneut ein [³H]NMS-Molekül anlagert. Bei einer einheitlichen Rezeptorpopulation sinkt die gebundene Radioaktivität exponentiell ab

(siehe Abb. 2.3). Dieser Abfall wird durch Probenentnahme zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

Zur Bestimmung der [³H]NMS-Dissoziation unter Kontrollbedingungen wurde anstelle einer Testsubstanz nur ein Aliquot ihres Lösungsmittels (hier Aqua pro analysi) zugesetzt. Zur Abschätzung der unspezifischen Bindung wurde Atropin von Anfang an zugesetzt. Bei der Auswertung wird der Durchschnittswert der unspezifischen Bindung von der [³H]NMS-Gesamtbindung abgezogen, so dass nur die spezifische [³H]NMS-Bindung übrig blieb.

Zur einfacheren Handhabung ist die Methode der „**2-Punkt-Kinetik**“ von Kostenis und Mohr (1996) entwickelt worden. Hierbei wird die Radioaktivität nur zu zwei Zeitpunkten bestimmt. Zum einen dient ein Ansatz ohne Atropin und ohne Testsubstanz, der 30 min vor der Filtration angesetzt wird, zur Bestimmung der [³H]NMS-Bindung zum Zeitpunkt 0 min. Die Dauer dieser Vorinkubation ist prinzipiell variabel, 30 min haben sich in der Vergangenheit als gut praktikabel erwiesen. Der zweite Messwert wird nach ca. 1,5 Halbwertszeiten der Radioliganddissoziation unter Kontrollbedingungen erfasst. Die Auswertung der spezifischen [³H]NMS-Bindung erfolgt anschließend nach einem einphasischen, exponentiellen Zerfall (Gleichung 23).

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

Gleichung 23

[RL]_t: Radioligand-Rezeptor-Komplexe zum Zeitpunkt t nach Start der Dissoziationsbestimmung

[RL]₀: Radioligand-Rezeptor-Komplexe zum Zeitpunkt t=0

k₋₁: Geschwindigkeitskonstante der Radioligand-Dissoziation

t: Zeit nach Start der Dissoziationsbestimmung

Aus der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k₋₁ lässt sich die Halbwertszeit nach Gleichung 24 berechnen.

$$\text{HWZ} = \frac{\ln 2}{k_{-1}}$$

Gleichung 24

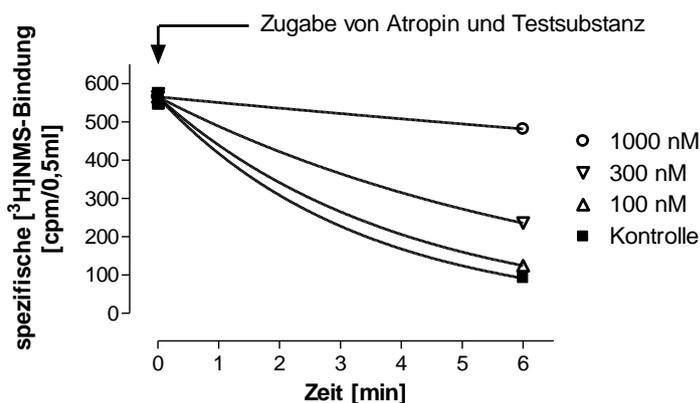


Abb. 2.3 Beispielhafte Darstellung eines kinetischen Versuchs mit einem allosterischen Modulator.

Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden, Radioaktivität in „counts per minute“ pro Versuchsansatz von 0,5ml. *Abszisse:* Zeit in Minuten.

Durch die Computer-gestützte Analyse kann aus Abb. 2.3 sowohl die Halbwertszeit der Radioligand-Dissoziation in Anwesenheit der verschiedenen Testsubstanzkonzentrationen, als auch die Geschwindigkeitskonstante k_{-1} berechnet werden. Zur Bestimmung der Affinität einer Testsubstanz zum $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptor werden die k_{-1} -Werte der Testsubstanzen auf den Kontrollwert normiert. Bei einem Ansatz ohne Modulator findet eine vollständige Dissoziation statt, während bei hohen Konzentrationen potenter Modulatoren die Dissoziation verlangsamt wird. Diese Prozentwerte gegen die eingesetzten Konzentrationen der Testsubstanz aufgetragen, ergeben eine sigmoidale Kurve, die durch die 4-Parameter-logistische Gleichung (Gleichung 11) beschrieben werden kann. Der $\text{EC}_{0,5\text{Diss.}}$ -Wert entspricht der Affinität des allosterischen Modulators zu $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptoren.

2.4.8.1 Durchführung von Zweipunkt-Kinetik-Experimenten

Alle durchgeführten kinetischen Experimente zur Bestimmung der dissoziationsverzögernden Eigenschaften von Testsubstanzen folgten dem Protokoll der 2-Punkt-Kinetik-Experimente. Die eingesetzten Komponenten sind für alle vier verschiedenen Versuchsansätze in Tab. 2.4 aufgeführt. Ein Versuch bestand aus zwei unterschiedlichen Arbeitsschritten. Zum einen wurde die Gesamtbindung für den Zeitpunkt Null bestimmt. Für diese Ansätze wurden der Radioligand, Inkubationspuffer (L 10) und Aqua pro analysi (R 5) in die entsprechenden Vertiefungen einer 96-well Mikrotiterplatte (M 3) pipettiert (analog Tab. 2.4). Die Radioligandkonzentration im Ansatz betrug 2 nM. Der Ansatz zur Bestimmung der unspezifischen $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung enthielt zusätzlich 3 μM Atropin. Diese beiden Reaktionen wurden 30 min vor der geplanten Filtration mittels Zugabe der Membransuspension angesetzt. Die Gesamt- und die unspezifische Bindung wurden pro Mikrotiterplatte mindestens vierfach bestimmt. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C.

Radioligand-Bindungsstudien

	Ansatz zur Messung des Ausgangswertes zum Zeitpunkt t = 0 min		Ansatz zur Messung der Dissoziationskinetik		eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
	Gesamtbindung	unspezifische Bindung	Kontrolle	Alloster		
			[³H]NMS-Rezeptor-Komplex-Bildung			
[³H]NMS	50	50	50	50	20 nM	2 nM
Membran (in Puffer)	50	50	50	50		
Inkubationspuffer	350	300	300	300	12,5 mM	10 mM
			Startlösung			
Aqua pro analysi	50	50	50			
Alloster-Verdünnung				50	1x10 ^{-x} M	1x10 ^{-(x+1)} M
Atropin (in Puffer)		50	50	50	30 µM	3 µM
Gesamtvolumen	500	500	500	500		

Tab. 2.4: Pipettierschema für ein 2-Punkt-Kinetik-Experiment.

Alle Volumina sind in µl angegeben. Sofern nicht anders bezeichnet, sind alle Komponenten in Aqua pro analysi (R 5) gelöst, sonst sind sie im Inkubationspuffer gelöst. Der Inkubationspuffer enthält 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 7,4 (L 10), Inkubationstemperatur 30°C.

Die Dissoziationsansätze erforderten zwei getrennte Arbeitsschritte. Zum einen wurden Atropin und Testsubstanz (bzw. Wasser für die Kontrollen) in den Mikrotiterplatten vorgelegt. Anschließend wurde in einem 50 ml-Röhrchen (M 6) ein Mastermix, bestehend aus einem Vielfachen des Ansatzes für die Bildung der [³H]NMS-Rezeptor-Komplexe, für 30 min inkubiert. Nach der Vorinkubation wurden jeweils 400 µl dieser Mischung möglichst rasch in die mit der Startlösung vorbereiteten Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 1,5 Kontrollhalbwertszeiten wurde der gesamte Versuchsansatz

abfiltriert. Die Kontrollhalbwertszeit wurde durch vier Versuchsansätze ohne Testsubstanz gemessen (siehe 2.4.8.2). Jede Allosterkonzentration wurde in Doppelbestimmung erfasst. Die für die verschiedenen Rezeptorsubtypen und -mutanten in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) erhaltenen Dissoziationshalbwertszeiten von [³H]NMS sind im Anhang in Tab. 7.4 bis Tab. 7.6 (ab Seite 265) angegeben. Ein allgemeines Zeitprotokoll ist in Tab. 2.5 dargestellt.

0 min	Start der Vorinkubation der Radioligand-Rezeptor-Komplexe (Master-Mix)
1,5 HWZ	Start der Vorinkubation für den Ansatz der Gesamt- und der unspezifischen Bindung
30 min	Zugabe des Master-Mix in die mit Atropin und Alloster vorbereiteten Vertiefungen
30 min + 1,5 HWZ	Filtration

Tab. 2.5: Allgemeines Zeitprotokoll eines 2-Punkt-kinetischen Versuchs am Tomtec[®]-Harvester
Master-Mix: Mischung von Membran, Radioligand und Inkubationspuffer für alle Reaktionsansätze der Kontrollen und der Allosterkonzentrationen. Die Vorinkubationen werden jeweils durch Vereinigung von Radioligand und Membran gestartet.

Die Filtration und anschließende Messung erfolgten wie in 2.4.1 und 2.4.3 beschrieben, die Auswertung der Daten ist in 2.4.8 erläutert worden.

2.4.8.2 Bestimmung der Dissoziationshalbwertszeit des Radioliganden

Die Halbwertszeit der Dissoziation des Radioliganden von dem eingesetzten Rezeptor wird im Kontrollansatz eines 2-Punkt- Experimentes bestimmt.

Um einen monophasischen Verlauf sicher zu stellen, welcher die Voraussetzung für ein Experiment nach dem 2-Punkt-Protokoll darstellt, empfiehlt sich die Aufnahme eines kompletten Dissoziationsverlaufs. Die Durchführung entspricht den unter 2.4.8.1 beschriebenen Arbeitsschritten, allerdings werden unterschiedliche Zeitpunkte gemessen, um den Zeitverlauf der Dissoziation vollständig erfassen zu können. Es wird ebenfalls je ein Ansatz für die Gesamt-, sowie die unspezifische Bindung für den Zeitpunkt 0 min vermessen. Die Kontrollansätze werden zeitlich so versetzt, dass sie einen Zeitraum bis ca. 3 zu erwartende Halbwertszeiten abdecken.

Das Pipettierschema und die Auswertung sind identisch mit denen aus 2.4.8.1.

2.4.8.3 Assoziationsexperimente

Kinetische Parameter der Bindung nicht markierter Substanzen sind auf direktem Weg nicht erfassbar. Motulsky und Mahan (1983) haben ein Verfahren entwickelt, mit dem es möglich ist, aus der zeitabhängigen Interaktion einer „kalten“ Substanz mit einem Radioliganden Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation und der Dissoziation nicht markierter Liganden zu berechnen. Hierfür werden Radioligand und Testsubstanz gemeinsam zu den Rezeptoren gegeben, es werden jeweils Proben zu verschiedenen Zeitpunkten vermessen. Die resultierende Radioaktivität entspricht dem gebundenen Radioliganden. Aus dem Verhältnis der verschiedenen Kurven zueinander kann über eine globale Analyse (Gleichung 25, Motulsky und Mahan, modifiziert nach Tränkle) sowohl auf die Assoziations- und Dissoziationskonstanten der Radioligand-Bindung, als auch auf die Bindung der unmarkierten Substanz geschlossen werden. Die Methode ist besonders für Verbindungen geeignet, deren kinetische Parameter stark verschieden sind, da in diesem Fall Unterschiede besser detektiert werden können.

Dieses Verfahren ist für kompetitive Interaktionen entwickelt worden. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Bindungskinetik dualsterischer Substanzen im Vergleich zum orthosterischen Baustein verlangsamt ist.

$$Y = \frac{10^{\log B_{\max}} \cdot k_1 \cdot 10^{\log[L]}}{K_F - K_S} \cdot \left(\frac{k_4 \cdot (K_F - K_S)}{K_F \cdot K_S} + \left(\frac{k_4 - K_F}{K_F} \right)^{-K_F \cdot X} - \left(\frac{k_4 - K_S}{K_S} \right)^{-K_S \cdot X} \right) \cdot F$$

Gleichung 25

$$K_A = k_1 \cdot 10^{\log[L] + k_2}$$

$$K_B = k_3 \cdot 10^{\log[I] + k_4}$$

$$S = \sqrt{(K_A - K_B)^2 + 4 \cdot k_1 \cdot k_3 \cdot 10^{\log[L]} \cdot 10^{\log[I]}}$$

$$K_F = 0,5 \cdot (K_A + K_B + S)$$

$$K_S = 0,5 \cdot (K_A + K_B - S)$$

Y: gemessene Radioaktivität [cpm/0,5ml]

X: Zeit [min]

k_1, k_2 : Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante der Radioligand-Bindung

k_3, k_4 : Assoziations- bzw. Dissoziationskonstante der Bindung des unmarkierten Liganden

[L]: molare Konzentration des Radioliganden

[I]: molare Konzentration der Testsubstanz

K_A, K_B, K_F, K_S : zusammenfassende Parameter

B_{\max} : Anzahl der maximalen Bindungsstellen im Versuchsansatz

F: Umrechnungsfaktor für den Versuchsansatz, um die gemessene Aktivität in mol/l umzurechnen

$$(1e^9 \cdot 2220 \cdot A_{\text{spez}} \cdot 6,6)$$

Die Affinität des Radioliganden bzw. der Testsubstanz lässt sich über den Quotienten $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (k_1/k_2 bzw. k_3/k_4) berechnen.

Durchführung von Assoziationsexperimenten

Es wurden verschiedene Zeitpunkte von 150 bis 0,5 min vor der Filtration vermessen, um sicherzustellen, dass das Reaktionsgleichgewicht erreicht wurde. Hierfür wurden analog Tab. 2.3 (Seite 45) alle Komponenten außer der Membran in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Zu den festgesetzten Zeitpunkten vor der Filtration wurde zu den einzelnen Ansätzen die Membransuspension zugegeben. Alle Proben einer Mikrotiterplatte wurden nach Ablauf der Inkubationszeit zeitgleich abfiltriert.

Die gemessene Radioaktivität wurde gegen die Zeit aufgetragen und die Daten wurden global nach Gleichung 25 analysiert. Von jedem Versuchstag wurden die Parameter k_1 - k_4 bestimmt,

und die daraus resultierenden Halbwertszeiten der Assoziation bzw. der Dissoziation des Radioliganden und der Testsubstanz, sowie die Affinitäten berechnet.

2.5 Funktionelle Untersuchungen

Um die Aktivierung von G Protein-gekoppelten Rezeptoren durch Testsubstanzen zu untersuchen, gibt es eine Vielzahl verschiedener Möglichkeiten, die an unterschiedlichen Stellen des Signalwegs ansetzen. Es kann die G Protein Aktivierung als erster Schritt gemessen werden, „second messenger“ können bestimmt werden (z.B. Ca^{2+} - oder cAMP-Messungen) oder auch die Zellantwort im Gesamten kann erfasst werden (z.B. mit dem Epic[®]-System). In der vorliegenden Arbeit ist der erste Schritt der Kaskade, sowie die Antwort der ganzen Zelle bestimmt worden.

2.5.1 Theoretischer Hintergrund von $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Experimenten

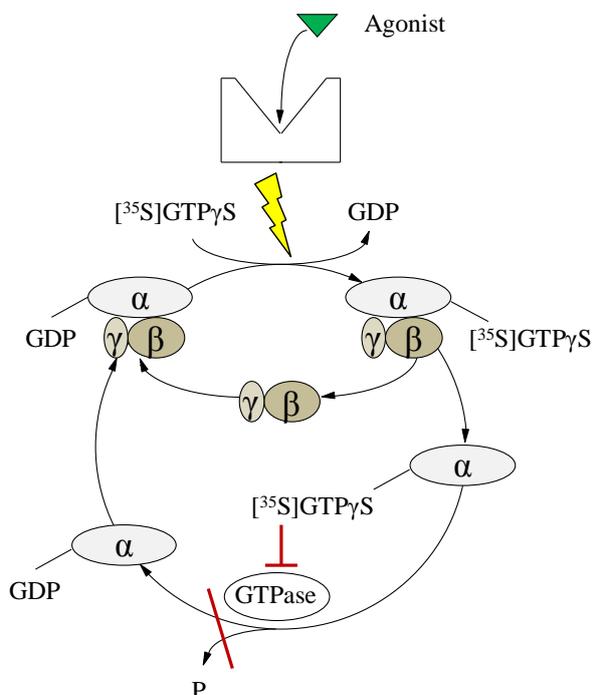


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Rezeptor-vermittelten G-Protein-Aktivierung in Anwesenheit von $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$. Durch das hydrolysestabile $\text{GTP}\gamma\text{S}$ kann die GTPase kein GTP zu GDP spalten. Dadurch wird der Aktivierungscyclus unterbrochen. Die radioaktiv markierten α-Untereinheiten akkumulieren. Modifiziert nach Milligan und Kostenis (2006).

Die G Protein-Aktivierung kann mit Hilfe von radioaktiv markiertem Guanosintriphosphat erfasst werden, bei dem ein γ -ständiger Sauerstoff gegen ein Schwefelatom ausgetauscht ist

($[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$). Dieses GTP-Derivat wird von der α -Untereinheit ebenfalls erkannt und für den Austausch von GDP gegen GTP genutzt. $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ist jedoch hydrolysestabil und kann nicht von der GTPase der α -Untereinheit in GDP und Pyrophosphat gespalten werden. Dadurch wird der Aktivierungszyklus an dieser Stelle unterbrochen, es kann keine Reassoziierung des Heterotrimers mehr stattfinden. Die Bindung des Radioliganden an die α -Untereinheit ist irreversibel, folglich ist die Reaktion sättigbar.

Da das G Protein und seine Untereinheiten wie der Rezeptor membranständig sind, akkumuliert das $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ in der Membran. Durch Vakuumfiltration (siehe Kap. 2.4.1) kann der gebundene Radioligand vom freien getrennt werden. Die Menge der retinierten Radioaktivität ist proportional zu den aktivierten α -Untereinheiten, und somit zur Rezeptoraktivierung.

Auf diese Weise kann die Agonist-abhängige Rezeptoraktivierung konzentrationsabhängig bestimmt werden. Da viele GPCR - abhängig von den Inkubationsbedingungen - jedoch auch über eine Spontanaktivität verfügen, d.h. der Zyklus läuft ohne Agoniststimulation ab, ist auch bedingt der invers agonistische Charakter von Antagonisten detektierbar.

2.5.2 Durchführung von $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimenten mit Agonisten

Der Versuchsansatz für $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimente wurde wie in Tab. 2.6 aufgeführt in eine 96-well Mikrotiterplatte (M 3) pipettiert. Die Membransuspension wurde mit dem Inkubationspuffer (L 10) so verdünnt, dass die Endkonzentration $40\ \mu\text{g}$ Membranprotein pro ml betrug. Die Radioligand-Lösung wurde auf eine Endkonzentration von $0,07\ \text{nM}$ eingestellt. Die Versuche wurden in einem Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) mit $10\ \text{mM}$ HEPES, $10\ \text{mM}$ MgCl_2 , $100\ \text{mM}$ NaCl, pH 7,4 bei 30°C in Vierfachbestimmung durchgeführt. Der Zusatz von GDP hemmt die $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung und schafft ein größeres Messfenster für Agonist-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung.

Da es sich um eine irreversible Bindung des Radioliganden an das G Protein handelt, kann kein Gleichgewicht erreicht werden. Der Zeitpunkt der Beendigung der Inkubationszeit durch Filtration ist entscheidend und muss immer gleich gewählt werden, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. In vorangegangenen Arbeiten (Klemt 2005) hat sich gezeigt, dass eine Inkubationszeit von 60 min ein optimales Messfenster zwischen Agonist-vermittelter- und spontaner $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung liefert.

Mit der Zugabe des Radioliganden wurde der Versuch gestartet. Die Mikrotiterplatte wurde vorsichtig auf einem Kleinmischer (G 23) geschüttelt und anschließend bei 30°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Bei diesen Versuchen wird die Filtermatte nicht in positiv geladener Polyethylenimin-Lösung eingelegt, sondern nur mit Aqua dest. (R 4) befeuchtet. Nach 60 min wurde der Ansatz wie in 2.4.1 beschrieben an einem Tomtec Harvester (G 35) abfiltriert und der Filter wurde zweimal mit Wasser gespült.

Zusätzlich zu den Ansätzen mit Testsubstanz wurde Atropin in einer supramaximalen Konzentration eingesetzt, um das Ausmaß der Spontanaktivität der Rezeptoren zu erfassen. Unter den hier dargestellten Versuchsbedingungen war jedoch kaum eine spontane Rezeptor-abhängige G-Protein Aktivierung detektierbar.

	Basale Bindung	Atropin	Testsubstanz	eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
[³⁵ S]GTP γ S	50	50	50	0,7 nM	0,07 nM
Aqua dest.	50				
Testsubstanzen			50	1x10 ^{-x} M	1x10 ^{-(x+1)} M
Atropin		50		10 μ M	1 μ M
GDP (in Puffer)	50	50	50	1x10 ⁻⁴ M	M ₂ : 10 μ M
Membran (in Puffer)	50	50	50	400 μ g/ml	40 μ g/ml
Inkubationspuffer (L 10)	300	300	300	12,5 mM	10 mM
Gesamt-volumen	500	500	500		

Tab. 2.6: Pipettierschema für ein [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperiment.

Alle Volumina sind in μ l angegeben. Sofern nicht anders bezeichnet, sind alle Komponenten in Aqua pro analysi (R 5) gelöst, sonst sind sie im Inkubationspuffer gelöst. Der Inkubationspuffer enthält 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 7,4 (L 10), Inkubationstemperatur 30°C. Die Proteinkonzentration der Membransuspension ist in μ g Membranprotein pro ml angegeben.

Die Auswertung der Datenpunkte erfolgte anhand der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 11). Mittels eines F-Tests mit 5%iger Irrtumswahrscheinlichkeit wurde überprüft, ob der Kurvenverlauf mit einer Steigung von 1 beschrieben werden konnte. Als charakteristische Parameter wurden der EC₅₀-Wert als Maß der Wirksamkeit des Agonisten und das obere Plateau als Ausdruck seiner intrinsischen Aktivität bestimmt.

2.5.3 Durchführung von [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimenten mit inversen Agonisten

Die Durchführung dieser Experimente entspricht denen aus Kap. 2.5.2. Der Natriumgehalt im Puffer wurde minimiert, um die Spontanaktivität der Rezeptoren zu steigern (Hilf und Jakobs, 1991, Giersbergen und Leppik, 1995, siehe auch Dissertation A. Kebig, 2010). Durch das HEPES-Säure/HEPES-Na-Puffersystem verbleibt eine Restnatriumkonzentration von 3,3 mM im System (10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 3,3 mM NaCl, pH 7,4). Durch Variation der Inkubationsdauer oder der Radioligandkonzentration kann das Verfahren variiert werden (siehe Kap. 7.5). Die in Kapitel 3.1.8.2 (Seite 194) dargestellten Befunde sind unter den Bedingungen von Kap. 2.5.2 (Seite 54, 60 min, 10 μ M GDP, 0,07 nM [³⁵S]GTP γ S) erhoben worden. Das Pipettierschema entspricht Tab. 2.6, jedoch wurde ein Inkubationspuffer mit reduziertem Natriumgehalt (L 11) verwendet. Die Spülvorgänge erfolgten mit Inkubationspuffer (L 11).

Ein Ansatz mit 1 μ M Atropin wurde als Referenz mitgeführt. Bei der prozentualen Auswertung entsprach der Ansatz ohne Testsubstanz (basale Bindung) 100% und der Atropin-Ansatz 0%. Inverse Agonisten senkten die basale Bindung ähnlich wie Atropin ab, neutrale Antagonisten würden die basale Bindung nicht beeinflussen.

2.5.4 GTP γ S-Inhibitionsexperimente zur Erfassung des Einflusses von Antagonisten auf die Rezeptoraktivierung

Neben der Betrachtung einer einzelnen Testsubstanz auf die basale Rezeptoraktivität kann in [³⁵S]GTP γ S-Experimenten auch die Interaktion zweier Komponenten betrachtet werden. Hierbei wird die Abnahme der Wirksamkeit eines Agonisten in Abhängigkeit eines Antagonisten untersucht. Diese Methode liefert bei fehlender Spontanaktivität der Rezeptoren einen Schätzwert für die Affinität des Antagonisten.

Für die klassischen Verfahren nach Arunlakshana und Schild (1959), Gaddum (1957) oder Lanzafame et al. (1996) müssen komplette Konzentrations-Wirkungskurven des Agonisten unter Einfluss verschiedener Antagonist-Konzentrationen aufgenommen werden. Aus der Abhängigkeit der berechneten Verschiebefaktoren (dose ratios) der Einzelkurven gegen die Antagonistkonzentration kann auf die Affinität des Antagonisten geschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ein vereinfachtes Verfahren nach Waud angewendet (Waud 1978,

Lazareno und Birdsall 1993), welches einer globalen Schild-Analyse entspricht. Alle Datensätze werden gemeinsam nach Gleichung 26 ausgewertet, so dass Verfälschungen über Verschiebefaktoren und weitere Einzelanalysen vermieden werden können. Wenn davon ausgegangen werden darf, dass es sich um eine Parallelverschiebung der Kurvenschar handelt, reichen für diese Methode wenige Punkte der Kurven in Anwesenheit des Antagonisten. Damit ist diese Methode effizienter als die klassischen Analysen.

$$Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{(\log[EC_{50} \cdot (1 + (\frac{B}{10^{-1pA_2}})^s]) - X) \cdot n_H}}$$

Gleichung 26

- Y: Rezeptoraktivität (hier als [³⁵S]GTPγS-Bindung)
 Bottom: unteres Plateau
 Top: oberes Plateau
 EC₅₀: Wendepunkt der Kontrollkurve des Agonisten in Abwesenheit des Kompetitors
 B: Konzentration des antagonistischen Kompetitors
 X: Konzentration des Agonisten
 pA₂: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Kompetitors, welche die Agonist-Kurve um den Faktor 2 nach rechts verschiebt
 s: Steigung der Schild-Geraden
 n_H: Steigung der Agonist-Kurve (nach Hill 1919)

Die Durchführung erfolgt wie unter Kap. 2.5.2 beschrieben. Das Pipettierschema ist in Tab. 2.7 angegeben. Mittels nicht-linearer Regressionsanalyse nach Gleichung 26 wurde eine Kurvenschar generiert. Durch einen F-Test (p<0,05) wurde überprüft, ob die Steigungen der Agonist-Kurve (n_H) bzw. der Schildgeraden (s) signifikant verschieden von 1 waren. War dies nicht der Fall, so wurden sie in der Auswertung auf 1 festgesetzt. Der pA₂-Wert gibt an, bei welcher Antagonist-Konzentration die Agonist-Kurve um den Faktor 2 nach rechts verschoben wird, er ist also ein Schätzwert für die Affinität des Antagonisten zum Rezeptor. Wenn die Steigung der Schildgeraden nicht signifikant verschieden ist von 1, so gilt:

$$pA_2 = pK_B = pK_A$$

Gleichung 27

In diesem Fall kann von einer kompetitiven Interaktion ausgegangen werden. Der pK_B -Wert entspricht der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten pK_A , welche in Gleichgewichtsbindungsexperimenten bestimmt wurde.

	Basale Bindung	Atropin	Agonist (Kontrolle)	Antagonist	eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
[³⁵ S]GTP γ S (in Puffer)	50	50	50	50	0,7 nM	0,07 nM
Aqua dest.	100	50	50			
Agonist (in Wasser)			50	50	1x10 ^{-x} M 3x10 ^{-x} M	1x10 ^{-(x+1)} M 3x10 ^{-(x+1)} M
Antagonist (in Wasser)				50	1x10 ^{-x} M 3x10 ^{-x} M	1x10 ^{-(x+1)} M 3x10 ^{-(x+1)} M
Atropin (in Wasser)		50			10 μ M	1 μ M
GDP (in Puffer)	50	50	50	50	1x10 ⁻⁴ M 1x10 ⁻⁵ M	M _{2/4} : 10 μ M, M _{1/3/5} : 1 μ M
Membran (in Puffer)	50	50	50	50	400 μ g/ml	40 μ g/ml
Inkubationspuffer (L 10)	250	250	250	250	12,5 mM	10 mM
Gesamt-volumen	500	500	500	500		

Tab. 2.7: Pipettierschema für ein [³⁵S]GTP γ S-Inhibitionsexperiment auf den Einfluss von Antagonisten auf die Agonist-vermittelte Rezeptoraktivierung am Tomtec[®]-Harvester. Alle Volumina sind in μ l angegeben. Sofern nicht anders bezeichnet sind alle Komponenten in Aqua pro analysi gelöst. Der Inkubationspuffer enthält 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂, 100mM NaCl, pH 7,4 (L 10), Inkubationstemperatur 30°C.

2.5.5 Funktionelle Experimente auf Ganzzell-Ebene: dynamische Massenumverteilung

2.5.5.1 Theoretischer Hintergrund

Neben der Untersuchung der direkten G Protein-Aktivierung kann auch die Agonist-Auswirkung an ganzen Zellen untersucht werden. Hierzu wurde die dynamische Massenumverteilung (dynamic mass redistribution, DMR) am Epic[®]-System gemessen. Die Vorteile

dieser nicht invasiven Messung liegen darin, dass im Gegensatz zu den zuvor dargestellten Methoden die Antwort von ganzen, lebenden Zelle in Echtzeit detektiert wird.

Die Massenverschiebungen werden mit Hilfe eines optischen Biosensors (resonant waveguide grating, RWG) erfasst, der auf der Reflektion des eingestrahnten Lichtstrahls beruht (siehe Abb. 2.5). Die Reflektion ist abhängig von der optischen Dichte im erreichten Medium. Das elektromagnetische Feld des Laserlichtes reicht ungefähr 150 nm in die Zelle hinein. Somit können Massenverschiebungen innerhalb dieses membranahnen Bereichs detektiert werden.

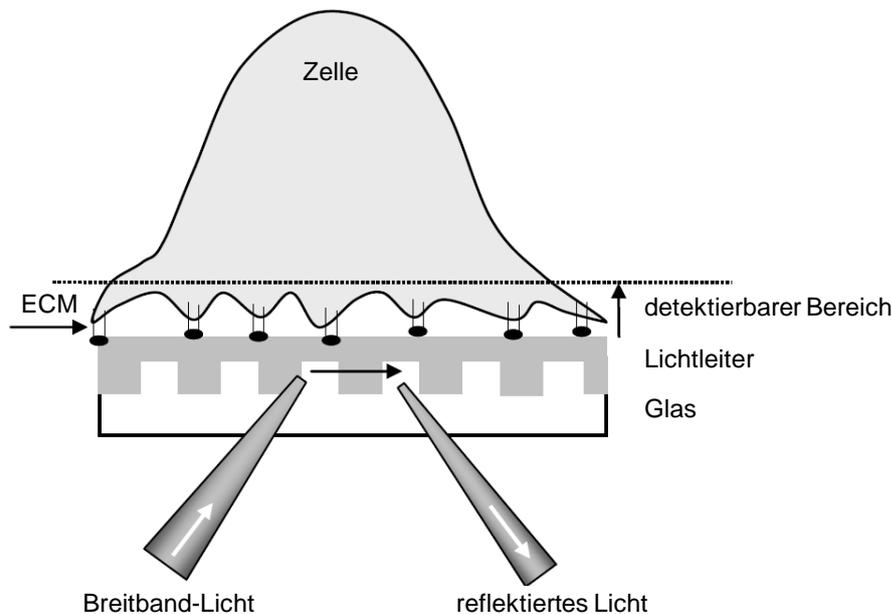


Abb. 2.5: Schematische Darstellung der Messung der dynamischen Massenverschiebung (DMR) mit einem optischen Biosensor (modifiziert nach Fang 2007)

Die Zellen adhären auf dem Biosensor, in den Breitbandlicht eingestrahlt wird. In Abhängigkeit von der optischen Dichte im detektierbaren Bereich wird eine Wellenlänge reflektiert, die durch den Lichtleiter zum Detektor weitergeleitet wird. Die Zellen sind über die Extrazellulärmatrix (ECM) mit dem Biosensor verbunden.

Bei ruhenden Zellen ist die reflektierte Wellenlänge konstant. Diese wird vor jeder Messung bestimmt. Durch Agonist-Stimulation kommt es zur Translokation von Partikeln innerhalb der Zelle, auch Formänderungen können beteiligt sein. Auch durch den Umbau im Cytoskelett verändern sich die optische Dichte und damit die Wellenlänge des reflektierten Lichtstrahls. Diese Wellenlängenverschiebung in Δ pm wird in Abhängigkeit von der Zeit vom Epic[®] System erfasst.

2.5.5.2 Praktische Durchführung

Um den Effekt von Antagonisten sichtbar machen zu können, mussten die Zellen zuvor mit einem Agonisten für ca. 10 min stimuliert werden. Daher ist das Protokoll von Kebig et al. (2009) leicht modifiziert worden. Für die DMR-Messungen wurden stabil transfizierte CHO FlpIn-Zellen verwendet.

Die Zellen wurden am Vortag des Versuchs in einer Mikrotiterplatte mit 384 Vertiefungen ausgesät. Jede Kavität verfügt am Boden über einen Biosensor wie oben beschrieben.

Die Zellen wurden wie unter Kap. 2.1.1 abgelöst und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml des entsprechenden Nährmediums (L 20) resuspendiert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (G 24) bestimmt und auf 250000 Zellen/ml verdünnt. In jede Vertiefung wurden 40 µl dieser Suspension (entsprechend 12500 Zellen) gegeben, für 1 min mit 900 rpm bei Raumtemperatur (Rotor JS 4.3, G 3) abzentrifugiert und anschließend über Nacht zur Konfluenz kultiviert (Bedingungen siehe Kap. 2.1.1). Beim Einsatz von Pertussistoxin wurden die Zellen in 30 µl ausgesät und 6 Stunden später wurden 10 µl Pertussistoxin (in Nährmedium verdünnt) zugesetzt. Die Endkonzentration betrug 100 ng/ml.

Nach 20 h wurde das Nährmedium ausgeschlagen und die Zellen wurden zweimal mit 50 µl des Messpuffers (HBSS mit 20 mM HEPES, L 7) gewaschen. Je nach weiterem Verlauf wurden 20 oder 30 µl Messpuffer zugesetzt (Endvolumen in der Messung 40 µl), in dem die Zellen 2 h bei 28°C im Messgerät ruhen konnten. Wenn die Zellen mit Forskolin (R 14) vorstimuliert werden sollten, so wurden 10 µl Puffer durch Forskolin (im Messpuffer verdünnt) ersetzt, so dass die Konzentration im Versuchsansatz 10 µM betrug.

In einer separaten Mikrotiterplatte (M 5) wurden je 20 µl der Testsubstanzen vorgelegt. Diese wurden ebenfalls für 2 h im Messgerät temperiert.

Zur Beginn der Messung wurde die reflektierte Wellenlänge für 100 sec bestimmt und als Ausgangswert definiert. Für die Vorstimulation wurden mit einer automatischen Pipettier-einrichtung 10 µl Acetylcholin zugesetzt (M 2). Die resultierende Wellenlängenverschiebung des reflektierten Lichtstrahls wurde detektiert.

Nach 8 min wurde der erste Lauf abgebrochen und die Substanzplatte für den eigentlichen Versuch geladen. Dadurch wurde gewährleistet, dass der Antagonist ungefähr 10 min nach dem Agonisten zugesetzt wurde.

Die erhaltenen Messpunkte wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism[®] graphisch dargestellt. Je nach Fragestellung wurden die Minima bzw. Maxima der Signaturen mit dem

Programm Microsoft Excel[®] 2007 bestimmt und wiederum mit GraphPad Prism[®] ausgewertet (Gleichung 11).

2.6 Statistik

Die Parameterwerte der ermittelten Konzentrations-Wirkungskurven (Wendepunkt, Steilheit und Plateaus) wurden für jede Kurve individuell bestimmt. Aus den Parameterwerten der unabhängigen Einzelversuche wurden im Anschluss die Mittelwerte und Standardfehler bestimmt, welche tabellarisch angegeben wurden. In den graphischen Abbildungen sind alle Datensätze zur besseren Darstellung vereint.

Da konzentrationsabhängige Messdaten log-normal verteilt sind (Christopoulos 1998), wurden aus den EC₅₀-Daten pEC₅₀-Werte gebildet.

$$pEC_{50} = -1 \cdot \log(EC_{50})$$

Gleichung 28

Der **arithmetische Mittelwert** \bar{x} ergibt sich aus der Summe der Einzeldaten, geteilt durch die Versuchsanzahl n.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n}$$

Gleichung 29

x_i : Messwert des i-ten Einzelversuchs
 n: Anzahl der unabhängigen Einzelversuche

Die Einzelwerte streuen um den Mittelwert. Maßzahlen für die Streuung und damit für die Präzision des Mittelwerts sind die **Varianz** s^2 , die **Standardabweichung SD**, sowie der **Standardfehler des Mittelwerts SEM** (standard error of the mean).

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Gleichung 30

$$SD = \sqrt{s^2}$$

Gleichung 31

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}}$$

Gleichung 32

Die nicht lineare Kurvenanpassung an die Datenpunkte erfolgt nach dem Prinzip der Minimierung der Abstandsquadrate (method of the least squares). Hierbei wird die Summe der vertikalen Abstandsquadrate bestimmt.

$$ss = \sum (f(x) - y_i)^2$$

Gleichung 33

- ss: Summe der Abstandsquadrate (sum of squares)
- f(x): berechneter y-Wert
- y_i: gemessener y-Wert

Über das Verhältnis der Abstandsquadrate der Datenpunkte zu dem berechneten Kurvenverlauf (ss) gegenüber den Abstandsquadraten zu einer horizontalen Linie durch den Mittelwert der y-Werte (ss_{tot}) wird der **Regressionskoeffizient** R² berechnet. Je besser die Analyse die Datenpunkte beschreibt, desto stärker nähert sich der Regressionskoeffizient 1 an.

$$R^2 = 1 - \frac{ss}{ss_{tot}}$$

Gleichung 34

Werden zwei verschiedene Modelle für die Auswertung eines Datensatzes miteinander verglichen, so wird von der Software GraphPad Prism[®] ein **F-Test** mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% durchgeführt. Dies gilt sowohl für den Vergleich zweier verschiedener Gleichungen, als auch zur Überprüfung einzelner Parameter (z.B. n_H = -1 oder Bottom = 0).

Neben den Abstandsquadraten werden auch die Freiheitsgrade (df, degrees of freedom) der einzelnen Modelle berücksichtigt.

$$F = \frac{\frac{ss_1 - ss_2}{df_1 - df_2}}{\frac{ss_2}{df_2}}$$

Gleichung 35

- ss₁: Summe der Abstandsquadrate bei Verwendung von Gleichung 1
- ss₂: Summe der Abstandsquadrate bei Verwendung von Gleichung 2
- df₁: Freiheitsgrade von Gleichung 1
- df₂: Freiheitsgrade von Gleichung 2

Für den Vergleich von Mittelwerten zweier Stichproben wurde mit Hilfe des Programms GraphPad InStat 3 ein ungepaarter, zweiseitiger **t-Test** durchgeführt. Dieses parametrische Verfahren ermittelt, ob ein gefundener Unterschied rein zufälliger Natur ist, oder ob sich die beiden Grundgesamtheiten statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Voraussetzungen hierfür sind, dass die beiden Messreihen annähernd dieselbe Standardabweichung besitzen (Überprüfung durch F-test) und die Einzelwerte normalverteilt sind.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \cdot \frac{(n_1 - 1) \cdot SD_1^2 + (n_2 - 1) \cdot SD_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}}$$

Gleichung 36

Mit Hilfe dieses berechneten t-Werts wird ein Maß für die Wahrscheinlichkeit (p-Wert) aus Tabellenwerken oder Computerprogrammen ermittelt. Ist der p-Wert <0,05 (Irrtumswahrscheinlichkeit 5%), so besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den getesteten Parametern. Andersfalls war der Unterschied zufällig.

Als Abwandlung kann ein Einstichproben-t-Test durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob der Mittelwert einer Versuchsreihe von einem hypothetischen Wert signifikant abweicht.

2.7 Strukturformeln der eingesetzten Verbindungen

Die eingesetzten Substanzen konnten entweder käuflich erworben werden oder wurden im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe (AK Holzgrabe) am Pharmazeutischen Institut der Universität Würzburg synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das Kürzel „JK“ steht für Frau Dipl.-Chem. Jessica Klöckner und „JSW“ für Herrn Dr. Jens Schmitz aus Würzburg. Einige der agonistischen Verbindungen wurden an der Universität Mailand im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. M. De Amici entwickelt.

2.7.1 Radioliganden

[³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS)

Summenformel: C₁₈H₂₄NO₄ x Br
 Molekulargewicht: 398,3 g/mol
 spezifische Aktivität: 70-82 Ci / mmol
 (chargenabhängig)
 Lieferant: Perkin Elmer
 Produktnummer: NET636001MC

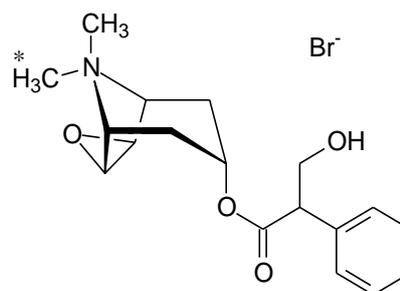


Abb. 2.6: Strukturformel von [³H]N-Methylscopolamin-Bromid

*: Position der radioaktiven Markierung, alle drei Wasserstoffatome einer der beiden Methylgruppen sind durch Tritium ausgetauscht

Eigenschaften: N-Methylscopolamin ist das quartäre Derivat von Scopolamin. Es ist ein inverser Agonist an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren.

[³⁵S]GTP_γS

Summenformel: C₁₀H₁₆N₅O₁₃P₃S
 Molekulargewicht: 539,2 g/mol
 spezifische Aktivität: 1250Ci / mmol
 Lieferant: Perkin Elmer
 Produktnummer: NET030H250UC

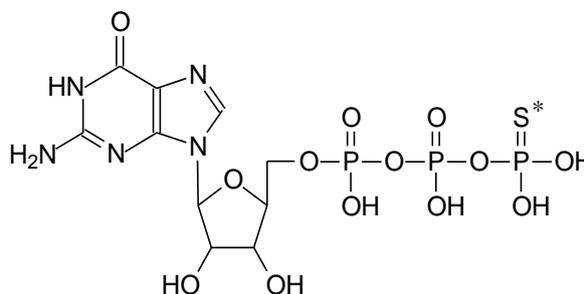


Abb. 2.7: Strukturformel von [³⁵S]GTP_γS

*: Position der radioaktiven Markierung

Eigenschaften: Guanosintriphosphat (GTP) ist ein essentielles Nukleotid bei der Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Durch Austausch eines Sauerstoffatoms gegen ein Schwefelatom wird das Molekül hydrolysestabil (siehe 2.5).

2.7.2 Orthosterische Liganden

Atropin

Summenformel: $(C_{17}H_{24}NO_3)_2 SO_4$
 Molekulargewicht: 676,8 g/mol
 Lieferant: Sigma-Aldrich
 Produktnummer: A-0257

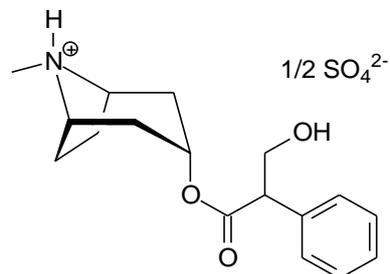


Abb. 2.8: Strukturformel von Diatropinsulfat

Eigenschaften: Atropin ist das Hauptalkaloid der Tollkirsche (*Atropa belladonna*, *Solanaceae*). Des Weiteren findet es sich in Engelstropfen (*Brugmansia*), Stechapfel (*Datura stramonium*) und Alraunen (*Mandragora*). Nativ kommt Atropin als Racemat aus S- und R-Hyoscyamin vor, welches sich bei der Isolierung aus S-Hyoscyamin bildet. Es führt als Parasympatholytikum bei einer Vergiftung u.a. zu Mydriasis, Obstipation, Hyperthermie und Halluzinationen. Therapeutisch wird es als Ophthalmikum zur Diagnostik (z.B. Atropin POS[®]), zur Ausschaltung des Nervus vagus in der Narkoseprämedikation (z.B. Atropinsulfat B. Braun), bei Spasmen des Gastro-Intestinal-Trakts (z.B. Dysurgal[®]) oder als Antidot bei Organophosphatvergiftungen eingesetzt.

Scopolamin

Summenformel: $C_{17}H_{22}BrNO_4$
 Molekulargewicht: 384,3 g/mol
 Lieferant: Sigma-Aldrich
 Produktnummer: S-1875

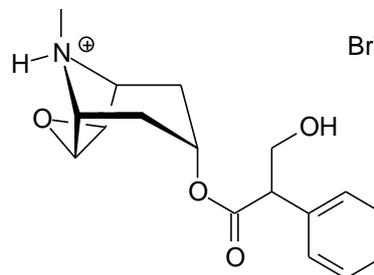
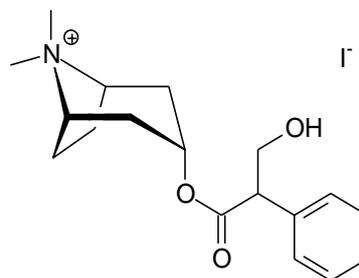


Abb. 2.9: Strukturformel von Scopolaminbromid

Eigenschaften: Scopolamin (=L-Hyoscin) ist wie Atropin als Tropanalkaloid ein Parasympatholytikum. Es kommt in verschiedenen Arten der Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) vor (z.B. Stechapfel (*Datura stramonium*), Engelstropfen (*Brugmansia*)). Therapeutischen Einsatz findet es in der Ophthalmologie (z.B. Boro-Scopol[®] N Augentropfen), sowie als transdermales System gegen Reiseübelkeit (z.B. Scopoderm[®]).

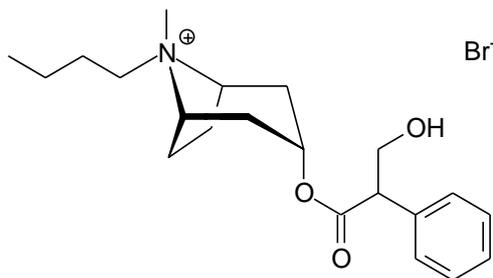
N-Methylatropin

Summenformel: $C_{18}H_{26}INO_3$
 Molekulargewicht: 431,31g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe
 Synthesebezeichnung: JK160



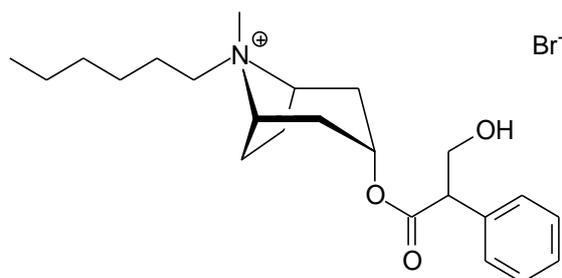
N-Butylatropin

Summenformel: $C_{21}H_{32}BrNO_3$
 Molekulargewicht: 426,39g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe
 Synthesebezeichnung: JK164-2



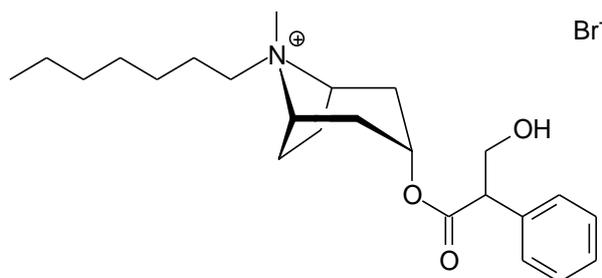
N-Hexylatropin

Summenformel: $C_{23}H_{36}BrNO_3$
 Molekulargewicht: 454,44 g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe
 Synthesebezeichnung: JK221



N-Heptylatropin

Summenformel: $C_{24}H_{38}BrNO_3$
 Molekulargewicht: 468,47 g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe
 Synthesebezeichnung: JK232



N-Octylatropin

Summenformel: $C_{25}H_{40}BrNO_3$
 Molekulargewicht: 482,49 g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe
 Synthesebezeichnung: JK235

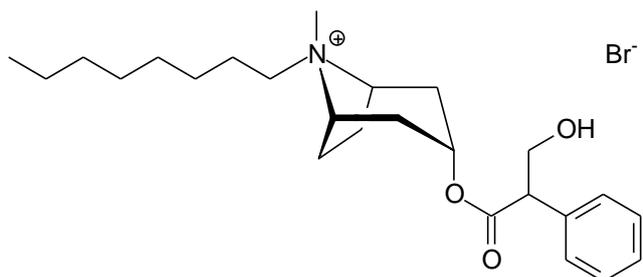
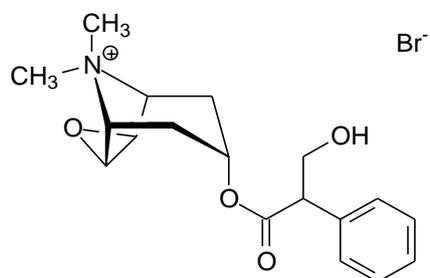


Abb. 2.10: Strukturformeln der schrittweise von Methyl (C1) bis Octyl (C8) verlängerten Atropin-Derivate als Iodid- bzw. Bromid-Salze

Ausgehend vom Atropin wurde die aliphatische Seitenkette am Tropanstickstoff schrittweise verlängert. Bei allen Verbindungen handelt es sich um inverse Agonisten.

N-Methylscopolamin

Summenformel: $C_{18}H_{24}BrNO_4$
 Molekulargewicht: 398,3 g/mol
 Lieferant: Sigma-Aldrich
 Produktnummer: S-8502



N-Butylscopolamin

Summenformel: $C_{21}H_{30}BrNO_4$
 Molekulargewicht: 440,4 g/mol
 Lieferant: Sigma-Aldrich
 Produktnummer: S-7882

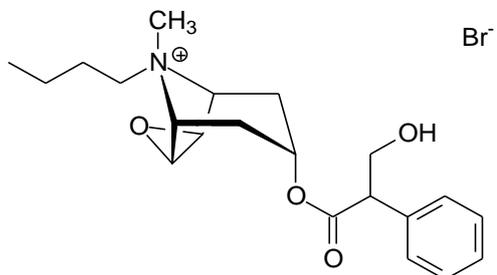


Abb. 2.11: Strukturformeln der schrittweise verlängerten Scopolaminderivate

Ausgehend vom Scopolamin wurde die aliphatische Seitenkette am Tropanstickstoff schrittweise verlängert. Bei beiden Verbindungen handelt es sich um inverse Agonisten.

Wegen seines quartären Stickstoffs wird N-Butylscopolamin kaum resorbiert und gelangt nicht ins zentrale Nervensystem. Daher wird es bei peripheren Anwendungen dem Scopolamin vorgezogen. Es wird bei vielfältigen viszerale Spasmen angewendet (z.B. Buscopan®).

Acetylcholin

Summenformel: $C_7H_{16}INO_2$
 Molekulargewicht: 273,11 g/mol
 Lieferant: Sigma-Aldrich
 Produktnummer: A-7000

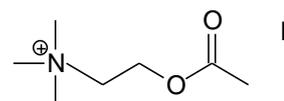


Abb. 2.12: Strukturformel von Acetylcholin-Iodid

Eigenschaften: Acetylcholin (ACh) ist ein wichtiger Neurotransmitter im menschlichen Körper. Es ist der physiologische Ligand an muskarinischen und nicotinischen Acetylcholinrezeptoren und kann beide Rezeptoren vollständig aktivieren. Desweiteren ist Acetylcholin in nicht-neuronalem Gewebe nachgewiesen worden, wo es vielfältige Effekte im Rahmen der Zellproliferation einnimmt (Wessler et al., 1999; Eglén, 2006).

Iperoxo

Summenformel: $C_{10}H_{17}IN_2O_2$
 Molekulargewicht: 324,16 g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe
 + AK De Amici
 Synthesebezeichnung: ITA5

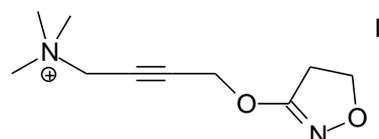


Abb. 2.13: Strukturformel von Iperoxo-Iodid

Eigenschaften: Iperoxo ist ein synthetisches Derivat des Oxotremorin M. An muskarinischen Acetylcholinrezeptoren stellt es einen Vollagonisten mit hoher Affinität dar.

N-Butyliperoxo

Summenformel: $C_{13}H_{23}BrN_2O_2$
 Molekulargewicht: 319,24 g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe
 Synthesebezeichnung: JK165

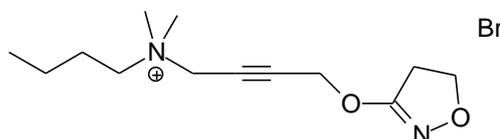


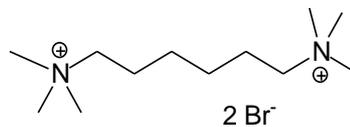
Abb. 2.14: Strukturformel von N-Butyliperoxo-Bromid

Bei N-Butyliperoxo wurde eine Methylgruppe des Iperoxo durch eine Butylgruppe ersetzt.

2.7.3 Allosterische Modulatoren

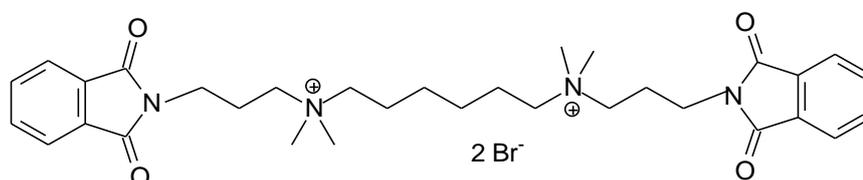
Hexamethonium

Summenformel: $C_{12}H_{30}Br_2N_2$
 Molekulargewicht: 362,2 g/mol
 Lieferant: Sigma-Aldrich
 Produktnummer: H-0879



W84

Summenformel: $C_{32}H_{44}Br_2N_4O_4$
 Molekulargewicht: 708,5 g/mol
 Herkunft: Dr. Pfeffer, Uni Kiel



Naphmethonium

Summenformel: $C_{38}H_{50}Br_2N_4O_4$
 Molekulargewicht: 786,62 g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe
 (Dr. M. Muth)
 Synthesebezeichnung: MM3A, EHW433

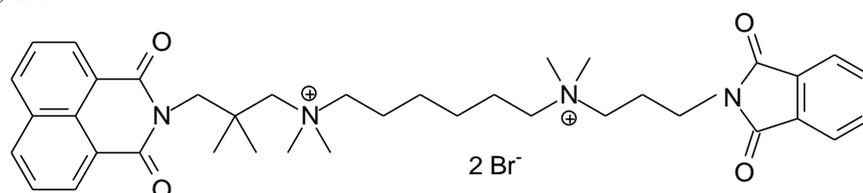


Abb. 2.15: Strukturformeln der eingesetzten allosterischen Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ

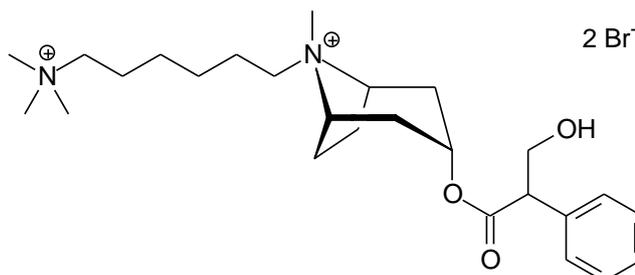
Bei allen drei Verbindungen handelt es sich um M_2 -selektive allosterische Modulatoren an Muskarinrezeptoren (Prilla Dissertation 2006).

2.7.4 Orthosterisch/allosterische Hybridsubstanzen

Die eingesetzten Hybridsubstanzen besitzen als orthosterischen Baustein Atropin (Atr), Scopolamin (Sco) oder Desmethyloperoxo (Iper). Der Stickstoff ist jeweils mit einem der Stickstoffe der allosterischen Modulatoren (Hex, W84, Naph) verknüpft.

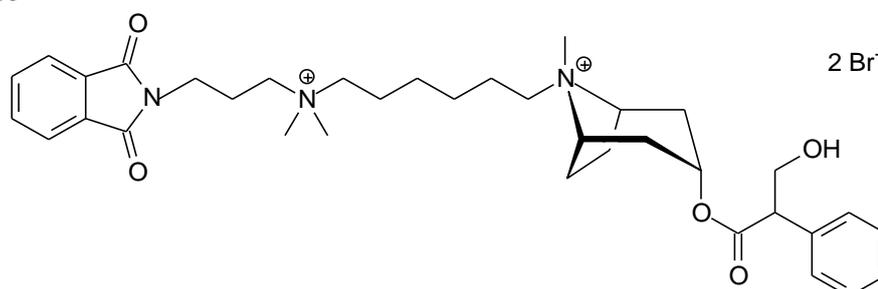
Atr-Hex (JSW258)

Summenformel: $C_{26}H_{44}Br_2N_2O_3$
 Molekulargewicht: 592,46 g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe
 Synthesebezeichnung: JSW258



Atr-W84 (JSW253)

Summenformel: $C_{36}H_{51}Br_2N_3O_5$
 Molekulargewicht: 785,6 g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe
 Synthesebezeichnung: JSW253



Atr-Naph (JSW254)

Summenformel: $C_{42}H_{57}Br_2N_3O_5$
 Molekulargewicht: 863,74 g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe
 Synthesebezeichnung: JSW254

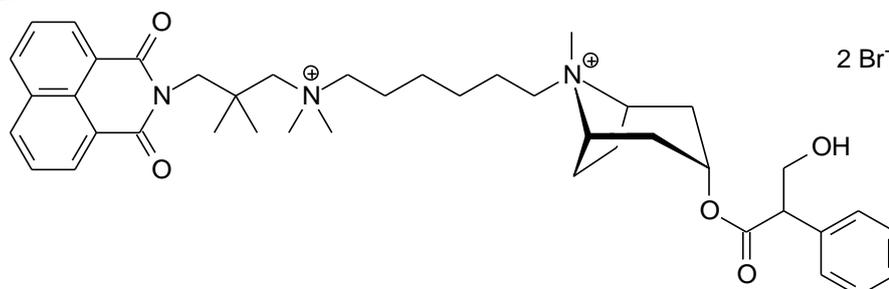
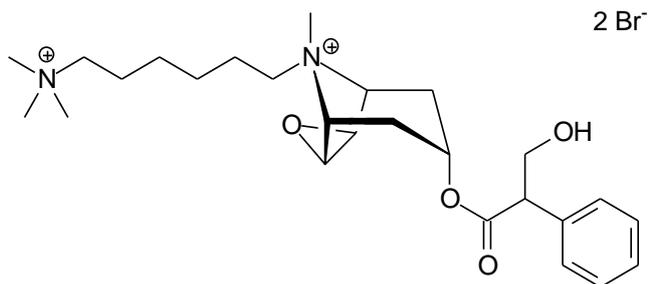


Abb. 2.16: Strukturformeln der untersuchten antagonistischen Hybridsubstanzen, die Atropin als orthosterischen Baustein besitzen.

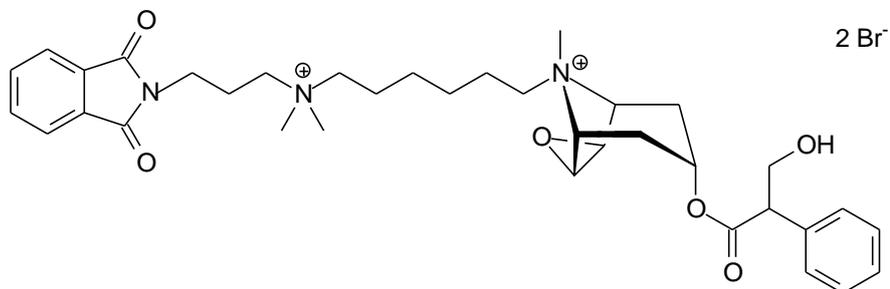
Sco-Hex (JK179)

Summenformel: $C_{26}H_{42}Br_2N_2O_4$
 Molekulargewicht: 606,43 g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe
 Synthesebezeichnung: JK179



Sco-W84 (JSW257)

Summenformel: $C_{36}H_{49}Br_2N_3O_6$
 Molekulargewicht: 779,62 g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe
 Synthesebezeichnung: JSW257



Sco-Naph (JSW256)

Summenformel: $C_{42}H_{55}Br_2N_3O_6$
 Molekulargewicht: 856,83 g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe
 Synthesebezeichnung: JSW256

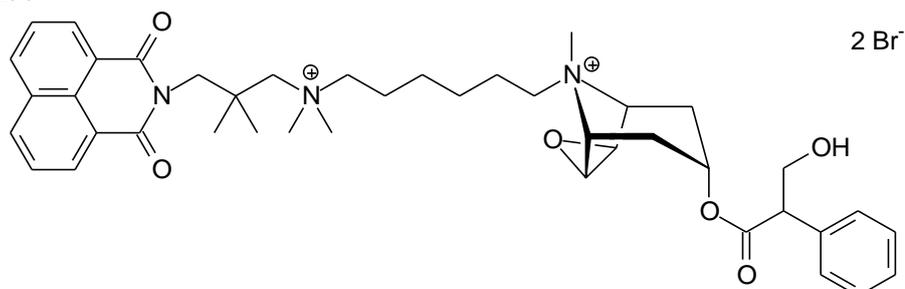
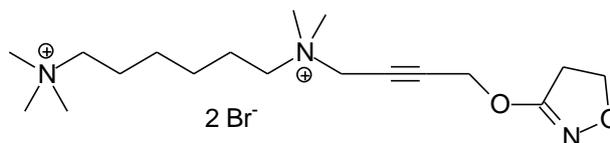


Abb. 2.17: Strukturformeln der untersuchten antagonistischen Hybridsubstanzen, die Scopolamin als orthosterischen Baustein besitzen.

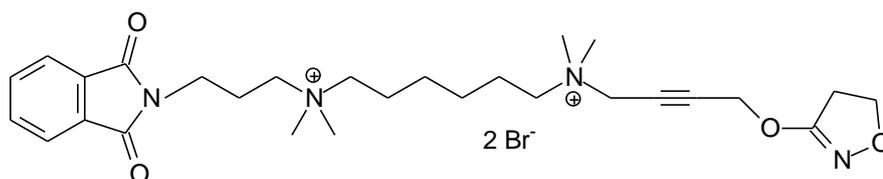
Iper-Hex (JSW236)

Summenformel: $C_{18}H_{33}Br_2N_3O_2$
 Molekulargewicht: 485,3 g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe
 Synthesebezeichnung: JSW236



Iper-W84 (=Hybrid1, DDT5)

Summenformel: $C_{28}H_{42}Br_2N_4O_4$
 Molekulargewicht: 658,47 g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe,
 AK DeAmici
 Synthesebezeichnung: DDT5



Iper-Naph (=Hybrid2, MMH5-6)

Summenformel: $C_{34}H_{48}Br_2N_4O_4$
 Molekulargewicht: 736,6 g/mol
 Herkunft: AK Holzgrabe,
 AK DeAmici
 Synthesebezeichnung: MMH5-6

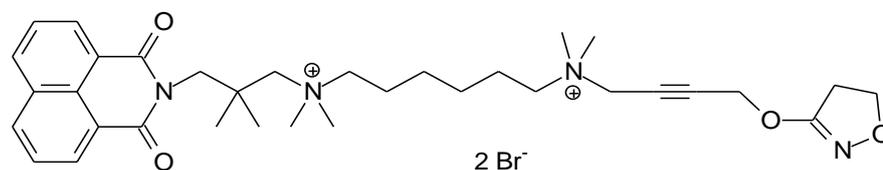


Abb. 2.18: Strukturformeln der untersuchten agonistischen Hybridsubstanzen, die Desmethyl-Iperoxo als orthosterischen Baustein besitzen.

2.8 Materialien

2.8.1 Herstellung von Puffern, Lösungen und Nährmedien

L 1 Ampicillin-Lösung (50 mg/ml)

750 mg Ampicillin-Natrium (R 3)

15 ml Aqua dest. (R 4)

Anschließend unter der Laminar-Airflow-Bank (G 16) sterilfiltrieren und in sterilisierte PP-Röhrchen (M 19) zu 550µl aliquotieren

Lagerung bei -20°C

L 2 Butyrat-Stammlösung

1,101 g Natriumbutyrat (R 30)

100 ml Aqua dest. (R 4)

Lagerung bei 2-8°C

L 3 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), steril

1 Packung PBS-Pulver (9,6 g) (R 8)

1000 ml Aqua dest. (R 4)

Anschließend unter der Laminar-Airflow-Bank (G 15) mit Hilfe von Einwegfiltern (M 25) sterilfiltrieren. Lagerung bei 2-8°C

(137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄)

L 4 GDP-Stammlösung (10 mM)

4,65 mg GDP-Natrium (R 17)

1 ml Aqua pro analysi (R 5)

zu je 50 µl aliquotieren und bei -20°C lagern

L 5 Glucose-Lösung 20%

4 g Glucose (R 6)
20 ml Aqua dest. (R 4)
steril filtrieren, Lagerung bei -20°C

L 6 Glycerol-Lösung 60%

30,3 ml Glycerol (R 16)
19,7 ml Aqua dest. (R 4)
Anschließend unter der Laminar-Airflow-Bank (G 16) sterilfiltrieren und zu 10ml
aliquotieren; Lagerung bei 2-8°C

L 7 HBSS mit 20 mM HEPES (pH 7,0)

490 ml HBSS (R 18)
10 ml HEPES-Lösung (R 21)
zu 50 ml aliquotieren (M 4)

L 8 HEPES-Stammlösung (200 mM, pH 7,4)

17,353 g HEPES Na-Salz (R 19)
31,773 g HEPES Säure (R 20)
in Aqua dest. (R 4) lösen, mit 0,1 M NaOH (R 33) auf pH 7,4 einstellen
mit Aqua dest. ad 1000 ml

L 9 Homogenisationspuffer (20 mM HEPES, 10 mM Na₂-EDTA)

50 ml HEPES-Stammlösung (L 8) (200 mM)
50 ml Na₂-EDTA (100 mM) (R 10)
400 ml Aqua dest. (R 4)

L 10 Inkubationspuffer (12,5 mM HEPES, 12,5 mM MgCl₂, 125 mM NaCl)

1,085 g HEPES Na-Salz (R 19)

1,986 g HEPES Säure (R 20)

2,541 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl₂ x 6 H₂O) (R 29)

7,305 g Natriumchlorid (R 32)

in Aqua dest. (R 4) lösen, mit 0,1 M NaOH (R 33) auf pH 7,4 einstellen
mit Aqua dest. ad 1000 ml

L 11 Inkubationspuffer ohne Natrium

(12,5 mM HEPES, 12,5 mM MgCl₂, ~5 mM NaCl)

1,085 g HEPES Na-Salz (R 19)

1,986 g HEPES Säure (R 20)

2,541 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl₂ x 6 H₂O) (R 29)

in Aqua dest. (R 4) lösen, mit 0,1 M NaOH (R 33) auf pH 7,4 einstellen
mit Aqua dest. ad 1000 ml

L 12 Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung 2%

2 g Kalium-Natrium-Tartrat-Tetrahydrat (R 24)

in 100 ml Aqua dest. (R 4) lösen

Lagerung bei Raumtemperatur

L 13 Kupfer(II)sulfat-Lösung 1%

1 g Kupfersulfat-Pentahydrat (R 25)

in 100 ml Aqua dest. (R 4) lösen

Lagerung bei Raumtemperatur

L 14 Lowry – Arbeitslösung

100 Teile 2% Natriumcarbonat-Lösung (L 21)

1 Teil 2% Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung (L 12)

1 Teil 1% Kupfersulfat-Lösung (L 13)

L 15 Lowry – Farblösung

- 1 Teil Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (R 13)
 3 Teile Aqua dest. (R 4)

L 16 Luria-Bertani Agarplatten, Ampicillin-haltig

- 18,5 g Luria-Bertani Agar (LB-Agar) (R 27)
 500 ml Aqua dest. (R 4)

in Mikrowelle lösen, anschließend autoklavieren, bei ca. 55°C 200 µl Ampicillin-Lösung zugeben (L 1). Je 25 ml flüssigen Agar in sterile Petrischale (10 cm) gießen und bei 2-8°C aushärten lassen

L 17 Luria-Bertani Medium, Ampicillin-haltig

- 12,5 g Luria-Bertoni Medium (LB Broth) (R 28)
 500 ml Aqua dest. (R 4)

nach der Herstellung autoklavieren

zur abgekühlten Lösung 500 µl Ampicillin-Lösung (L 1) zugeben

L 18 Nährmedium für CHO-Zellen aus Frankfurt (M₁-M₅wt)

Zum handelsüblichen Nährmedium F-12 (Nutrient Mixture F-12 Ham, R 34) wurde zugegeben:

Fetales Kälber Serum (R 11)	50	ml
Penicillin-Streptomycin Lösung (R 37)	5	ml
L-Glutamin Lösung (200mM) (R 26)	3	ml
G418 Stammlösung (100mg/ml) (R 15)	1	ml

L 19 Nährmedium für CHO-K1-Zellen

Zum handelsüblichen Nährmedium F-12 (Nutrient Mixture F-12 Ham, R 34) wurde zugegeben:

Fetales Kälber Serum (R 11)	50	ml
Penicillin-Streptomycin Lösung (R 37)	5	ml
L-Glutamin Lösung (200mM) (R 26)	3	ml

L 20 Nährmedium für FlpIn CHO-Zellen

Zum handelsüblichen Nährmedium F-12 (Nutrient Mixture F-12 Ham) wurde zugegeben.

Fetales Kälber Serum (R 11)	50	ml
Penicillin-Streptomycin Lösung (R 37)	5	ml
L-Glutamin Lösung (200mM) (R 26)	6	ml

L 21 Na₂CO₃-Lösung 2%

2 g Natriumcarbonat (R 31)
10 ml Aqua dest. (R 4)

Bei jeder Proteinbestimmung ist eine frische Herstellung nötig.

L 22 NZY-Lösung

4,2 g NZY-Broth (R 35)
200 ml Aqua dest. (R 4)

mit 1N NaOH (R 33) auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren und bei 2-8°C lagern

L 23 NZY⁺-Lösung

10 ml NZY-Lösung (L 22)
200 µl sterile Glucose-Lösung (L 5)

Lagerung bei 2-8°C

L 24 Polyethylenimin-Stammlösung 1% (PEI)

10 g PEI-Lösung 50% (R 40)
mit Aqua dest. ad 500 ml (R 4)

Lagerung bei 2-8°C

L 25 Polyethylenimin-Lösung 0,1% (PEI)

50 ml PEI-Stammlösung (L 24)
mit Aqua dest. (R 4) ad 500 ml

L 26 Tris-EDTA-Puffer 10 mM, steril (TE-Puffer)

0,0292 g EDTA (Ethylendiaminotetraessigsäure) (R 9)

0,1211 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (R 48)

mit Aqua dest. (R 4) ad 100 ml

EDTA unter Rühren und Zugabe von 1N NaOH (R 33) in ca. 60ml Aqua dest. lösen.

Tris hinzugeben und den pH-Wert mit 1N Salzsäure (R 46) auf pH 8,0 einstellen.

Mit Aqua dest. auffüllen, steril filtrieren und bei 2-8°C lagern

L 27 Zentrifugationspuffer (20 mM HEPES, 0,1mM Na₂-EDTA)

50 ml HEPES-Stammlösung (L 8)

0,5 ml Na₂-EDTA (100 mM) (R 10)

Aqua dest. (R 4) ad 500 ml

2.8.2 Reagenzien

	Bezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller
R 1	Agarose	A9539	Sigma
R 2	Albumin, human (Fraktion V)	A-1653	Sigma
R 3	Ampicillin-Natrium	A-9518	Sigma
R 4	Aqua destillata (Herstellung mittels Elix [®] -Wasseraufbereitung (G 8))		Milli
R 5	Aqua pro analysi (Herstellung mittels Milli Q [®] -Wasseraufbereitung (G 21))		Milli
R 6	D(+)-Glucose-Monohydrat	8346	Merck
R 7	Dimethylsulfoxid (DMSO)	D-5879	Sigma
R 8	Dulbeccos' s phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	D-5652	Sigma
R 9	Ethylendiaminotetraessigsäure- (EDTA)	E-9884	Sigma
R 10	Ethylendiaminotetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA), Maßlösung, 100mM	20271	Grüss

Materialien

R 11	Fetal Bovine Serum (FKS)	F-7524	Sigma
R 12	FlpIn™ Complete System	K601001	Invi
R 13	Folin-Ciocalteus Phenolreagenz	1.09001.0500	Merck
R 14	Forskolin	A2165	AppliChem
R 15	G418-Disulfat	ant-gn	Invi
R 16	Glycerol 99 %	G-5516	Sigma
R 17	Guanosin-5'-diphosphat, Natriumsalz	G-7127	Sigma
R 18	Hanks' balanced salt solution (HBSS) (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,25 mM Na ₂ HPO ₄ , 0,44 mM KH ₂ PO ₄ , 1,3 mM CaCl ₂ , 1,0 mM MgSO ₄ , 4,2 mM NaHCO ₃)	14025-050	Invi
R 19	HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1- ylethansulfonsäure), Natriumsalz	H-7006	Sigma
R 20	HEPES, freie Säure	H-3375	Sigma
R 21	HEPES buffer solution (1 M)	15630-056	Invi
R 22	Hygromycin B	10687-010	Invi
R 23	Isopropanol 99,5% (HPLC)	34863	Qia
R 24	Kalium-Natriumtartrat-Tetraydrat (KNaC ₄ H ₄ O ₆ x 4 H ₂ O)	B6916	Sigma
R 25	Kupfersulfat-Pentahydrat (CuSO ₄ x 5 H ₂ O)	1.02790.0250	Merck
R 26	L-Glutamin-Lösung 200mM	G-7513	Sigma
R 27	Luria-Bertani-Agar	L-3027	Sigma
R 28	Luria-Bertani Broth	L-3522	Sigma
R 29	Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	M-2670	Sigma
R 30	Natriumbutyrat	26319	Acros
R 31	Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	1.06392.0500	Merck
R 32	Natriumchlorid (NaCl)	1064041	Merck
R 33	Natronlauge 1 N (NaOH)	35256	RdH
R 34	Nutrient Mixture F-12 Ham	N-4888	Sigma
R 35	NZY-Broth	13635-024	Gibco
R 36	Oxotremorin M	O-100	Sigma

Materialien

R 37	Penicillin-Streptomycin-Lösung (Penicillin 10.000 U/ml, Streptomycin 10 mg/ml) (PenStrep)	P-0781	Sigma
R 38	Pertussistoxin	P2980	Sigma
R 39	pOG44-Plasmid	V6005-20	Invi
R 40	Polyethylenimin, 50 %, wässrige Lösung (PEI)	P-3143	Sigma
R 41	PolyFect [®] Transfection Reagent	301107	Qia
R 42	2-Propanol, 99,5 % für HPLC	27,049-0	Sigma
R 43	Qiagen [®] Plasmid Maxi Kit	12162	Qia
R 44	QuickChange [™] site-directed mutagenesis kit	200519	Strata
R 45	Ready Protein [™] Szintillations-Cocktail	P/N586604	BeckC
R 46	Salzsäure 1N (HCl)	23204	Grüss
R 47	Sigmacote [®]	SL2	Sigma
R 48	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	1.08382.0500	Merck
R 49	Trypsin-EDTA-Lösung	T-3924	Sigma
R 50	Zeocin [™]	R25001	Invi

2.8.3 Verbrauchsmaterialien

	Bezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller
M 1	Cellstar [®] Einmalpipette 10ml, 25ml, steril	607160 760160	Grein
M 2	CyBio Spitzen 284/25 µl	520922	CyB
M 3	Deep Well Plates, 96 Kavitäten, PP	AB-0564	Abg
M 4	Epic [®] microplate	5040	Corn
M 5	Epic [®] source plate	3657	Corn
M 6	Falcon tubes, steril, PP, 15ml 50 ml	188271 227261	Grein
M 7	Finntip-Stepper-Spitzen 0,5ml, 1,25ml, 2,5ml, 5,0ml, 12,5ml		TherF
M 8	Gewebekulturschalen, steril, 100/20mm	664160	Grein

Materialien

M 9	Gewebekulturschalen, steril, 145/20mm	639160	Grein
M 10	Glasfaserfilter, rund, Ø 25 mm	10370018	Whatm
M 11	Inject Einmalspritzen 10ml, 20ml		B. Braun
M 12	Kryovials CryoFlex 1,5ml, PP-Röhrchen mit Drehverschluss	123263	Grein
M 13	Meltilex™ A-Wachsplatte	1450-441	Perk
M 14	MicroAmp® Reaktionsgefäße 0,2ml	N8010540	App Bio
M 15	Parafilm® M Laboratory Film	PM-996	Brand
M 16	Pasteur-Pipetten aus Glas	747715	Brand
M 17	Pipettenspitzen Tip-One® 1-200µl, 200-1000µl		Star Brand
M 18	Plate Cassette	1450-105	Perk
M 19	PP-Reaktionsgefäße 1,5ml	616201	Grein
M 20	PP-Reaktionsgefäße Safe-lock 1,5ml	0030 120.086	Epp
M 21	Printed Filtermat A (Glasfaserfiltermatte)	1450-421	Perk
M 22	Qualilab® Spritzenvorsatzfilter, 0,22µm CM-Membran, steril	5122110	Merck Lab
M 23	Sample bag	1450-432	Perk
M 24	Schraubverschluss für Szintillationsgefäße, weiß, 27mm	619080	Fish
M 25	SFCA Bottle Top Filter 150ml	8-1020-05	Nalge
M 26	Szintillationsgefäße aus Polypropylen (PE) 27/60mm	619301	Fish
M 27	Zellschaber 25cm, steril	83.1830	Sar
M 28	Zentrifugenbehältnis, PP, 500 ml	361691	BeckI
M 29	Zentrifugenröhrchen, Polycarbonat (PC), 50 ml	3138-0050	Nalge

2.8.4 Geräte und Apparaturen

	Bezeichnung	Hersteller
G 1	Accu-Jet [®]	Brand
G 2	Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss
G 3	Beckman Avanti J-20 XP Ultrazentrifuge	BeckC
G 4	Beckman LS 6000 SC +LS 6500	BeckC
G 5	Beckmann Mikrofuge 365627	BeckC
G 6	Dri-Block [®] DB2A	Tech
G 7	Eismaschine, AF 100 AS-E 230/50/1	Scot
G 8	Elix [®] Destillieranlage	Milli
G 9	Epic [®] , β -Version	Corn
G 10	Eppendorf Centrifuge 5417C	Epp
G 11	Finnpipette [®] fixed 50 μ l, fixed 1000 μ l, 0,2-2 μ l, 0,5-10 μ l, 5-50 μ l, 20-200 μ l, 200-1000 μ l, 1-5ml	TherF
G 12	Finnpipette [®] Multistep	TherF
G 13	Gefrierschrank -86°C ULT	Ther
G 14	GeneAmp-PCR-System 2400	Perk
G 15	Heraeus-Brutschrank, B6060	Kendro
G 16	Herasafe-Werkbank HS15, Klasse II	Hera
G 17	Messkolben 100ml/ 500ml/ 1000ml/ 2000ml/ 5000ml	Hirsch
G 18	Messzylinder 50ml/ 100ml/ 500ml/ 1000ml	Brand
G 19	1450-Microbeta [®] Trilux Liquid Scintillation & Luminescence Counter	Wal
G 20	Mikrowelle R-611 / Energia NN-E25WB	Sharp / Pana
G 21	Milli-Q [®] Biocel A10	Milli
G 22	Mr Frosty 5100 Cryo 1°C Freezing Container	Nalge
G 23	MS 1 Minishaker (Kleinschüttler)	IKA
G 24	Neubauer Zählkammer	Marie

G 25	Orbital Shaker, Model 420	Ther
G 26	pH-Elektrode SenTix 41	WTW
G 27	pH Meter, pH 523	WTW
G 28	Polytron-Homogenisator, Model PT 10/35	Kine
G 29	Präzisionsküvette 100-QS	Hellma
G 30	Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL
G 31	Stickstofftank LS 750	TW
G 32	ThermoForma Series II Water Jacketed CO ₂ -Inkubator	Ther
G 33	Trockenschrank UM500	Mem
G 34	Tomtec [®] Harvester 96 [®] Mach III (Produktnummer 963-589) automatisierte Filtrationseinheit	Tomt
G 35	Tomtec [®] Harvester 96 [®] Mach III M (Produktnummer 990607010) manuelle Filtrationseinheit	Tomt
G 36	Ultrospec 3300 pro, UV / Vis-Spektrometer	Bioch
G 37	Vakuumpumpe RE16 / 1023-703Q-ER56X	vacu / Gast
G 38	Varioklav Dampfsterilisator 135 S	H+P
G 39	Variomag [®] Elektronikrührer / Monotherm Heizgerät	H+P
G 40	Vortex Genie 2 [®] , G-560 E	Sci
G 41	Waage AG204, B2002-S, PB1502-S, PB 403-S	Met

2.8.5 Auflistung der Herstellerfirmen

Kürzel	Anschrift
Abg	Abgene House, Epsom, UK
Acros	Acros Organics, Geel, B
App Bio	Applied Biosystems, Applera GmbH, Darmstadt, D
AppliChem	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
B. Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
BeckC	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
BeckI	Beckman Instruments, Palo Alto, USA

Materialien

Bioch	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
Brand	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Corn	Corning Inc., New York, USA
CyB	CyBio AG, Jena, D
Epp	Eppendorf AG, Hamburg, D
Fish	Fisher Scientific, Schwerte, D
Gast	Gast Manufacturing Inc., Benton Harbor, USA
GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D
Gibco	Gibco BRL, Eggenstein, D
Grein	Greiner-Bio-One, Solingen, D
Grüss	Grüssing Diagnostika Analytika, Filsum, D
H+P	H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, D
Hellma	Hellma GmbH & Co. KG, Mühlheim, D
Hera	Heraeus, Hilden, D
Hirsch	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, D
IKA	IKA [®] Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
Invi	Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, USA
Kendro	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, D
Kine	Kinematika AG, Littau-Luzern, CH
Marie	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D
Mem	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Merck	Merck KGaA, Darmstadt, D
Merck Lab	Merck Labor und Chemie Vertrieb GmbH, Bruchsal, D
Met	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, D
Milli	Millipore, Schwalbach, D
Nalge	Nalgene Company (Sybron Corporation), Rochester, New York, USA
Pana	Panasonic Europe GmbH, Hamburg, D
Perk	Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Rodgau-Jügesheim, D
Qia	Quiagen GmbH, Hilden, D
RdH	Riedel-deHäen, Laborchemikalien GmbH & Co. KG, Seelze, D
Sar	Sarstedt AG Co., Nümbrecht, D
Sci	Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA

Scot	Scotsman Ice Systems, Bettolino di Pogliano, Mailand, I
Sharp	Sharp Electronics GmbH, Hamburg, D
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Star	STARLAB GmbH, Ahrensburg, D
Strata	Stratagene Europe, Amsterdam, NL
Tech	Techne AG, Jahnsdorf, D
Ther	ThermoFisher Scientific, Marietta Ohio, USA
TherF	ThermoFisher Scientific Oy, Vantaa, Finland
Tomt	Tomtec Inc., Hamden, USA
TW	Taylor Wharton Harsco GmbH, Husum, D
vacu	vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, D
Wal	Wallac, Turku, FIN
Whatm	Whatman GmbH, Dassel, D
WTW	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, D
Zeiss	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D

2.8.6 Verwendete Computerprogramme

ChemWindow[®]:	Version 6.0, BioRad, Philadelphia, USA
ChromasPro[®]:	Version 1.5, Technelysium Pty Ltd., Shannon, Irland
GraphPad Instat[®]:	Version 3.05, GraphPad Software, San Diegao, USA
GraphPad Prism[®]:	Version 4.03, GraphPad Software, San Diego, USA
MathType[™] (Lite Modus):	Version 6.5c, Design Science, Long Beach, USA
Microsoft Excel[®] 2007:	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Microsoft PowerPoint[®] 2007:	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Microsoft Word[®] 2007:	Microsoft Corporation, Redmont, USA

3 Ergebnisse

3.1 Wege zu dualsterischen Liganden: Bindungseigenschaften neuartiger Hybridliganden

In Kapitel 1.3 (Seite 8) wurde dargestellt, dass es möglich ist, für den aktiven M₂-Rezeptor Hybridliganden zu entwickeln, die simultan die orthosterische und die allosterische Bindungsstelle besetzen. Dadurch wurden M₂-prävalente Agonisten mit Signalwegsspezifität erhalten (Antony et al., 2009). In dem folgenden Kapitel soll nun anhand verschiedener Methoden untersucht werden, ob analog synthetisierte Hybridantagonisten ebenfalls zu Liganden mit besonderen Bindungseigenschaften führen, die sich von den rein ortho- und allosterischen Bausteinen unterscheiden, und ob diese Liganden ebenfalls einen dualsterischen Bindungsmodus aufweisen. Hierzu werden zuerst die Radioligandbindungsstudien zur Aufklärung der Bindungstopographie dargestellt und anschließend die funktionelle Charakterisierung ausgewählter Verbindungen beschrieben. Die bereits als dualsterisch erprobten Hybridagonisten wurden als Kontrollen mitgeführt.

Um neu erhobene Daten besser deuten zu können werden gelegentlich zum Vergleich bereits gezeigte Befunde erneut dargestellt. Diese sind optisch von neuen Daten abgehoben.

3.1.1 Subtypselektivität der Hybridliganden in [³H]NMS-Bindungsstudien an Muskarinrezeptoren

Eine große Herausforderung in der Entwicklung von selektiven Liganden an G Protein gekoppelten Rezeptoren ist die hohe Sequenzhomologie im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle zwischen den einzelnen Rezeptorsubtypen (Eglen, 2006). Allosterische Modulatoren weisen an Muskarinrezeptoren meist eine ausgeprägte M₂-Selektivität auf (Mohr et al., 2010). Über die Bildung von allo-/orthosterischen Hybridliganden sollte die allosterisch

vermittelte Subtypselektivität mit der orthosterisch vermittelten Rezeptor (In-)Aktivierung verbunden werden.

Zur Bestimmung der Subtypselektivität der zur Verfügung stehenden Liganden wurden Radioligandbindungsstudien an allen fünf Muskarinrezeptorsubtypen durchgeführt. Bei einigen Verbindungen wurden nur der M_2 und der M_5 -Rezeptor untersucht, da die allosterischen Bausteine zu diesen die höchste bzw. niedrigste Affinität aufweisen (Ellis et al., 1991, Sennwitz, Dissertation 2006). Alle Versuche wurden an stabil transfizierten CHO-Zellen durchgeführt, die aus der Abteilung von Herrn Prof. Dr. G. Lambrecht (Abteilung Pharmakologie des Biozentrums Niederursel, Universität Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt wurden (siehe Kap. 2.1). Im Folgenden werden erst die Bindungsdaten der Ausgangsverbindungen, dann der neuartigen Hybridantagonisten gezeigt. Die Daten für die agonistischen Hybridliganden sind als Kontrolldaten am Ende dieses Kapitels (ab Seite 98) zu finden.

Alle Versuche wurden unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt.

3.1.1.1 Bindungseigenschaften orthosterischer Antagonistbausteine an Wildtyprezeptoren

Die orthosterischen Ausgangsverbindungen der neuen Hybride sind Atropin und Scopolamin. Da die Hybridliganden quartäre Stickstoffverbindungen darstellen, wurde auch N-Methylscopolamin als Ausgangsverbindung mitgeführt.

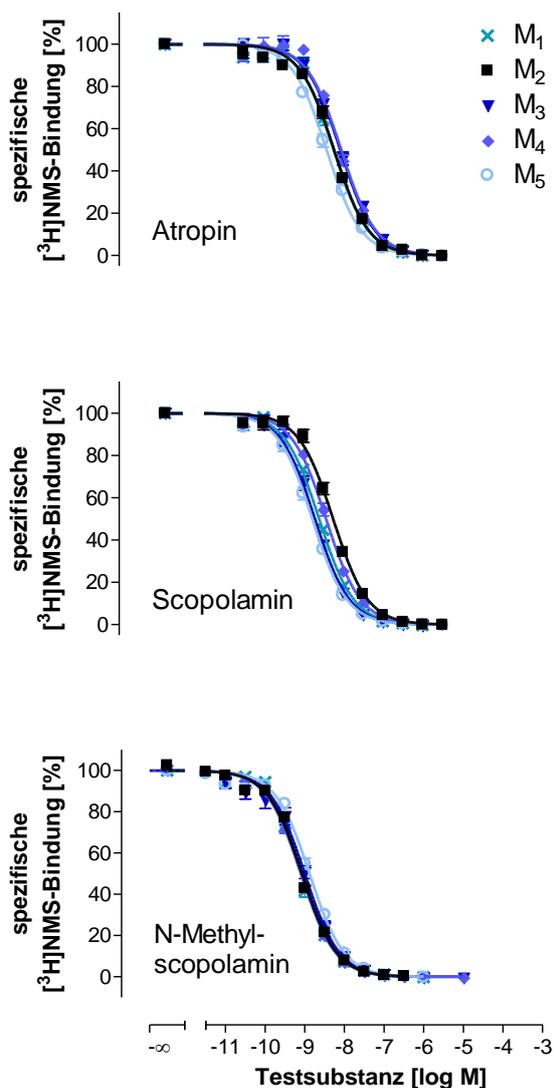


Abb. 3.1: Interaktion der orthosterischen Antagonisten mit [³H]NMS an den fünf M-Rezeptor-Subtypen.

Von oben nach unten sind die Graphen für Atropin, Scopolamin, sowie für N-Methylscopolamin dargestellt. *Ordinate*: Spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM [³H]NMS durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-21 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

In Abb. 3.1 sind die Konzentrations-Effekt-Kurven der orthosterischen Antagonisten gezeigt. Die pharmakologischen Parameterwerte sind in Tab. 3.1 aufgeführt. Alle Verbindungen zeigten eine Kurvensteilheit, die nicht signifikant verschieden ist von -1, daher wurden die pK_A-Werte auf Basis der auf n_H = -1 fixierten Kurve ermittelt. Ebenfalls erreichten sie alle das Niveau der unspezifischen Bindung (unteres Plateau = 0%), welche in Gegenwart von 3 μM Atropin bestimmt wurde und durchschnittlich ca. 1% der Gesamtbindung ausmachte. Diese

vollständige Inhibition ist charakteristisch für eine kompetitive Interaktion mit dem Radioliganden [³H]NMS.

Keine der Verbindungen zeigte eine deutliche Subtypselektivität, was durch die starke Konservierung der orthosterischen Epitope begründet ist. Scopolamin differenzierte zwar signifikant zwischen den Subtypen, da die Unterschiede allerdings sehr gering sind, kann die Substanz nicht als subtypselektiv bezeichnet werden. N-Methylscopolamin als quartäre Verbindung konnte hingegen nicht zwischen den Subtypen unterscheiden.

Für N-Methylscopolamin wurde die fehlende Subtypselektivität bereits in vielen Arbeiten dargestellt (z.B. Sennwitz, Dissertation 2006; Prilla et al., 2006; Antony et al., 2009). Giersbergen und Leppik (1995) fanden für Atropin an CHO-Zellen eine geringe, aber signifikante Differenz von 0,27 Dekaden zwischen M₅ und M₂ bei vergleichbarer Affinität wie in dieser Arbeit. Ney et al. (2007) hingegen detektierten für Atropin die höchste Affinität an M₃ (9,46) und die niedrigste an M₅ (8,70, Unterschied signifikant). In der vorliegenden Arbeit hatte Atropin die höchste Affinität zu M₅ und die niedrigste zu M₃ bzw. M₄ (siehe Tab. 3.1). Da die Unterschiede gering sind und abhängig von den Inkubationsbedingungen in verschiedene Richtungen schwanken, kann auch Atropin als unselektiv bezeichnet werden. Obwohl Scopolamin bereits lange bekannt ist, ist seine Affinität in der Literatur nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante M₅- über M₂-Selektivität detektiert. Die Ursache hierfür konnte im Rahmen der Untersuchungen nicht geklärt werden.

		M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Atropin	n	3	6	3	3	6
	n_H	-1,12 ± 0,13	-1,00 ± 0,06	-1,00 ± 0,09	-1,24 ± 0,14	-0,94 ± 0,06
	pK_A	8,34 ± 0,05	8,35 ± 0,08	8,15 ± 0,03	8,15 ± 0,03	8,52 ± 0,10
	ΔpK_A	-0,01	-	-0,20	-0,20	0,17
Scopolamin	n	3	4	3	3	4
	n_H	-1,03 ± 0,05	-1,08 ± 0,17	-1,15 ± 0,17	-1,13 ± 0,06	-0,98 ± 0,14
	pK_A	8,71 ± 0,05 ^s	8,38 ± 0,05	8,80 ± 0,07 ^s	8,54 ± 0,08	8,89 ± 0,07 ^s
	ΔpK_A	0,33	-	0,42	0,16	0,51
N-Methyl-scopolamin	n	7	21	7	3	6
	n_H	-1,15 ± 0,06	-1,16 ± 0,05	-1,04 ± 0,16	-1,04 ± 0,03	-1,06 ± 0,03
	pK_A	9,25 ± 0,12	9,17 ± 0,05	9,05 ± 0,12	9,22 ± 0,06	8,95 ± 0,08 ^s
	ΔpK_A	0,07	-	-0,13	-0,04	-0,23

Tab. 3.1: Bindungscharakteristika der orthosterischen Antagonisten an den angegebenen Rezeptoren. Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet und anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. pK_A: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, ΔpK_A: pK_A-Differenz zwischen dem entsprechenden Rezeptor und M₂wt. Da die Kurvensteilheit n_H nicht signifikant von -1 abwich, wurden die pK_A-Werte auf Basis der auf n_H = -1 fixierten Kurve ermittelt.

^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

3.1.1.2 Bindungseigenschaften allosterischer Ausgangssubstanzen an Wildtyprezeptoren

In diesem Kapitel soll die Subtypselektivität der allosterischen Ausgangsverbindungen der Hybridliganden gezeigt werden. W84 ist der älteste bekannte M₂-Modulator und Naphmethonium ist ein W84-Derivat mit erhöhter Affinität. Das Pharmakophor dieser Substanzen stellt Hexamethonium dar. In vorangegangenen Arbeiten (z.B. Sennwitz, Dissertation 2006) konnte gezeigt werden, dass diese Verbindungen die höchste Affinität zum M₂ und die niedrigste Affinität zum M₅-Rezeptor aufweisen. Daher wurden in dieser Arbeit auch nur die Bindungseigenschaften an diesen beiden Rezeptorsubtypen untersucht. Die Inkubationszeit wurde nach Gleichung 22 berechnet und betrug maximal 7 h (Naphmethonium); meist reichte eine Inkubationszeit von 2 h.

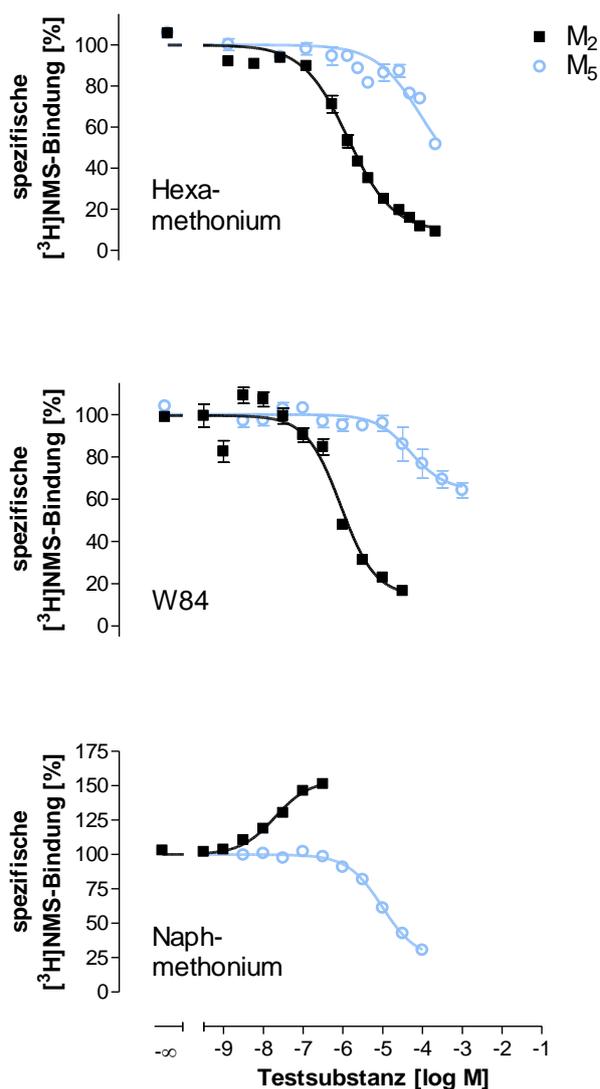


Abb. 3.2: Interaktion der allosterischen Modulatoren mit [³H]NMS am M₂ und M₅-Rezeptor.

Von oben nach unten sind die Graphen für Hexamethonium, W84 sowie für Naphmethonium dargestellt. *Ordinate:* Spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 17 bzw. Gleichung 19 ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM [³H]NMS durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-11 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Abb. 3.2 und Tab. 3.2 zeigen die Konzentrations-Effekt-Kurven bzw. die pharmakologischen Parameterwerte für die untersuchten allosterischen Modulatoren. Im Gegensatz zu den orthosterischen Antagonisten (Kap. 3.1.1.1) zeigten alle drei Allosteren eine deutliche M₂-Prävalenz von mindestens einem Faktor 20 gegenüber M₅. Im Fall von Naphmethonium ergab sich darüber hinaus eine qualitative Differenzierung, da die Substanz am M₂-Rezeptor eine positive und am M₅-Rezeptor eine negative Kooperativität mit [³H]NMS aufwies.

Die Affinitätsunterschiede aller drei untersuchten Liganden am M₂ und M₅-Rezeptor im 5 mM Na,K,P_i-Puffer wurden bereits von S. Prilla (Dissertation 2006) und J. Antony (Dissertation 2007) beschrieben. J. Antony fand für Hexamethonium eine Affinitätsabnahme von 2,00 Dekaden, für W84 und Naphmethonium fand S. Prilla eine Abnahme von 2,35 bzw. 1,87 Dekaden. Die teilweise etwas stärker als in dieser Arbeit ausgeprägte M₂/M₅-Präferenz

könnte durch den 5 mM Na,K,P_i-Puffer mit seiner geringeren Ionenstärke erklärt werden, welche die Affinität allosterischer Modulatoren erhöht.

Bei V. Straßmann (Dissertation 2007) ergab sich an COS7-Zellen im Na,Mg,HEPES-Puffer für W84 an M₂ eine Affinität von $6,60 \pm 0,03$ und mit [³H]NMS eine Kooperativität von $-1,10 \pm 0,05$ und an M₅ von $4,17 \pm 0,04$ bzw. $-0,35 \pm 0,04$. Die Werte am M₂-Rezeptor unterscheiden sich zwar signifikant von den Befunden aus der vorliegenden Arbeit, befinden sich jedoch in derselben Größenordnung. Die Befunde am M₅-Rezeptor waren nicht verschieden. Die Affinität und die Kooperativität für Naphmethonium am M₂-Rezeptor unterschieden sich weder von den von K. Kellershohn (Dissertation 2007) noch von C. Schmalenbach (Dissertation 2005) erhobenen Daten, welche unter denselben Bedingungen erfasst worden sind.

		n	pα	pK _A	ΔpK _A
Hexa-methonium	M ₂	3	$-1,32 \pm 0,12$	$3,81 \pm 0,06$	-
	M ₅	3	$-0,53 \pm 0,15^s$	$2,43 \pm 0,32^s$	$-1,38^s$
W84	M ₂	3	$-0,92 \pm 0,04$	$6,14 \pm 0,16$	-
	M ₅	5*	$-0,28 \pm 0,09^s$	$4,37 \pm 0,09^s$	$-1,77^s$
Naph-methonium	M ₂	11	$0,25 \pm 0,03$	$7,67 \pm 0,17$	-
	M ₅	3	$-0,66 \pm 0,06^s$	$5,05 \pm 0,06^s$	$-2,62^s$

Tab. 3.2: Charakteristika der Interaktion allosterischer Modulatoren mit [³H]NMS an den angegebenen Rezeptoren.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 17 ausgewertet. pK_A: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A, pα: negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α, ΔpK_A: pK_A-Differenz zwischen M₅ und M₂.

^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

*: Die Konzentrations-Bindungs-Kurve wurde mit der modifizierten Ehlert-Gleichung (Gleichung 19) unter Berücksichtigung von pEC_{0,5Diss} erhalten (für pEC_{0,5Diss}-Daten siehe Kapitel 3.1.6, Seite 169).

3.1.1.3 Bindungseigenschaften allo-/orthosterischer Hybridliganden antagonistischer Struktur an Wildtyprezeptoren

In den beiden vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass orthosterische Antagonisten zwar über eine hohe Affinität im niedrigen nanomolaren Bereich verfügen, jedoch kaum zwischen den fünf Muskarinrezeptorsubtypen unterscheiden können. Die allosterischen Modulatoren dagegen verfügen über eine M_2 -Prävalenz, weisen teilweise aber eher eine mäßige Affinität auf.

Im Versuch hohe Affinität und Subtypselektivität zu vereinen wurden Hybridliganden entwickelt (siehe Kap. 1.3). Die Konzentrations-Effekt-Kurven zur M_2/M_5 -Selektivität der Hybridsubstanzen sind in Abb. 3.3 gezeigt. Die Kurven von Atropin und Scopolamin sind zum Vergleich dargestellt.

Von oben nach unten wurden die Strukturen von Atropin (linke Spalte) bzw. Scopolamin (rechte Spalte) am Stickstoff über eine Hexylammoniumkette zu W84- und Naphmethonium-Derivaten verlängert (Strukturformeln siehe Kap. 2.7.4).

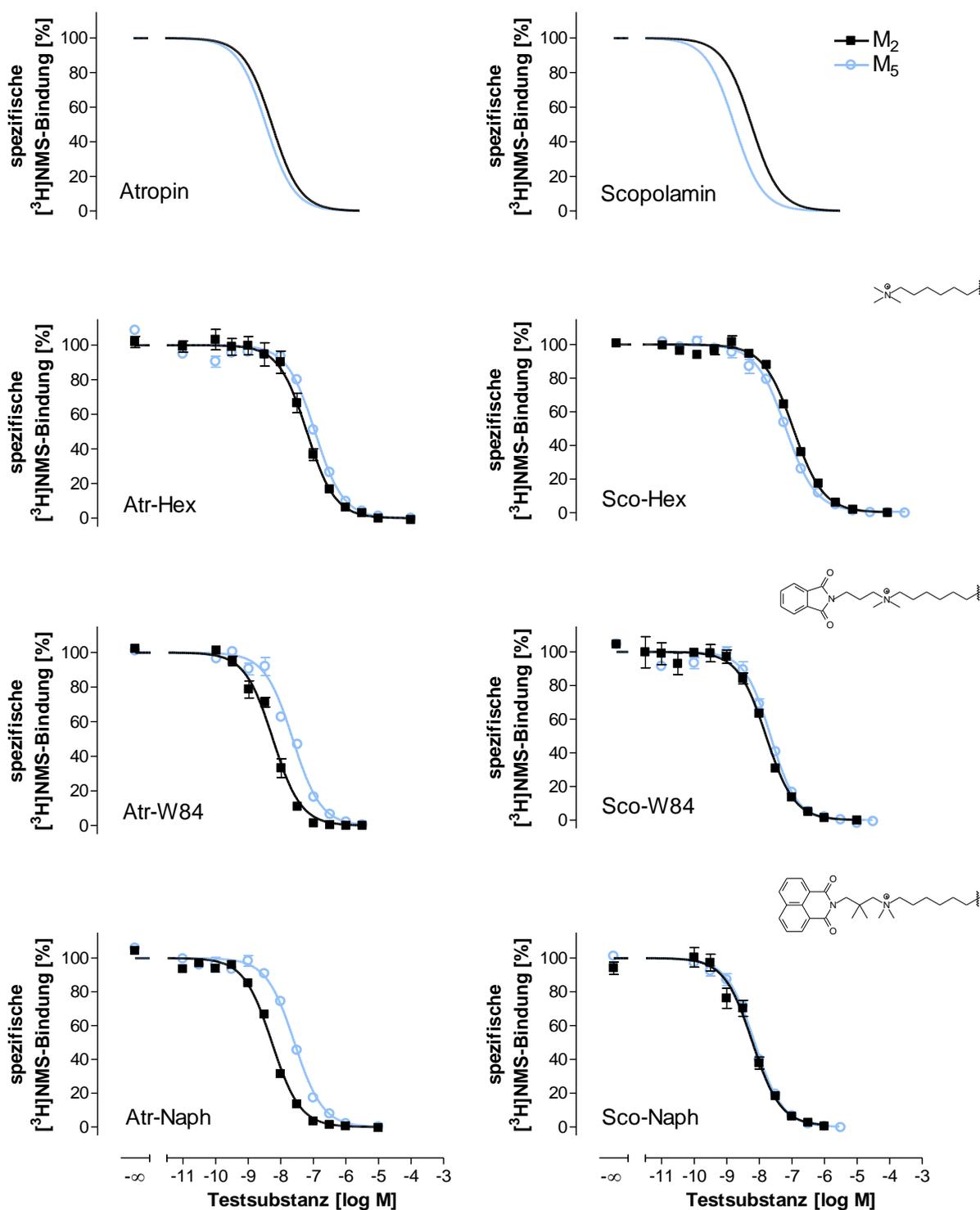


Abb. 3.3: Interaktion der antagonistischen Hybridliganden mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ am M_2 und M_5 -Rezeptor. Von oben nach unten wurden die Strukturen schrittweise vom reinen Orthoster ausgehend zu allo-/orthosterischen Hybridliganden verlängert. Links sind die Atropin-haltigen, rechts die Scopolamin-haltigen Verbindungen dargestellt. *Ordinate:* Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung in Gegenwart von $3 \mu\text{M}$ Atropin. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von $0,2 \text{ nM}$ $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E.M. aus 3-6 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Alle Kurven verfügen über eine Kurvensteilheit von -1 und erreichten das Niveau der unspezifischen Bindung. Diese Befunde lassen eine orthosterische Interaktion vermuten (genauere Untersuchungen zur Epitopabhängigkeit in Kap. 3.1.3 und 3.1.4). Alle Verbindungen zeigten ein kompetitives oder pseudo-kompetitives Verhalten. Aus diesem Grund erfolgte die Datenanalyse nach dem orthosterischen Modell (4 Parameter-logistische Gleichung mit anschließendem Cheng-Prusoff-Verfahren, Gleichung 11 und Gleichung 13), da kein allosterisches Verhalten in Versuchen unter Gleichgewichtsbedingungen erkannt werden konnte.

Scopolamin wies eine signifikant höhere Affinität zum M_5 als zum M_2 -Rezeptor auf, wohingegen Atropin nicht zwischen den fünf Subtypen differenzieren konnte (siehe Abb. 3.1, Seite 89). Bei den Atropin-Derivaten (linke Spalte in Abb. 3.3) war mit zunehmender Hybridgröße die Entwicklung einer M_2/M_5 -Prävalenz erkennbar. Das bedeutet vermutlich, dass der größere allosterische Molekülanteil verstärkt seine Eigenschaften in das Hybrid einbringt. Bei den Scopolamin-Hybriden hingegen glichen sich mit steigender Größe des allosterischen Bausteins die Affinitäten zum M_2 und M_5 -Rezeptor näher an. Für beide Substanzreihen fällt das Affinitätsniveau am M_2 -Rezeptor bei den Hexylderivaten gegenüber den Muttersubstanzen ab, und erreicht bei den W84- und Naphmethonium-haltigen Hybridliganden etwa das Ausgangsniveau (Strukturwirkungsbeziehungen siehe Kapitel 3.1.2, Seite 104).

Somit stieg bei beiden Hybridreihen die Affinität zum M_2 -Rezeptor stärker an als zum M_5 -Rezeptor, was aber auf Grund der unterschiedlichen M_2/M_5 -Affinitäten der Muttersubstanzen nur bei den Atropin-Hybriden zu einer M_2 -Prävalenz führt.

In Tab. 3.3 sind die pharmakologischen Parameterwerte der Hybridantagonisten aufgeführt. Wie oben bereits erläutert ist der signifikante Affinitätsunterschied bei Atr-W84 und Atr-Naph auffällig.

		n	n_H	pK_A	ΔpK_A
Atropin	M₂	6	-1,00 ± 0,06	8,35 ± 0,08	-
	M₅	6	-0,94 ± 0,06	8,52 ± 0,10	0,17
Atr-Hex (JSW258)	M₂	3	-1,08 ± 0,12	7,34 ± 0,12	-
	M₅	3	-1,02 ± 0,11	7,06 ± 0,04	-0,28
Atr-W84 (JSW253)	M₂	5	-1,21 ± 0,10	8,41 ± 0,15	-
	M₅	4	-0,92 ± 0,08	7,78 ± 0,10 ^s	-0,63 ^s
Atr-Naph (JSW254)	M₂	5	-1,17 ± 0,15	8,41 ± 0,04	-
	M₅	4	-1,19 ± 0,09	7,71 ± 0,03 ^s	-0,70 ^s
Scopolamin	M₂	4	-1,08 ± 0,17	8,38 ± 0,05	-
	M₅	4	-0,98 ± 0,14	8,89 ± 0,07 ^s	0,51 ^s
Sco-Hex (JK179)	M₂	3	-1,03 ± 0,04	7,32 ± 0,03	-
	M₅	4	-0,96 ± 0,04	7,68 ± 0,06 ^s	0,36 ^s
Sco-W84 (JSW257)	M₂	3	-1,09 ± 0,10	7,92 ± 0,10	-
	M₅	3	-0,82 ± 0,38	7,77 ± 0,08	-0,15
Sco-Naph (JSW256)	M₂	4	-1,03 ± 0,16	8,41 ± 0,10	-
	M₅	4	-0,94 ± 0,08	8,26 ± 0,08	-0,15

Tab. 3.3: Bindungscharakteristika der von Atropin bzw. von Scopolamin abgeleiteten Hybridliganden an den angegebenen Rezeptoren.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet und anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. pK_A: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, ΔpK_A: pK_A-Differenz zwischen M₅ und M₂.

^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

3.1.1.4 Bindungseigenschaften agonistischer Hybridliganden im Vergleich zu Iperoxo und zu Acetylcholin

Die von Iperoxo abgeleiteten Hybridagonisten zeigten in Organbadversuchen und in Radioligandbindungsversuchen eine M_2 -Prävalenz (Antony et al., 2009). Im folgenden Abschnitt soll untersucht werden, ob diese Eigenschaft auch in Radioligandbindungsstudien ermittelt werden kann. Zum Vergleich wurden die Ausgangssubstanz Iperoxo (im Organbad keine Differenzierung zwischen M_1 -, M_2 - und M_3 -Modellen) und der endogene Agonist Acetylcholin untersucht, welcher ebenfalls funktionell nicht zwischen den fünf Subtypen unterscheiden kann.

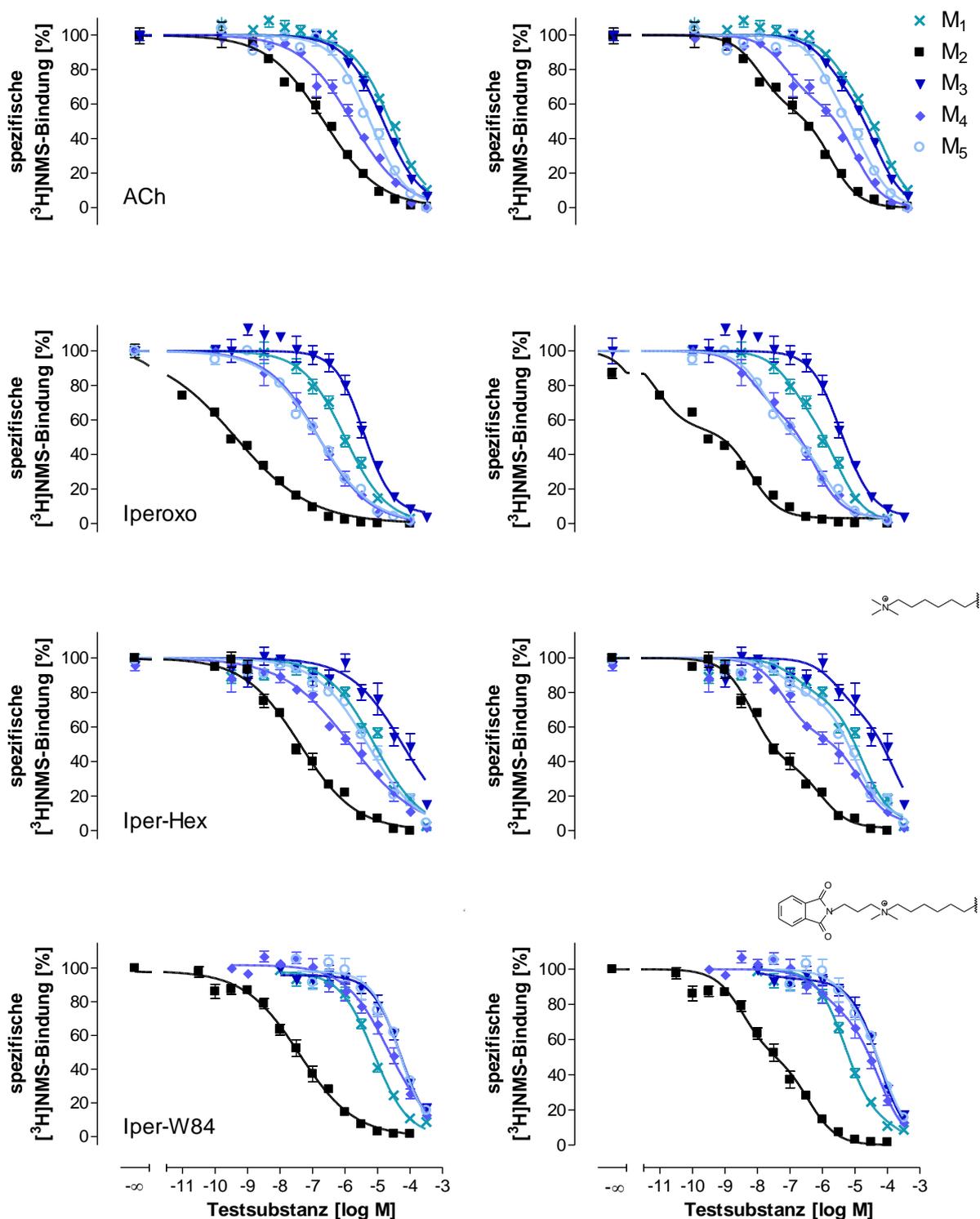


Abb. 3.4: Interaktion der agonistischen Hybridliganden mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an den fünf Subtypen. Von oben nach unten wurden die Strukturen schrittweise vom reinen Orthoster Iperoxo ausgehend über eine Hexylammoniumkette zu allo-/orthosterischen Hybridliganden verlängert. Links wurden die Datensätze nach Gleichung 11 (monophasisch) und rechts nach Gleichung 16 (biphasisch) ausgewertet. Ordinate: Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

In Abb. 3.4 sind die Konzentrations-Effekt-Kurven der orthosterischen Agonisten Iperoxo und Acetylcholin, sowie verlängerter Iperoxo-Derivate aufgeführt. Wie in Kap. 2.4.7.1 erläutert, kann die Inhibition durch Agonisten neben dem klassischen 1-Kompartiment-Modell auch biphasisch ausgewertet werden, um die Affinität zu verschiedenen Rezeptorkonformationen zu erfassen. Da in mehreren Fällen jedoch statistisch eine monophasische Auswertung ausreichend war und zusätzlich die biphasische Analyse eine wesentlich höhere Streuung aufwies, wurden die Kurven von Agonisten in dieser Arbeit jeweils nach beiden Modellen analysiert. In den entsprechenden Tabellen ist in der Spalte „biph>mono“ angegeben, wie viele der Einzelversuche statistisch besser nach dem biphasischen Modell anzupassen war. Wenn die Einzelversuche nicht biphasisch auswertbar waren, so sind in Tab. 3.4 die Daten der Mittelwertskurven angegeben. Die monophasischen Kurven finden sich in der linken, die biphasischen in der rechten Spalte von Abb. 3.4. Die entsprechenden pharmakologischen Parameterwerte sind in Tab. 3.4 aufgeführt.

Wie bei den Hybridantagonisten wurde Iperoxo am Stickstoff schrittweise verlängert. Die M_2/M_5 -Prävalenz von Iper-W84 wurde bereits von J. Antony (Antony et al., 2009 und Antony Dissertation 2008) beschrieben. Die Verbindung Iper-Hex wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal auf ihre Bindungseigenschaften hin untersucht.

In der monophasischen Auswertung zeigten alle Kurven einen flachen Verlauf, also eine Steilheit >-1 . Dies wird durch das heterogene Rezeptorkollektiv erklärt. Die verschiedenen Rezeptorkonformationen von G-Protein-gekoppelten und entkoppelten Rezeptoren werden durch agonistische Liganden mit unterschiedlicher Affinität erkannt (Hulme et al., 1990). Diese Einzelaffinitäten lassen sich durch die biphasische Analyse bestimmen. Die Einzelversuche von Iper-Hex am M_4 -Rezeptor ließen sich nicht biphasisch auswerten. Daher sind für diese Kombination in Tab. 3.4 die Parameterwerte aufgeführt, die aus der Mittelwertskurve erhalten wurden. Alle Kurven erreichten das Niveau der unspezifischen Bindung. Wird eine Auswertung nach dem biphasischen 2-Kompartiment-Modell vorgenommen, ergeben sich für jedes Kompartiment als Variablen die Affinität der Testsubstanz-Bindung und die Kompartiment-Größe (als prozentualer Anteil der mit dem Radioliganden besetzten Rezeptorfraktion ausgedrückt). In Abb. 3.5 werden die Affinität durch die Säulenhöhe und die Kompartimentgröße durch die Säulenbreite angegeben.

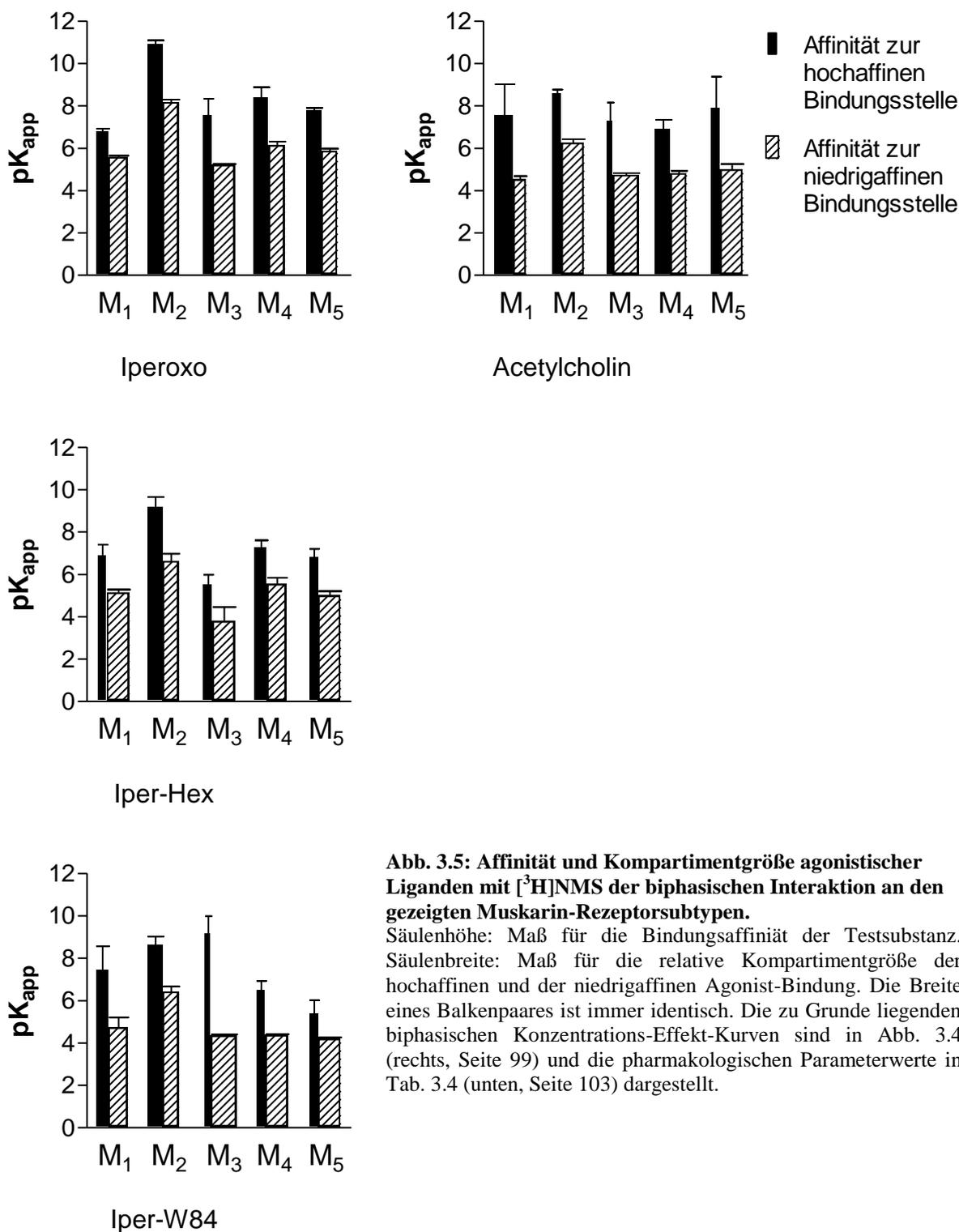


Abb. 3.5: Affinität und Kompartimentgröße agonistischer Liganden mit [³H]NMS der biphasischen Interaktion an den gezeigten Muskarin-Rezeptorsubtypen.
 Säulenhöhe: Maß für die Bindungsaffinität der Testsubstanz.
 Säulenbreite: Maß für die relative Kompartimentgröße der hochaffinen und der niedrigaffinen Agonist-Bindung. Die Breite eines Balkenpaares ist immer identisch. Die zu Grunde liegenden biphasischen Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abb. 3.4 (rechts, Seite 99) und die pharmakologischen Parameterwerte in Tab. 3.4 (unten, Seite 103) dargestellt.

Sowohl aus den Konzentrations-Effekt-Kurven als auch aus der tabellarischen Darstellung (Tab. 3.4, Seite 103) wird deutlich, dass auch die Orthostere Acetylcholin und Iperoxo in Radioligandbindungsuntersuchungen verschiedene Affinitäten für die unterschiedlichen Subtypen zeigen. Für Acetylcholin ist ein solches Verhalten bereits in der Literatur

beschrieben (z.B. Sennwitz, Dissertation, 2006; Lazareno et al., 1995). Da Acetylcholin sich funktionell unselektiv, in Radioligandbindungsstudien jedoch M₂-selektiv verhält, kann aus Bindungsstudien keine Voraussage über die Subtypselektivität von Agonisten in lebendem Gewebe gemacht werden.

Für die Hybridliganden lassen sich die veränderten Bindungseigenschaften gegenüber der Muttersubstanz Iperoxo in der Affinitätsreihenfolge der 1-Kompartiment-Analyse erkennen. Eine intensive Betrachtung dieses Vorgehens findet sich in Kapitel 4.4 (Seite 239).

		M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Acetylcholin (ACh)	n	3	3	3	3	3
	n_H	-0,63 ± 0,03 ^{#s.}	-0,49 ± 0,01 [#]	-0,76 ± 0,09 ^{#s.}	-0,50 ± 0,07 [#]	-0,67 ± 0,05 ^{#s.}
	n_H ≠ -1	3/3	3/3	1/3	3/3	3/3
	pK_{app}	4,84 ± 0,05 ^{s.}	6,88 ± 0,10	4,91 ± 0,04 ^{s.}	5,86 ± 0,23 ^{s.}	5,29 ± 0,13 ^{s.}
	ΔpK_{app}	-2,04 ^{s.}	-	-1,97 ^{s.}	-1,02 ^{s.}	-1,59 ^{s.}
Iperoxo	n	3	3	4	3	3
	n_H	-0,67 ± 0,07 ^{#s.}	-0,37 ± 0,02 [#]	-0,92 ± 0,19 ^{#s.}	-0,51 ± 0,05 [#]	-0,54 ± 0,01 ^{#s.}
	n_H ≠ -1	3/3	3/3	2/4	3/3	3/3
	pK_{app}	6,20 ± 0,12 ^{s.}	9,57 ± 0,04	5,55 ± 0,06 ^{s.}	7,18 ± 0,20 ^{s.}	6,92 ± 0,06 ^{s.}
	ΔpK_{app}	-3,37 ^s	-	-4,02 ^s	-2,39 ^s	-2,65 ^s
Iper-Hex (JSW236)	n	3	3	3	3	3
	n_H	-0,63 ± 0,13 [#]	-0,50 ± 0,08 [#]	-0,86 ± 0,28 [#]	-0,46 ± 0,04 [#]	-0,61 ± 0,06 [#]
	n_H ≠ -1	2/3	3/3	1/3	1/3	2/3
	pK_{app}	5,46 ± 0,13 ^{s.}	7,81 ± 0,06	4,43 ± 0,37 ^{s.}	6,41 ± 0,39 ^{s.}	5,40 ± 0,13 ^{s.}
	ΔpK_{app}	-2,35 ^s	-	-3,38 ^s	-1,40 ^s	-2,41 ^s
Iper-W84 (DDT5)	n	3	3	3	3	3
	n_H	-0,81 ± 0,13 [#]	-0,55 ± 0,06 [#]	-0,90 ± 0,18 [#]	-0,61 ± 0,05 [#]	-0,78 ± 0,15 [#]
	n_H ≠ -1	2/3	3/3	1/3	1/3	1/3
	pK_{app}	5,32 ± 0,12 ^s	7,56 ± 0,25	4,47 ± 0,18 ^s	4,82 ± 0,26 ^s	4,52 ± 0,09 ^s
	ΔpK_{app}	-2,24 ^s	-	-3,09 ^s	-2,74 ^s	-3,04 ^s

		M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅
Acetylcholin (ACh)	n	3	3	3	3	3
	biph>mono	2/3	1/3	1/3	3/3	0/3
	pK_{app}(high)	7,54 ± 1,48	8,59 ± 0,17	7,28 ± 0,87	6,91 ± 0,43 ^s	7,91 ± 1,47
	pK_{app}(low)	4,51 ± 0,17 ^s	6,23 ± 0,19	4,72 ± 0,11 ^s	4,80 ± 0,13 ^s	4,98 ± 0,27 ^s
	F	0,62 ± 0,23	0,31 ± 0,07	0,19 ± 0,09	0,49 ± 0,05	0,30 ± 0,12
Iperoxo	n	3	3	3	3	3
	biph>mono	2/3	1/3	1/3	3/3	2/3
	pK_{app}(high)	6,79 ± 0,13 ^s	10,9 ± 0,19	7,56 ± 0,77 ^s	8,41 ± 0,47 ^s	7,79 ± 0,11 ^s
	pK_{app}(low)	5,56 ± 0,09 ^s	8,15 ± 0,14	5,19 ± 0,06 ^s	6,12 ± 0,19 ^s	5,86 ± 0,12 ^s
	F	0,44 ± 0,06	0,49 ± 0,04	0,31 ± 0,12	0,51 ± 0,10	0,54 ± 0,04
Iper-Hex (JSW236)	n	3	3	3 ^M	3	3
	biph>mono	0/3	1/3	0/3	1/3	0/3
	pK_{app}(high)	6,87 ± 0,54 ^s	9,19 ± 0,47	5,52 ± 0,46 ^s	7,26 ± 0,35 ^s	6,80 ± 0,40 ^s
	pK_{app}(low)	5,12 ± 0,16 ^s	6,61 ± 0,36	3,77 ± 0,69 ^s	5,52 ± 0,32	4,98 ± 0,22 ^s
	F	0,26 ± 0,08	0,53 ± 0,09	0,32 ± 0,13	0,42 ± 0,06	0,29 ± 0,06
Iper-W84 (DDT5)	n	3	3	3	3	3
	biph>mono	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3
	pK_{app}(high)	7,44 ± 1,12	8,61 ± 0,41	9,15 ± 0,83	6,50 ± 0,42 ^s	5,37 ± 0,65 ^s
	pK_{app}(low)	4,71 ± 0,49 ^s	6,40 ± 0,27	4,33 ± 0,08 ^s	4,36 ± 0,06 ^s	4,18 ± 0,09 ^s
	F	0,36 ± 0,25	0,50 ± 0,15	0,23 ± 0,05	0,28 ± 0,12	0,32 ± 0,08

Tab. 3.4: Parameterwerte der Interaktion von Acetylcholin, Iperoxo und abgeleiteten Hybridliganden mit [³H]NMS (0,2 nM) an den angegebenen Rezeptoren.

1. Teil: Monophasische Auswertung nach Gleichung 11, **2. Teil:** Biphasische Auswertung nach Gleichung 16. Alle Werte wurden anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. pK_{app}: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_{app} nach monophasischer Analyse, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, ΔpK_{app}: pK_{app}-Differenz zwischen dem entsprechenden Rezeptor und M₂wt, biph>mono: Anteil der Einzelversuche, die statistisch besser nach dem 2-Kompartiment-Modell anzupassen waren, pK_{app}(high) bzw. pK_{app}(low): negativer dekadischer Logarithmus von K_{app}(high) der hochaffinen Fraktion bzw. von K_{app}(low) der niedrigaffinen Fraktion, F: Anteil der hochaffinen Fraktion an der Gesamtbinding. Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung (Iperoxo in Doppelbestimmung).

^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

[#]: Steilheitsmaß n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test, p<0,05).

^M: Dargestellt sind Daten der Mittelwertskurve.

3.1.2 Struktur-Wirkungsbeziehungen der Interaktion schrittweise verlängerter Derivate orthosterischer Liganden mit [³H]NMS am M₂-Rezeptor

Die in Kapitel 3.1.1 (Seite 87) dargestellten Befunde am M₂-Rezeptor sollen im Folgenden zwischen den einzelnen Substanzreihen von Atropin, Scopolamin und Iperoxo verglichen werden, um zu überprüfen, ob hinter dem für alle Substanzreihen detektierte Affinitätsverlust der Hexamethonium-Derivate einer Systematik unterliegt. Dazu wurden zusätzlich die Affinitäten zu weiteren aliphatischen Derivaten der Ausgangsverbindungen bestimmt. Ziel dieser Untersuchungen war es, Gemeinsamkeiten der verschiedenen Reihen aufzudecken und damit auf parallele Bindungsmodi schließen zu können.

Das tertiäre Iperoxo-Derivat stand zum Zeitpunkt der Experimente nicht zur Verfügung. Daher fehlen in der Iperoxo-Reihe die Daten zur tertiären Verbindung.

Die Affinitäten von Atropin und Scopolamin nehmen durch die Einführung einer Methylgruppe zu und sinken stark durch dessen Verlängerung zu einer Butylkette. Durch die Substitution mit allosterischen Bausteinen wurde die Affinität schrittweise auf das Niveau der Ausgangsverbindung wieder hergestellt.

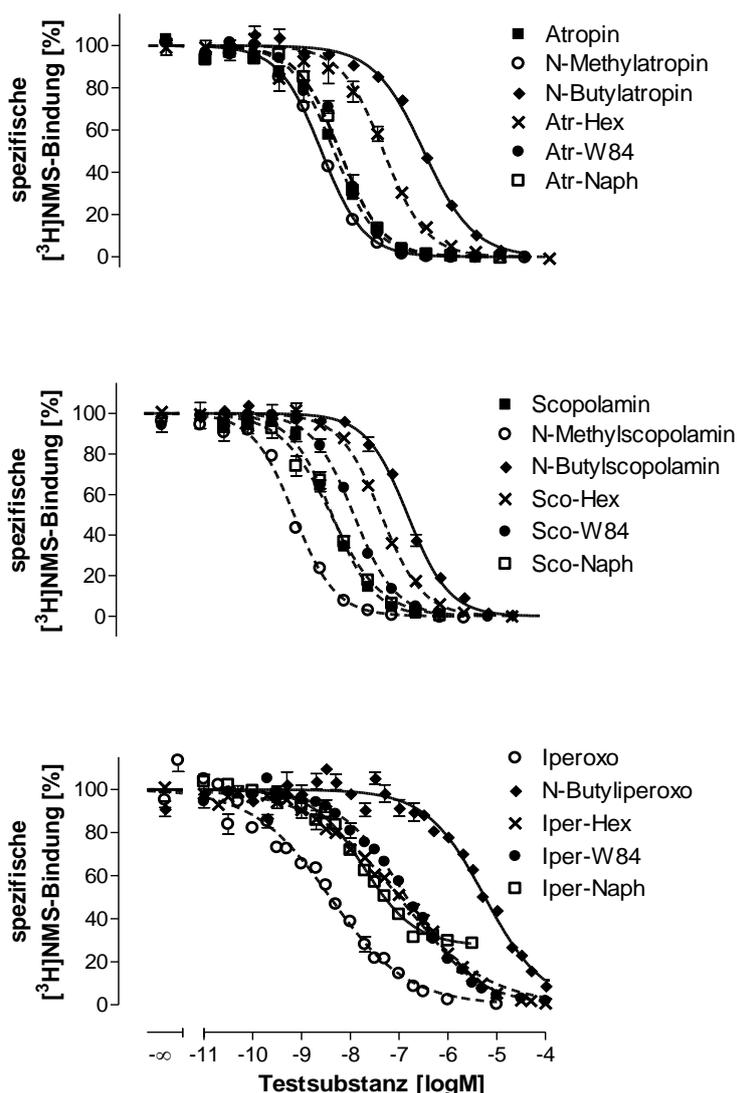


Abb. 3.6: Interaktion schrittweise verlängerter Derivate orthosterischer Liganden mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ am M_2 -Rezeptor.

Von oben nach unten sind die Graphen für Atropin, Scopolamin, Iperoxo sowie deren Derivate dargestellt. *Ordinate:* Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die Versuche wurden an M_2 -Rezeptoren aus stabil transfizierten CHO-Zellen (bzw. aus FlpIn CHO-Zellen bei der Iperoxo-Reihe) in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-21 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Die Affinitätsreihenfolge war innerhalb der Iperoxo-Gruppe identisch zu den Antagonistenreihen. Bei Iperoxo waren die Affinitätsabstände zwischen den Derivaten und der quartären Ausgangsverbindung sehr stark ausgeprägt. Dies könnte mit der hohen Gesamaffinität von Iperoxo erklärt werden. Iperoxo scheint ein Affinitätsoptimum darzustellen, dessen Bindungsneigung bereits mit kleinen Strukturänderungen abnimmt. Die Affinitäten sind in Tab. 3.5 (siehe S. 107) aufgeführt.

Für die Iperoxo-Hybride Iper-W84 und Iper-Naph ist aus Antony et al. (2009) bekannt, dass diese Verbindungen sich simultan an die allo- und an die orthosterische Bindungsstelle anlagern, sie also über einen dualsterischen Bindungsmodus verfügen. Da die Antagonisten-Derivate analoge Struktur-Wirkungsbeziehungen zeigen, kann aus diesem Vergleich auch eine analoge Bindung an den Rezeptor postuliert werden (siehe Kapitel 4.1.1, Seite 231). In

den folgenden Kapiteln wird dies anhand von Radioligandbindungsstudien an punktmutierten M_2 -Rezeptoren genauer untersucht werden.

In Abb. 3.6 fehlen die Zwischenschritte zwischen den Methyl- und Butylderivaten und der aliphatischen Butyl- zu der bisquartären Hexylammoniumstruktur. Die N-Ethyl- und N-Propylderivate standen nicht zur Verfügung, da diese Verbindungen schwierig zu synthetisieren sind (mündliche Mitteilung von Jessica Klöckner und Dr. Jens Schmitz, Universität Würzburg). Für die Atropinreihe sind aliphatische N-Hexyl-, N-Heptyl- und N-Octylderivate synthetisiert worden, um zu bestimmen, ob der Affinitätsanstieg allein über den zweiten quartären Stickstoff erklärt werden kann. Die Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abb. 3.7 und die entsprechenden Parameterwerte in Tab. 3.5 dargestellt.

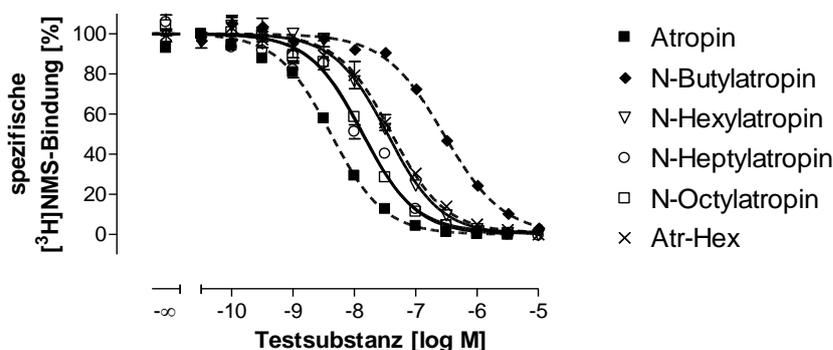


Abb. 3.7: Konzentrations-Effekt-Kurven der aliphatischen Atropinderivate am M_2 -Rezeptor.

Dargestellt sind die schrittweise am Stickstoff verlängerten aliphatischen Derivate von Atropin. Die Hybridsubstanz Atr-Hex ist zum Vergleich aufgeführt.

Ordinate: Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die Versuche wurden an M_2 -Rezeptoren aus stabil transfizierten CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Atropin und N-Butylatropin sind die Substanzen mit maximaler bzw. minimaler Affinität. Durch die Vergrößerung des aliphatischen Restes stieg die Bindungsneigung bei verlängerten Derivaten wieder an. So erreichte N-Hexylatropin das Niveau von Atr-Hex. N-Heptyl- und N-Octylatropin gewannen sogar weiter an Affinität. Dies spricht dafür, dass nicht unbedingt ein zweiter quartärer Stickstoff nötig ist, um weitere Wechselwirkungen mit dem Rezeptor einzugehen (für weitere Erklärungsansätze siehe Kapitel 4.2, Seite 236).

	n	n _H	pK _A bzw. pK _{app}	ΔpK _A
Atropin	6	-1,00 ± 0,06	8,35 ± 0,08 ^s .	-0,39 ^s .
N-Methylatropin	3	-0,99 ± 0,04	8,74 ± 0,03	-
N-Butylatropin	5	-0,85 ± 0,04	6,67 ± 0,03 ^s .	-2,07 ^s .
N-Hexylatropin	3	-1,10 ± 0,08	7,69 ± 0,09 ^s .	-1,05 ^s .
N-Heptylatropin	6	-0,86 ± 0,05	8,09 ± 0,08 ^s .	-0,65 ^s .
N-Octylatropin	3	-1,08 ± 0,11	8,09 ± 0,04 ^s .	-0,65 ^s .
Atr-Hex	3	-1,08 ± 0,12	7,64 ± 0,12 ^s .	-1,10 ^s .
Atr-W84	5	-1,21 ± 0,10	8,41 ± 0,15	-0,33
Atr-Naph	5	-1,17 ± 0,15	8,41 ± 0,04 ^s .	-0,33 ^s .
Scopolamin	4	-1,08 ± 0,17	8,38 ± 0,05 ^s .	-0,80 ^s .
N-Methylscopolamin	21	-1,16 ± 0,05	9,18 ± 0,05	-
N-Butylscopolamin	4	-1,00 ± 0,08	6,80 ± 0,10 ^s .	-2,38 ^s .
Sco-Hex	3	-1,03 ± 0,04	7,32 ± 0,03 ^s .	-1,86 ^s .
Sco-W84	3	-1,09 ± 0,10	7,92 ± 0,10 ^s .	-1,26 ^s .
Sco-Naph	4	-1,03 ± 0,16	8,41 ± 0,10 ^s .	-0,77 ^s .
Iperoxo	3	-0,37 ± 0,02 [#]	9,57 ± 0,04	-
N-Butyliperoxo	3	-0,71 ± 0,05 [#]	5,42 ± 0,08 ^s .	-4,15 ^s .
Iper-Hex	3	-0,50 ± 0,08 [#]	7,81 ± 0,06 ^s .	-1,76 ^s .
Iper-W84	3	-0,55 ± 0,06 [#]	7,56 ± 0,25 ^s .	-2,01 ^s .
Iper-Naph	3	-0,85 ± 0,06	7,94 ± 0,06 ^s .	-1,63 ^s .

Tab. 3.5: Bindungscharakteristika der von Atropin, Scopolamin und Iperoxo abgeleiteten Hybridliganden an M₂-Rezeptoren.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet und anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. pK_A (Antagonisten) bzw. pK_{app} (Agonisten): negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A bzw. K_{app}, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, ΔpK_A: pK_A-Differenz zwischen dem Derivat und der quartären Ausgangsverbindung.

^s: Wert signifikant verschieden vom entsprechenden Wert der Ausgangsverbindung (t-Test, p<0,05).

[#]: Steilheitsmaß n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test, p<0,05).

3.1.3 Nachweis der orthosterischen Interaktion durch Bindungsuntersuchungen an der Mutante M₂¹⁰⁴Tyrosin zu Alanin

Die dualsterische Bindungstopographie der Antagonist-Hybride sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden. Die ortho- und allosterischen Bausteine wurden zur Kontrolle ebenfalls untersucht, um eine Änderung der [³H]NMS-Bindungseigenschaften durch die Hybridbildung zu detektieren. In den vorangegangenen Kapiteln wurden die Verbindungen als orthosterisch oder allosterisch bindend, sowie als Hybridliganden bezeichnet. Ob die postulierte Bindungstopographie im vorliegenden Testsystem die Rezeptorinteraktion erklären kann, wird in diesem und im folgenden Kapitel behandelt. Zu diesem Zweck wurden Radioligandbindungsstudien unter Gleichgewichtsbedingungen an M₂-Rezeptormutanten durchgeführt. Sofern nicht anders beschrieben, wurden Membranpräparationen aus stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen (siehe Kap. 2.2.3.2) verwendet. Da es sich also um eine andere Expressionszelllinie als zuvor beschrieben handelt, wurden die Kontrollkurven am M₂-Wildtyp erneut aufgenommen (Vergleich der verwendeten Zelllinien siehe Kap. 7.3, Seite 268).

Die in diesem Kapitel vorgestellte Aminosäure M₂¹⁰⁴Tyrosin befindet sich im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle (siehe Abb. 1.6, Seite 11). Eine Mutation des aromatischen Tyrosins zu Alanin vermindert die Zahl möglicher Interaktionsstellen in der Bindungstasche und vermindert so die Affinität orthosterischer Liganden (Antony et al., 2009; Gregory et al., 2010). Folglich dient die Mutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala zur Prüfung einer orthosterischen Interaktion.

3.1.3.1 Einfluss der Mutation M₂¹⁰⁴Tyr→Ala auf orthosterische Antagonisten

Die orthosterischen Liganden Atropin und Scopolamin dienen als Positivkontrolle, um zu überprüfen, ob sich eine Mutation von M₂¹⁰⁴Tyr→Ala wie erwartet auf die Bindungsaffinität auswirkt. Zusätzlich soll der Einfluss der Mutation auf die Affinität der aliphatischen Derivate dieser beiden Ausgangsverbindungen untersucht werden. Abb. 3.8 zeigt die erhaltenen Konzentrations-Bindungs-Kurven.

Da die Affinität von [³H]NMS zu dieser orthosterischen Mutante ca. um den Faktor 10 geringer ist als zum M₂wt (siehe Tab. 3.6), wurde die Radioligandkonzentration auf 1 nM angehoben. Die unspezifische Bindung unter diesen Bedingungen betrug im Durchschnitt ca. 5%. Die Anzahl der maximalen [³H]NMS-Bindungsstellen war durch die Mutation um 50% abgesenkt (siehe Kapitel 7.1, Tab. 7.2 (Seite 264), Waschproblematik siehe Kapitel 7.4, Seite 269).

Für alle in Abb. 3.8 dargestellten Verbindungen zeigte sich eine deutliche Affinitätsabnahme bei der Mutation ¹⁰⁴Tyr→Ala. Dieser Unterschied ist für alle Verbindungen statistisch signifikant (siehe Tab. 3.6). Alle Kurven wurden mit einer Steilheit von -1 ausreichend beschrieben und erreichten das Niveau der unspezifischen Bindung, nur Atropin wies an der Mutante ein flaches Steilheitsmaß auf.

Der Einfluss dieser orthosterischen Mutation auf die Bindung von N-Methylscopolamin wurde bereits in Antony et al. (2009) gezeigt. Dort wurde im Na,K,P_i-Puffer eine Affinitätsabnahme von 1,13 Dekaden beschrieben. Diese Differenz liegt in derselben Größenordnung wie in dieser Arbeit (1,39 Dekaden). Der Wert für NMS am M₂-Rezeptor liegt zwischen den von Kellershohn (pK_D = 9,07 ± 0,02 (n=25), 2007) und Straßmann (pK_D = 9,64 ± 0,15 (n=10), 2007) erhobenen Befunden im Na,Mg,HEPES-Puffer.

Im Vergleich zwischen den Atropin- und den Scopolaminderivaten zeigte sich, dass der Affinitätsverlust durch die Mutation M₂ ¹⁰⁴Tyr→Ala bei den Scopolaminderivaten stärker ausgeprägt war. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Epoxidstruktur des Scopolamins eine direkte Interaktion mit dem untersuchten Tyrosin eingeht, wohingegen Atropin nur mit dem hydrophoben Käfig der orthosterischen Tasche interagiert. Durch diese spezifische Wechselwirkung könnte Scopolamin tiefer in die orthosterische Bindungsstelle gezogen werden (siehe auch Kapitel 4.1.3, Seite 233).

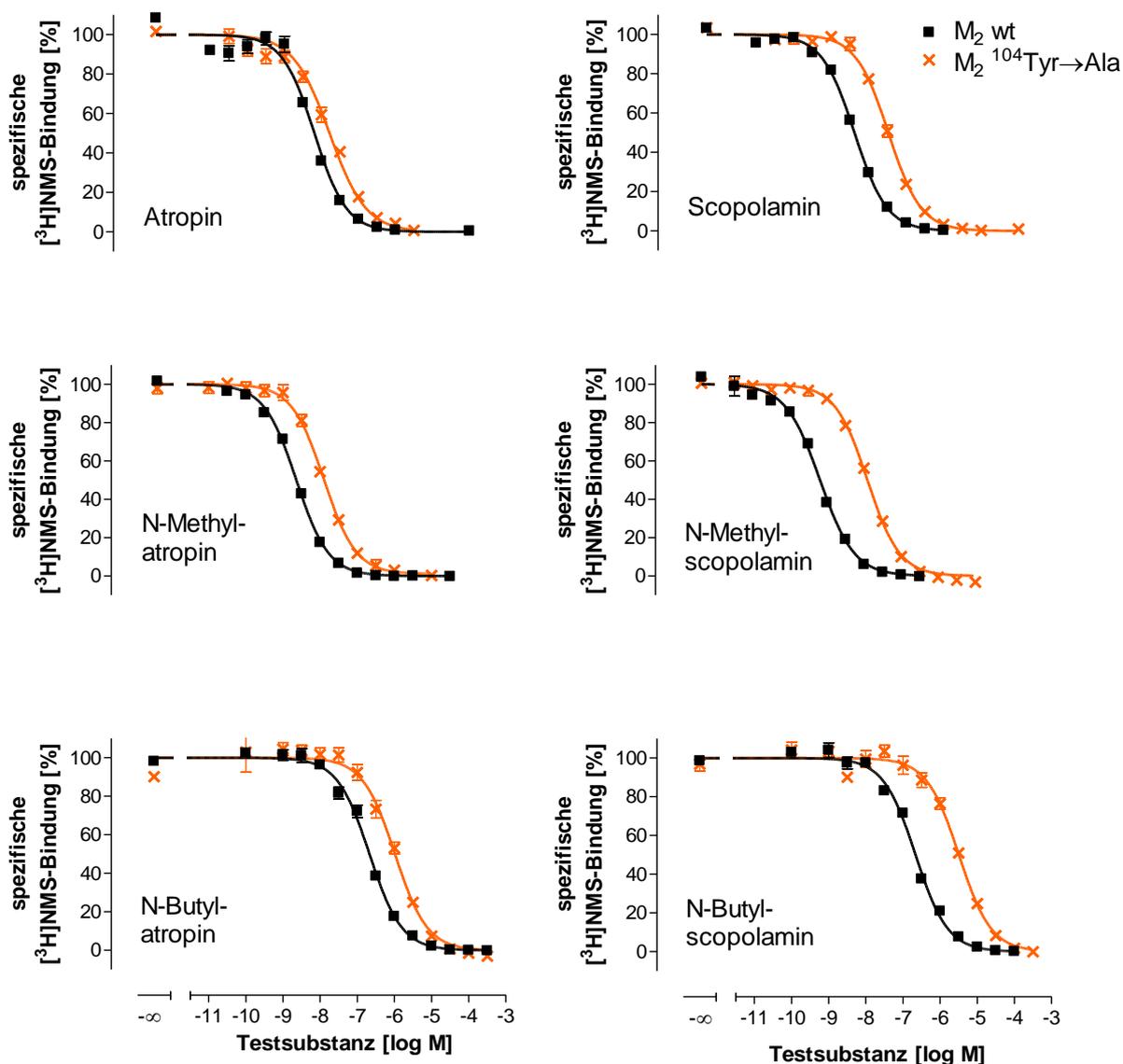


Abb. 3.8: Einfluss der Mutation $M_2^{104}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$ auf die Interaktion orthosterischer Antagonisten mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$.

Von oben nach unten sind die Graphen der schrittweise verlängerten Derivate von Atropin (links) und Scopolamin (rechts) dargestellt. *Ordinate*: Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 1,0 nM ($M_2^{104}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$) bzw. 0,2 nM ($M_2\text{wt}$) $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-22 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

		n	n_H	pK_A	ΔpK_A
Atropin	M₂ wt	3	-1,17 ± 0,08	8,30 ± 0,08	-
	M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	4	-0,84 ± 0,15 [#]	7,89 ± 0,09 ^{s.}	-0,41 ^{s.}
N-Methyl-atropin	M₂ wt	3	-0,99 ± 0,04	8,74 ± 0,03	-
	M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	4	-1,10 ± 0,09	7,96 ± 0,08 ^{s.}	-0,78 ^{s.}
N-Butyl-atropin	M₂ wt	3	-1,00 ± 0,05	6,89 ± 0,08	-
	M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	-1,06 ± 0,08	6,03 ± 0,10 ^{s.}	-0,86 ^{s.}
Scopolamin	M₂ wt	3	-0,98 ± 0,02	8,52 ± 0,05	-
	M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	-1,14 ± 0,06	7,54 ± 0,06 ^{s.}	-0,98 ^{s.}
N-Methyl-scopolamin	M₂ wt	22	-0,97 ± 0,02	9,37 ± 0,04	-
	M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	20	-1,09 ± 0,07	7,98 ± 0,05 ^{s.}	-1,39 ^{s.}
N-Butyl-scopolamin	M₂ wt	3	-0,97 ± 0,03	6,88 ± 0,04	-
	M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	-1,00 ± 0,01	5,54 ± 0,04 ^{s.}	-1,34 ^{s.}

Tab. 3.6: Bindungscharakteristika der orthosterischen Antagonisten an der Rezeptormutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala (1 nM [³H]NMS) im Vergleich zum Wildtyp M₂ (0,2 nM [³H]NMS).

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet und anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. pK_A: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, ΔpK_A: pK_A-Differenz zwischen der Rezeptormutante und M₂wt.

^{s.}: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

[#]: Steilheitsmaß n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test, p<0,05).

3.1.3.2 Einfluss der Mutation $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ auf allosterische Modulatoren

Wenn die Aminosäure M_2^{104} Tyrosin nur die Affinität von orthosterischen Liganden beeinflusst, so sollte die Bindung von allosterischen Modulatoren unbeeinflusst bleiben. Zur Überprüfung dieser These wurden Bindungsuntersuchungen mit W84 und Naphmethonium an der Mutante durchgeführt.

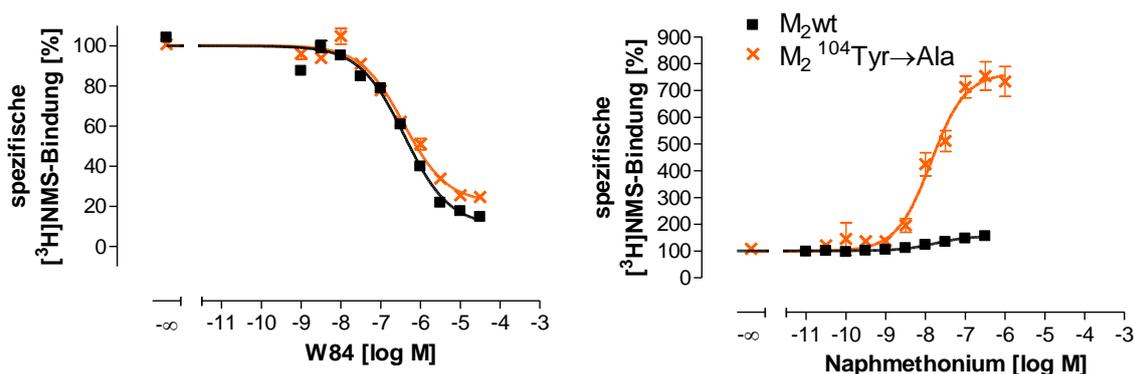


Abb. 3.9: Einfluss der Mutation $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ auf die Interaktion allosterischer Modulatoren mit der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung.

Ordinate: Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 17 ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 1,0 nM ($M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$) bzw. 0,2 nM ($M_2\text{wt}$) $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Die Daten für Naphmethonium an der Rezeptormutante wurden im Zentrifugationsverfahren bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

In Abb. 3.9 ist der Einfluss der orthosterischen Mutation $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ auf allosterische Modulatoren dargestellt, die Parameterwerte sind in Tab. 3.7 aufgeführt. Es ist erkennbar, dass sich die Mutation zwar nicht auf die Affinität der Verbindung, jedoch auf die Kooperativität auswirkte. Bei beiden untersuchten Verbindungen stieg der Kooperativitätsfaktor $p\alpha$ an. Die Kooperativität wurde positiver, das heißt, die Affinität des allosterischen Modulators zum NMS-besetzten Rezeptor war bei der Mutante höher als beim $M_2\text{wt}$ (siehe Kapitel 3.1.6, Seite 169).

In der Dissertation von J. Antony (2008) wurde der Einfluss der Mutation $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ auf die beiden allosterischen Modulatoren ebenfalls untersucht. Dort zeigte sich für beide Verbindungen kein Einfluss auf die Affinität. Bei Antony wurde die Kooperativität von W84 mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ im 5 mM Na,K,P_i-Puffer signifikant abgesenkt. Die Kooperativität von Naphmethonium stieg dort wie in dieser Arbeit auf einen $p\alpha$ -Wert >1 an. Wegen einer geringen Versuchsanzahl war dieser Anstieg bei Antony jedoch nicht signifikant.

		n	p α	pK _A	Δ pK _A
W84	M ₂ wt	3	-0,95 ± 0,00	6,55 ± 0,03	-
	M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	3	-0,67 ± 0,03 ^s	6,59 ± 0,04	0,04
Naph-methonium	M ₂ wt	6	0,29 ± 0,04	7,70 ± 0,12	-
	M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala ^z	5 ^z	1,17 ± 0,07 ^s	7,64 ± 0,08	-0,06

Tab. 3.7: Bindungscharakteristika der allosterischen Modulatoren an der Rezeptormutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala (1 nM [³H]NMS) im Vergleich zum M₂ Wildtyp (0,2 nM [³H]NMS).

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 17 ausgewertet. Die Daten für Naphmethonium an der Rezeptormutante wurden im Zentrifugationsverfahren bestimmt.

pK_A: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A, p α : negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktor α , Δ pK_A: pK_A-Differenz zwischen der Rezeptormutante und M₂wt.

^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

^z: Daten wurden über das Zentrifugationsverfahren ermittelt.

Erstaunlich erschien das starke Ausmaß der Steigerung der [³H]NMS-Bindung in der Anwesenheit von Naphmethonium an der orthosterischen Mutante auf 735 ± 52 % (bei einer deskriptiven Auswertung nach Gleichung 11). Bei J. Antony (Dissertation 2008) fand sich lediglich eine Erhöhung auf knapp 250%, obwohl der Kooperativitätsfaktor mit 1,13 nicht signifikant niedriger war als in dieser Arbeit.

Eine mögliche Erklärung könnte die rasche Dissoziationsgeschwindigkeit der Mutante in Na,Mg,HEPES-Puffer von <<1 min sein (siehe Kapitel 7.2.1, Seite 267). So könnte während des einen Waschschriffs mit Aqua dest. (R 4) beim Filtrationsverfahren (~20 s) bei den Proben ohne bzw. mit wenig allosterischem Modulator viel Radioligand abdissoziieren und damit abfiltriert werden. In Anwesenheit hoher Naphmethoniumkonzentrationen würde die Dissoziation des Radioliganden verlangsamt und es käme zu einer erhöhten Radioligandbindung. Der Waschschriff ist beim Filtrationsverfahren essentiell, um die unspezifische Bindung zu reduzieren. Um auszuschließen, dass der ausgeprägte Bindungsanstieg durch eine veränderte Dissoziationsgeschwindigkeit der einzelnen Proben während der Filtration zu Stande kommt, wurden diese Versuche mit dem Zentrifugationsverfahren durchgeführt (siehe Kapitel 7.4, Seite 269). Hier muss das abzentrifugierte Pellet zwar ebenfalls mit Ligand-freier Pufferlösung (L 10) gewaschen werden, um den Anteil der unspezifischen Bindung zu reduzieren, jedoch sollte bei einer kurzen Waschung (~2-3 sec) mit kaltem Puffer keine merkbare Dissoziation des Radioliganden auftreten. Die erhaltenen Kurven waren im Zentrifugations- und Filtrationsverfahren nahezu identisch (siehe Kapitel 7.4, Seite 269), die

Ergebnisse der Zentrifugationsversuche wiesen jedoch eine geringere Streuung auf. Daher sind in Abb. 3.9 und Tab. 3.7 die Daten aus den Zentrifugationsversuchen dargestellt.

Der deutliche Anstieg der spezifischen Bindung in Abb. 3.9 lässt sich relativieren, wenn nicht die prozentuale Bindung in Bezug auf die Bindung ohne Testsubstanz betrachtet wird, sondern wenn die fraktionelle Rezeptorbesetzung aufgetragen wird (siehe Abb. 3.10). Hierfür wurde die erhaltene spezifische Bindung über Gleichung 2 in eine Konzentration [nM] umgerechnet. Anschließend wurden die Radioligand-Rezeptor-Komplexe auf die Gesamtanzahl der eingesetzten Rezeptoren normiert. Durch diese Auftragung wird deutlich, dass ohne Zugabe von Testsubstanz der Anteil der Radioligand-Rezeptor-Komplexe bei der orthosterischen Mutante deutlich geringer ist. Dies beruht auf der verminderten Affinität des Radioliganden zu dieser Mutante (Faktor 25). In dieser Auftragung ist die verschiedene Radioligandkonzentration bei der Vermessung des Wildtyps und der Mutante nicht berücksichtigt, der Wildtyp wurde mit 0,2 nM und die Mutante mit 1 nM [³H]NMS vermessen.

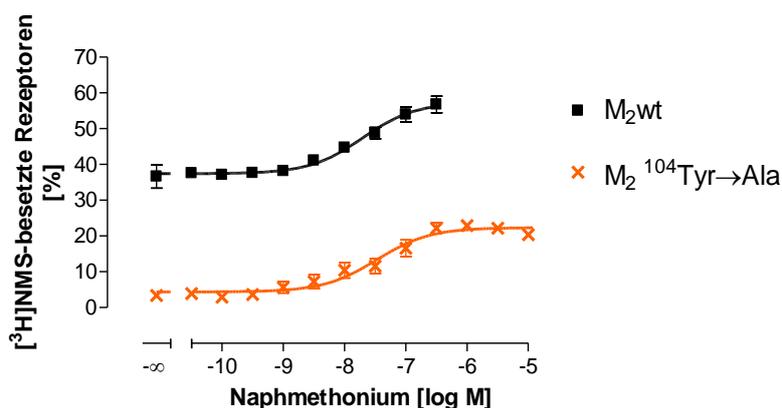


Abb. 3.10: Vergleich der prozentualen Rezeptorbesetzung mit [³H]NMS in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Naphmethonium am M₂wt und an der Mutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala.

Die in Abb. 3.9 (rechts, Seite 112) dargestellten Daten wurden auf die im Text beschriebene Art analysiert und auf die Anzahl der im Versuch eingesetzten Rezeptoren (100%) normiert. Die Versuchsbedingungen sind in der Legende von Abb. 3.9 beschrieben. *Ordinate*: Anteil der mit Radioligand besetzten Rezeptoren bezogen auf die Gesamtzahl im Versuchsansatz. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 5-6 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Unter Einfluss von Naphmethonium stieg die Bindung des Radioliganden bei beiden Rezeptoren um ca. 20 Prozentpunkte an (M₂wt 25,6 ± 4,0%, M₂¹⁰⁴Tyr→Ala 19,8 ± 0,5%). Auch wenn die Bindungserhöhung in Abb. 3.9 bei der Mutation M₂¹⁰⁴Tyr→Ala stärker erscheint als beim Wildtyp, so erreicht das Maximalniveau der Mutante -auf Rezeptorebene betrachtet- auch bei hohen Naphmethoniumkonzentrationen nicht das Ausgangsniveau des

Wildtyps. Die pharmakologischen Parameterwerte der beiden Analysen unterscheiden sich nur minimal.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die orthosterische Mutante zu einem geringeren Anteil als der Wildtyp in der von NMS-geforderten inaktiven Konformation vorliegt. Die beiden inversen Agonisten NMS und Naphmethonium stabilisieren sich gegenseitig die erforderliche Konformation. Dies könnte die stark positive Kooperativität dieser Interaktion erklären.

3.1.3.3 Einfluss der Mutation $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ auf allo-/orthosterische Hybridliganden antagonistischer Struktur

In diesem Kapitel wird die Abhängigkeit der Affinität der Antagonist-Hybride vom orthosterischen Epitop $M_2^{104}\text{Tyrosin}$ dargestellt, um die orthosterische Interaktion als Bestandteil eines dualsterischen Bindungsmodus zu detektieren. Der Einfluss der Mutation $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ auf die Affinität der Hybridliganden ist in Abb. 3.11 aufgezeigt.

Eine orthosterische Interaktion erschien wahrscheinlich, da sich z.B. die erwartete Subtypselektivität durch den allosterischen Molekülteil in Bindungsexperimenten nicht zeigte. Auch die insgesamt recht hohe Affinität zum freien Rezeptor ließ eine orthosterische Interaktion vermuten.

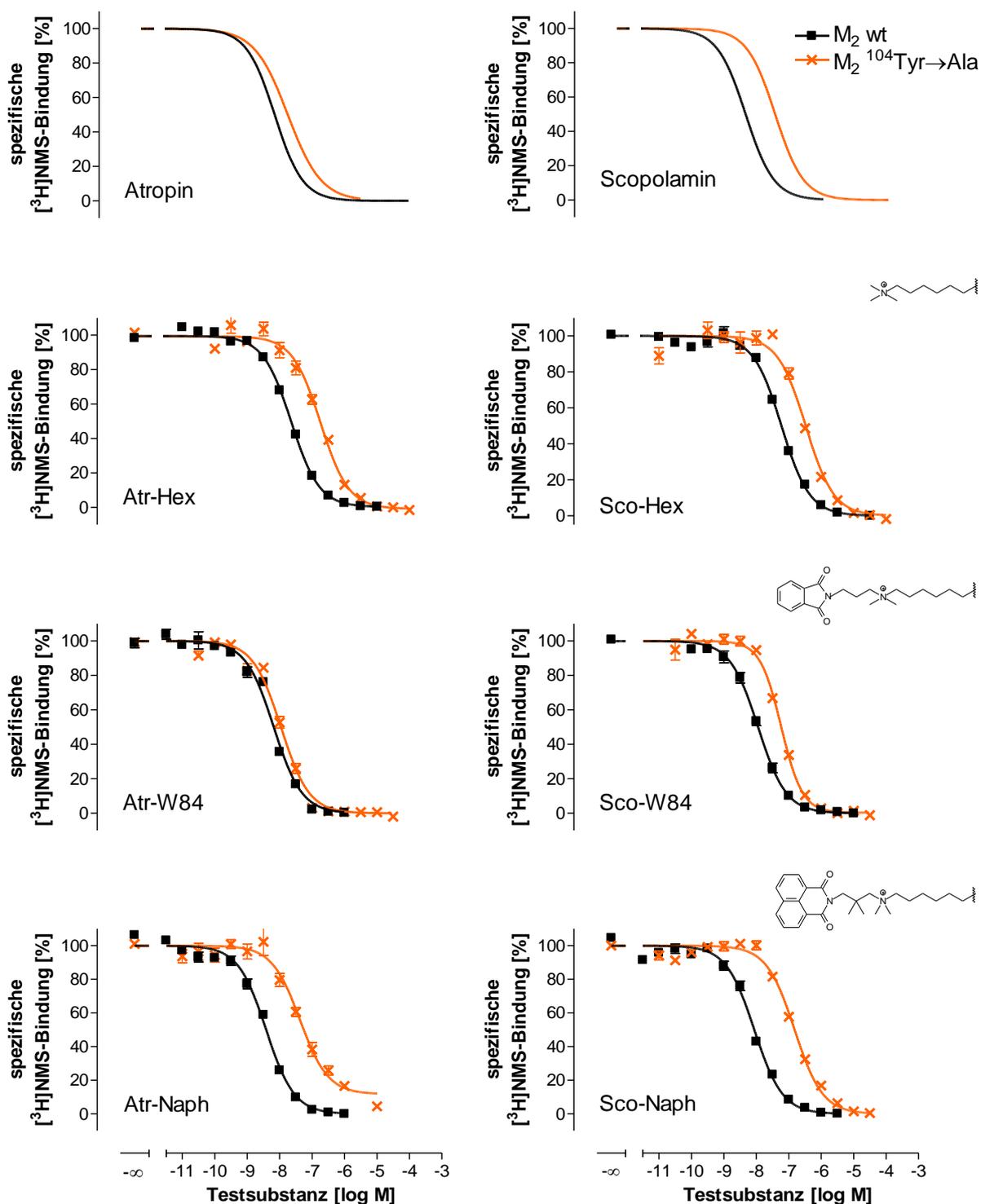


Abb. 3.11: Einfluss der Mutation M₂¹⁰⁴Tyr→Ala auf die Interaktion antagonistischer Hybridliganden mit ³H]NMS im Vergleich zum M₂wt.

Von oben nach unten sind die Graphen der schrittweise verlängerten Hybrid-Derivate von Atropin (links) und Scopolamin (rechts) dargestellt. Ordinate: Spezifische ³H]NMS-Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) mit 1 bzw. 0,2 nM ³H]NMS (Mutante bzw. Wildtyp) durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-7 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Die meisten Kurven konnten zufriedenstellend mit einer Kurvensteilheit von -1 beschrieben werden (F-Test, $p < 0,05$), nur Atropin und Sco-W84 an der Mutante $M_2^{104}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$ wiesen abweichende Steilheiten auf. Alle Kurven außer Atr-Naph an der Mutante erreichten das Niveau der unspezifischen Bindung. Bei Atr-Naph konnten $12,79 \pm 1,3\%$ der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung an der Mutante $M_2^{104}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$ nicht verdrängt werden. An der orthosterischen Mutante überwiegt der allosterische Bindungsmodus des Hybridliganden, so dass $[^3\text{H}]\text{NMS}$ nicht vollständig über einen kompetitiven Mechanismus verdrängt werden kann.

Bei allen untersuchten Verbindungen war ein signifikanter Affinitätsabfall durch die untersuchte Mutation $M_2^{104}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$ festzustellen (Tab. 3.8).

		n	n_H	pK_A	ΔpK_A
Atropin	M_2 wt	3	$-1,17 \pm 0,08$	$8,30 \pm 0,08$	-
	$M_2^{104}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$	4	$-0,84 \pm 0,15^\#$	$7,89 \pm 0,09^s$	$-0,41^s$
Atr-Hex (JSW258)	M_2 wt	4	$-1,01 \pm 0,06$	$7,79 \pm 0,05$	-
	$M_2^{104}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$	4	$-0,97 \pm 0,08$	$6,82 \pm 0,06^s$	$-0,97^s$
Atr-W84 (JSW253)	M_2 wt	3	$-1,27 \pm 0,05$	$8,28 \pm 0,07$	-
	$M_2^{104}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$	5	$-1,38 \pm 0,24$	$8,01 \pm 0,07^s$	$-0,27^s$
Atr-Naph (JSW254)	M_2 wt	3	$-1,00 \pm 0,11$	$8,55 \pm 0,02$	-
	$M_2^{104}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$	4	$-0,92 \pm 0,19$	$7,21 \pm 0,06^s$	$-1,34^s$

		n	n _H	pK _A	ΔpK _A
Scopolamin	M ₂ wt	3	-0,98 ± 0,02	8,52 ± 0,05	-
	M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	3	-1,14 ± 0,06	7,54 ± 0,06 ^s	-0,98 ^s
Sco-Hex (JK179)	M ₂ wt ^F	3	-1,03 ± 0,04	7,32 ± 0,03	-
	M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	4	-1,32 ± 0,10	6,51 ± 0,03 ^s	-0,81 ^s
Sco-W84 (JSW257)	M ₂ wt	3	-0,98 ± 0,09	8,09 ± 0,12	-
	M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	4	-1,33 ± 0,11 [#]	7,30 ± 0,05 ^s	-0,79 ^s
Sco-Naph (JSW256)	M ₂ wt	7	-1,04 ± 0,05	8,21 ± 0,08	-
	M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	5	-1,03 ± 0,05	6,88 ± 0,04 ^s	-1,33 ^s

Tab. 3.8: Bindungscharakteristika der von Atropin bzw. von Scopolamin abgeleiteten Hybridliganden an der Rezeptormutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala (1 nM [³H]NMS) im Vergleich zum Wildtyp M₂ (0,2 nM [³H]NMS).

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet und anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. pK_A: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, ΔpK_A: pK_A-Differenz zwischen der Rezeptormutante und M₂wt.

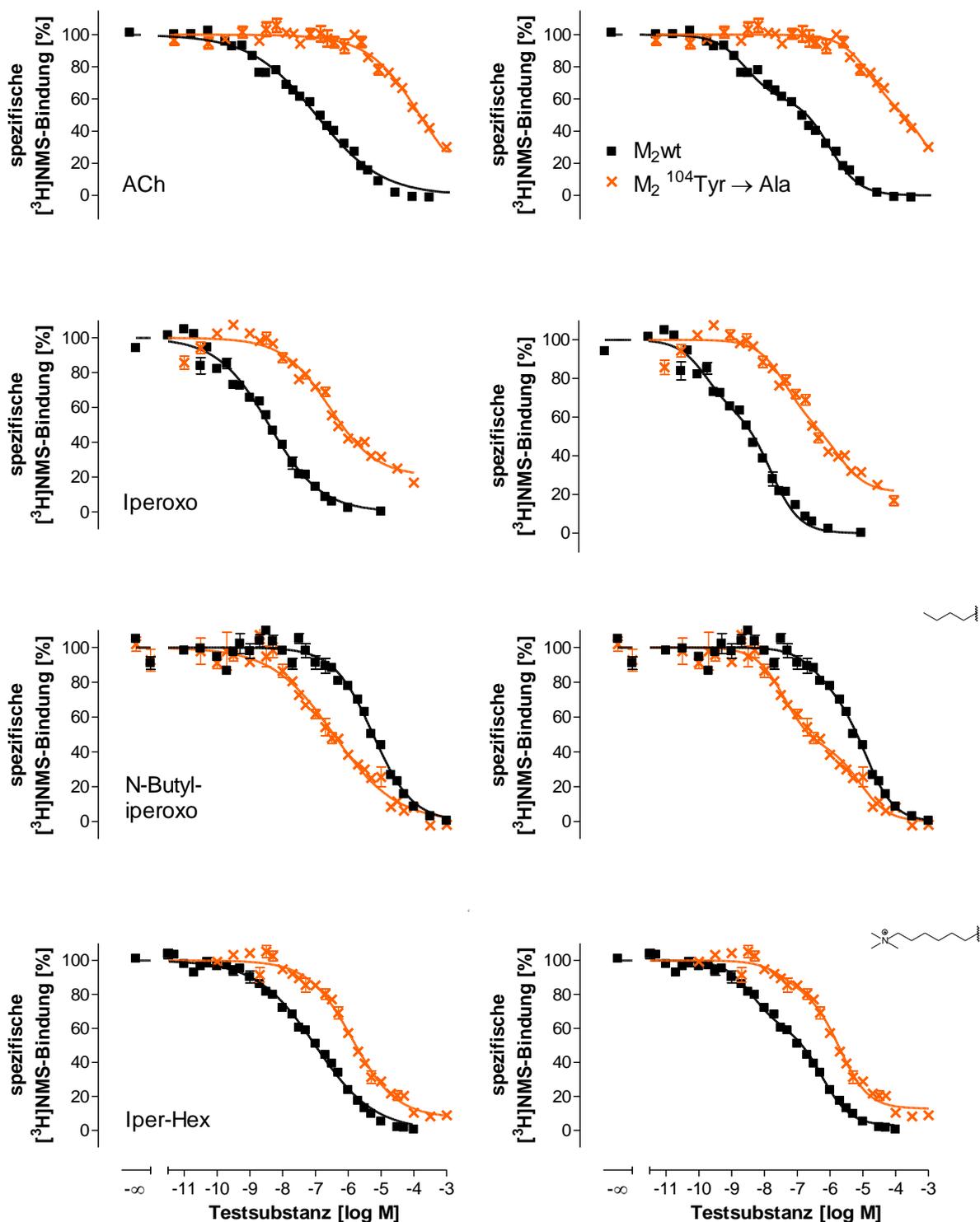
^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

[#]: Steilheitsmaß n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test, p<0,05).

^F: Diese Daten wurden nicht an FlpIn CHO M₂-Zellen, sondern an CHO-Zellen aus Frankfurt generiert.

3.1.3.4 Einfluss der Mutation M₂¹⁰⁴Tyr→Ala auf agonistische Verbindungen

Antony et al. (2009) konnten bereits im 5 mM Na,K,P_i-Puffer zeigen, dass die Aminosäure Tyrosin104 einen Einfluss auf die Bindung von Iperoxo, Iper-W84 und Iper-Naph besitzt. Diese Befunde sollen in diesem Kapitel im Na,Mg,HEPES-Puffer bestätigt, und mit den beiden neuen Verbindungen Iper-Hex und N-Butyliperoxo verglichen werden. Zusätzlich wurde der endogene Agonist Acetylcholin untersucht. Die Befunde sind graphisch in Abb. 3.12 und tabellarisch in Tab. 3.9 dargestellt. Eine graphische Auftragung der Affinität zur hoch- und niedrigaffinen Bindungsstelle in Abhängigkeit der Fraktionsgröße findet sich in Kapitel 3.1.5, Seite 167.



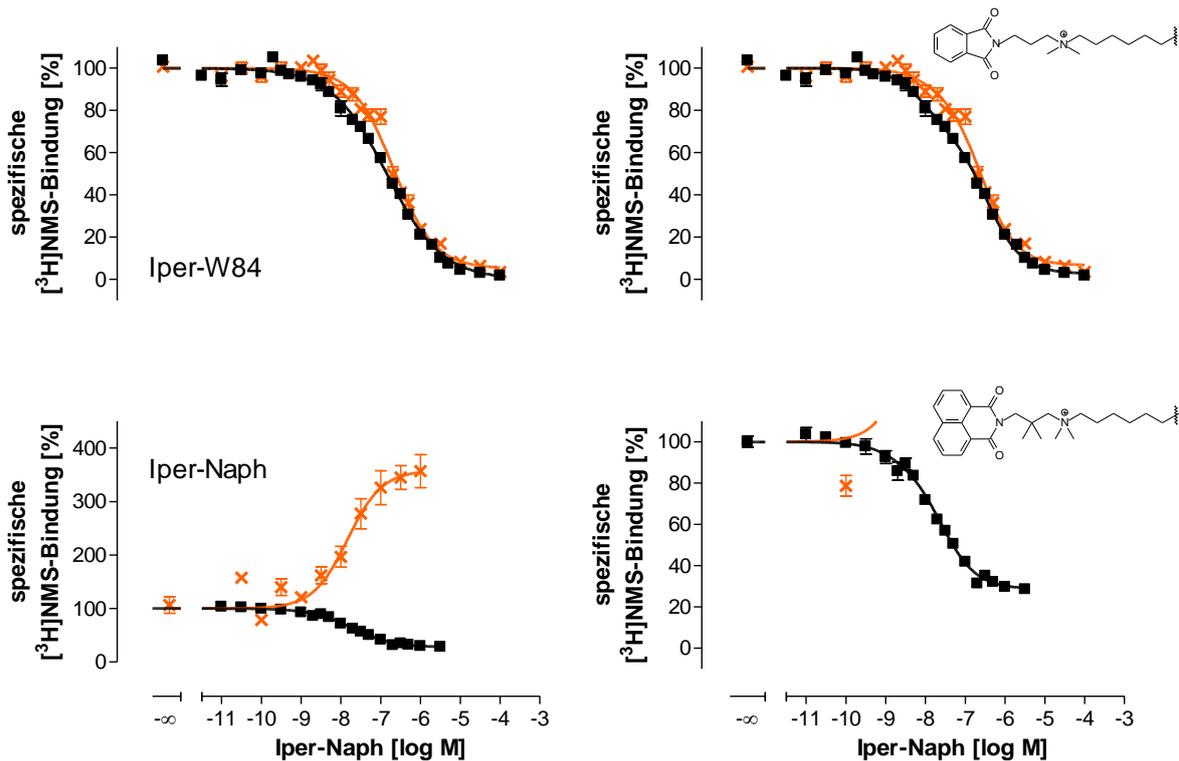


Abb. 3.12: Einfluss der Mutation $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ auf die Konzentrations-Effekt-Kurven agonistischer Hybridliganden im Vergleich zu $M_2\text{wt}$.

Von oben nach unten wurden die Strukturen schrittweise vom reinen Orthoster Iperoxo ausgehend über eine Butyl- und Hexylammoniumkette zu allo-/orthosterischen Hybridliganden verlängert. Links wurden die Datensätze nach Gleichung 11 (monophasisch) und rechts nach Gleichung 16 (biphasisch) ausgewertet. *Ordinate*: Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 1,0 nM ($M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$) bzw. 0,2 nM ($M_2\text{wt}$) $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Die Daten für Iper-Naph an der Rezeptormutante wurden im Zentrifugationsverfahren bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Die Mutation $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ zeigte auf die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung aller Substanzen einen signifikanten Einfluss. Nur der Effekt bei Iper-W84 war gering ausgeprägt, doch auch diese Affinitätsabnahme war in der monophasischen Auswertung signifikant. Außer den Kurven von Iper-Naph an der Mutante waren alle flacher als -1. Meist wurde die monophasische Auswertung bevorzugt (siehe Tab. 3.9), dies ist in der Spalte „biph>mono“ ablesbar, da dort die Anzahl der Versuche angegeben wird, die signifikant besser nach dem 2-Kompartiment-Modell anzupassen waren. Mit der Ausnahme von N-Butylperoxo wurden die Kurvenverläufe bei der orthosterischen Mutante steiler. Die Daten der Mutante mit Iperoxo und Iper-Hex erreichten nicht vollständig das Niveau der unspezifischen Bindung (Iperoxo $19,92 \pm 3,74\%$, Iper-Hex $6,55 \pm 2,04\%$). Möglich wäre ein allosterischer Bindungsmodus wie bei Iper-Naph, im Fall von Iperoxo erscheint dies jedoch unwahrscheinlich, da keine Disso-

ziationsverzögerung gemessen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Eine endgültige Erklärung konnte im Rahmen dieser Arbeit hierfür nicht gefunden werden.

N-Butylperoxo zeigte ein außergewöhnliches Bindungsverhalten. Die Substanz gewann an der orthosterischen Mutante deutlich an Affinität. Damit nimmt sie eine Einzelstellung ein, da alle bisher untersuchten Verbindungen entweder an Affinität verloren (orthosterische Liganden) oder unbeeinflusst blieben (allosterische Modulatoren). Besonders die Affinität zur hochaffinen Bindungsstelle wurde gefördert, pK_A und die hochaffine Fraktion nahmen zu (Tab. 3.9). Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Butylkette mehr Platz innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle benötigt, und durch die Mutation das freie Volumen vergrößert wird. Diese Hypothese ließ sich nicht auf die Antagonisten übertragen, die Butylderivate von Atropin und Scopolamin verloren an der Mutante $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ an Affinität.

Acetylcholin verlor stärker als Iperoxo durch die orthosterische Mutation $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ an Affinität. Die Affinität von N-Methylscopolamin (siehe Abb. 3.8, Seite 110) sank durch die Mutation um den Faktor 10, Iperoxo um den Faktor 100 und Acetylcholin um den Faktor 1000. Auch in der Dissertation von J. Antony (2007) zeigte Acetylcholin den stärksten Affinitätsverlust zwischen den Vollagonisten ACh, Oxotremorin M und Iperoxo.

Die Kooperativität von Iper-Naph mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ wechselte sich durch die orthosterische Mutation von negativ nach positiv. Durch das gestörte orthosterische Haftareal dominierte nun der allosterische Molekülteil, und Iper-Naph verhielt sich analog der allosterischen Muttersubstanz Naphmethonium. Wegen des starken Anstiegs wurden auch die Versuche von Iper-Naph an der orthosterischen Mutante mit dem Zentrifugationsverfahren durchgeführt (analog Naphmethonium, siehe Kap. 3.1.3.2). Da auch am Wildtyp die Radioligand-Bindung nicht vollständig inhibiert werden konnte (unteres Plateau $28,47 \pm 0,52\%$), wurden die Daten von Iper-Naph zusätzlich allosterisch nach dem Ehlert-Modell ausgewertet (Gleichung 17). Für den Wildtyp ergab sich ein pK_A -Wert von $7,89 \pm 0,04$ und ein Kooperativitätsfaktor $p\alpha$ von $-0,69 \pm 0,02$ und für die Mutante eine Affinität von $pK_A = 7,69 \pm 0,11$ und eine Kooperativität von $0,67 \pm 0,07$. Der Kooperativitätsunterschied ist deutlich ausgeprägt und signifikant. Die pK_A -Werte zwischen den beiden verschiedenen Analyseverfahren sind jeweils nicht signifikant verschieden von der monophasischen Auswertung (Tab. 3.9). Die Kooperativitätswerte entsprechen denen aus Antony et al. (2009, M_2 $-0,50 \pm 0,05$, $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ $0,61 \pm 0,10$). Iper-Naph zeichnete sich durch relativ steile Kurven aus. Am M_2 -Wildtyp war das Steilheitsmaß zwar signifikant kleiner als -1, jedoch deutlich größer als bei

den anderen Verbindungen. An der orthosterischen Mutante konnte die Konzentrations-Bindungs-Kurve ausreichend mit einem Steilheitsmaß von -1 beschrieben werden. Daher war eine biphasische Auswertung hier nicht möglich.

Antony et al. fanden für Iperoxo einen Affinitätsverlust von 3,19 Dekaden. Dies ist etwas stärker ausgeprägt als in der vorliegenden Arbeit (2,01 Dekaden). Die hohe Affinität des Wildtyps im nM-Bereich zeigte sich in beiden Arbeiten. Die genauen Werte können nicht miteinander verglichen werden, da Antony in Na,K,P₁-Puffer gearbeitet hat, und die hier dargestellten Untersuchungen in Na,Mg,HEPES-Puffer durchgeführt wurden (zur Pufferabhängigkeit siehe Dissertation V. Straßmann 2007).

Iper-Hex zeigte eine Affinitätsabnahme durch die Mutation M₂¹⁰⁴Tyr→Ala, die jedoch nicht so stark ausgeprägt war wie bei Iperoxo. Die Tatsache, dass Iper-Hex an Affinität verliert und insgesamt eine höhere Affinität aufweist als N-Butyliperoxo könnte ein Hinweis darauf sein, dass die beiden Verbindungen eine unterschiedliche Bindungstopographie besitzen.

Die beiden Hybridagonisten Iper-W84 und Iper-Naph zeigten bereits bei Antony et al. eine Affinitätsabnahme. Dies ist auch in der vorliegenden Arbeit der Fall. Der Affinitätsverlust von Iper-Naph im Na,Mg,HEPES-Puffer war zwar nicht signifikant, aber es zeigte sich ebenfalls der Wechsel der Kooperativität.

Insgesamt konnte für alle untersuchten Agonisten eine Abhängigkeit von der orthosterischen Bindungsstelle bestätigt werden.

Wege zu dualsterischen Liganden: Bindungseigenschaften neuartiger Hybridliganden

	n	n_H	n_H ≠ -1	pK_{app}	ΔpK_{app}	
Acetylcholin	M₂ wt	3	-0,38 ± 0,01 [#]	3/3	6,90 ± 0,14	-
	M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	-0,55 ± 0,03 ^{#s.}	3/3	3,80 ± 0,03 ^{s.}	-3,10 ^{s.}
Iperoxo	M₂ wt	4	-0,56 ± 0,05 [#]	4/4	8,60 ± 0,05	-
	M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	4	-0,62 ± 0,06 [#]	4/4	6,59 ± 0,07 ^{s.}	-2,01 ^{s.}
N-Butyl- iperoxo	M₂ wt	3	-0,71 ± 0,05 [#]	3/3	5,42 ± 0,08	-
	M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	-0,45 ± 0,02 ^{#s.}	3/3	6,48 ± 0,14 ^{s.}	1,06 ^{s.}
Iper-Hex (JSW236)	M₂ wt	4	-0,50 ± 0,03 [#]	4/4	7,21 ± 0,12	-
	M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	-0,65 ± 0,02 ^{#s.}	3/3	5,89 ± 0,04 ^{s.}	-1,32 ^{s.}
Iper-W84 (DDT5)	M₂ wt	4	-0,64 ± 0,02 [#]	4/4	7,04 ± 0,10	-
	M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	-0,88 ± 0,13 [#]	1/3	6,69 ± 0,05 ^{s.}	-0,35 ^{s.}
Iper-Naph (MMH5-6)	M₂ wt	3	-0,85 ± 0,06 [#]	1/3	7,94 ± 0,06	-
	M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	1,11 ± 0,39	0/3	7,84 ± 0,11	-0,10

	n	biph>mono	pK _{app} (high)	pK _{app} (low)	F	
Acetylcholin	M ₂ wt	3	3/3	8,66 ± 0,08	6,17 ± 0,01	0,40 ± 0,02
	M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	3	1/3	4,77 ± 0,18 ^s	2,97 ± 0,16 ^s	0,48 ± 0,06
Iperoxo	M ₂ wt	4	1/4	9,84 ± 0,20	7,95 ± 0,07	0,39 ± 0,03
	M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	4	0/4	7,56 ± 0,25 ^s	5,59 ± 0,49 ^s	0,45 ± 0,07
N-Butyl- iperoxo	M ₂ wt	3	1/3	6,91 ± 0,36	5,21 ± 0,02	0,20 ± 0,02
	M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	3	1/3	7,36 ± 0,07	5,02 ± 0,17	0,57 ± 0,00 ^s
Iper-Hex (JSW236)	M ₂ wt	4	3/4	8,62 ± 0,26	6,45 ± 0,13	0,40 ± 0,02
	M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	3	0/3	7,63 ± 0,08 ^s	5,68 ± 0,06 ^s	0,19 ± 0,04 ^s
Iper-W84 (DDT5)	M ₂ wt	4	2/4	8,05 ± 0,20	6,54 ± 0,09	0,37 ± 0,02
	M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	3	0/3	8,01 ± 0,32	6,51 ± 0,17	0,16 ± 0,10
Iper-Naph (MMH5-6)	M ₂ wt	3	0/3	9,03 ± 0,66	7,34 ± 0,41	0,44 ± 0,23
	M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	3	0/3		nicht möglich	

Tab. 3.9: Bindungscharakteristika der von Iperoxo abgeleiteten Hybridliganden an der Rezeptor-mutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala (1 nM [³H]NMS) im Vergleich zum Wildtyp M₂(0,2 nM [³H]NMS). Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. **1. Teil:** Monophasische Auswertung nach Gleichung 11, **2. Teil:** Biphasische Auswertung nach Gleichung 16. Alle Werte wurden anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. pK_{app}: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_{app} nach monophasischer Analyse, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, ΔpK_{app}: pK_{app}-Differenz zwischen dem entsprechenden Rezeptor und M₂wt, pK_{app}(high) bzw. pK_{app}(low): negativer dekadischer Logarithmus von K_{app}(high) der hochaffinen Fraktion bzw. von K_{app}(low) der niedrigaffinen Fraktion, F: Anteil der hochaffinen Fraktion an der Gesamtbindung.
^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).
[#]: Steilheitsmaß n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test, p<0,05).

3.1.4 Detektion allosterischer Bindung durch Untersuchungen an allosterischen M₂-Rezeptormutanten

Im vorangegangenen Kapitel (Kapitel 3.1.3, Seite 108) konnte die orthosterische Interaktion der Hybridliganden gezeigt werden. Wenn sich die Substanzen wie erwünscht dualsterisch binden, so müsste ihre Bindung zusätzlich von allosterischen Epitopen abhängen. In diesem Abschnitt wird die Rolle allosterischer Epitope für die Bindung der Hybridliganden dargestellt. Hierfür wurden die subtypselektivitätsgebenden Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyr und ⁴²³Thr sowohl gegen die korrespondierenden Aminosäuren des M₅-Rezeptors als auch gegen

Alanin ausgetauscht. Auch der Einfluss der beiden Glutamate M₂ 172 und 175 innerhalb der EDGE₂Y-Sequenz (M₂ 172-177) in der allosterischen Bindungsstelle auf die Bindung der Hybridliganden wurde überprüft. Zusätzlich wurde die Rolle des konservierten Tryptophans 7.35 (M₂⁴²²Trp) untersucht. Eine Abbildung zur Lokalisation der Aminosäuren findet sich in Abb. 1.6 (Seite 11, Kapitel 1.4). All diese Aminosäuren zeigten sich in der Vergangenheit als essentielle Epitope für die Rezeptorinteraktion muskarinischer allosterischer Modulatoren (z. B. Prilla Dissertation 2006, Voigtländer Dissertation 2003).

3.1.4.1 Folgen des gemeinsamen Austauschs der M₂-Subtypselektivitätsgebenden Epitope ¹⁷⁷Tyrosin und ⁴²³Threonin zu den korrespondierenden Aminosäuren des M₅-Rezeptors

Antony et al. (2009) verwendeten zur Detektion einer allosterischen Interaktion von Hybridliganden mit dem M₂-Rezeptor eine allosterische Doppelmutante. Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde in dieser Arbeit dieselbe Rezeptorvariation gewählt. Bei dieser Mutante wurden die beiden für die Subtypselektivität essentiellen Aminosäuren (Prilla Dissertation 2007) M₂¹⁷⁷Tyr und M₂⁴²³Thr gegen die korrespondierenden Aminosäuren des M₅-Rezeptors ausgetauscht. Diese Mutante ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit stabil in FlpIn CHO-Zellen transfiziert worden (siehe 2.2).

Einfluss der Mutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ auf die Bindung „klassischer“ allosterischer Modulatoren

Zur Kontrolle wurden eingangs Bindungsexperimente mit ausgewählten allosterischen Modulatoren durchgeführt, von denen eine Interaktion mit den beiden Epitopen bereits beschrieben worden ist (Antony et al., 2009). Die resultierenden Konzentrations-Bindungs-Kurven sind in Abb. 3.13 dargestellt.

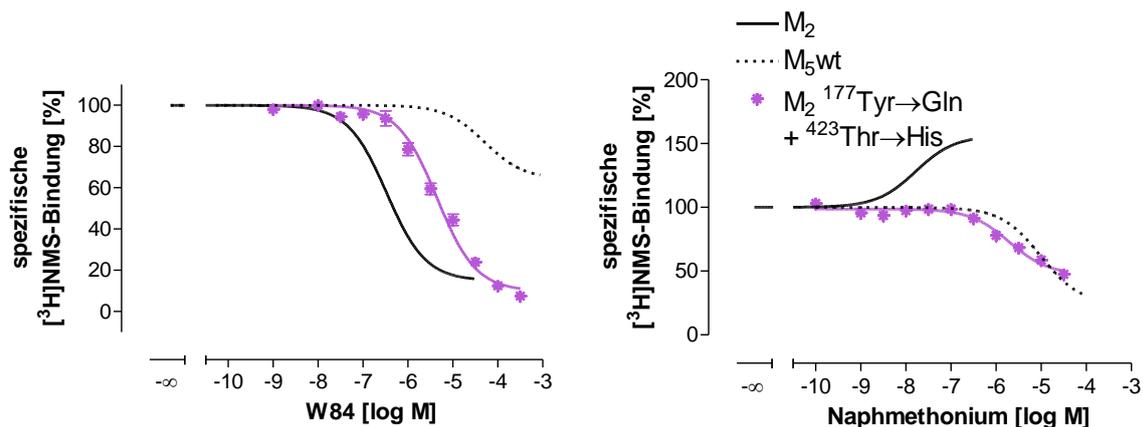


Abb. 3.13: Einfluss der Doppelmutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ auf die Konzentrations-Bindungs-Kurven der allosterischen Modulatoren W84 und Naphmethonium.

Ordinate: spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 17 ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM [³H]NMS durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datenpunkte für die Wildtyprezeptoren finden sich in Abb. 3.2 (CHO M₅, Seite 92) bzw. Abb. 3.9 (CHO FlpIn M₂wt, Seite 112).

An beiden Modulatoren zeigte sich ein Einfluss der allosterischen Mutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ auf die Gleichgewichtsbindung des Radioliganden [³H]NMS. W84 verlor an der Doppelmutante um den Faktor 10 an Affinität (Parameterwerte in Tab. 3.10, Seite 130). Auch die negative Kooperativität mit [³H]NMS wurde signifikant stärker. Die für W84 ermittelten Daten unterschieden sich nicht signifikant von den Ergebnissen von Straßmann (Dissertation 2007) (außer $p\alpha$ am Wildtyp, t-Test: $p = 0,04$). Obwohl durch die Doppelmutation Kernepitope des M₂-Rezeptors fehlen, erreichte die Affinität von W84 nicht das Niveau wie am M₅-Rezeptor.

Bei Naphmethonium sanken Affinität und Kooperativität fast auf die Werte der Interaktion mit dem M₅-Rezeptor ab, die Unterschiede waren allerdings noch signifikant verschieden. Eindrucksvoll ist der Kooperativitätswechsel von positiv zu negativ an M₅. Der Affinitätsverlust von fast 2 Dekaden ist im Einklang mit den Befunden von Prilla (Dissertation 2006).

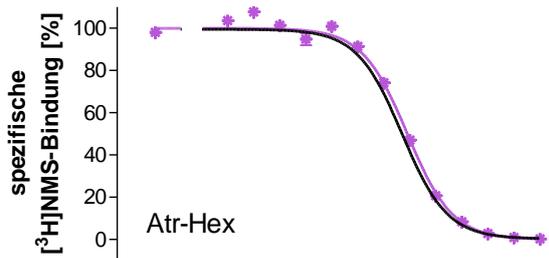
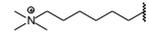
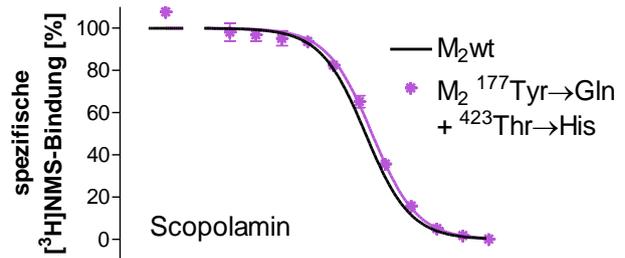
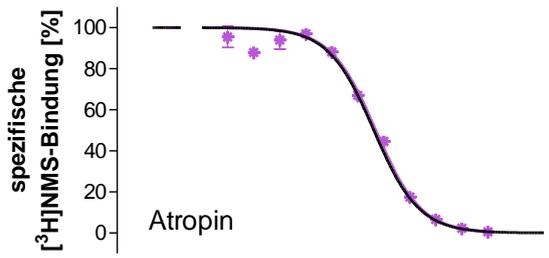
Im Na,K,P_i-Puffer fand Prilla zwar auch eine Abnahme der Kooperativität, allerdings keine Umkehr ins Negative. Da jedoch die Naphmethonium/NMS-Interaktion am M₅-Rezeptor im Na,K,P_i-Puffer nicht negativ, sondern neutral kooperativ ist, kann dieser Unterschied durch die verschiedenen Inkubationsbedingungen erklärt werden.

Einfluss der Mutation M₂ ¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His auf die Bindung orthosterischer Antagonisten und Hybridantagonisten

Wenn der W84- bzw. Naphmethoniumanteil der Hybridliganden an der Rezeptorinteraktion beteiligt ist, und wenn dieser Molekülteil ähnlich der allosterischen Ausgangsverbindung im Rezeptor lokalisiert ist, so sollte die Epitopabhängigkeit analog sein. Mittels [³H]NMS-Bindungsversuchen wurde der Einfluss der allosterischen Doppelmutante auf die Bindung der Hybridsubstanzen untersucht. Die Ausgangsverbindungen Atropin und Scopolamin wurden als Kontrollen mitgeführt.

Die Kurvenverläufe (Abb. 3.14) wurden alle außer im Fall von Atr-W84 mit einem Steilheitsmaß von -1 ausreichend beschrieben und die Testsubstanzen konnten die [³H]NMS-Bindung vollständig inhibieren. Sowohl aus der graphischen Abbildung (Abb. 3.14) als auch aus den ermittelten Parameterwerten (Tab. 3.10) war erkennbar, dass keine der untersuchten Verbindungen einen Affinitätsverlust durch die allosterische Doppelmutation erfuhr. Unerwarteter Weise scheinen diese beiden Epitope an der Bindung der antagonistischen Hybridliganden nicht beteiligt zu sein. Auch wenn keiner der Affinitätsunterschiede signifikant war, so ist in Tab. 3.10 dennoch die Differenz der pK_A-Werte angegeben.

Nicht auszuschließen ist jedoch, dass einem fehlenden Affinitätsverlust an der Doppelmutante einander kompensierende Affinitätsänderungen an den beiden mutierten Epitopen unterliegen. Um solch einen gegensätzlichen Effekt auszuschließen, wurden Untersuchungen an den Einzelmutanten durchgeführt (siehe 3.1.4.2 bzw. 3.1.4.3).



n.u.

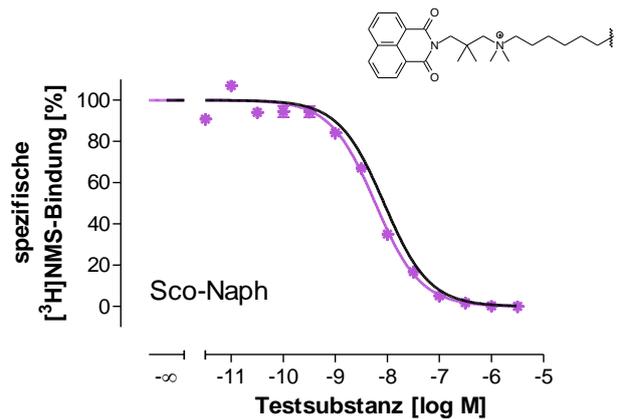
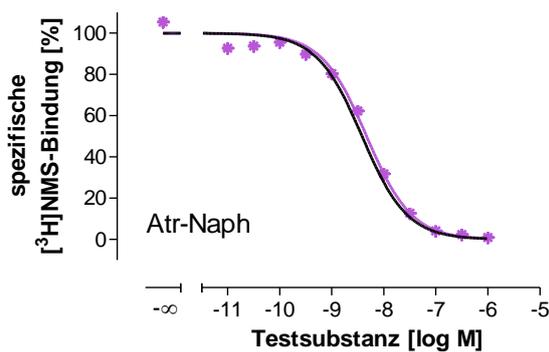
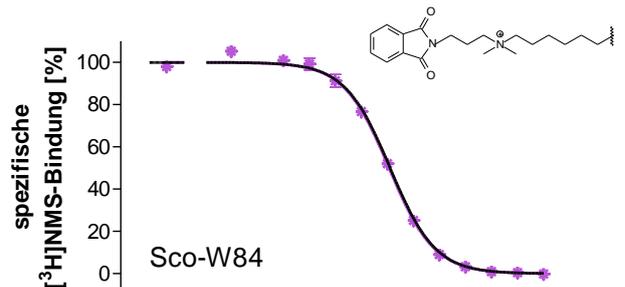
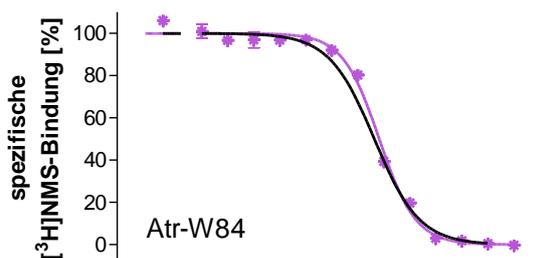


Abb. 3.14: Einfluss der Doppelmutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ auf die Konzentrations-Bindungs-Kurven der antagonistischen Hybridsubstanzen.

Von oben nach unten wurden die Strukturen schrittweise vom reinen Orthoster ausgehend über eine Hexylammoniumkette zu allo-/orthosterischen Hybridliganden verlängert. Links sind die Atropin-haltigen, rechts die Scopolamin-haltigen Verbindungen dargestellt. *Ordinate*: Spezifische [^3H]NMS-Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM [^3H]NMS durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-7 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. n.u.: nicht untersucht. Die Datenpunkte für $M_2\text{wt}$ finden sich in Abb. 3.8 (Seite 110) bzw. in Abb. 3.11 (Seite 116).

		n	n_H	pK_A	ΔpK_A
Atropin	M_2 wt	3	$-1,17 \pm 0,08$	$8,30 \pm 0,08$	-
	$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ + $^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$	3	$-0,95 \pm 0,06$	$8,34 \pm 0,05$	0,04
Atr-Hex (JSW258)	M_2 wt	4	$-1,01 \pm 0,06$	$7,79 \pm 0,05$	-
	$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ + $^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$	3	$-1,09 \pm 0,06$	$7,74 \pm 0,04$	-0,05
Atr-W84 (JSW253)	M_2 wt	3	$-1,27 \pm 0,05$	$8,28 \pm 0,07$	-
	$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ + $^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$	5	$-1,23 \pm 0,23^\#$	$8,27 \pm 0,04$	-0,01
Atr-Naph (JSW254)	M_2 wt	3	$-1,00 \pm 0,11$	$8,55 \pm 0,02$	-
	$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ + $^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$	4	$-0,96 \pm 0,08$	$8,55 \pm 0,07$	0,00

		n	n _H	pK _A	ΔpK _A
Scopolamin	M ₂ wt	3	-0,98 ± 0,02	8,52 ± 0,05	-
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3	-0,92 ± 0,03	8,45 ± 0,02	-0,07
N-Methyl-Scopolamin	M ₂ wt	22	-0,97 ± 0,02	9,37 ± 0,04	-
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	7 [§]	-0,83 ± 0,07	9,48 ± 0,06	0,11
Sco-Hex (JK179)	M ₂ wt ^F	3	-1,03 ± 0,04	7,32 ± 0,03	-
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	n.u.		n.u.	
Sco-W84 (JSW257)	M ₂ wt	3	-0,98 ± 0,09	8,09 ± 0,12	-
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3	-1,02 ± 0,11	8,15 ± 0,03	0,06
Sco-Naph (JSW256)	M ₂ wt	7	-1,04 ± 0,05	8,21 ± 0,08	-
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3	-0,86 ± 0,10	8,48 ± 0,01	0,27

		n	pα	pK _A	ΔpK _A
W84	M ₂ wt	3	-0,95 ± 0,00	6,55 ± 0,03	-
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	4	-1,23 ± 0,09 ^{s.}	5,47 ± 0,11 ^{s.}	-1,08 ^{s.}
Naph-methonium	M ₂ wt	6	0,29 ± 0,04	7,70 ± 0,12	-
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	5	-0,41 ± 0,06 ^{s.}	5,82 ± 0,06 ^{s.}	-1,88 ^{s.}

Tab. 3.10: Bindungscharakteristika der angegebenen Testsubstanzen antagonistischer Struktur an der Rezeptordoppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His im Vergleich zum Wildtyp M₂.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet und anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. Die Daten von der Interaktion mit Naphmethonium und W84 wurden nach Gleichung 17 ausgewertet. pK_A: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, pα: negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktor α, ΔpK_A: pK_A-Differenz zwischen der Rezeptormutante und M₂wt, n.u.: nicht untersucht.

^{s.}: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

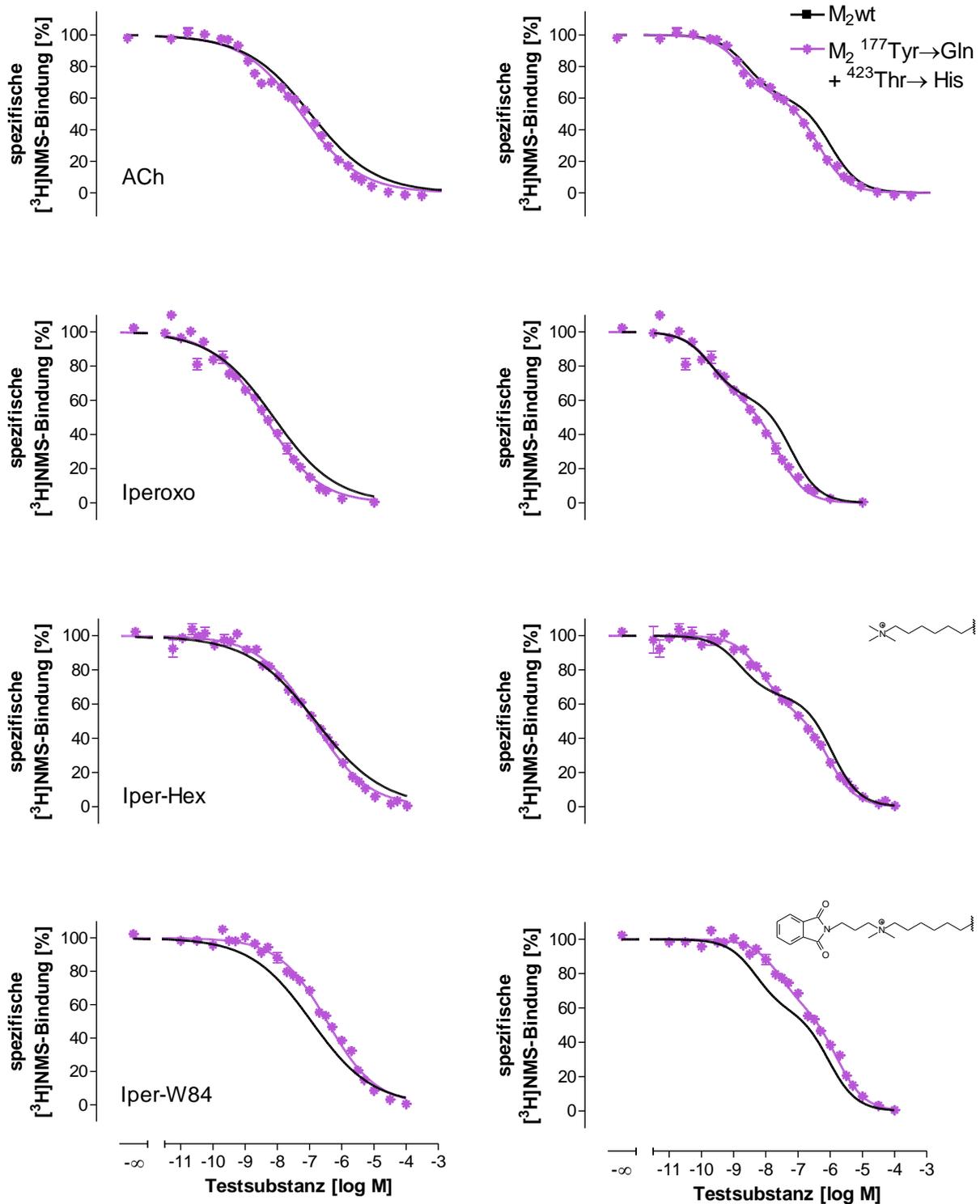
^F: Diese Daten wurden nicht an FlpIn CHO M₂-Zellen, sondern an CHO-Zellen aus Frankfurt generiert.

[§]: Die zu Grunde liegenden Kurvenverläufe sind nicht dargestellt.

Einfluss der Mutation M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His auf die Bindung von Acetylcholin, Iperoxo und dessen Derivaten

Wie im vorangegangenen Abschnitt dargestellt hatte sich für die allosterisch/orthosterischen Antagonisthybride unerwarteter Weise keine Abhängigkeit ihrer Bindung von der allosterischen Doppelmutation ergeben. Hingegen verloren die agonistischen Hybridliganden Iper-W84 und Iper-Naph an der Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His ungefähr um den Faktor 6-10 an Affinität (Antony et al., 2009), allerdings sind diese Untersuchungen unter den Bedingungen des Na,K,P_i-Puffers durchgeführt worden. In der Dissertation von V. Straßmann (2007) konnte zwar gezeigt werden, dass der Wechsel der Inkubationsbedingungen die Epitopabhängigkeit von Testsubstanzen nicht verändert, allerdings wurde dies nur für reine Allosterie und nicht für Hybridliganden bestimmt. Daher wird in diesem Abschnitt der Einfluss der allosterischen Doppelmutante auf bekannte agonistische Hybridliganden untersucht, um zu überprüfen, ob durch diese Mutation auch im Na,Mg,HEPES-Puffer die dualsterische Bindung detektiert werden kann oder ob der fehlende Einfluss der allosterischen Mutationen auf die Interaktion der Antagonist-Hybride durch die Inkubationsbedingungen erklärt werden kann.

In Abb. 3.15 sind die Konzentrations-Effekt-Kurven von Acetylcholin, Iperoxo und seinen Hybridderivaten dargestellt. In der linken Spalte befinden sich die Kurven nach monophasischer Analyse, rechts sind die biphasischen Kurven dargestellt.



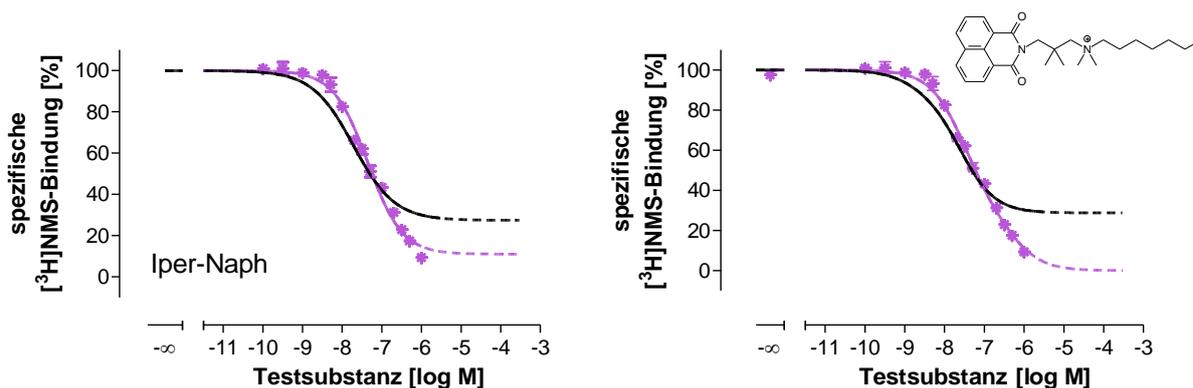


Abb. 3.15: Einfluss der Mutation $M_2^{177}\text{Tyr} \rightarrow \text{Gln} + {}^{423}\text{Thr} \rightarrow \text{His}$ auf die Interaktion von Acetylcholin, Iperoxo und davon abgeleiteten Hybridliganden.

Von oben nach unten wurden die Strukturen schrittweise vom reinen Orthoster Iperoxo ausgehend zu allo-/orthosterischen Hybridliganden verlängert. Links wurden die Datensätze nach Gleichung 11 (monophasisch) und rechts nach Gleichung 16 (biphasisch) ausgewertet. *Ordinate:* Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datenpunkte für M_2^{wt} finden sich in Abb. 3.12 (Seite 120).

Auch im Na,Mg,HEPES-Puffer zeigte sich für Iper-W84 und Iper-Naph eine zwar geringe, aber signifikante Affinitätsabnahme bei der allosterischen Doppelmutante. Dieser Befund kann als Indiz für die dualsterische Interaktion dieser beiden Hybridliganden mit dem M_2 -Rezeptor betrachtet werden. Folglich ist der fehlende Affinitätsverlust der Antagonist-Hybride durch die allosterische Mutation nicht auf das Puffersystem zurückzuführen.

Außer für Iper-Naph wiesen alle Analysen einen flachen Kurvenverlauf auf. Viele dieser Kurven wurden besser durch eine biphasische Auswertung beschrieben (siehe Tab. 3.11, biph>mono). Die Kurve von Iper-Naph erreichte nicht das Niveau der unspezifischen Bindung. Beim Wildtyp konnten $28,5 \pm 0,5\%$ und bei der Mutante $10,9 \pm 0,4\%$ der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung nicht verdrängt werden. Bei einer allosterischen Analyse dieser Substanz nach dem Ehlert-Modell (Gleichung 17) ergab sich eine Kooperativität von $p\alpha = -0,69 \pm 0,02$ für den Wildtyp und von $-1,17 \pm 0,01$ für die Mutante. Folglich wurde die Kooperativität durch die Mutation negativer. Dies kann dadurch erklärt werden, dass durch das Fehlen der allosterischen Aminosäuren der orthosterische Molekülteil der Hybridstruktur verstärkt Einfluss auf die Bindungseigenschaften nimmt. Folglich verhält sich Iper-Naph eher wie Iperoxo und vermag die Radioligandbindung stärker zu inhibieren. Die Datensätze der anderen Verbindungen wurden nicht nach dem Ehlert-Modell analysiert, da sie vollständig

das Niveau der unspezifischen Bindung erreichten, und damit ein kompetitives oder pseudo-kompetitives Verhalten aufwiesen.

Acetylcholin, Iperoxo und Iper-Hex zeigten keine statistische Affinitätsabnahme durch die Mutation. Auch der Einfluss auf die hoch- und niedrigaffine Bindungsstelle blieb durch die Mutation unbeeinflusst, bei der niedrigaffinen Bindung ist jedoch eine Tendenz zur Affinitätsabnahme zu sehen. Der Fraktionsanteil blieb fast gleich.

Folglich scheint sich die allosterische Doppelmutation zwar auch in einem geringen Maß auf die Affinität orthosterischer Agonisten zu der hoch- bzw. niedrigaffinen Bindungsstelle auszuwirken, statistisch signifikant ist der Affinitätsverlust jedoch nur bei den beiden Hybridliganden Iper-W84 und Iper-Naph.

Iper-Hex zeigte keine Affinitätsabnahme durch die allosterische Mutation, die Interaktion glich eher der des orthosterischen Liganden Iperoxo als der der dualsterischen Liganden Iper-W84 und Iper-Naph. Somit erscheint ein dualsterischer Bindungsmodus dieser verkürzten Hybridsubstanz unwahrscheinlich.

		n	n _H	n _H ≠ -1	pK _{app}	ΔpK _{app}
Acetylcholin	M₂ wt	3	-0,38 ± 0,01 [#]	3/3	6,90 ± 0,14	-
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His	3	-0,47 ± 0,01 ^{#s.}	3/3	7,23 ± 0,10	0,33
Iperoxo	M₂ wt	4	-0,56 ± 0,05 [#]	4/4	8,60 ± 0,05	-
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His	4	-0,50 ± 0,01 [#]	4/4	8,66 ± 0,06	0,06
Iper-Hex (JSW236)	M₂ wt	4	-0,50 ± 0,03 [#]	4/4	7,21 ± 0,12	-
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His	3	-0,50 ± 0,02 [#]	3/3	7,19 ± 0,05	-0,02
Iper-W84 (DDT5)	M₂ wt	4	-0,64 ± 0,02 [#]	4/4	7,04 ± 0,10	-
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His	4	-0,56 ± 0,02 [#]	4/4	6,70 ± 0,09 ^{s.}	-0,34 ^{s.}
Iper-Naph (MMH5-6)	M₂ wt	3	-0,85 ± 0,06	1/3	7,94 ± 0,06	-
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His	3	-0,89 ± 0,00	0/3	7,57 ± 0,02 ^{s.}	-0,37 ^{s.}

		n	biph>mono	pK _{app} (high)	pK _{app} (low)	F
Acetylcholin	M ₂ wt	3	3/3	8,66 ± 0,08	6,17 ± 0,01	0,40 ± 0,02
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3	3/3	8,79 ± 0,05	6,50 ± 0,08 ^s	0,38 ± 0,03
Iperoxo	M ₂ wt	4	1/4	9,84 ± 0,20	7,95 ± 0,07	0,39 ± 0,03
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	4	2/4	10,1 ± 0,21	7,99 ± 0,13	0,38 ± 0,04
Iper-Hex (JSW236)	M ₂ wt	4	3/4	8,62 ± 0,26	6,45 ± 0,13	0,40 ± 0,02
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3	3/3	8,39 ± 0,07	6,31 ± 0,08	0,43 ± 0,05
Iper-W84 (DDT5)	M ₂ wt	4	2/4	8,05 ± 0,20	6,54 ± 0,09	0,37 ± 0,02
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	4	3/4	7,89 ± 0,19	6,08 ± 0,12 ^s Δ = 0,46 ^s	0,38 ± 0,03
Iper-Naph (MMH5-6)	M ₂ wt	3	0/3	9,03 ± 0,66	7,34 ± 0,41	0,44 ± 0,23
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3	0/3	7,78 ± 0,03	6,64 ± 0,04	0,67 ± 0,03

Tab. 3.11: Bindungscharakteristika der von Iperoxo abgeleiteten Hybridliganden an der Rezeptor-doppelmutanten M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His im Vergleich zum Wildtyp M₂.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

1. Teil: Monophasische Auswertung nach Gleichung 11, **2. Teil:** Biphaseische Auswertung nach Gleichung 16. Alle Werte wurden anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. pK_{app}: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_{app} nach monophasischer Analyse, n_H Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, ΔpK_{app}: pK_{app}-Differenz zwischen dem entsprechenden Rezeptor und M₂wt, pK_{app}(high) bzw. pK_{app}(low): negativer dekadischer Logarithmus von K_{app}(high) der hochaffinen Fraktion bzw. von K_{app}(low) der niedrigaffinen Fraktion, F: Anteil der hochaffinen Fraktion an der Gesamtbindung.

^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

[#]: Steilheitsmaß n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test, p<0,05).

3.1.4.2 Abhängigkeit der Ligandbindung vom allosterischen Epitop M₂¹⁷⁷Tyrosin

An der allosterischen Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His zeigten die Antagonist-Hybride keinen Affinitätsverlust. Um auszuschließen, dass die beiden Einzelinteraktionen gegensätzlicher Natur sind, wird in diesem und dem folgenden Kapitel 3.1.4.3 der Einfluss

der Einzelmutationen auf die Bindung der Testsubstanzen untersucht. Neben den Mutanten zu den entsprechenden Aminosäuren des M₂-Rezeptors wurden auch die Mutationen zu Alanin untersucht. Durch diese Mutation befindet sich an der entsprechenden Position kein Interaktionspartner, da Alanin über keine freien funktionellen Gruppen verfügt. Folglich sollte damit auch eine Subtyp-unabhängige Wechselwirkung detektiert werden können.

Einfluss der Mutationen M₂¹⁷⁷Tyr→Ala und M₂¹⁷⁷Tyr→Gln auf orthosterische Antagonisten

In Abb. 3.16 sind die Konzentrations-Bindungs-Kurven der orthosterischen Antagonisten Atropin, Scopolamin und N-Methylscopolamin an den oben aufgeführten Rezeptormutanten dargestellt.

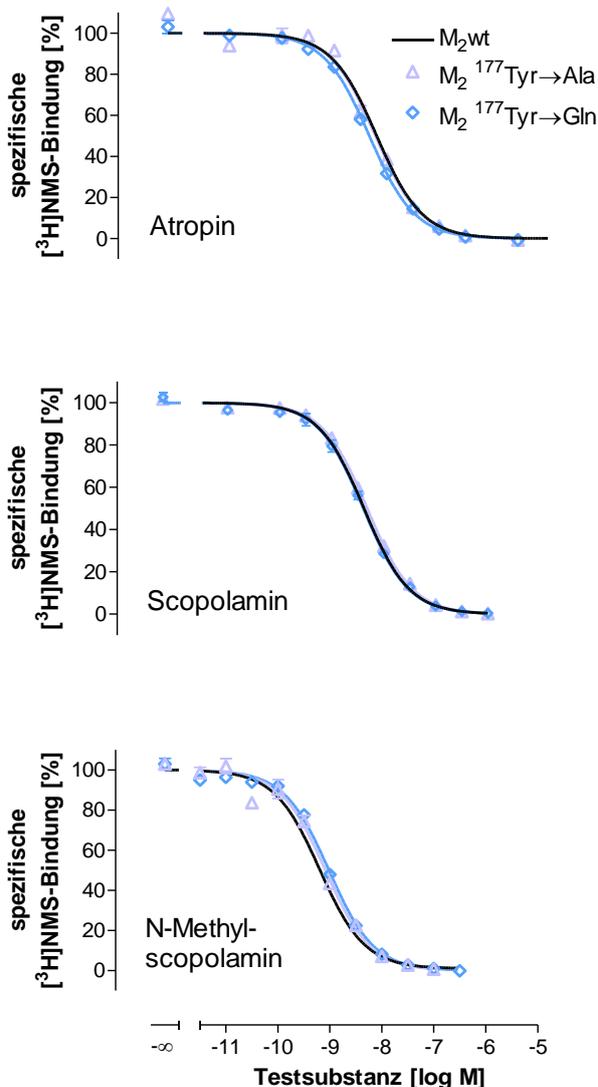


Abb. 3.16: Einfluss der Mutation M₂¹⁷⁷Tyr→Ala und M₂¹⁷⁷Tyr→Gln auf die Inhibition orthosterischer Antagonisten.

Von oben nach unten sind die Graphen der orthosterischen Antagonisten dargestellt. *Ordinate*: spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM [³H]NMS durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-22 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datenpunkte für M₂wt finden sich in Abb. 3.8 (Seite 110).

Keiner der orthosterischen Antagonisten zeigte einen signifikanten Affinitätsabfall, die Kurven ließen sich durch eine Steilheit von -1 ausreichend beschreiben (siehe Tab. 3.12, S. 141). Dies bestätigt die reine orthosterische Interaktion mit dem Rezeptor und das kompetitive Verhalten mit dem Radioliganden. Eine Ausnahme bildete N-Methylscopolamin an der Mutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$. Hier wurde ein zwar geringer, aber signifikanter Affinitätsverlust detektiert. Prilla und Antony (Dissertationen 2006 bzw. 2007) fanden im Na,K,P_i-Puffer ebenfalls einen Affiniätsabfall von NMS an der Mutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$, den Straßmann (Dissertation 2007) auch im Na,Mg,HEPES-Puffer beschrieben hat.

Einfluss der Mutationen $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ und $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ auf die Bindung allosterischer Modulatoren und Antagonist-Hybridliganden

Der Effekt dieser allosterischen Mutationen auf die Bindung des ausgewählten Hybridantagonisten Atr-Naph wurde untersucht. Diese Verbindung zeigte die größte Subtypselektivität und schien daher am wahrscheinlichsten über einen dualsterischen Bindungsmodus zu verfügen. Als Positivkontrolle für den Einfluss der untersuchten Mutationen wurde Naphmethonium gewählt, da dies die allosterische Muttersubstanz von Atr-Naph darstellt. Die resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abb. 3.17 dargestellt.

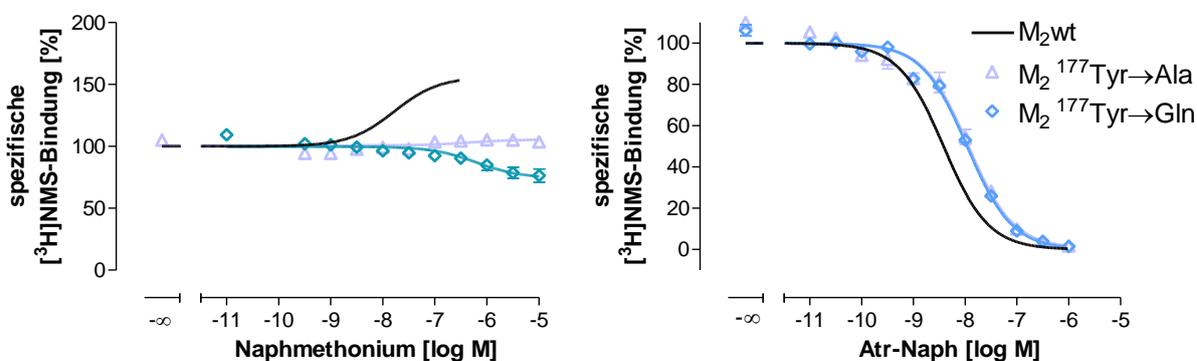


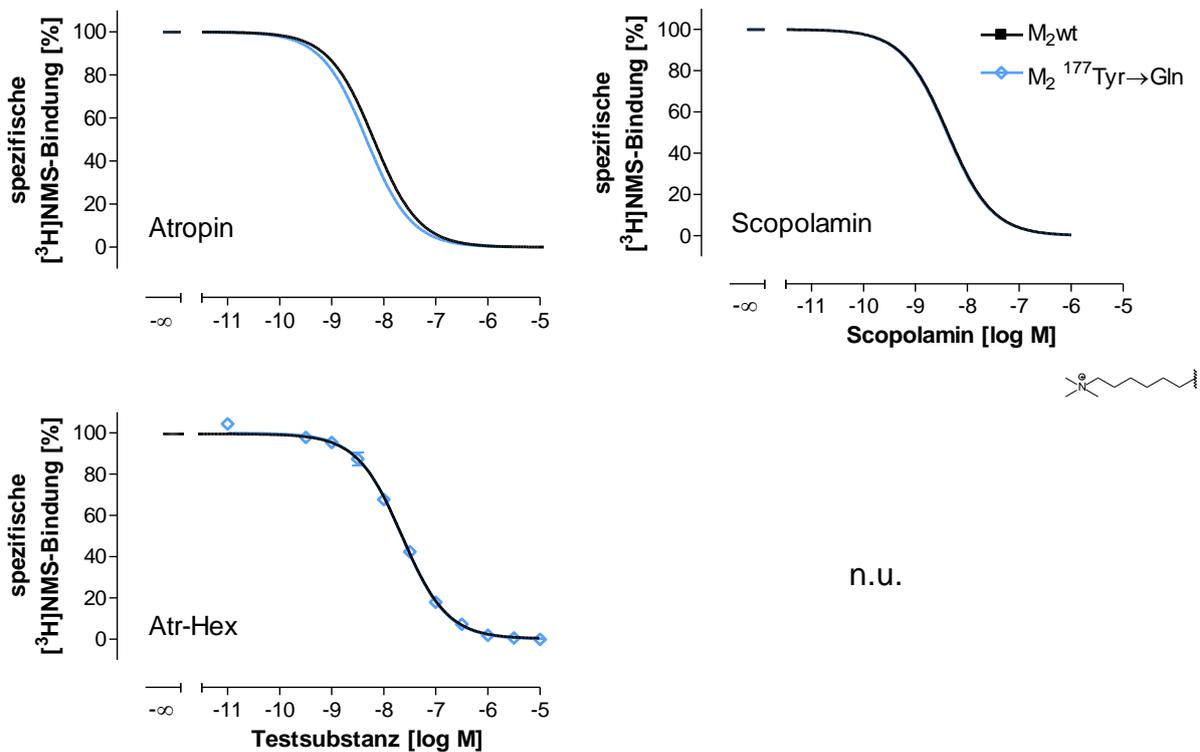
Abb. 3.17: Einfluss der Mutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ und $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ auf die Konzentrations-Bindungs-Kurven der Hybrids substanz Atr-Naph, sowie dessen allosterischen Baustein Naphmethonium.

Ordinate: spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 17 (Naphmethonium) bzw. Gleichung 11 (Atr-Naph) ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM [³H]NMS durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datenpunkte für $M_2\text{wt}$ finden sich in Abb. 3.9 (Naphmethonium, Seite 112) bzw. in Abb. 3.11 (Atr-Naph, Seite 116).

Naphmethonium zeigte an beiden Mutanten einen signifikanten Abfall der Affinität sowie eine negativere Kooperativität mit [³H]NMS (siehe Tab. 3.12, S. 141). Dies bedeutet, dass die Affinität von Naphmethonium am NMS-besetzten Rezeptor stärker durch die untersuchten Mutationen abnimmt als am freien Rezeptor (vergleiche Kapitel 3.1.6.2, Seite 172). Der Einfluss bei der Mutation zur korrespondierenden Aminosäure des M₅-Rezeptors war stärker ausgeprägt, was auf einen störenden Einfluss des Glutamins schließen lässt.

Auch der Hybridantagonist Atr-Naph schien an beiden veränderten Rezeptoren an Affinität zu verlieren, was allerdings nur im Fall von M₂¹⁷⁷Tyr→Gln signifikant war. Daher wurden auch die anderen Hybridliganden an dieser Mutante untersucht. Die entsprechenden Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abb. 3.18 aufgeführt.

Die pharmakologischen Parameterwerte befinden sich in Tab. 3.12.



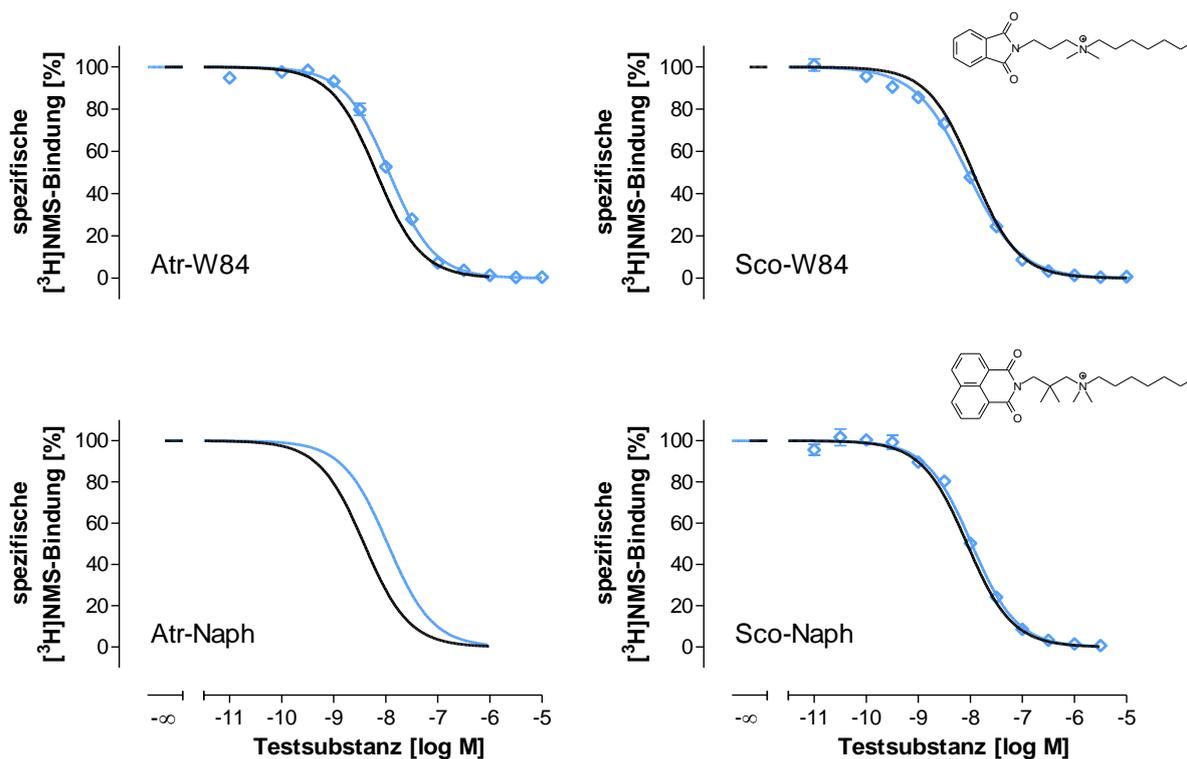


Abb. 3.18: Einfluss der Mutation $M_2^{177}\text{Tyr} \rightarrow \text{Gln}$ auf die Konzentrations-Effekt-Kurven der antagonistischen Hybridsubstanzen.

Von oben nach unten wurden die Strukturen schrittweise vom reinen Orthoster ausgehend über eine Hexylammoniumkette zu allo-/orthosterischen Hybridliganden verlängert. Links sind die Atropin-haltigen, rechts die Scopolamin-haltigen Verbindungen dargestellt. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. *Ordinate:* Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datenpunkte für M_2^{wt} finden sich in Abb. 3.8 (Seite 110) bzw. in Abb. 3.11 (Seite 116), für die Orthostere an der Mutante in Abb. 3.16 (Seite 136).

Neben Atr-Naph zeigte nur das etwas kleinere Atropinderivat Atr-W84 einen signifikanten Affinitätsabfall durch die Mutation $M_2^{177}\text{Tyr} \rightarrow \text{Gln}$ (Tab. 3.12). Sowohl die kürzeren Atropin-, als auch die Scopolamin-haltigen Derivate zeigten keine Interaktion mit der Aminosäure $M_2^{177}\text{Tyrosin}$. Alle Kurven wurden mit einem Steilheitsmaß von -1 ausreichend gut beschrieben und erreichten das Niveau der unspezifischen Bindung.

Wege zu dualsterischen Liganden: Bindungseigenschaften neuartiger Hybridliganden

		n	n_H	pK_A	ΔpK_A
Atropin	M₂ wt	3	-1,17 ± 0,08	8,30 ± 0,08	-
	M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	3	-1,09 ± 0,04	8,35 ± 0,03	0,05
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	4	-0,96 ± 0,04	8,44 ± 0,04	0,14
Atr-Hex (JSW258)	M₂ wt	4	-1,01 ± 0,06	7,79 ± 0,05	-
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	3	-0,96 ± 0,03	7,73 ± 0,03	-0,06
Atr-W84 (JSW253)	M₂ wt	3	-1,27 ± 0,05	8,28 ± 0,07	-
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	3	-1,08 ± 0,11	8,01 ± 0,01 ^s	-0,27 ^s
Atr-Naph (JSW254)	M₂ wt	3	-1,00 ± 0,11	8,55 ± 0,02	-
	M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	3	-0,95 ± 0,21	8,16 ± 0,15	-0,39
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	3	-0,93 ± 0,07	8,07 ± 0,06 ^s	-0,48 ^s
		n	n_H	pK_A	ΔpK_A
Scopolamin	M₂ wt	3	-0,98 ± 0,02	8,52 ± 0,05	-
	M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	3	-1,00 ± 0,06	8,45 ± 0,04	-0,07
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	3	-0,98 ± 0,12	8,48 ± 0,07	-0,04
N-Methyl- Scopolamin	M₂ wt	22	-0,97 ± 0,02	9,37 ± 0,04	-
	M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	4	-0,99 ± 0,08	9,24 ± 0,13	-0,13
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	8	-1,09 ± 0,06	9,14 ± 0,06 ^s	-0,23 ^s
Sco-Hex (JK179)	M₂ wt	3	-1,03 ± 0,04	7,32 ± 0,03	-
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	n.u.		n.u.	
Sco-W84 (JSW257)	M₂ wt	3	-0,98 ± 0,09	8,09 ± 0,12	-
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	4	0,87 ± 0,07	8,15 ± 0,04	0,06
Sco-Naph (JSW256)	M₂ wt	7	-1,04 ± 0,05	8,21 ± 0,08	-
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	3	-1,10 ± 0,01	8,05 ± 0,03	-0,16

		n	p α	pK _A	Δ pK _A
Naph-methonium	M ₂ wt	6	0,29 ± 0,04	7,70 ± 0,12	-
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Ala	5*	0,04 ± 0,02 ^s .	6,31 ± 0,02 ^s .	-1,39 ^s .
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	3*	-0,00 ± 0,13 ^s .	6,23 ± 0,07 ^s .	-1,47 ^s .

Tab. 3.12: Bindungscharakteristika verschiedener Antagonisten an den Rezeptormutanten M₂¹⁷⁷Tyr→Ala und M₂¹⁷⁷Tyr→Gln im Vergleich zum M₂Wildtyp.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet und anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. Naphmethonium wurde nach Gleichung 17 ausgewertet. pK_A: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, p α : negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktor α , Δ pK_A: pK_A-Differenz zwischen der Rezeptormutante und M₂wt, n.u.: nicht untersucht. Die Daten für Sco-Hex wurden nicht an FlpIn CHO M₂-Zellen, sondern an Zellen aus Frankfurt generiert.

^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

*: Die Dosis-Wirkungs-Kurve wurde mit der modifizierten Ehlert-Gleichung (Gleichung 19) unter Berücksichtigung von pEC_{0,5Diss} ausgewertet (für pEC_{0,5Diss}-Daten siehe Kapitel 3.1.6, Seite 169).

Einfluss der Mutationen M₂¹⁷⁷Tyr→Ala und M₂¹⁷⁷Tyr→Gln auf die Bindung agonistischer Verbindungen

Auch für die agonistischen Hybridliganden sollte der Effekt auf die Rezeptorinteraktion durch die Einzelmutanten im Na,Mg,HEPES-Puffer gezeigt werden. Dieser ist für Iperoxo, Iper-Hex und Iper-W84 in Abb. 3.19 dargestellt. In der linken Spalte findet sich die monophasische und in der rechten die biphasische Auswertung.

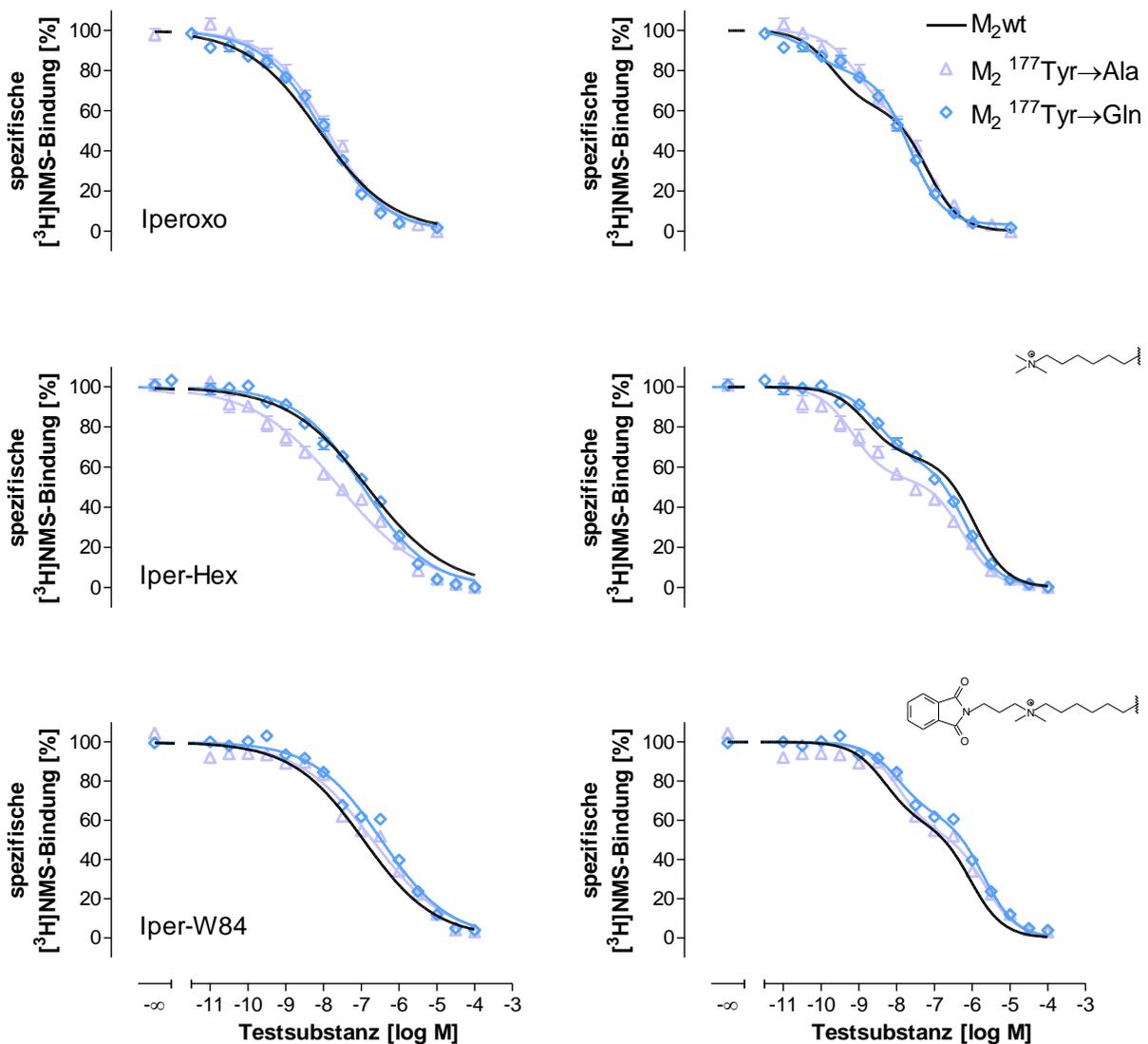


Abb. 3.19: Einfluss der Mutation $M_2^{177}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$ und $M_2^{177}\text{Tyr} \rightarrow \text{Gln}$ auf die Konzentrations-Effekt-Kurven der von Iperoxo abgeleiteten Hybridliganden.

Von oben nach unten wurden die Strukturen schrittweise vom reinen Orthoster Iperoxo ausgehend zu allo-/orthosterischen Hybridliganden verlängert. Links wurden die Datensätze nach Gleichung 11 (monophasisch) und rechts nach Gleichung 16 (biphasisch) ausgewertet. *Ordinate*: Spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM [³H]NMS durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datenpunkte für M_2 wt finden sich in Abb. 3.12 (Seite 120).

Alle Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 3.19 zeigten einen flachen Verlauf und konnten nicht mit einer Steigung von -1 beschrieben werden. Der Radioligand wurde von allen Liganden vollständig verdrängt. Die Kurvensteilheit blieb durch die Mutationen entweder unbeeinflusst oder nahm leicht ab. Die Fraktionsanteile waren weitestgehend identisch zwischen Wildtyp und Mutante.

Für Iper-W84 fand Antony (Dissertation 2007) einen Affinitätsabfall von 0,57 Dekaden durch die Mutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$, was jedoch nicht signifikant war (vorliegende Arbeit 0,48 Dekaden, siehe Tab. 3.13 oben). Die Bindungsneigung von Iperoxo wurde bei J. Antony etwas stärker abgesenkt (0,77 Dekaden, in dieser Arbeit 0,54). In beiden Arbeiten war die Affinitätsabnahme bei Iperoxo signifikant.

Besonders bei der monophasischen Analyse wird deutlich, dass auch der orthosterische Agonist Iperoxo –im Gegensatz zu den Antagonisten- durch die allosterische Mutation an Affinität verlor. Dieser Verlust war bei Iperoxo sogar stärker ausgeprägt als bei der dualsterischen Hybridsubstanz Iper-W84. Bei Iper-W84 schien vor allem das Glutamin des M_5 -Rezeptors die Bindung zu stören, da der Austausch von Tyrosin zu Alanin zu keinem signifikanten Affinitätsabfall führte.

Bemerkenswerter Weise gewann Iper-Hex bei der Mutation $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ an Affinität. Der Grund hierfür konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden, das erhöhte räumliche Angebot könnte jedoch für die Bindung des Liganden von Vorteil sein. Eine voluminöse Aminosäure im Eingang zur orthosterischen Tasche könnte für Iper-Hex hinderlich sein.

Folglich blieb die Epitopabhängigkeit der Hybridagonisten auch unter den Inkubationsbedingungen dieser Arbeit in Bezug auf die Aminosäure M_2^{177} Tyrosin erhalten.

		n	n_H	$n_H \neq -1$	pK_{app}	ΔpK_{app}
Iperoxo	M_2 wt	4	$-0,56 \pm 0,05^\#$	4/4	$8,60 \pm 0,05$	-
	$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$	4	$-0,63 \pm 0,04^\#$	4/4	$7,90 \pm 0,15^s$	$-0,70^s$
	$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$	4	$-0,59 \pm 0,05^\#$	4/4	$8,06 \pm 0,13^s$	$-0,54^s$
Iper-Hex (JSW236)	M_2 wt	4	$-0,50 \pm 0,03^\#$	4/4	$7,21 \pm 0,12$	-
	$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$	3	$-0,37 \pm 0,15^\#$	3/3	$7,81 \pm 0,10^s$	$0,60^s$
	$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$	6	$-0,51 \pm 0,03^\#$	6/6	$7,04 \pm 0,12$	$-0,17$
Iper-W84 (DDT5)	M_2 wt	4	$-0,64 \pm 0,02^\#$	4/4	$7,04 \pm 0,10$	-
	$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$	3	$-0,43 \pm 0,03^{\#s}$	3/3	$6,86 \pm 0,08$	$-0,18$
	$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$	4	$-0,49 \pm 0,04^{\#s}$	4/4	$6,56 \pm 0,07^s$	$-0,48^s$

		n	biph>mono	pK _{app} (high)	pK _{app} (low)	F
Iperoxo	M₂ wt	4	1/4	9,84 ± 0,20	7,95 ± 0,07	0,39 ± 0,03
	M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	4	1/4	8,99 ± 0,15 ^s	7,28 ± 0,07 ^s	0,38 ± 0,09
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	4	3/4	10,1 ± 0,50	7,67 ± 0,11	0,26 ± 0,02 ^s
Iper-Hex (JSW236)	M₂ wt	4	3/4	8,62 ± 0,26	6,45 ± 0,13	0,40 ± 0,02
	M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	3	3/3	9,32 ± 0,32	6,39 ± 0,04	0,48 ± 0,04
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	6	5/6	8,57 ± 0,18	6,26 ± 0,13	0,37 ± 0,04
Iper-W84 (DDT5)	M₂ wt	4	2/4	8,05 ± 0,20	6,54 ± 0,09	0,37 ± 0,02
	M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	3	1/3	8,03 ± 0,06	5,80 ± 0,03 ^s	0,46 ± 0,06
	M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	4	4/4	8,09 ± 0,12	5,80 ± 0,06 ^s	0,37 ± 0,04

Tab. 3.13: Bindungscharakteristika der von Iperoxo abgeleiteten Hybridliganden an den Rezeptormutanten M₂¹⁷⁷Tyr→Ala und M₂¹⁷⁷Tyr→Gln im Vergleich zum Wildtyp M₂. Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

1. Teil: Monophasische Auswertung nach Gleichung 11, **2. Teil:** Biphaseische Auswertung nach Gleichung 16. Alle Werte wurden anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. pK_{app}: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_{app} nach monophasischer Analyse, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, ΔpK_{app}: pK_{app}-Differenz zwischen dem entsprechenden Rezeptor und M₂wt, pK_{app}(high) bzw. pK_{app}(low): negativer dekadischer Logarithmus von K_{app}(high) der hochaffinen Fraktion bzw. von K_{app}(low) der niedrigaffinen Fraktion, F: Anteil der hochaffinen Fraktion an der Gesamtbindung.

^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

[#]: Steilheitsmaß n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test, p<0,05).

3.1.4.3 Abhängigkeit vom allosterischen Epitop ⁴²³Threonin

Einfluss der Mutationen M₂⁴²³Thr→Ala und M₂⁴²³Thr→His auf orthosterische Antagonisten

Die orthosterischen Antagonisten zeigten keine Affinitätsänderung an der Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His, NMS verlor an der Einzelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln jedoch an Affinität. Im folgenden Kapitel soll untersucht werden, ob es durch die Mutation M₂⁴²³Thr→His folglich zu einer Affinitätszunahme von NMS kommt, um den fehlenden Effekt an der Doppelmutante zu erklären. Der Vollständigkeit wegen ist der Einfluss der Aminosäure M₂⁴²³Threonin auf die Affinität der beiden Ausgangsverbindungen Atropin und Scopolamin ebenfalls vermessen worden. In Abb. 3.20 sind die Konzentrations-Effekt-Kurven der orthosterischen Antagonisten Atropin, Scopolamin und N-Methylscopolamin an den oben aufgeführten Rezeptormutanten dargestellt.

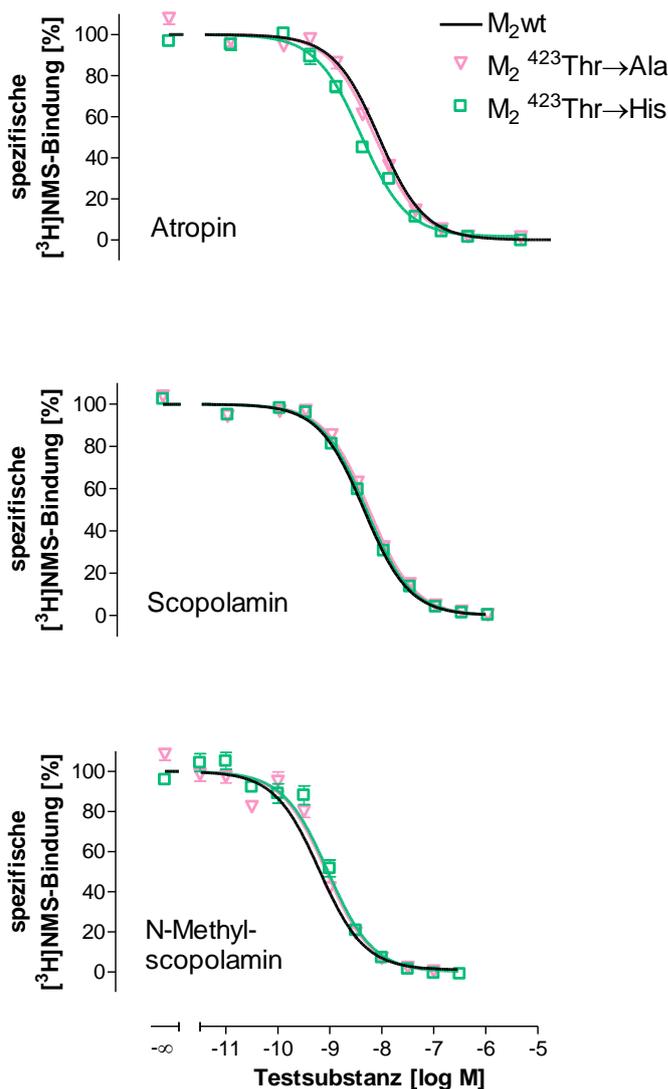


Abb. 3.20: Einfluss der Mutationen M₂⁴²³Thr→Ala und M₂⁴²³Thr→His auf die Konzentrations-Effekt-Kurven orthosterischer Antagonisten.

Von oben nach unten sind die Graphen der orthosterischen Antagonisten dargestellt. *Ordinate*: Spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM [³H]NMS durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-22 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datenpunkte für M₂wt finden sich in Abb. 3.8 (Seite 110).

Außer N-Methylscopolamin an der Mutante zur korrespondierenden Aminosäure des M₅-Rezeptors verfügten alle Kurven über eine Steilheit von -1, alle Verbindungen haben die Radioligandbindung vollständig inhibiert. An der Mutation M₂⁴²³Thr→His zeigte Atropin einen Affinitätsgewinn und NMS einen -verlust. Da diese Unterschiede gegenläufig und -wie in Tab. 3.14 (S. 149) zu sehen- gering sind, kann hier vermutlich nicht von einer relevanten biologischen Interaktion ausgegangen werden. Prilla und Straßmann (Dissertationen 2007) fanden beide für NMS eine nicht signifikante Affinitätsabnahme durch die Mutation M₂⁴²³Thr→His. Folglich kann der fehlende Effekt der Doppelmutation M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His auf NMS nicht auf zwei gegenläufige Effekte der Einzelmutationen zurückgeführt werden. Da die Änderungen jeweils gering sind, kann davon ausgegangen werden, dass die orthosterischen Antagonisten zwar durch die Mutationen beeinflusst werden, aber mit diesen Epitopen nicht direkt interagieren.

Einfluss der Mutationen $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$ und $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ auf Naphmethonium und Atr-Naph

Der Einfluss der beiden Einzelmutationen $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$ und $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ auf Atr-Naph wird im vorliegenden Kapitel dargestellt. V. Straßmann konnte in ihrer Dissertation (2007) zeigen, dass der Austausch von Threonin423 zu Histidin im Na,Mg,HEPES-Puffer zu einem Affinitätsabfall von allosterischen Modulatoren führt. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit am Beispiel von Naphmethonium als allosterischer Baustein von Atr-Naph mit FlpIn CHO-Zellen überprüft. Die Effekte der beiden Mutationen auf Naphmethonium und Atr-Naph sind in Abb. 3.21 dargestellt.

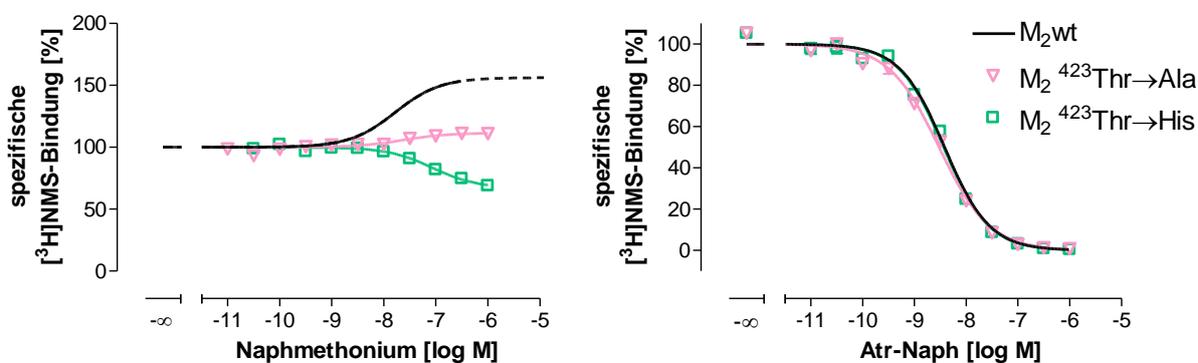


Abb. 3.21: Einfluss der Mutationen $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$ und $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ auf die Konzentrations-Bindungs-Kurven der Hybridsubstanz Atr-Naph, sowie auf dessen allosterischen Baustein Naphmethonium.

Ordinate: Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 17 (Naphmethonium) bzw. Gleichung 11 (Atr-Naph) ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datenpunkte für $M_2\text{wt}$ finden sich in Abb. 3.9 (Naphmethonium, Seite 112) bzw. in Abb. 3.11 (Atr-Naph, Seite 116).

Für Naphmethonium war ein Unterschied an beiden Mutationen erkennbar. Die Parameterwerte der Bindung sind in Tab. 3.14 (Seite 149) aufgeführt. Der Austausch zu Alanin führte zu einer Kooperativitätsabnahme mit NMS, die durch die Mutation zu der korrespondierenden Aminosäure des M_5 -Rezeptors noch verstärkt wurde. Die positive Kooperativität von Naphmethonium am $M_2\text{wt}$ wird an der Mutante $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$ fast aufgehoben. An der Histidinmutante kehrt sie sich sogar ins Negative um. S. Prilla konnte in ihrer Dissertation (2006) am $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptor für W84 und Diallylcaracurin V keine direkte Interaktion mit $M_2^{423}\text{Thr}$ detektieren, sondern es zeigte sich ein störender Einfluss des korrespondierenden Histidins im M_5 -Rezeptor. In der vorliegenden Arbeit kann der störende

Einfluss des Histidins durch die signifikante Affinitätsabnahme bestätigt werden, das Threonin selbst war am freien Rezeptor jedoch auch an der Interaktion beteiligt, da es auch bei der Mutation zu Alanin zu einer signifikanten Abnahme der Kooperativität kam.

Atr-Naph zeigte an keiner der beiden Mutanten eine Veränderung der Affinität oder der Kooperativität mit [³H]NMS. Daher wurden die anderen Hybridantagonisten an diesen veränderten Rezeptoren nicht weiter untersucht. Insbesondere zeigte sich keine Affinitätszunahme durch die Threonin-Mutationen. Diese hätte den fehlenden Einfluss der Doppelmutation auf die Atr-Naph-Affinität erklären können, nachdem sich an der Mutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln eine signifikante Affinitätsabnahme gezeigt hat.

		n	n _H	pK _A	ΔpK _A
Atropin	M ₂ wt	3	-1,17 ± 0,08	8,30 ± 0,08	-
	M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	5	-1,05 ± 0,09	8,41 ± 0,06	0,11
	M ₂ ⁴²³ Thr→His	4	-0,90 ± 0,12	8,62 ± 0,06 ^s	0,32 ^s
Scopolamin	M ₂ wt	3	-0,98 ± 0,02	8,52 ± 0,05	-
	M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	3	-1,08 ± 0,07	8,40 ± 0,03	-0,12
	M ₂ ⁴²³ Thr→His	3	-1,03 ± 0,05	8,40 ± 0,06	-0,12
N-Methyl-Scopolamin	M ₂ wt	22	-0,97 ± 0,02	9,37 ± 0,04	-
	M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	3	-1,23 ± 0,30	9,22 ± 0,03	-0,15
	M ₂ ⁴²³ Thr→His	3	-1,44 ± 0,18	8,93 ± 0,01 ^s	-0,44 ^s
Atr-Naph (JSW254)	M ₂ wt	3	-1,00 ± 0,11	8,55 ± 0,02	-
	M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	3	-0,89 ± 0,09	8,66 ± 0,06	0,11
	M ₂ ⁴²³ Thr→His	3	-1,01 ± 0,07	8,51 ± 0,05	-0,04

		n	p α	pK _A	Δ pK _A
Naph-methonium	M ₂ wt	6	0,29 ± 0,04	7,70 ± 0,12	-
	M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	4*	0,07 ± 0,02 ^s .	7,62 ± 0,02	-0,08
	M ₂ ⁴²³ Thr→His	3	-0,07 ± 0,13 ^s .	7,09 ± 0,08 ^s .	-0,61 ^s .

Tab. 3.14: Bindungscharakteristika verschiedener Antagonisten an den Rezeptormutanten M₂¹⁷⁷Tyr→Ala und M₂¹⁷⁷Tyr→Gln im Vergleich zum M₂Wildtyp.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet und anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. Naphmethonium wurde nach Gleichung 17 ausgewertet. pK_A: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, p α : negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktor α , Δ pK_A: pK_A-Differenz zwischen der Rezeptormutante und M₂wt.

^s: Wert Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

*: Der Datensatz wurde mit der modifizierten Ehlert-Gleichung (Gleichung 19) unter Berücksichtigung von pEC_{0,5Diss}. ausgewertet (für pEC_{0,5Diss}-Daten siehe Kapitel 3.1.6, Seite 169).

Einfluss der Mutationen $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$ und $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ auf Agonisten

Analog 3.1.4.2 wurde auch der Einfluss der Threonin423-Mutanten auf die Affinitäten von Iperoxo, Iper-Hex und Iper-W84 untersucht. Die Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abb. 3.22 dargestellt. In der linken Spalte sind die monophasischen, in der rechten die biphasischen Analysen aufgeführt.

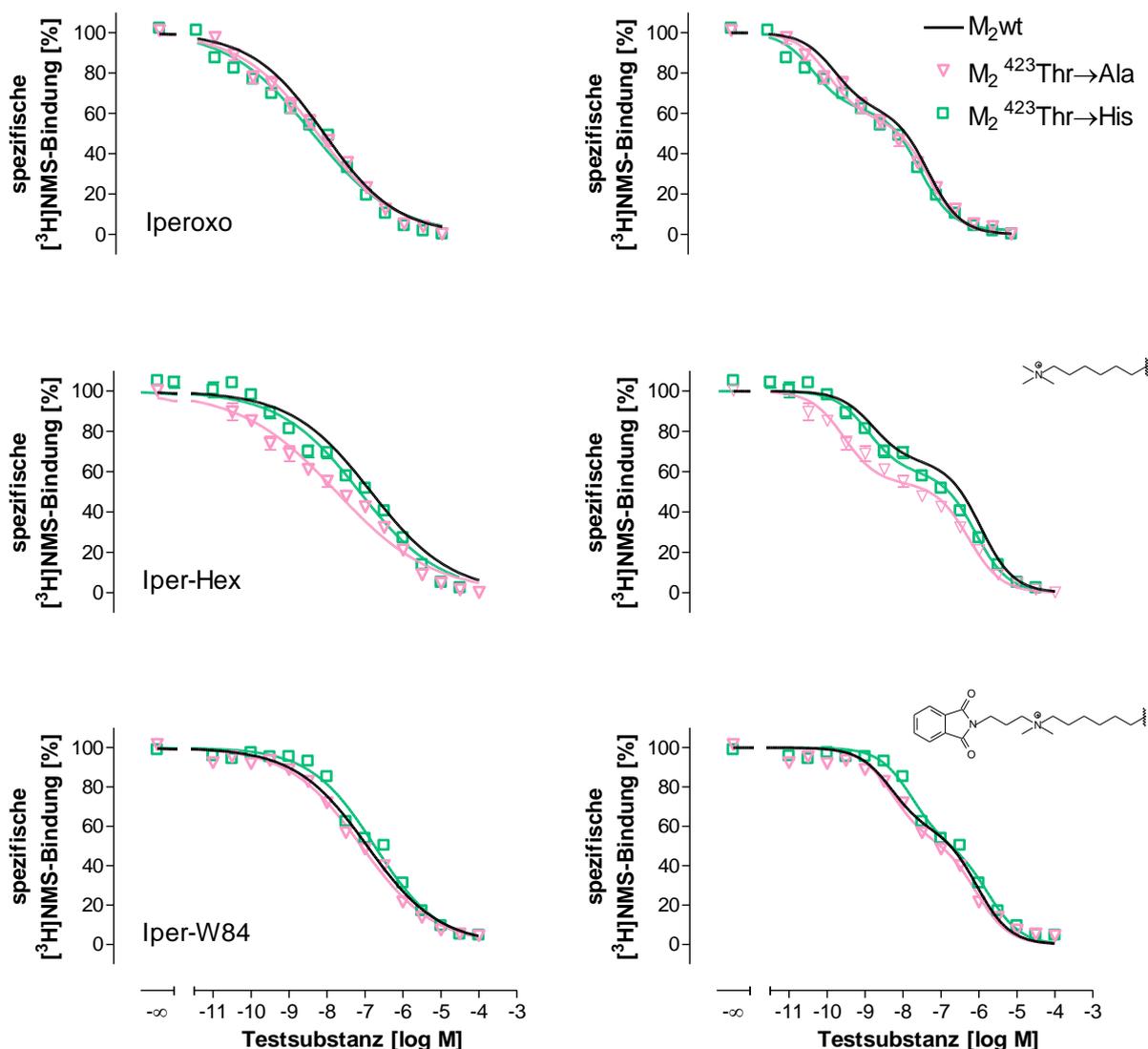


Abb. 3.22: Einfluss der Mutationen $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$ und $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ auf die Konzentrations-Effekt-Kurven der von Iperoxo abgeleiteten Hybridliganden.

Von oben nach unten wurden die Strukturen schrittweise vom reinen Orthoster Iperoxo ausgehend zu allo-/orthosterischen Hybridliganden verlängert. Links wurden die Datensätze nach Gleichung 11 (monophasisch) und rechts nach Gleichung 16 (biphasisch) ausgewertet. *Ordinate:* Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten F1pIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datenpunkte für M_2^{wt} finden sich in Abb. 3.12 (Seite 120).

Alle in Abb. 3.22 dargestellten Kurven wiesen einen flachen Kurvenverlauf auf ($n_H > -1$) und erreichten alle das Niveau der unspezifischen Bindung. Im Vergleich mit den Antagonisten wurde die Affinität der Agonisten stärker durch den Austausch allosterischer Epitope beeinflusst als die Bindung der Antagonisten. Die Interaktionskurven von Iperoxo wurden durch den Austausch der Aminosäure 423Threonin sowohl gegen Alanin als auch gegen Histidin flacher, was sich in der Analyse nach dem 2-Kompartiment-Modell als Affinitätsabnahme der niedrigaffinen Fraktion auswirkt. Folglich war die am inaktiven Rezeptor als allosterisch beschriebene Aminosäure $M_2^{423}\text{Thr}$ am aktiven Rezeptor ebenfalls an der Bindung von orthosterischen Liganden beteiligt.

Für beide untersuchten Mutationen $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ und $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$ zeigte sich ein Affinitätsgewinn von Iper-Hex (siehe auch Abb. 3.19, Seite 142), der bei den Mutationen zu den korrespondierenden Aminosäuren des M_5 -Rezeptors nicht detektiert werden konnte. Dies könnte dadurch begründet sein, dass Iper-Hex mit seiner im Vergleich zu Iperoxo vergrößerten Struktur mehr Raum benötigt. Da die Ergebnisse nicht dafür sprechen, dass die Verbindung allosterische Epitope nutzen kann (siehe Kapitel 4.3, Seite 237), ist es möglich, dass ein vergrößertes Platzangebot die Bindung fördert.

Bei Iper-W84 deutete sich an der Histidinmutante ein Affinitätsverlust an, der jedoch nur in Bezug auf die Affinität der niedrigaffinen Fraktion signifikant war. In der Dissertation von J. Antony (2007) zeigte sich für diese Mutation bei Iper-W84 ebenfalls ein nicht signifikanter Affinitätsverlust.

		n	n_H	$n_H \neq -1$	pK_{app}	ΔpK_{app}
Iperoxo	M_2 wt	4	$-0,56 \pm 0,05^\#$	4/4	$8,60 \pm 0,05$	-
	$M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$	5	$-0,42 \pm 0,05^\#$	5/5	$8,59 \pm 0,27$	-0,01
	$M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$	3	$-0,39 \pm 0,01^{\#s.}$	3/3	$8,52 \pm 0,13$	-0,08
Iper-Hex (JSW236)	M_2 wt	4	$-0,50 \pm 0,03^\#$	4/4	$7,21 \pm 0,12$	-
	$M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$	3	$-0,33 \pm 0,14^\#$	3/3	$7,99 \pm 0,18^s.$	$0,78^s.$
	$M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$	3	$-0,41 \pm 0,04^\#$	3/3	$7,23 \pm 0,12$	0,02
Iper-W84 (DDT5)	M_2 wt	4	$-0,64 \pm 0,02^\#$	4/4	$7,04 \pm 0,10$	-
	$M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$	3	$-0,46 \pm 0,05^{\#s.}$	3/3	$7,23 \pm 0,29$	0,19
	$M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$	4	$-0,52 \pm 0,04^{\#s.}$	4/4	$6,81 \pm 0,07$	-0,23

		n	biph>mono	pK _{app} (high)	pK _{app} (low)	F
Iperoxo	M₂ wt	4	1/4	9,84 ± 0,20	7,95 ± 0,07	0,39 ± 0,03
	M₂⁴²³Thr→Ala	5	1/5	10,0 ± 0,24	7,41 ± 0,08 ^s	0,44 ± 0,06
	M₂⁴²³Thr→His	3	3/3	10,4 ± 0,09	7,51 ± 0,10 ^s	0,39 ± 0,02
Iper-Hex (JSW236)	M₂ wt	4	3/4	8,62 ± 0,26	6,45 ± 0,13	0,40 ± 0,02
	M₂⁴²³Thr→Ala	3	3/3	9,62 ± 0,22 ^s	6,43 ± 0,02	0,48 ± 0,02 ^s
	M₂⁴²³Thr→His	3	3/3	8,97 ± 0,16	6,19 ± 0,08	0,42 ± 0,03
Iper-W84 (DDT5)	M₂ wt	4	2/4	8,05 ± 0,20	6,54 ± 0,09	0,37 ± 0,02
	M₂⁴²³Thr→Ala	3	0/3	8,32 ± 0,19	6,24 ± 0,10	0,47 ± 0,08
	M₂⁴²³Thr→His	4	2/4	7,83 ± 0,09	5,86 ± 0,03 ^s	0,48 ± 0,03 ^s

Tab. 3.15: Bindungscharakteristika der von Iperoxo abgeleiteten Hybridliganden an den Rezeptormutanten M₂⁴²³Thr→Ala und M₂⁴²³Thr→His im Vergleich zum Wildtyp M₂. Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

1. Teil: Monophasische Auswertung nach Gleichung 11, **2. Teil:** Biphaseische Auswertung nach Gleichung 16. Alle Werte wurden anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. pK_{app}: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_{app} nach monophasischer Analyse, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, ΔpK_{app}: pK_{app}-Differenz zwischen dem entsprechenden Rezeptor und M₂wt, pK_{app}(high) bzw. pK_{app}(low): negativer dekadischer Logarithmus von K_{app}(high) der hochaffinen Fraktion bzw. von K_{app}(low) der niedrigaffinen Fraktion, F: Anteil der hochaffinen Fraktion an der Gesamtbindung.

^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

[#]: Steilheitsmaß n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test, p<0,05).

3.1.4.4 Abhängigkeit der Bindung allosterischer Modulatoren und Antagonist-Hybriden von den beiden Glutamat-Resten 172 und 175 der EDGE-Sequenz des M₂-Rezeptors

Bei einer klassischen dualsterischen Interaktion sollte der allosterische Molekülteil sich im Kanal zwischen den beiden Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin befinden. Für die antagonistischen Hybridliganden konnte jedoch nur eine Wechselwirkung für Atr-W84 und Atr-Naph mit Tyrosin177 detektiert werden. Theoretisch denkbar wäre eine andere Anhaftung im allosterischen Bereich. In diesem Fall würden andere als die untersuchten allosterischen Epitope genutzt. Um dies zu überprüfen wurden die beiden Glutamate172 und 175 gegen Alanin ausgetauscht. Diese beiden Aminosäuren liegen in der EDGE₂-Sequenz (abgeleitet von den Aminosäuren) und sind als weitere Interaktionspartner für allosterische Modulatoren bekannt (Leppik et al., 1994; May et al., 2007 b).

In Abb. 3.23 ist der Einfluss dieser beiden Aminosäuren auf die Bindung des orthosterischen Antagonisten N-Methylscopolamin und der allosterischen Modulatoren W84 und Naphmethonium dargestellt. Die Versuche wurden an transient transfizierten CHO-Zellen durchgeführt.

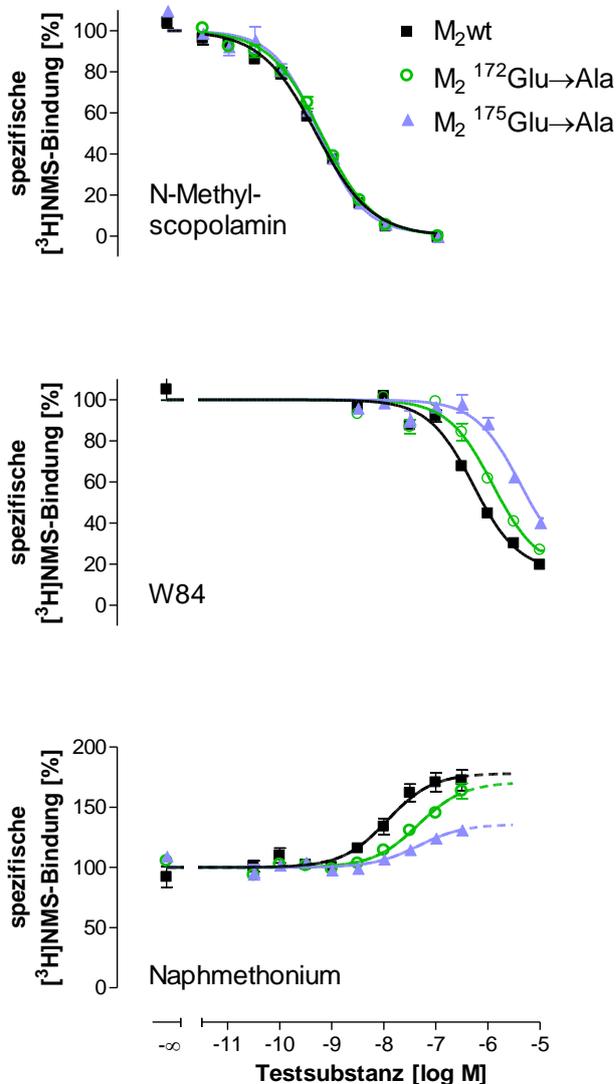


Abb. 3.23: Einfluss der Mutationen $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ und $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ auf die Konzentrations-Bindungs-Kurven von N-Methylscopolamin, W84 und Naphmethonium.

Ordinate: Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze von N-Methylscopolamin wurden nach Gleichung 11 ausgewertet, W84 und Naphmethonium nach Gleichung 17. Die Versuche wurden mit transient transfizierten CHO K1-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

N-Methylscopolamin zeigte durch keine der Mutationen eine Affinitätsveränderung. Die Kurven waren flacher als -1. Dies zeigte sich auch bei den Einzelversuchen.

Die Bindungsneigung von W84 und Naphmethonium nahm bei beiden Mutationen ab. Beide reagierten empfindlicher auf den Austausch des Glutamats175 zu Alanin. Im Fall von Naphmethonium ist weder die Affinitätsabnahme noch der Kooperativitätsunterschied statistisch signifikant, die Tendenz kann in Abb. 3.23 jedoch deutlich erkannt werden. Die pharmakologischen Parameterwerte sind in Tab. 3.16 (Seite 156) aufgeführt.

In Abb. 3.24 ist der Einfluss der beiden Glutamat-Reste auf die Affinität der jeweils größten und kleinsten Hybridantagonisten abgebildet.

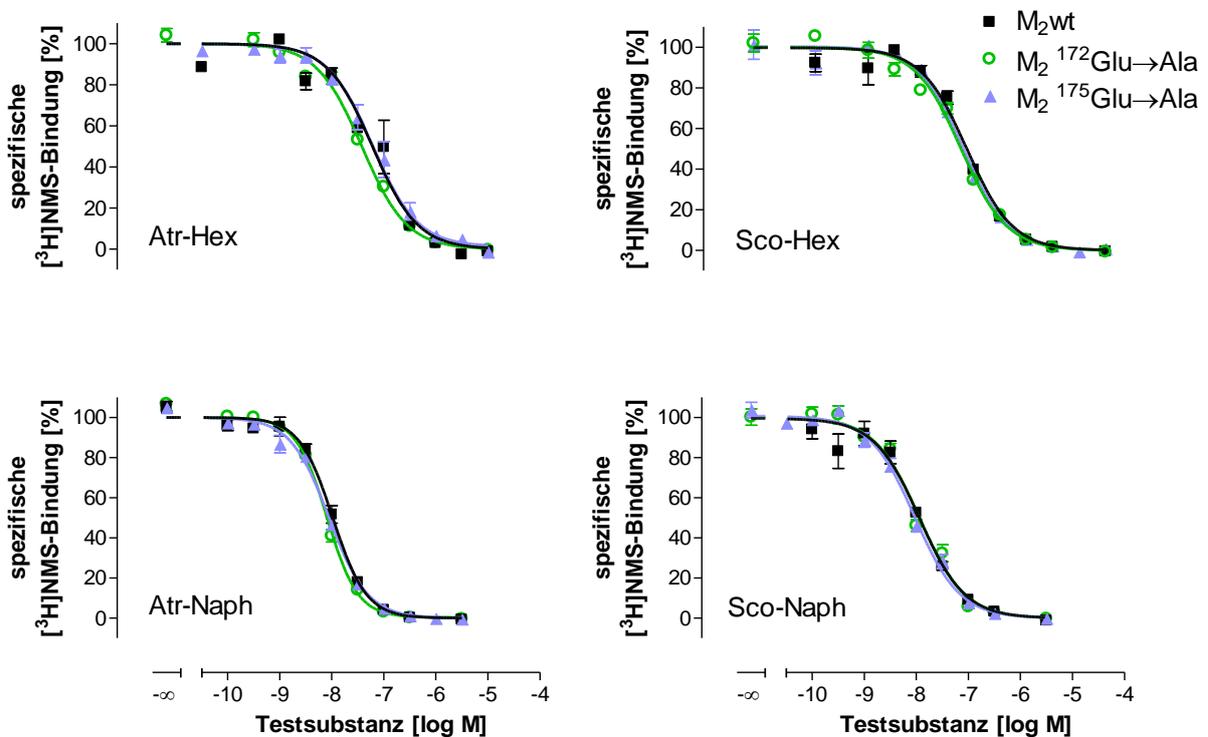


Abb. 3.24: Einfluss der Mutationen M₂¹⁷²Glu→Ala und M₂¹⁷⁵Glu→Ala auf die Inhibitionskurven der antagonistischen Hybridsubstanzen.

Oben sind die Hexamethonium-, unten die Naphmethonium-Derivate links die Atropin-haltigen und rechts die Scopolamin-haltigen Verbindungen dargestellt. *Ordinate:* spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die Versuche wurden mit transient transfizierten CHO K1-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM [³H]NMS durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

Mit der Ausnahme von Atr-Naph, welches in diesen Versuchen einen steilen Kurvenverlauf aufwies, ließen sich alle Kurven mit einem Steilheitsmaß von -1 beschreiben. Alle inhibierten die Radioligandbindung vollständig. Keiner der untersuchten Hybridantagonisten zeigte eine Affinitätsänderung durch die hier untersuchten Rezeptormutanten (siehe Tab. 3.16). Folglich scheint von der EDGECY-Sequenz nur das Tyrosin177 (siehe Kapitel 3.1.4.2, Seite 135) an der Bindung der Hybridantagonisten beteiligt zu sein. Die beiden Glutamate 172 und 175 wurden offenbar nicht genutzt.

Wege zu dualsterischen Liganden: Bindungseigenschaften neuartiger Hybridliganden

		n	n_H	pK_A	ΔpK_A
N-Methyl-scopolamin	M₂ wt	3	-0,80 ± 0,04 [#]	9,58 ± 0,03	-
	M₂¹⁷²Glu→Ala	3	-0,88 ± 0,06 [#]	9,44 ± 0,07	0,14
	M₂¹⁷⁵Glu→Ala	3	-0,82 ± 0,02	9,54 ± 0,01	0,04
Atr-Hex (JSW258)	M₂ wt	3	-0,86 ± 0,07	7,57 ± 0,05	-
	M₂¹⁷²Glu→Ala	3	-0,94 ± 0,11	7,65 ± 0,49	0,08
	M₂¹⁷⁵Glu→Ala	3	-1,04 ± 0,16	7,57 ± 0,06	0,00
Atr-Naph (JSW254)	M₂ wt	3	-1,41 ± 0,17 [#]	8,15 ± 0,07	-
	M₂¹⁷²Glu→Ala	3	-1,50 ± 0,10 [#]	8,32 ± 0,07	0,17
	M₂¹⁷⁵Glu→Ala	3	-1,18 ± 0,20 [#]	8,31 ± 0,05	0,16
Sco-Hex (JK179)	M₂ wt	3	-1,17 ± 0,05	7,31 ± 0,08	-
	M₂¹⁷²Glu→Ala	3	-0,90 ± 0,09	7,45 ± 0,07	0,14
	M₂¹⁷⁵Glu→Ala	3	-1,19 ± 0,03	7,46 ± 0,04	0,15
Sco-Naph (JSW256)	M₂ wt	3	-0,98 ± 0,19	8,15 ± 0,10	-
	M₂¹⁷²Glu→Ala	3	-1,10 ± 0,10	8,15 ± 0,07	0,00
	M₂¹⁷⁵Glu→Ala	3	-1,02 ± 0,11	8,25 ± 0,04	0,10

		n	p α	pK _A	Δ pK _A
W84	M₂ wt	3	-0,94 ± 0,03	6,45 ± 0,05	-
	M₂¹⁷²Glu→Ala	3	-0,95 ± 0,03	6,17 ± 0,00 ^s	-0,28 ^s
	M₂¹⁷⁵Glu→Ala	3	-0,98 ± 0,05	5,68 ± 0,05 ^s	-0,77 ^s
Naph-methonium	M₂ wt	3	0,46 ± 0,09	7,67 ± 0,06	-
	M₂¹⁷²Glu→Ala	5	0,63 ± 0,14	6,95 ± 0,36	-0,72
	M₂¹⁷⁵Glu→Ala	5	0,44 ± 0,12	6,94 ± 0,46	-0,73

Tab. 3.16: Bindungscharakteristika verschiedener Antagonisten an den Rezeptormutanten M₂¹⁷²Glu→Ala und M₂¹⁷⁵Glu→Ala im Vergleich zum M₂ Wildtyp.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet und anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. W84 und Naphmethonium wurden nach Gleichung 17 ausgewertet. pK_A: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, p α : negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktor α , Δ pK_A: pK_A-Differenz zwischen der Rezeptormutante und M₂wt.

^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

[#]: Steilheitsmaß n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test, p<0,05).

3.1.4.5 Abhängigkeit vom Epitop ⁴²²Tryptophan

Die Aminosäure Tryptophan 7.35 ($M_2^{422}\text{Trp}$) am Beginn der siebten transmembranären Domäne ist zwischen den fünf Muskarinrezeptorsubtypen konserviert. Prilla et al. (2006) konnten zeigen, dass dieses Epitop wichtig für die Basisaffinität allosterischer Modulatoren ist, da es über eine π - π -Wechselwirkung mit dem Phthalimid- bzw. Naphthalimidrest interagiert. In Jäger et al. (2007) war die Mutation dieser Aminosäure zu Alanin wichtig für die Affinität von orthosterischen Vollagonisten und für die intrinsische Aktivität von Partialagonisten. Kebig (Dissertation 2010) beschrieb in funktionellen Experimenten einen Affinitätsverlust strukturell verschiedener Agonisten durch den Austausch der Aminosäure $M_2^{422}\text{Tryptophan}$ zu Alanin. Somit stellt diese Aminosäure am inaktiven Rezeptor ein allosterisches Epitop dar, während es am aktiven Rezeptor die Bindung und Aktivierung des Rezeptors durch Agonisten beeinflusst.

In dem folgenden Kapitel soll die Beeinflussung der Bindung antagonistischer und agonistischer Hybridliganden durch den Austausch von $M_2^{422}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ untersucht werden. Die rein orthosterischen Liganden werden als Kontrollen mitgeführt, um zu überprüfen, ob sich die Affinität dieser Liganden auch durch die Mutation verändert. Prilla et al. (2006) zeigten bereits den Affinitätsverlust von Naphmethonium und W84 am M_2 -Rezeptor durch diese Mutation. V. Straßmann (Dissertation 2007) konnte diese Befunde im Na,Mg,HEPES-Puffer bestätigen. Aus diesem Grund wurden die allosterischen Modulatoren in dieser Arbeit nicht erneut untersucht.

Einfluss der Mutationen $M_2^{422}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ auf die Bindung von Antagonist-Hybriden und von dessen Ausgangsverbindungen

Sowohl bei S. Prilla (Dissertation 2006) im Na,K, P_i -Puffer als auch bei V. Straßmann (Dissertation 2007) im Na,Mg,HEPES-Puffer unterschieden sich die pK_D -Werte von NMS zwischen M_2^{wt} und $M_2^{422}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ nicht signifikant voneinander. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob diese Aussage auch für andere orthosterische Antagonisten gilt.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven von Atropin und Scopolamin sowie von dessen aliphatischen Derivaten sind in Abb. 3.25 dargestellt.

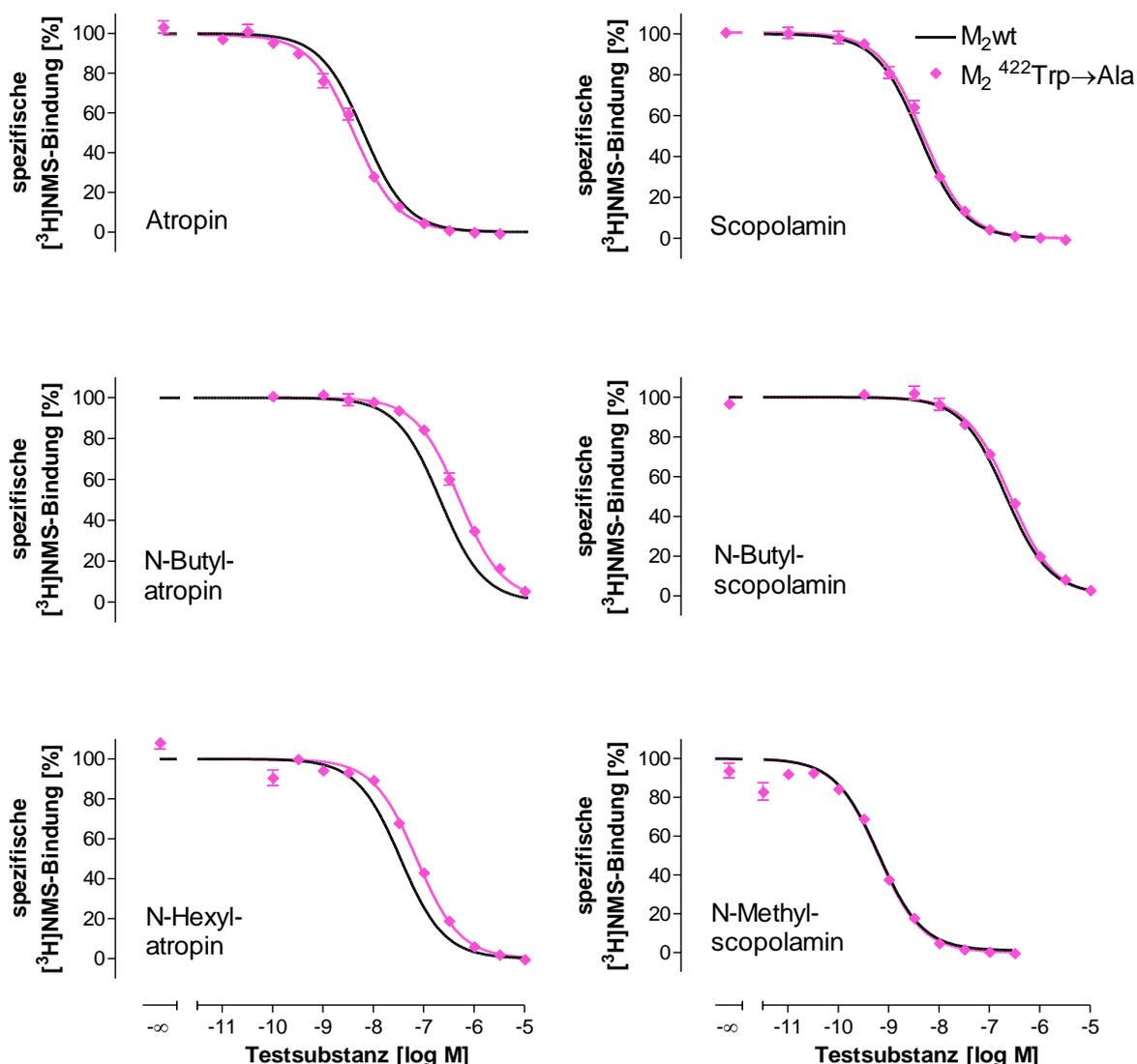


Abb. 3.25: Einfluss der Mutation $M_2^{422}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ auf die Inhibitionskurven der aliphatischen Derivate von Atropin (links) und Scopolamin (rechts).

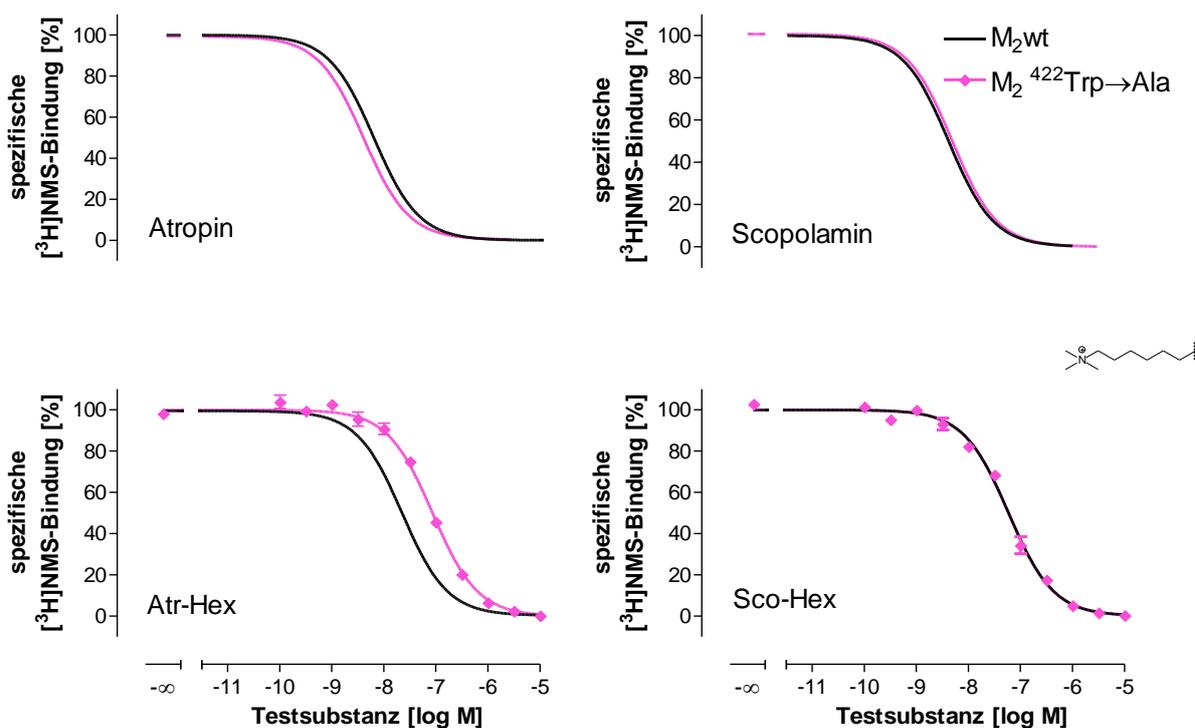
Ordinate: Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-22 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datenpunkte für M_2^{wt} finden sich in Abb. 3.7 (Seite 106) bzw. in Abb. 3.8 (Seite 110).

Abb. 3.25 zeigt die Beeinflussung der Bindung orthosterischer Antagonisten durch die Mutation $M_2^{422}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$. Die Steilheitsmaße aller Kurven waren nicht signifikant verschieden von -1 und alle Liganden inhibierten die Radioligandbindung vollständig, die pharmakologischen Parameterwerte befinden sich in Tab. 3.17 (Seite 162). Keines der Scopolaminderivate wies einen Affinitätsverlust durch die Mutation auf. Folglich scheint die

Aminosäure Tryptophan⁴²² nicht an der Bindung dieser Liganden beteiligt zu sein. Dies stimmt mit den Ergebnissen der oben aufgeführten vorangegangenen Arbeiten überein.

Atropin selbst gewann durch die Mutation leicht an Affinität, während alle untersuchten Atropin-Derivate an Affinität verloren (Abb. 3.25, Abb. 3.26). Offenbar spielt M₂⁴²²Tryptophan eine Rolle für die Bindung von Atropin und dessen Derivaten, wohingegen Scopolamin eine andere Position im Rezeptor einnimmt, da das untersuchte Epitop nicht für die Bindung genutzt wird.

Von Interesse war in der vorliegenden Arbeit der Einfluss auf allo-/orthosterische Hybridliganden. Wenn diese über den hydrophoben Kanal mit der allosterischen Bindungsstelle verbunden sind, so müssten sie eine Interaktion mit der Aminosäure Tryptophan⁴²² eingehen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.26 dargestellt.



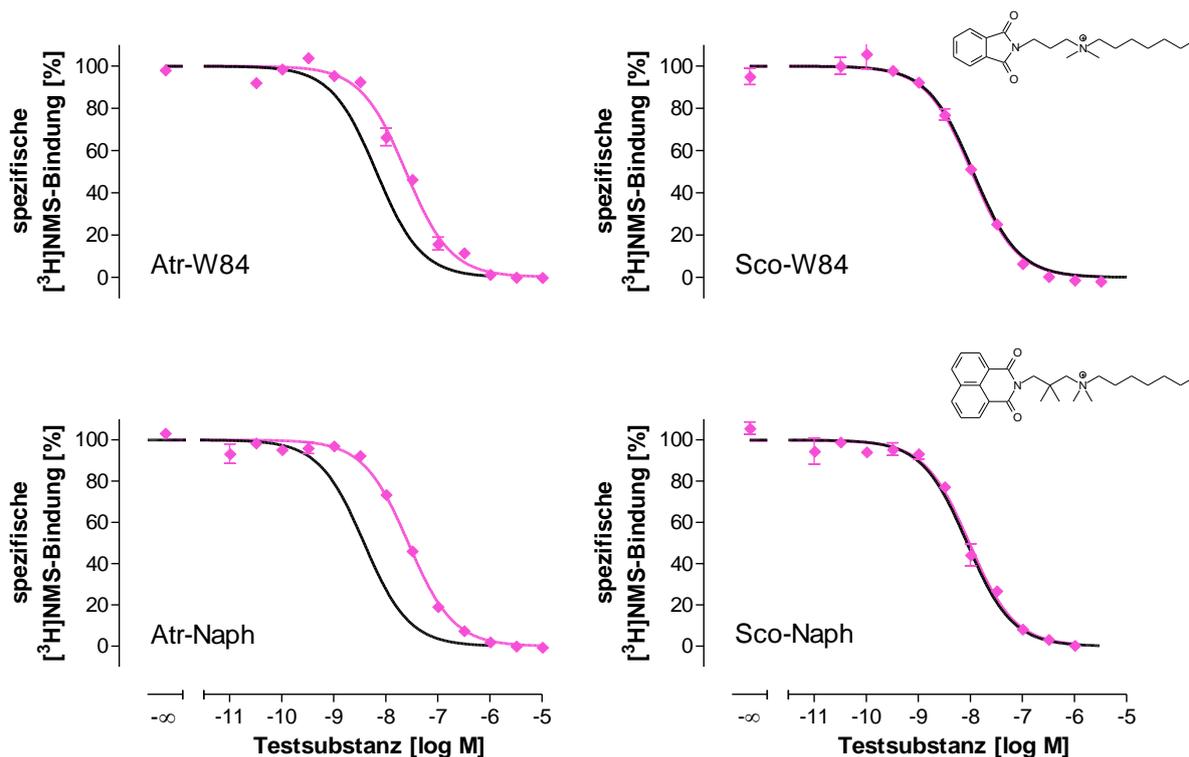


Abb. 3.26: Einfluss der Mutation $M_2^{422}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ auf die Inhibitionskurven antagonistischer Hybridsubstanzen.

Von oben nach unten wurden die Strukturen schrittweise vom reinen Orthoster ausgehend über eine Hexylammoniumkette zu allo-/orthosterischen Hybridliganden verlängert. Links sind die Atropin-haltigen, rechts die Scopolamin-haltigen Verbindungen dargestellt. *Ordinate*: Spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM [³H]NMS durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-22 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datenpunkte für M_2^{wt} finden sich in Abb. 3.8 (Seite 110) bzw. in Abb. 3.11 (Seite 116).

In Tab. 3.17 sind die Parameterwerte angegeben, die aus den Kurven von Abb. 3.26 resultieren. Alle Kurven wurden mit einem Steilheitsmaß von -1 ausreichend beschrieben. Die Verbindungen erreichten das Niveau der unspezifischen Bindung. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Atropin- und Scopolaminderivaten. Die Scopolaminhybride wiesen keine Abhängigkeit vom Epitop Tryptophan422 auf. Die Atropinhybride hingegen zeigten einen deutlichen Affinitätsverlust, der sich verstärkte, je größer der allosterische Anteil des Moleküls war.

Die Scopolamin-haltigen Derivate zeigten in den Bindungsuntersuchungen mit punktmutierten Rezeptoren nur eine Abhängigkeit vom orthosterischen Epitop $M_2^{104}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$ und keinen Hinweis auf eine Interaktion mit allosterischen Epitopen. Eine Orientierung des allosterischen Bausteins in Richtung der allosterischen Bindungsstelle erscheint durch die

parallelen Strukturwirkungsbeziehungen jedoch auch für die Scopolamin-haltigen Hybride als wahrscheinlich, obwohl die untersuchten allosterischen Aminosäuren nicht erreicht werden konnten (für weitere Ausführungen siehe Kapitel 4.1.1, Seite 231).

Die Atropin-haltigen Hybridliganden Atr-W84 und Atr-Naph hingegen wiesen verschiedene Hinweise auf eine dualsterische Interaktion auf:

- Diese Substanzen zeigten eine M_2/M_5 -Subtypselektivität durch die Einführung allosterischer Bausteine.
- Atr-W84 und Atr-Naph verloren sowohl durch die orthosterische Mutation $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ als auch durch die beiden allosterischen Mutationen $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ und $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ signifikant an Affinität. Dadurch konnte eine Wechselwirkung mit beiden Haftarealen detektiert werden. Damit konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig ein dualsterischer Bindungsmodus für Alkanbisammonium-haltige Hybridliganden am inaktiven Rezeptor gezeigt werden.

		n	n_H	pK_A	ΔpK_A
Atropin	M_2 wt	3	$-1,17 \pm 0,08$	$8,30 \pm 0,08$	-
	$M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	4	$-0,94 \pm 0,09$	$8,55 \pm 0,03^s$	$0,25^s$
N-Butyl-atropin	M_2 wt	3	$-1,00 \pm 0,05$	$6,89 \pm 0,08$	-
	$M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	4	$-0,98 \pm 0,04$	$6,48 \pm 0,08^s$	$-0,41^s$
N-Hexyl-atropin	M_2 wt	3	$-1,10 \pm 0,08$	$7,69 \pm 0,09$	-
	$M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	3	$-0,98 \pm 0,07$	$7,32 \pm 0,06^s$	$-0,37^s$
Atr-Hex (JSW258)	M_2 wt	4	$-1,01 \pm 0,06$	$7,79 \pm 0,05$	-
	$M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	4	$-1,10 \pm 0,12$	$7,26 \pm 0,05^s$	$-0,53^s$
Atr-W84 (JSW253)	M_2 wt	3	$-1,27 \pm 0,05$	$8,28 \pm 0,07$	-
	$M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	6	$-1,09 \pm 0,03$	$7,78 \pm 0,10^s$	$-0,50^s$
Atr-Naph (JSW254)	M_2 wt	3	$-1,00 \pm 0,11$	$8,55 \pm 0,02$	-
	$M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	4	$-1,08 \pm 0,05$	$7,67 \pm 0,08^s$	$-0,88^s$

		n	n _H	pK _A	ΔpK _A
Scopolamin	M ₂ wt	3	-0,98 ± 0,02	8,52 ± 0,05	-
	M ₂ ⁴²² Trp→Ala	3	-1,05 ± 0,05	8,48 ± 0,08	-0,04
N-Methyl-Scopolamin	M ₂ wt	22	-0,97 ± 0,02	9,37 ± 0,04	-
	M ₂ ⁴²² Trp→Ala	3	-0,91 ± 0,04	9,36 ± 0,04	-0,01
N-Butyl-scopolamin	M ₂ wt	3	-0,97 ± 0,03	6,88 ± 0,04	-
	M ₂ ⁴²² Trp→Ala	3	-0,98 ± 0,04	6,75 ± 0,03	-0,13
Sco-Hex (JK179)	M ₂ wt ^F	3	-1,03 ± 0,04	7,32 ± 0,03	-
	M ₂ ⁴²² Trp→Ala	3	-1,03 ± 0,12	7,39 ± 0,04	0,07
Sco-W84 (JSW257)	M ₂ wt	3	-0,98 ± 0,09	8,09 ± 0,12	-
	M ₂ ⁴²² Trp→Ala	4	-1,32 ± 0,22	8,16 ± 0,06	0,07
Sco-Naph (JSW256)	M ₂ wt	7	-1,04 ± 0,05	8,21 ± 0,08	-
	M ₂ ⁴²² Trp→Ala	3	-1,04 ± 0,09	8,19 ± 0,08	-0,02

Tab. 3.17: Bindungscharakteristika verschiedener Antagonisten an der Rezeptormutante M₂⁴²²Trp→Ala im Vergleich zum M₂ Wildtyp.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet und anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. pK_A: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, pα: negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktor α, ΔpK_A: pK_A-Differenz zwischen der Rezeptormutante und M₂wt.

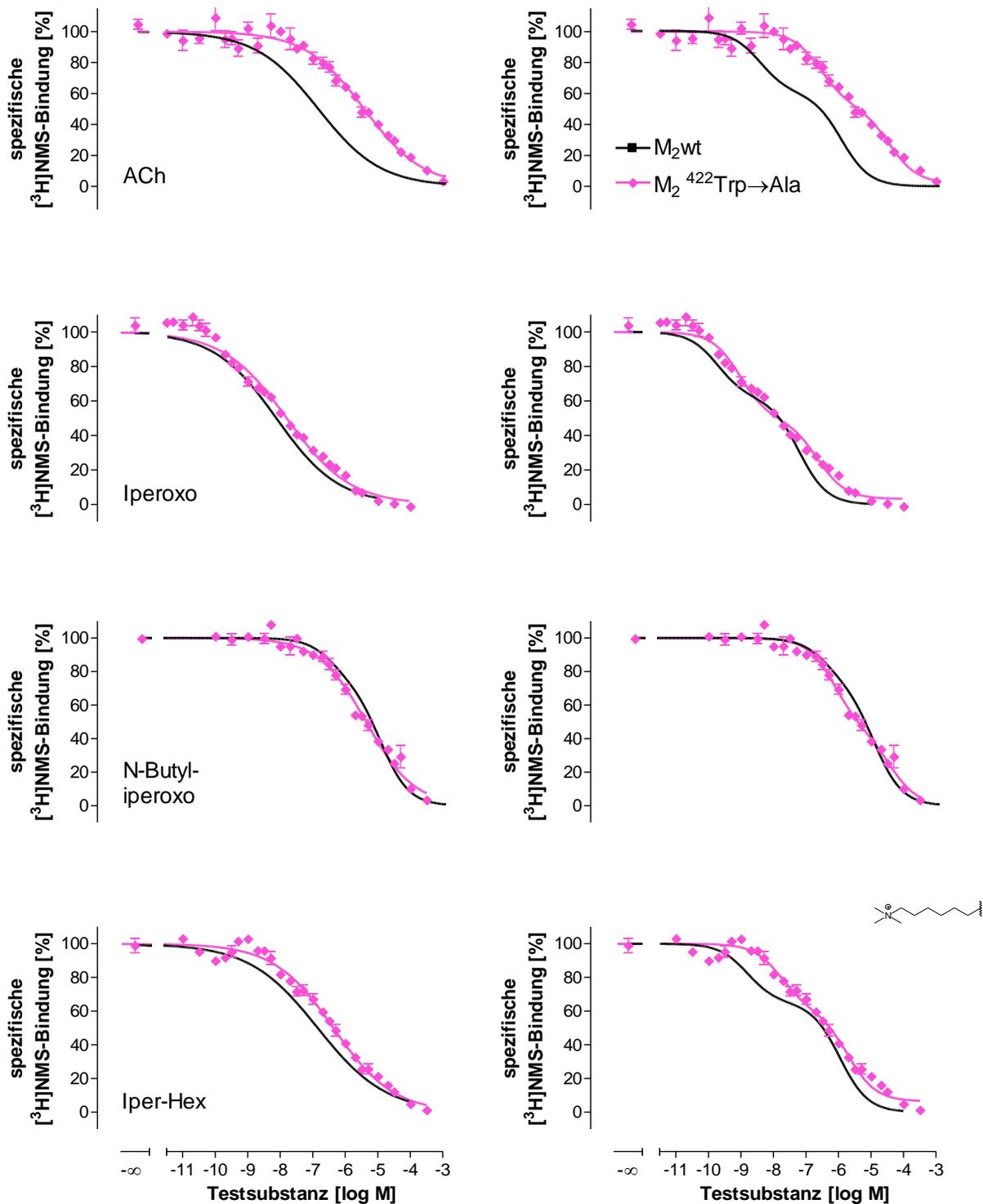
^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

^F: Diese Daten wurden nicht an FlpIn CHO M₂-Zellen, sondern an Zellen aus Frankfurt generiert.

Einfluss der Mutationen M₂⁴²²Trp→Ala auf die Bindung von Agonist-Hybriden und von dessen Ausgangsverbindungen, sowie von Acetylcholin

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss der Aminosäure M₂ Tryptophan422 auf die Interaktion dualsterischer Agonisten mit [³H]NMS im Na,Mg,HEPES-Puffer untersucht werden. Wie eingangs bereits erläutert, zeigte sich in der Vergangenheit eine Abhängigkeit orthosterischer Liganden von der Aminosäure M₂⁴²²Trp am aktiven Rezeptor. Neben dem bereits im Na,K,P_i-Puffer beschriebenen Einfluss der Mutation auf Iper-W84 und Iper-Naph (Antony, Dissertation 2007) wurde der Effekt auf das verkürzte Hybrid Iper-Hex und auf N-Butylperoxo erstmals in dieser Arbeit beschrieben.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven von Acetylcholin, Iperoxo, N-Butyliperoxo sowie der Hybridliganden sind in Abb. 3.27 dargestellt. In der linken Spalte befinden sich die Kurven nach monophasischer, rechts nach biphasischer Analyse.



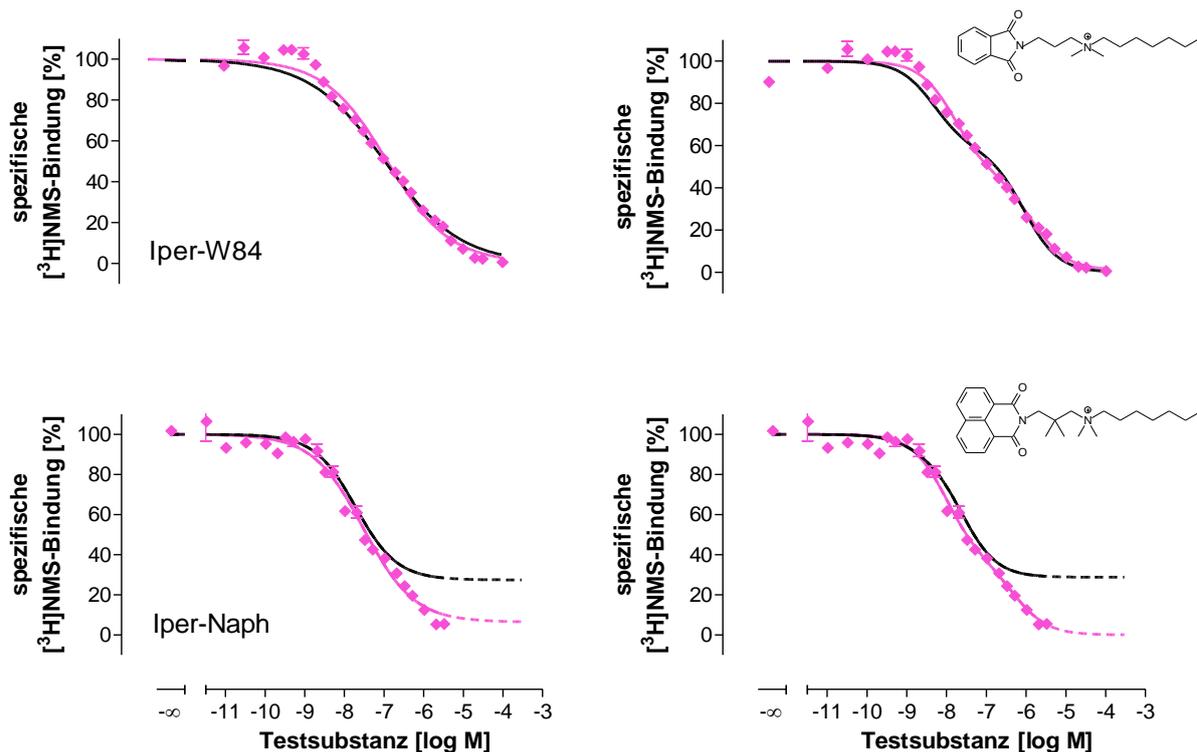


Abb. 3.27: Einfluss der Mutation $M_2^{422}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ auf die Inhibitionskurven der von Iperoxo abgeleiteten Hybridliganden.

Von oben nach unten wurden die Strukturen schrittweise vom reinen Orthoster Iperoxo ausgehend zu allo-/orthosterischen Hybridliganden verlängert. Links wurden die Datensätze nach Gleichung 11 (monophasisch) und rechts nach Gleichung 16 (biphasisch) ausgewertet. *Ordinate*: Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datenpunkte für M_2^{wt} finden sich in Abb. 3.12 (Seite 120).

In Tab. 3.18 sind die Parameterwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abb. 3.27 aufgeführt. Keine der Mittelwertskurven ließ sich durch ein Steilheitsmaß von -1 beschreiben. Lediglich einige Einzelversuche mit Iper-Naph ergaben $n_H = -1$.

Je nach Auswertung zeigte jeder Agonist eine signifikante Veränderung seiner Rezeptorinteraktion durch den Austausch von Tryptophan⁴²² gegen Alanin. Iper-Naph wies zwar keinen signifikanten Affinitätsverlust auf, das untere Plateau wurde durch die Mutation jedoch signifikant abgesenkt. N-Butyliperoxo nahm wie bei der Mutation $M_2^{104}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$ (Kapitel 3.1.3.4, Seite 118) eine Sonderstellung ein. Es zeigte als einzige Verbindung eine Linksverschiebung der Konzentrations-Bindungs-Kurve. Dies ist durch die starke Zunahme des hochaffinen Kompartiments begründet.

Bei Acetylcholin, Iperoxo und Iper-Hex war der Affinitätsverlust am stärksten ausgeprägt. Die beiden als dualsterisch erwiesenen Hybridliganden Iper-W84 und Iper-Naph zeigten nur

eine geringe Veränderung in ihrer Bindung durch die hier vorgestellte Mutation. Dies ist kongruent mit den Befunden von A. Kebig (Dissertation 2010), wo für die dualsterischen Verbindungen in [³⁵S]GTPγS-Experimenten eine geringere Beeinflussung durch die Mutation M₂⁴²²Trp→Ala gefunden wurde als für orthosterische Agonisten. Dies könnte dadurch begründet sein, dass durch die Vielzahl der möglichen Interaktionen einer dualsterischen Testsubstanz sich eine Einzelmutation nicht so stark auswirkt. Bei Jäger et al. (2007) beeinflusste die Mutation des Tryptophans422 nur die Affinität des Vollagonisten Acetylcholin, nicht aber die Affinität des Partialagonisten Pilocarpin. Bei den beiden Hybridagonisten Iper-W84 und Iper-Naph handelt es sich um starke Partialagonisten (~80% der Vollagonisten, siehe Kapitel 3.3, Seite 225). Folglich könnte der verringerte Einfluss durch die Mutation M₂⁴²²Trp→Ala auch durch den Partialagonismus begründet sein.

Das Epitop M₂⁴²²Trp kann am aktiven Rezeptor nur als Hinweis für eine dualsterische Interaktion gesehen werden, da die Änderung der Rezeptorinteraktion von Hybridagonisten gering ist. Wie bei Jäger et al. (2008) konnte auch in dieser Arbeit für strukturell verschiedene Vollagonisten ein deutlicher Affinitätsverlust gezeigt werden. (siehe Abb. 3.27). Dies bestätigt die orthosterische Orientierung des Tryptophans am aktiven Rezeptor. In der inaktiven Rezeptorkonformation hingegen ist es allosterisch lokalisiert (Prilla et al., 2006) und kann somit eine Bindung an das allosterische Haftareal detektieren (siehe Kapitel 4.5, Seite 243).

Wege zu dualsterischen Liganden: Bindungseigenschaften neuartiger Hybridliganden

		n	n_H	n_H ≠ -1	pK_{app}	ΔpK_{app}
Acetylcholin	M₂ wt	3	0,38 ± 0,01 [#]	3/3	6,90 ± 0,14	-
	M₂⁴²²Trp→Ala	3	0,47 ± 0,02 ^{#s.}	3/3	5,58 ± 0,09 ^{s.}	-1,32 ^{s.}
Iperoxo	M₂ wt	4	-0,56 ± 0,05 [#]	4/4	8,60 ± 0,05	-
	M₂⁴²²Trp→Ala	4	-0,43 ± 0,03 [#]	4/4	8,00 ± 0,09 ^{s.}	-0,60 ^{s.}
N-Butyl- iperoxo	M₂ wt	3	-0,71 ± 0,05 [#]	3/3	5,42 ± 0,08	-
	M₂⁴²²Trp→Ala	5	-0,63 ± 0,04 [#]	5/5	5,56 ± 0,13	0,14
Iper-Hex (JSW236)	M₂ wt	4	-0,50 ± 0,03 [#]	4/4	7,21 ± 0,12	-
	M₂⁴²²Trp→Ala	4	-0,49 ± 0,01 [#]	4/4	6,56 ± 0,16 ^{s.}	-0,65 ^{s.}
Iper-W84 (DDT5)	M₂ wt	4	-0,64 ± 0,02 [#]	4/4	7,04 ± 0,10	-
	M₂⁴²²Trp→Ala	3	-0,56 ± 0,01 [#]	3/3	7,12 ± 0,05	0,08
Iper-Naph (MMH5-6)	M₂ wt	3	-0,85 ± 0,06 [#]	1/3	7,94 ± 0,06	-
	M₂⁴²²Trp→Ala	4	-0,73 ± 0,10 [#]	2/4	7,71 ± 0,09	-0,23

	n	biph>mono	pK _{app} (high)	pK _{app} (low)	F
Acetylcholin	M ₂ wt	3/3	8,66 ± 0,08	6,17 ± 0,01	0,40 ± 0,02
	M ₂ ⁴²² Trp→Ala	2/3	6,73 ± 0,27 ^s	4,51 ± 0,22 ^s	0,51 ± 0,04
Iperoxo	M ₂ wt	1/4	9,84 ± 0,20	7,95 ± 0,07	0,39 ± 0,03
	M ₂ ⁴²² Trp→Ala	3/4	9,25 ± 0,19	6,85 ± 0,16 ^s	0,52 ± 0,04 ^s
N-Butyl- iperoxo	M ₂ wt	1/3	6,91 ± 0,36	5,21 ± 0,02	0,20 ± 0,02
	M ₂ ⁴²² Trp→Ala	5/5	6,26 ± 0,16	4,54 ± 0,08 ^s	0,87 ± 0,04 ^s
Iper-Hex (JSW236)	M ₂ wt	3/4	8,62 ± 0,26	6,45 ± 0,13	0,40 ± 0,02
	M ₂ ⁴²² Trp→Ala	2/4	8,01 ± 0,14	5,90 ± 0,13 ^s	0,39 ± 0,07
Iper-W84 (DDT5)	M ₂ wt	2/4	8,05 ± 0,20	6,54 ± 0,09	0,37 ± 0,02
	M ₂ ⁴²² Trp→Ala	0/3	8,00 ± 0,07	6,04 ± 0,02 ^s	0,55 ± 0,01 ^s
Iper-Naph (MMH5-6)	M ₂ wt	0/3	9,03 ± 0,66	7,34 ± 0,41	0,44 ± 0,23
	M ₂ ⁴²² Trp→Ala	3/4	8,21 ± 0,14	6,42 ± 0,14	0,63 ± 0,06

Tab. 3.18: Bindungscharakteristika der von Iperoxo abgeleiteten Derivate an der Rezeptormutante M₂⁴²²Trp→Ala im Vergleich zum Wildtyp M₂.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

1. Teil: Monophasische Auswertung nach Gleichung 11, **2. Teil:** Biphasische Auswertung nach Gleichung 16. Alle Werte wurden anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. pK_{app}: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_{app} nach monophasischer Analyse, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, ΔpK_{app}: pK_{app}-Differenz zwischen dem entsprechenden Rezeptor und M₂wt, pK_{app}(high) bzw. pK_{app}(low): negativer dekadischer Logarithmus von K_{app}(high) der hochaffinen Fraktion bzw. von K_{app}(low) der niedrigaffinen Fraktion, F: Anteil der hochaffinen Fraktion an der Gesamtbindung.

^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

[#]: Steilheitsmaß n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test, p<0,05).

3.1.5 Einfluss der M₂-Rezeptormutationen auf die Biphasizität von agonistischen Testsubstanzen

In den Kapiteln 3.1.3 und 3.1.4 (Seite 108 bzw. 124) sind die ermittelten Affinitätsdaten der agonistischen Testsubstanzen zur hoch- und zur niedrigaffinen Fraktion nach biphasischer Auswertung an den verschiedenen M₂-Rezeptormutanten bestimmt worden. Diese sind in Abb. 3.28 dargestellt, die Breite der Einzelbalken ist proportional zum entsprechenden Fraktionsanteil. Die dem Balkendiagramm zu Grunde liegenden Parameterwerte befinden sich in Tab. 3.9, Tab. 3.11, Tab. 3.13, Tab. 3.15 und Tab. 3.18 in Kapitel 3.

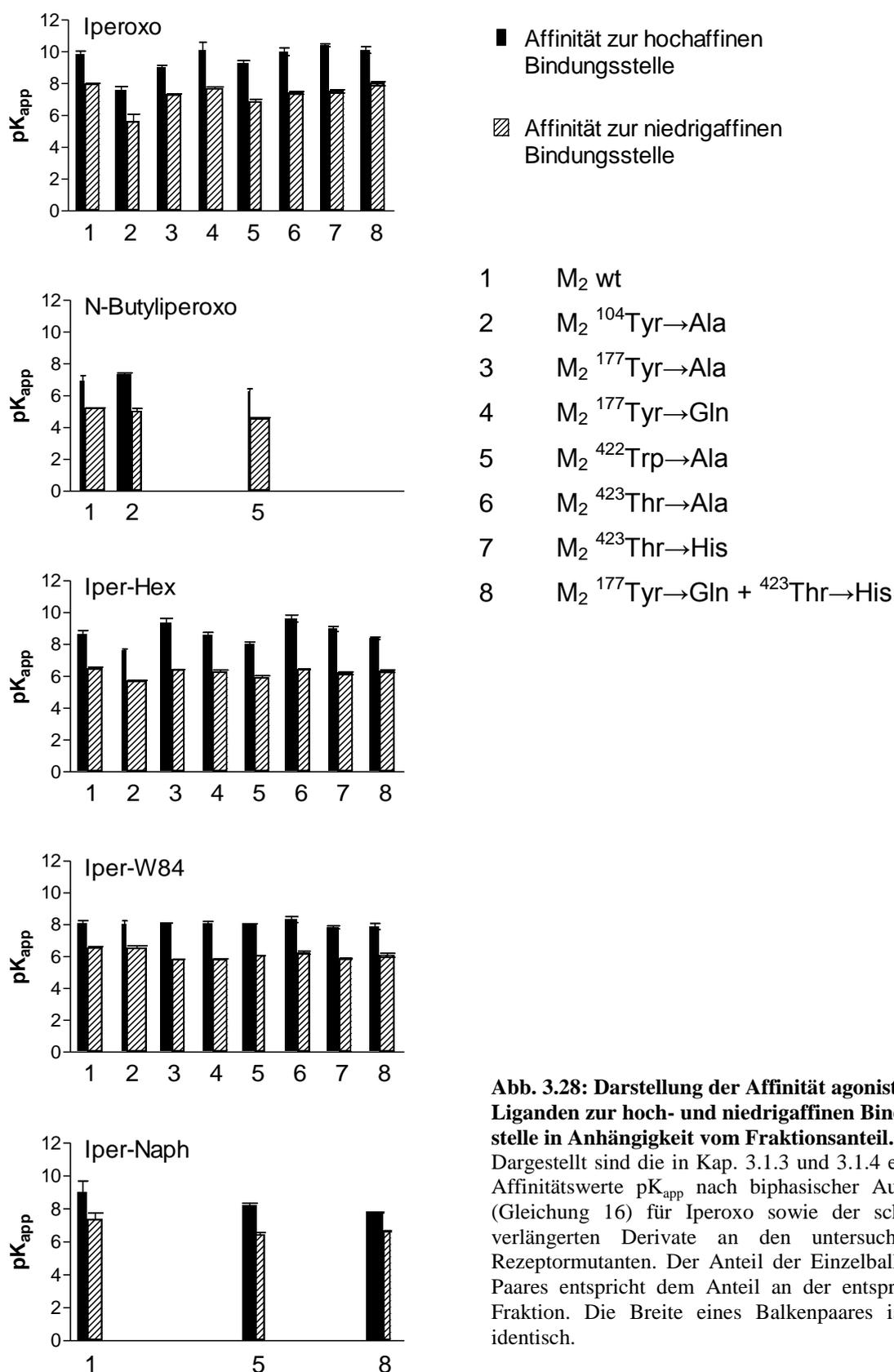


Abb. 3.28: Darstellung der Affinität agonistischer Liganden zur hoch- und niedrigaffinen Bindungsstelle in Anhängigkeit vom Fraktionsanteil.
 Dargestellt sind die in Kap. 3.1.3 und 3.1.4 erhaltenen Affinitätswerte pK_{app} nach biphasischer Auswertung (Gleichung 16) für Iperoxo sowie der schrittweise verlängerten Derivate an den untersuchten M_2 -Rezeptormutanten. Der Anteil der Einzelbalken eines Paares entspricht dem Anteil an der entsprechenden Fraktion. Die Breite eines Balkenpaares ist immer identisch.

In Abb. 3.28 ist zu erkennen, dass die hochaffine Fraktion in den meisten Fällen 30-40% der Gesamtaffinität ausmachte. Bei der orthosterischen Mutation $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ nahm die hochaffine Fraktion der beiden Hybridliganden Iper-Hex und Iper-W84 deutlich ab, bei N-Butyliperoxo nahm sie zu und bei Iperoxo blieb sie fast gleich. Für Iper-Naph konnten nicht für alle untersuchten Mutationen Fraktionsanteile angegeben werden, da wegen der meist recht steilen Kurven eine biphasische Auswertung teils nicht möglich war. Insgesamt ist kein klares Schema zu erkennen, dass alle untersuchten ortho- oder dualsterischen Liganden an bestimmten Mutationen ihre Bindungsfractionen verändern.

3.1.6 Charakterisierung der rein allosterischen Interaktion durch Untersuchungen am [^3H]NMS-besetzten Rezeptor

In Kapitel 3.1.1 - 3.1.4 (ab Seite 87) wurden die Bindungseigenschaften der Testsubstanzen an Rezeptoren aufgeführt, bei denen sowohl die ortho- als auch die allosterische Bindungsstelle frei zugänglich war. In diesem Kapitel werden Bindungsdaten vorgestellt, die an Rezeptoren erhoben wurden, deren orthosterische Bindungsstelle mit dem Radioliganden [^3H]NMS besetzt war. Durch diese Methode soll über die dissoziationsverzögernden Eigenschaften eine allosterische Interaktion der Testsubstanzen nachgewiesen werden. Es galt zu beantworten, ob die Hybridantagonisten in der Lage sind, die Dissoziation des Radioliganden zu beeinflussen. Ein Vergleich der Konzentrationsabhängigkeit zwischen den Effekten am freien und besetzten Rezeptor findet sich am Ende dieses Kapitels (siehe Abschnitt 3.1.6.6, Seite 184).

Neben der Erkenntnis über die Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor ist das Ausmaß der Dissoziationsverzögerung einer Substanz essentiell für die Berechnung der Inkubationszeit eines heterologen Kompetitionsexperiments (Gleichung 22, Seite 46). Wenn eine Testsubstanzen die Dissoziation des Radioliganden verlangsamt indem sie ternäre Komplexe ausbildet, wird die Gleichgewichtseinstellung verzögert. Aus diesem Grund sind alle verwendeten Testsubstanzen anfangs in Dissoziationsverzögerungs-Experimenten eingesetzt worden.

Für ein Dissoziationsexperiment wurden die Rezeptoren vor der Zugabe der Testsubstanzen für 30 min mit dem Radioliganden vorinkubiert, um eine orthosterische Besetzung zu erreichen (siehe Kapitel 2.4.8.1, Seite 48). Anschließend wird Atropin im Überschuss (3 μM) gemeinsam mit der Testsubstanzen zum Versuchsansatz gegeben. Parallel wird ein Kontroll-

ansatz ohne Testsubstanz vermessen. In Abb. 3.29 sind exemplarisch die Rohdaten eines Dissoziationsversuchs von W84 an M_2 -Rezeptoren dargestellt. Aus der Steilheit der monophasischen Zerfallskurve kann die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} bestimmt werden, welche in den folgenden Kapiteln gegen die Konzentration aufgetragen ist.

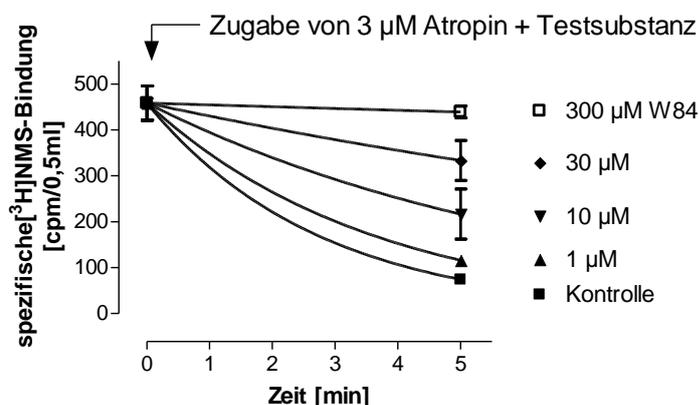


Abb. 3.29: Rohdaten eines Versuchs nach dem „2-Punkt-Protokoll“ mit W84 an M_2 -Rezeptoren.

Nach einer 30-minütigen Vorinkubation von Rezeptor und Radioligand wurde der Versuch durch Zugabe von Atropin im Überschuss und Testsubstanz gestartet. *Ordinate:* spezifische Bindung des Radioliganden in cpm (*counts per minute*) pro Versuchsansatz von 0,5 ml. *Abszisse:* Zeit in min. Die Daten wurden nach einem monophasigen exponentiellen Zerfall (Gleichung 23) ausgewertet. Dargestellt ist ein repräsentativer Einzelversuch in Doppelbestimmung, der in mindestens zwei weiteren Versuchen bestätigt werden konnte.

3.1.6.1 Interaktion orthosterischer Antagonisten mit [3 H]NMS-besetzten M -Rezeptoren

Tränkle et al. (1996) veröffentlichten für Atropin und Redka et al. (2008) für N-Methylscopolamin und Oxotremorin-M eine dissoziationsverzögernde Wirkung. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auch bei Konzentrationen sichtbar ist, die zu einer [3 H]NMS-Inhibition am freien Rezeptor eingesetzt werden, wurden im Rahmen dieser Arbeit kinetische Experimente nach dem „2-Punkt“-Protokoll mit Atropin, Scopolamin und dessen Derivaten durchgeführt. Die konzentrationsabhängige Dissoziationsverzögerung durch orthosterische Antagonisten ist in Abb. 3.30 dargestellt.

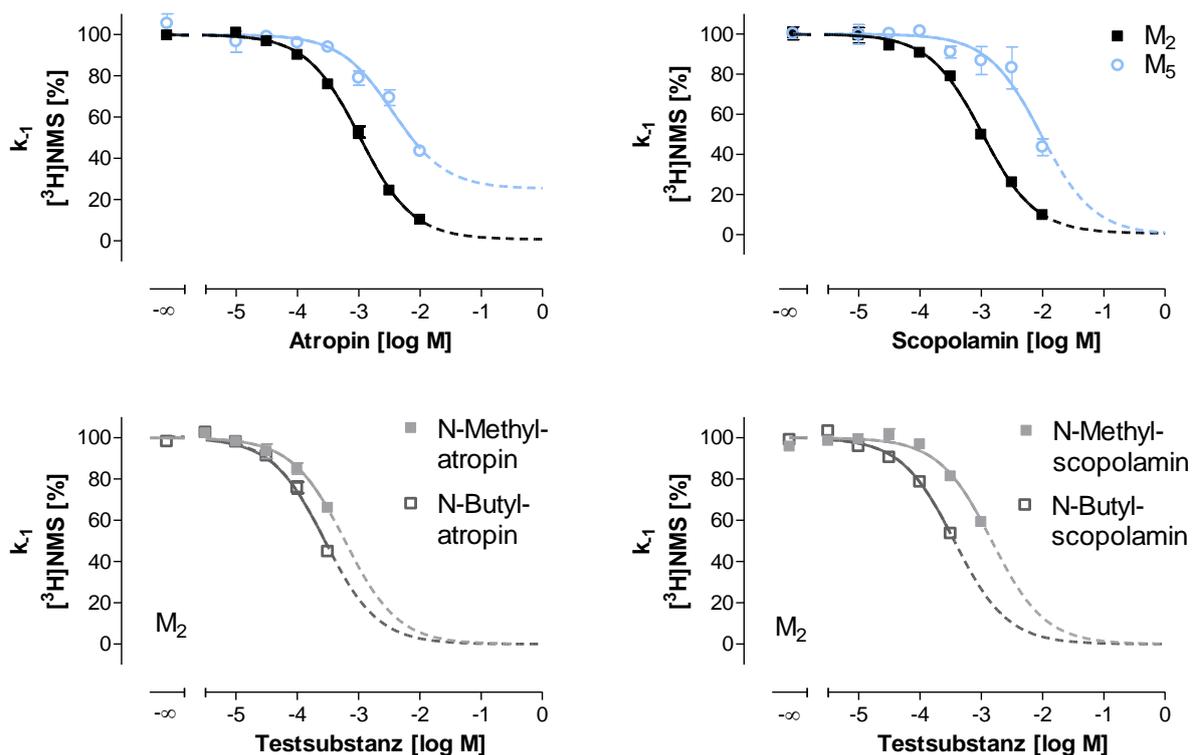


Abb. 3.30: Interaktion orthosterischer Antagonisten mit M_2 und M_5 -Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ blockiert ist.

Es sind die Konzentrations-Effekt-Kurven für Atropin (links) und Scopolamin (rechts) und deren Derivate dargestellt. *Ordinate:* Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} , normiert auf das obere Plateau, 0% entspricht einer vollständigen Dissoziationsverzögerung ($k_{-1} = 0$). *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die k_{-1} -Werte wurden aus 2-Punkt-Kinetik-Experimenten durch eine monophasische Analyse (Gleichung 23) ermittelt. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 2 nM $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

Alle sechs untersuchten orthosterischen Antagonisten waren bei hohen Konzentrationen in der Lage, die Dissoziationsgeschwindigkeit des Radioliganden zu reduzieren. Dieser Konzentrationsbereich war jedoch um mindestens den Faktor 1000 zu niedrigeren Konzentrationen hin verschoben als bei den Versuchen unter Gleichgewichtsbedingungen, so dass bei einem Inhibitionsexperiment mit diesen orthosterischen Liganden keine dissoziationsverzögernden Effekte zu erwarten sind. Ob die Dissoziation des Radioliganden völlig unterdrückt werden kann, konnte Konzentrationsbedingt nicht bestimmt werden. Für die meisten Kurven musste bei der Auswertung ein unteres Plateau von 0% vorgegeben werden, da sonst keine sinnvolle Kurvenanpassung möglich gewesen wäre. Die Parameterwerte sind in Tab. 3.19 aufgeführt.

Sowohl Atropin als auch Scopolamin wiesen eine M_2 -Prävalenz von fast einer Dekade auf. An freien Rezeptoren konnten diese Liganden nicht zwischen den Subtypen unterscheiden

(siehe Kapitel 3.1.1.1, Seite 89). Die Affinität der N-Butylderivate ist für beide Reihen größer als für die tertiären und die quartären Ausgangsverbindungen. Insgesamt ist der Konzentrationsbereich der allosterischen Interaktion im Vergleich zur orthosterischen Bindung stark zu höheren Konzentrationen hin verschoben. Bei den in Gleichgewichtsexperimenten eingesetzten Konzentrationen sind keine dissoziationsverzögernden Effekte zu erwarten (z.B. Atropin 3 μM zur Bestimmung der unspezifischen Bindung, [^3H]NMS 0,2 nM als Radioligand).

		n	n _H	pEC _{0,5Diss.}	$\Delta\text{pEC}_{0,5\text{Diss.}}$
Atropin	M₂	3	-1,02 ± 0,01	3,00 ± 0,02	-
	M₅	3	-0,78 ± 0,08 ^s	2,42 ± 0,16 ^s	-0,58 ^s
N-Methylatropin	M₂	3	-0,99 ± 0,13	3,22 ± 0,05	-
N-Butylatropin	M₂	3	-1,19 ± 0,15	3,57 ± 0,02	-
Scopolamin	M₂	3	-1,03 ± 0,12	3,00 ± 0,05	-
	M₅	3	-5,01 ± 4,00	2,10 ± 0,14 ^s	-0,90 ^s
N-Methylscopolamin	M₂	3	-1,05 ± 0,13	2,80 ± 0,04	-
N-Butylscopolamin	M₂	3	-0,98 ± 0,08	3,44 ± 0,02	-

Tab. 3.19: Pharmakologische Parameterwerte der orthosterischen Antagonisten an den angegebenen Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle durch [^3H]NMS blockiert war.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die k_{-1} -Werte wurden aus 2-Punkt-Kinetik-Experimenten durch eine monophasische Analyse (Gleichung 23) ermittelt. n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, pEC_{0,5Diss.}: Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve, $\Delta\text{pEC}_{0,5\text{Diss.}}$: pEC_{0,5Diss.}-Differenz zwischen M₅ und M₂.
^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

3.1.6.2 Interaktion allosterischer Modulatoren mit [^3H]NMS-besetzten M-Rezeptoren

Die allosterischen Modulatoren Hexamethonium, W84 und Naphmethonium sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Na,Mg,HEPES-Puffer untersucht worden, um den Effekt der allosterischen Ausgangsverbindungen der Hybridliganden zu erfassen. Zum einen konnte somit das Ausmaß der Dissoziationsverzögerung zwischen Hybrid und Muttersubstanz verglichen werden (siehe Abb. 3.35, Seite 185) und zum anderen waren die Versuche nötig für die Berechnung der Inkubationszeit zur Erreichung des Bindungsgleichgewichts.

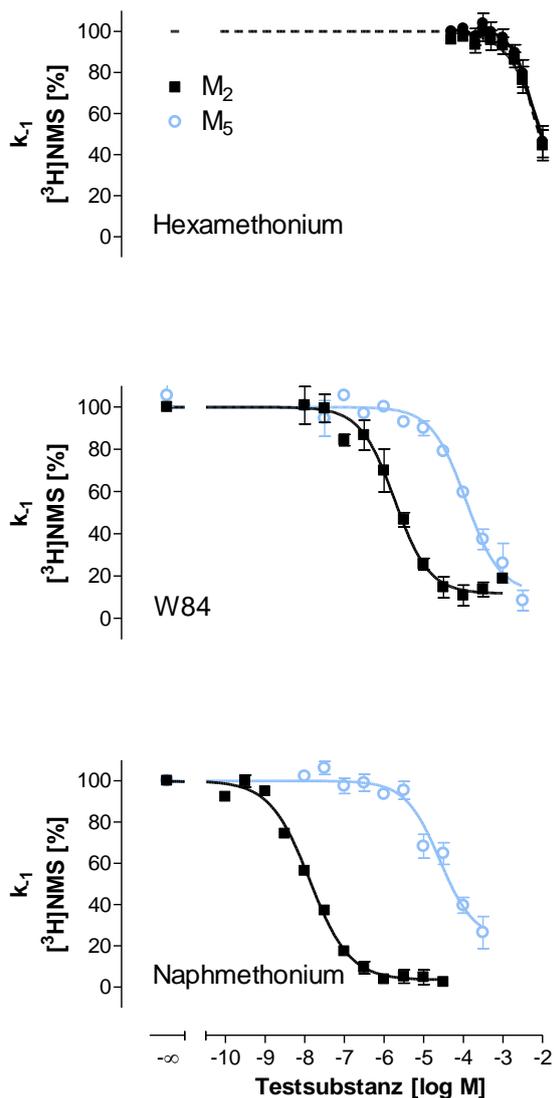


Abb. 3.31: Interaktion allosterischer Modulatoren mit M_2 - und M_5 -Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [^3H]NMS blockiert ist.

Es sind die Konzentrations-Effekt-Kurven für Hexamethonium (nur M_2), W84 und Naphmethonium dargestellt. *Ordinate:* Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} , normiert auf das obere Plateau, 0% entspricht einer vollständigen Dissoziationsverzögerung ($k_{-1} = 0$).

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die k_{-1} -Werte wurden aus 2-Punkt-Kinetik-Experimenten durch eine monophasische Analyse (Gleichung 23) ermittelt. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 2 nM [^3H]NMS durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

In Abb. 3.31 sind die Konzentrations-Effekt-Kurven der untersuchten allosterischen Modulatoren an M_2 - und M_5 -Rezeptoren dargestellt, deren orthosterische Bindungsstelle mit [^3H]NMS besetzt war. Die resultierenden pharmakologischen Parameterwerte befinden sich in Tab. 3.20. Hexamethonium ist nur am M_2 -Rezeptor untersucht worden, da der Effekt am M_5 -Rezeptor bei noch höheren Konzentrationen zu erwarten gewesen wäre.

Alle aufgeführten allosterischen Modulatoren konnten die Dissoziation des Radioliganden reduzieren. Hexamethonium war allerdings am M_2 -Rezeptor erst in sehr hohen Konzentrationen hierzu in der Lage. S. Prilla konnte in ihrer Dissertation (2006) im Na,K, P^i -Puffer zeigen, dass auch diese Substanz an [^3H]NMS-besetzten Rezeptoren zwischen M_2 und M_5 differenzieren kann. In der vorliegenden Arbeit ist die Subtypselektivität von Hexamethonium am freien Rezeptor gezeigt worden (siehe Abb. 3.2, Seite 92).

W84 und Naphmethonium wiesen eine deutlich höhere Affinität zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren als Hexamethonium auf (siehe Tab. 3.20). Beide Verbindungen verfügten über eine ausgeprägte M₂/M₅-Selektivität. V. Straßmann fand im Na,Mg,HEPES-Puffer für W84 und Naphmethonium ähnliche Affinitätswerte wie in dieser Arbeit. Außer für die Interaktion von W84 mit dem orthosterisch besetzten M₅-Rezeptor sind die Befunde nicht signifikant verschieden voneinander.

Nach dem Ehlert-Modell (Abb. 1.3, Seite 89) sind die Affinitäten eines allosterischen Modulators zum NMS-besetzten Rezeptor und zum freien Rezeptor umgekehrt proportional zueinander, der Kooperativitätsfaktor α stellt den Proportionalitätsfaktor dar. Folglich kann aus dem pK_A-Wert und α aus den Gleichgewichtsbindungsexperimenten (siehe Tab. 3.2, Seite 93) die Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor berechnet werden ($pK_A = pEC_{0,5Diss} - p\alpha$, Gleichung 18). Diese berechneten Werte für pEC_{0,5Diss.} sind in Tab. 3.20 in der Spalte „p($\alpha \cdot K_A$)“ angegeben, um einen Plausibilitätsvergleich zwischen den Befunden am freien und am NMS-besetzten Rezeptor zu ermöglichen. Diese Schätzwerte stimmen gut mit den gemessenen Daten überein, was eine interne Validität der Ergebnisse zeigt.

		n	n _H	unteres Plateau [%]	pEC _{0,5Diss.}	p($\alpha \cdot K_A$)	$\Delta pEC_{0,5Diss.}$
Hexamethonium	M ₂	3	-0,78 ± 0,18	13,3 ± 7,81	2,27 ± 0,14	2,49	-
	M ₅	n. u.			n. u.	1,90	-
W84	M ₂	4	-1,13 ± 0,23	10,44 ± 4,80 ⁺	5,69 ± 0,09	5,22	-
	M ₅	4	-0,66 ± 0,14	15,7 ± 10,5 ⁺	4,10 ± 0,07 ^{s.}	4,09	-1,59 ^{s.}
Naphmethonium	M ₂	3	-0,88 ± 0,04 [#]	3,56 ± 2,44 ⁺	7,89 ± 0,05	7,92	-
	M ₅	5	-0,53 ± 0,12	12,6 ± 8,22 ⁺	4,58 ± 0,11 ^{s.}	4,39	-3,31 ^{s.}

Tab. 3.20: Pharmakologische Parameterwerte der allosterischen Modulatoren an den angegebenen Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle durch [³H]NMS blockiert war.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die k₋₁-Werte wurden aus 2-Punkt-Kinetik-Experimenten durch eine monophasische Analyse (Gleichung 23) ermittelt. n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, pEC_{0,5Diss.}: Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve, p($\alpha \cdot K_A$): berechnete Affinität zum besetzten Rezeptor aus der Analyse von Gleichgewichtsexperimenten, $\Delta pEC_{0,5Diss.}$: pEC_{0,5Diss.}-Differenz zwischen M₅ und M₂, n. u.: nicht untersucht.

^{s.}: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

⁺: Das untere Plateau ist signifikant verschieden von 0% (F-Test, p<0,05).

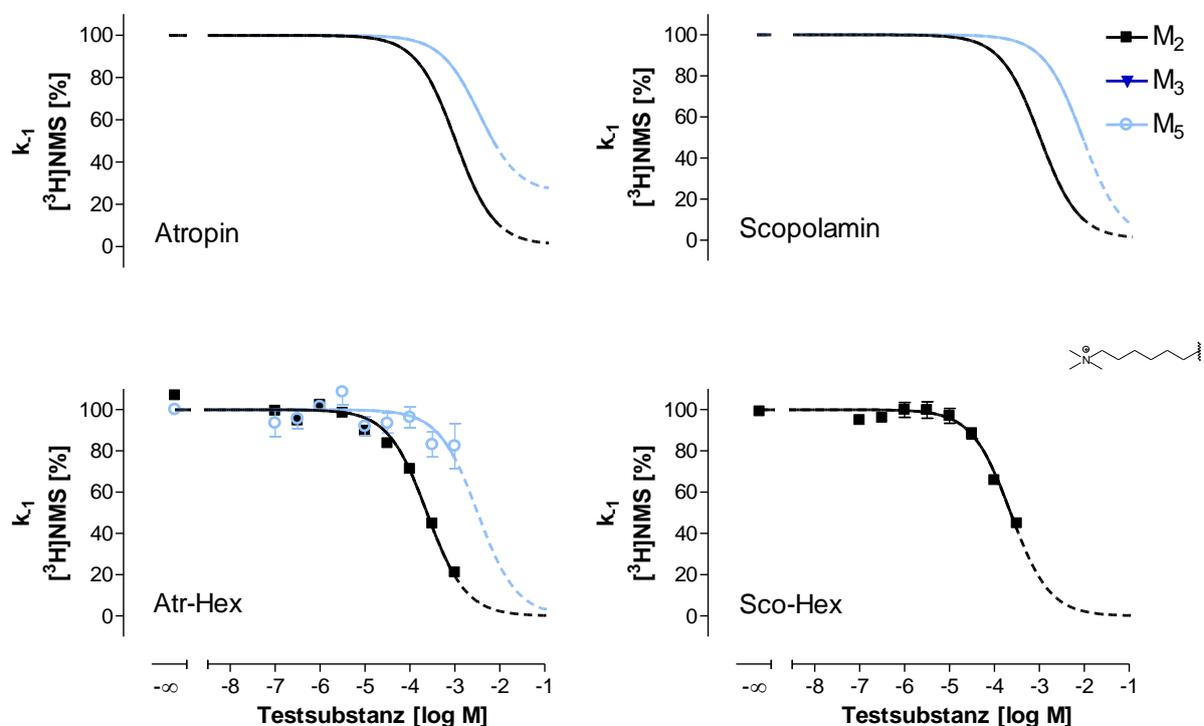
[#]: Steilheitsmaß n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test, p<0,05).

3.1.6.3 Interaktion antagonistischer Hybridliganden mit [³H]NMS-besetzten M-Rezeptoren

Die orthosterische Interaktion konnte in Kapitel 3.1.3.3 (Seite 115) für alle Hybrid-antagonisten bestätigt werden. Für Atr-W84 und Atr-Naph konnte am freien Rezeptor auch eine allosterische Bindung detektiert werden. Im Folgenden wird überprüft, ob durch die Hybridbildung der allosterische Baustein noch in der Lage ist, die Dissoziation zu verzögern. Die Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor sollte zwischen den Hybridstrukturen und den allosterischen Bausteinen verglichen werden (siehe Kapitel 3.1.6.6, Seite 184). Desweiteren dienen diese Versuche zur Bestimmung der Inkubationsdauer der Gleichgewichtsexperimente.

An einigen Liganden wurde neben dem M₂- und dem M₅-Rezeptor auch der M₃-Rezeptor untersucht, um zu überprüfen, ob die Hybridliganden der klassischen Affinitätsreihenfolge allosterischer Modulatoren unterliegen (z.B. Ellis et al., 1991). In diesem Fall sollte die Affinität zum M₃-Rezeptor höher sein als zum M₅-Rezeptor.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven der antagonistischen Hybridliganden an Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle besetzt ist, sind in Abb. 3.32 dargestellt.



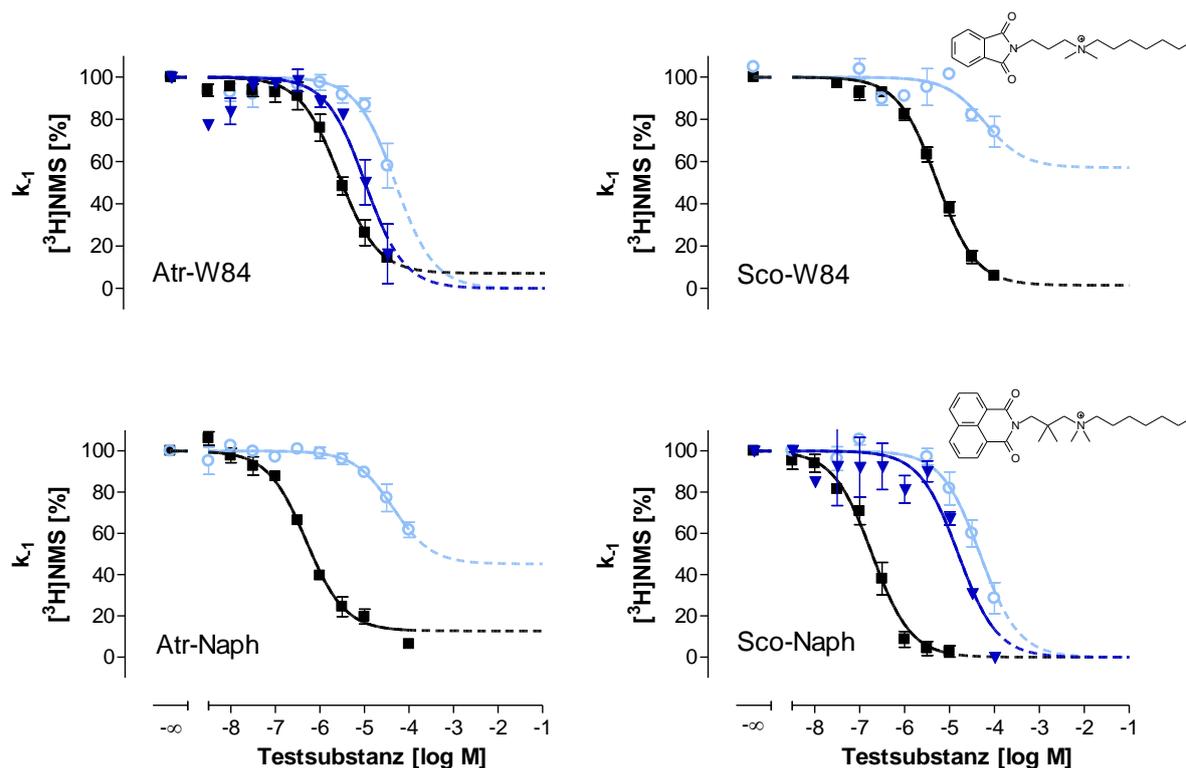


Abb. 3.32: Interaktion antagonistischer Hybridliganden mit M_2 , M_3 und M_5 -Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit $[^3H]NMS$ blockiert ist.

Von oben nach unten wurden die Strukturen schrittweise zu allo-/orthosterischen Hybridliganden verlängert. Links sind die Atropin-haltigen, rechts die Scopolamin-haltigen Verbindungen dargestellt. *Ordinate*: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} , normiert auf das obere Plateau, 0% entspricht einer vollständigen Dissoziationsverzögerung ($k_{-1} = 0$). *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die k_{-1} -Werte wurden aus 2-Punkt-Kinetik-Experimenten durch eine monophasische Analyse (Gleichung 23) ermittelt. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 2 nM $[^3H]NMS$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

Alle Kurven konnten mit einer Steilheit von -1 beschrieben werden. Die in

Tab. 3.21 aufgeführten Steilheitsmaße aus der freilaufenden Kurvenanpassung sind zwar teilweise fern von -1, was allerdings durch die fehlenden Daten im Bereich des unteren Plateaus erklärbar ist. Konzentrationsbedingt konnte das untere Plateau vor allem für den M_5 -Rezeptor wegen seiner geringen Affinität teilweise nicht bestimmt werden, und musste auf 0 % festgesetzt werden.

Die Affinität von Atr-W84 und Sco-Naph zum M_3 -Rezeptor lag zwischen den Werten für M_2 und M_5 . Dies lässt darauf schließen, dass die Bindung analog zu den bekannten allosterischen Modulatoren W84 oder Naphmethonium erfolgt.

Zwischen der Atropin- und der Scopolaminreihe waren keine Unterschiede auffällig. Beide Hexamethonium-Derivate gewannen im Gegensatz zu den einzelnen Bausteinen an Affinität

(vergleiche Tab. 3.19, Seite 172, und Tab. 3.20, Seite 174). Vermutlich fördert eine vergrößerte Molekülstruktur die Dissoziationsverzögerung. Atr-W84 und Sco-W84 befanden sich mit ihrer Affinität in der Größenordnung von W84. Die Naphmethoniumderivate besaßen zwar die höchste Affinität der Hybridliganden zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor, konnten aber nicht vollständig das Niveau der Ausgangsverbindung erreichen.

Für alle Hybridantagonisten konnte gezeigt werden, dass der allosterische Molekülteil wie die Ausgangsverbindung über dissoziationsverzögernde Eigenschaften verfügt. Im Fall der Hex-Hybride konnte durch die Hybridbildung sogar die Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor erhöht werden. Im Konzentrationsbereich der Interaktion mit freien M₂-Rezeptoren wird die Dissoziation allerdings noch nicht stark beeinträchtigt. Bei allen Hybriden ist die Affinität zum freien Rezeptor deutlich größer als zum NMS-besetzten Rezeptor.

Diese Befunde zeigen zwar an, dass die Hybride Eigenschaften allosterischer Modulatoren aufweisen, können allerdings nicht als Bestätigung einer allosterischen Interaktion am freien Rezeptor gewertet werden. Die Bindungstopographie ist im dualsterischen und im rein allosterischen Bindungsmodus unterschiedlich, da der allosterische Baustein unterschiedlich zu liegen kommt. Am freien Rezeptor zeigt der orthosterische Baustein zur orthosterischen Bindungsstelle. Im allosterischen Bindungsmodus hingegen ist die orthosterische Bindungsstelle mit NMS belegt, und der orthosterische Molekülteil befindet sich im Bereich der extrazellulären Seite des Rezeptors. Folglich ist das Hybridmolekül und damit der allosterische Baustein zwischen den beiden Bindungsmodi um 180° gedreht.

		n	n _H	unteres Plateau [%]	pEC _{0,5Diss.}	ΔpEC _{0,5Diss.}
Atropin	M ₂	3	-1,02 ± 0,01	1,98 ± 1,41	3,00 ± 0,02	-
	M ₅	3	-0,78 ± 0,08	21,8 ± 5,59	2,42 ± 0,16 ^s	-0,58 ^s
Atr-Hex (JSW258)	M ₂	4	-0,74 ± 0,16	0,00 ± 0,00	3,72 ± 0,13	-
	M ₅	3	-4,56 ± 4,37	0 (festgesetzt)	2,17 ± 0,27 ^s	-1,55 ^s
Atr-W84 (JSW253)	M ₂	4	-1,41 ± 0,24	17,5 ± 8,41	5,50 ± 0,11	-
	M ₃	4	-1,09 ± 0,45	16,6 ± 9,94	4,94 ± 0,15 ^s	-0,56 ^s
	M ₅	4	-1,38 ± 0,34	37,5 ± 21,9	4,29 ± 0,16 ^s	-1,21 ^s
Atr-Naph (JSW254)	M ₂	4	-1,13 ± 0,14	14,7 ± 4,44 ⁺	6,33 ± 0,04	-
	M ₅	4	-1,10 ± 0,25	42,8 ± 3,91 ⁺	4,34 ± 0,14 ^s	-1,99 ^s
		n	n _H	unteres Plateau [%]	pEC _{0,5Diss.}	ΔpEC _{0,5Diss.}
Scopolamin	M ₂	3	-1,03 ± 0,12	2,18 ± 2,18	3,00 ± 0,05	-
	M ₅	3	-5,01 ± 4,00	6,33 ± 6,33	2,10 ± 0,14 ^s	-0,90 ^s
Sco-Hex (JK179)	M ₂	3	-1,43 ± 0,40	12,7 ± 7,27	3,64 ± 0,04	-
	M ₅	n. u.			n. u.	
Sco-W84 (JSW257)	M ₂	4	-0,93 ± 0,08	0,23 ± 0,23	5,26 ± 0,14	-
	M ₅	3	-0,17 ± 0,12	0 (festgesetzt)	3,66 ± 0,10 ^s	-1,60 ^s
Sco-Naph (JSW256)	M ₂	4	-1,45 ± 0,18	2,88 ± 2,88	6,69 ± 0,14	-
	M ₃	3	-0,92 ± 0,37	27,5 ± 27,5	4,78 ± 0,06 ^s	-1,91 ^s
	M ₅	3	-1,63 ± 0,56	0,00 ± 0,00	4,30 ± 0,13 ^s	-2,39 ^s

Tab. 3.21: Pharmakologische Parameterwerte der von Atropin bzw. von Scopolamin abgeleiteten Hybridliganden an den angegebenen Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle durch [³H]NMS blockiert war.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die k₁-Werte wurden aus 2-Punkt-Kinetik-Experimenten durch eine monophasische Analyse (Gleichung 23) ermittelt. n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, pEC_{0,5Diss.}: Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve, ΔpEC_{0,5Diss.}: pEC_{0,5Diss.}-Differenz zwischen M₅ und M₂, n. u.: nicht untersucht.

^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

⁺: Das untere Plateau ist signifikant verschieden von 0%.

3.1.6.4 Einfluss allosterischer Rezeptormutationen auf die dissoziationsverzögernden Eigenschaften von Atr-Naph und von Naphmethonium

Für die Hybridstrukturen sollte gezeigt werden, dass sie sich im rein allosterischen Bindungsmodus wie die allosterischen Ausgangsverbindungen verhalten und dieselbe Bindungstopographie aufweisen. Exemplarische wurde dies für Atr-Naph und dessen Muttersubstanz Naphmethonium am NMS-besetzten Rezeptor untersucht.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven an den M₂-Mutanten sind in Abb. 3.33 gezeigt.

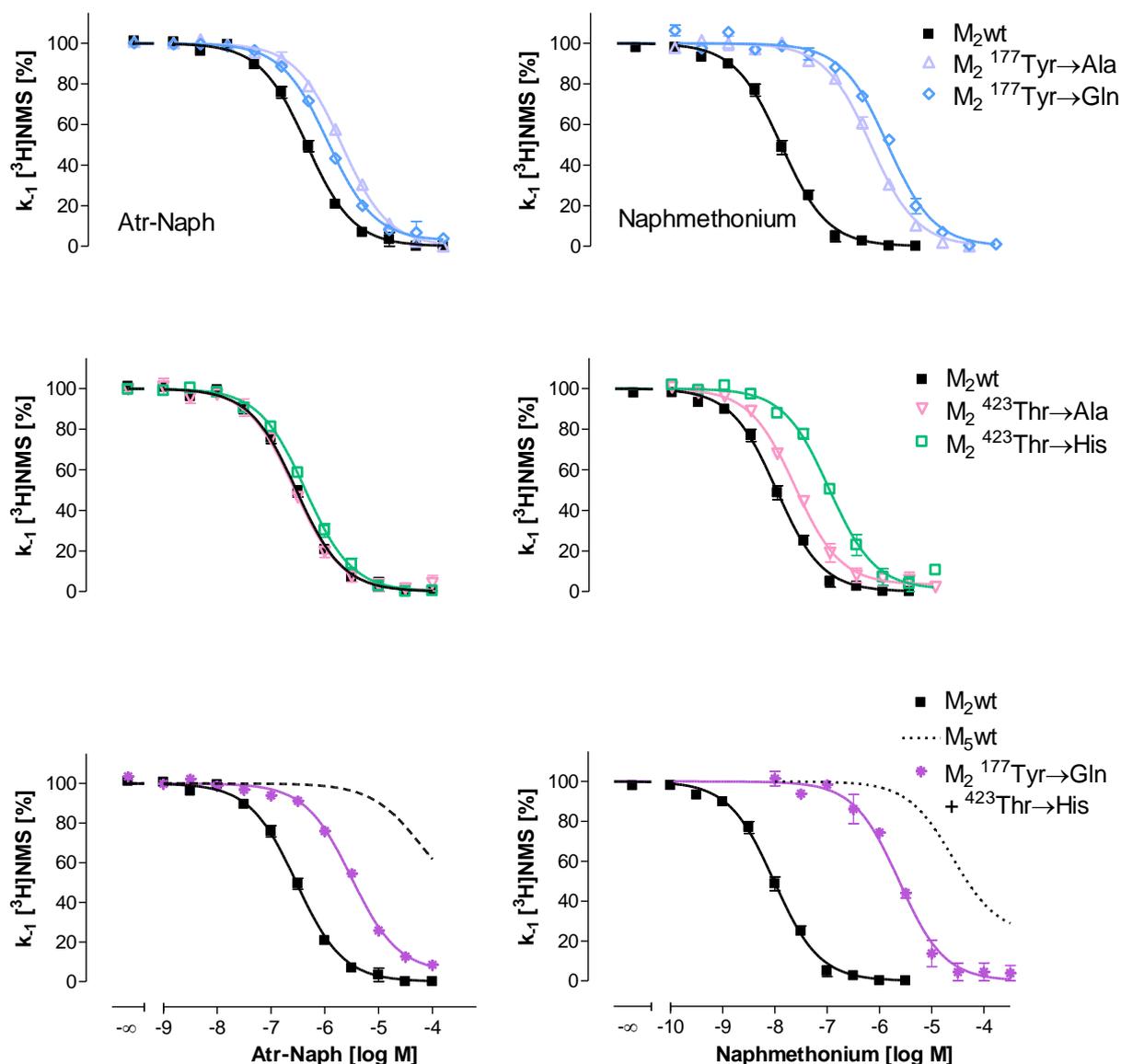


Abb. 3.33: Interaktion von Atr-Naph mit allosterischen M_2 -Rezeptormutanten, deren orthosterische Bindungsstelle mit $[^3H]NMS$ blockiert war.

Ordinate: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} , normiert auf das obere Plateau, 0% entspricht einer vollständigen Dissoziationsverzögerung ($k_{-1} = 0$). *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die k_{-1} -Werte wurden aus 2-Punkt-Kinetik-Experimenten durch eine monophasische Analyse (Gleichung 23) ermittelt. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 2 nM $[^3H]NMS$ durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

Atr-Naph zeigte am $[^3H]NMS$ -besetzten Rezeptor eine Abhängigkeit von M_2^{177Tyr} , sowohl beim Austausch gegen Alanin als auch zum korrespondierenden Glutamin des M_5 -Rezeptors. M_2^{423Thr} schien nicht an der Bindung beteiligt gewesen zu sein, auch der

Austausch gegen Histidin führte nur zu einem geringen Affinitätsverlust. Die Doppelmutation führte jedoch zu einem überadditiven Effekt der Einzelmutanten.

Bei Naphmethonium führten alle untersuchten Mutationen auch im Na,Mg,HEPES-Puffer zu einem signifikanten Affinitätsverlust. Die Kurven wurden alle mit einem Steilheitsmaß von -1 zufriedenstellend beschrieben. Naphmethonium war bei allen M₂-Rezeptormutationen in der Lage, die Dissoziation des Radioliganden vollständig zu inhibieren. Der Austausch von M₂⁴²³Thr→Ala führte nur zu einem geringen Affinitätsverlust, der bei dem Austausch gegen Histidin vergrößert wurde. Dies zeigt an, dass M₂⁴²³Threonin selbst keinen nennenswerten Einfluss auf die Bindung von Naphmethonium ausübt, das Histidin des M₅-Rezeptors an dieser Stelle jedoch stört. Analoge Beobachtungen konnte auch S. Prilla im Na,K,P_i-Puffer (Dissertation 2006) angeben. Dort wurde postuliert, dass die Aminosäure M₂⁴²³Threonin kein direkter Interaktionspartner von allosterischen Modulatoren ist, sondern die räumliche Orientierung der beiden Tryptophane 422 und 427 beeinflusst.

Die Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His führte zwar zu einem ausgeprägten Affinitätsverlust von Naphmethonium, konnte die M₂/M₅-Subtypselektivität im Na,Mg,HEPES-Puffer jedoch nicht vollständig erklären.

Auch wenn die Beeinflussung der Bindungsaffinität durch allosterische Mutationen bei Naphmethonium stärker ausgeprägt war als bei Atr-Naph, so kann dennoch für beide Verbindungen eine ähnliche Bindungstopographie am [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptor postuliert werden.

	n	n _H	unteres Plateau [%]	pEC _{0,5Diss.}	ΔpEC _{0,5Diss.}	
Atr-Naph (JSW254)	M ₂ wt	3	-1,08 ± 0,08	1,09 ± 1,09	6,54 ± 0,04	-
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Ala	3	-0,97 ± 0,04	0,00 ± 0,00	5,88 ± 0,03 ^s	-0,66 ^s
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	3	-1,06 ± 0,04	3,03 ± 1,74	6,14 ± 0,03 ^s	-0,40 ^s
	M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	3	-1,15 ± 0,08	1,42 ± 1,42	6,57 ± 0,03	-0,03
	M ₂ ⁴²³ Thr→His	4	-0,98 ± 0,05	0,68 ± 0,64	6,37 ± 0,02 ^s	-0,17 ^s
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	4	-0,97 ± 0,07	4,45 ± 1,52	5,50 ± 0,03 ^s	-1,04 ^s
Naph-methonium	M ₂ wt	3	-1,02 ± 0,04	0,00 ± 0,00	8,01 ± 0,06	-
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Ala	3	-1,10 ± 0,05	0,00 ± 0,00	6,34 ± 0,03 ^s	-1,67 ^s
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	3	-1,00 ± 0,12	4,41 ± 4,41	6,07 ± 0,05 ^s	-1,94 ^s
	M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	3	-1,06 ± 0,03	4,11 ± 3,54	7,68 ± 0,01 ^s	-0,33 ^s
	M ₂ ⁴²³ Thr→His	3	-1,09 ± 0,05	2,88 ± 2,88	7,03 ± 0,02 ^s	-0,98 ^s
	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3	-1,09 ± 0,17	3,12 ± 3,04	5,61 ± 0,05 ^s	-2,40 ^s

Tab. 3.22: Pharmakologische Parameterwerte von Atr-Naph und Naphmethonium an allosterischen Rezeptormutanten, deren orthosterische Bindungsstelle durch [³H]NMS blockiert war.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die k₋₁-Werte wurden aus 2-Punkt-Kinetik-Experimenten durch eine monophasische Analyse (Gleichung 23) ermittelt. n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, pEC_{0,5Diss.}: Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve, ΔpEC_{0,5Diss.}: pEC_{0,5Diss.}-Differenz zwischen M₅ und M₂.
^s: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).

3.1.6.5 Interaktion agonistischer Hybridliganden mit [³H]NMS-besetzten M-Rezeptoren

Die dissoziationsverzögernden Eigenschaften von Iper-W84 und Iper-Naph am M₂- und M₅-Rezeptor konnte J. Antony bereits in seiner Dissertation (2008) zeigen. Um Bindungsstudien mit Iper-W84 an allen fünf Rezeptorsubtypen durchführen zu können, wurde die Dissoziationsverzögerung an allen Subtypen vermessen. Die Affinität der Hybridliganden zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor war essentiell für die Berechnung der Inkubationszeit für die Gleichgewichtsbindungsexperimente. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit

erstmals gezeigt, dass auch das verkürzte Hybrid Iper-Hex ebenfalls über dissoziationsverzögernde Eigenschaften verfügt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.34 und Tab. 3.23 dargestellt.

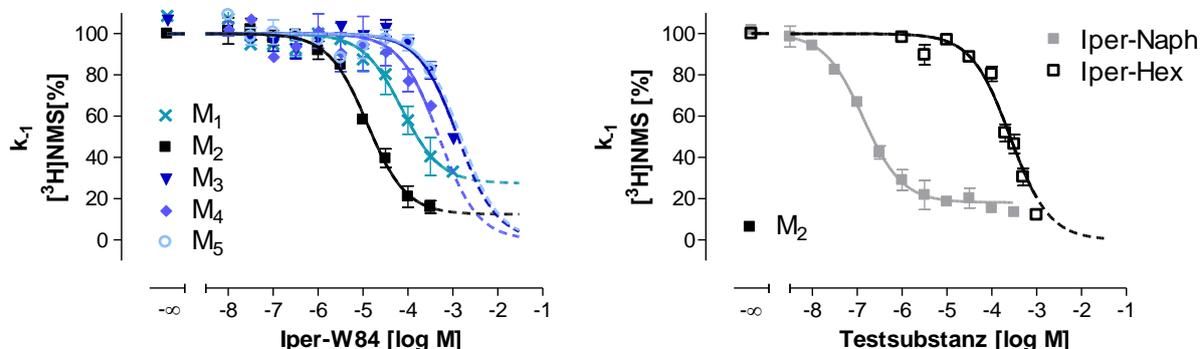


Abb. 3.34: Interaktion agonistischer Hybridliganden mit den angegebenen Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit $[^3\text{H}]$ NMS blockiert war.

Links sind die Konzentrations-Effekt-Kurven von Iper-W84 an allen fünf Subtypen dargestellt, rechts sind die Interaktionen der Hybride Iper-Naph und Iper-Hex mit dem M_2 -Rezeptor dargestellt. *Ordinate:* Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} , normiert auf das obere Plateau, 0% entspricht einer vollständigen Dissoziationsverzögerung ($k_{-1} = 0$). *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die k_{-1} -Werte wurden aus 2-Punkt-Kinetik-Experimenten durch eine monophasische Analyse (Gleichung 23) ermittelt. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 2 nM $[^3\text{H}]$ NMS durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

Alle in Abb. 3.34 gezeigten Konzentrations-Effekt-Kurven konnten mit einer Steilheit von -1 beschrieben werden. Bei Kurven niedriger Affinität konnte die Konzentration nicht soweit gesteigert werden, als dass eine zufriedenstellende Kurvenanpassung möglich gewesen wäre. Bei diesen Analysen wurden das untere Plateau sowie die Steilheit festgesetzt (siehe Tab. 3.23). Iper-Naph und Iper-W84 konnten am M_2 -Rezeptor (und Iper-W84 am M_1 -Rezeptor) die Dissoziation des Radioliganden nicht vollständig unterbinden.

Iper-W84 konnte am NMS-besetzten Rezeptor zwischen den fünf Subtypen unterscheiden. Die Reihenfolge entspricht dem Affinitätsmuster der allosterischen Modulatoren (Sennwitz, Dissertation 2006): $M_2 > M_1 > M_4 > M_3 \approx M_5$. Folglich verhielt sich der allosterische Baustein in Bezug auf die Subtypselektivität wie die allosterische Ausgangsverbindung.

Die Affinität von Iper-W84 zum NMS-besetzten M_2 - und zum M_5 -Rezeptor lag jeweils ungefähr um einen Faktor 10 unterhalb den Werten für W84. Das Verhältnis zwischen Iper-Naph und Naphmethonium war analog. Dies könnte anzeigen, dass der allosterische Molekülteil der Hybridliganden zwar durchaus noch seine dissoziationsverzögernden Eigenschaften

besitzt, allerdings der orthosterische Anteil nicht den sonst vorhandenen Rest des allosterischen Modulators ersetzen kann.

		n	n _H	unteres Plateau [%]	pEC _{0,5Diss.}	ΔpEC _{0,5Diss.}
Iper-W84	M ₁	3	-1,08 ± 0,28	27,4 ± 7,69 ⁺	4,18 ± 0,23 ^{s.}	-0,72 ^{s.}
	M ₂	3	-1,01 ± 0,06	12,4 ± 4,42 ⁺	4,90 ± 0,04	-
	M ₃	3	-4,99 ± 3,35	5,42 ± 5,42	2,83 ± 0,18 ^{s.}	-2,07 ^{s.}
	M ₄	3	-1 (festgesetzt)	0 (festgesetzt)	3,33 ± 0,05 ^{s.}	-1,57 ^{s.}
	M ₅	3	-1 (festgesetzt)	0 (festgesetzt)	2,81 ± 0,07 ^{s.}	-2,09 ^{s.}
Iper-Hex (JSW236)	M ₂	6	-1,50 ± 0,18	8,77 ± 6,66	3,50 ± 0,06	-
Iper-Naph (MMH5-6)	M ₂	3	-0,96 ± 0,03	19,0 ± 5,97 ⁺	6,88 ± 0,03	-

Tab. 3.23: Pharmakologische Parameterwerte der von Iperoxo abgeleiteten Hybridliganden an den angegebenen Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle durch [³H]NMS blockiert war. Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die k₋₁-Werte wurden aus 2-Punkt-Kinetik-Experimenten durch eine monophasische Analyse (Gleichung 23) ermittelt. n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, pEC_{0,5Diss.}: Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve, ΔpEC_{0,5Diss.}: pEC_{0,5Diss.}-Differenz zwischen M₅ und M₂.
^{s.}: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden M₂wt-Kenngröße (t-Test, p<0,05).
⁺: Das untere Plateau ist signifikant verschieden von 0% (F-Test, p<0,05).

3.1.6.6 Vergleich der Affinitäten am freien und [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptor

Wie in Kapitel 3.1.6.1 (Seite 170) dargestellt können auch orthosterische Liganden am [³H]NMS-besetzten Rezeptor allosterisch interagieren. Neben Mutagenesestudien kann auch das Verhältnis der Affinität zum freien und zum besetzten Rezeptor einen Hinweis auf die Orientierung der Substanzen am Rezeptor geben. Ein orthosterisch bindender Ligand wird eine deutlich höhere Affinität zum freien Rezeptor aufweisen, da dann das bevorzugte Haftareal frei zugänglich ist. Allosterische Modulatoren hingegen weisen oft am freien und am besetzten Rezeptor eine ähnliche Affinität auf (Allosterie: Affinitätsunterschied von einem Faktor 10-100, Orthostere: 1000-10000).

In Abb. 3.35 sind die Affinitäten der untersuchten Hybridliganden mit den entsprechenden Bausteinen dargestellt. Die offenen Balken repräsentieren die Affinität zum freien M_2 -Rezeptor (pK_A), die geschlossenen zum $[^3H]$ NMS-besetzten M_2 -Rezeptor ($pEC_{0,5Diss.}$).

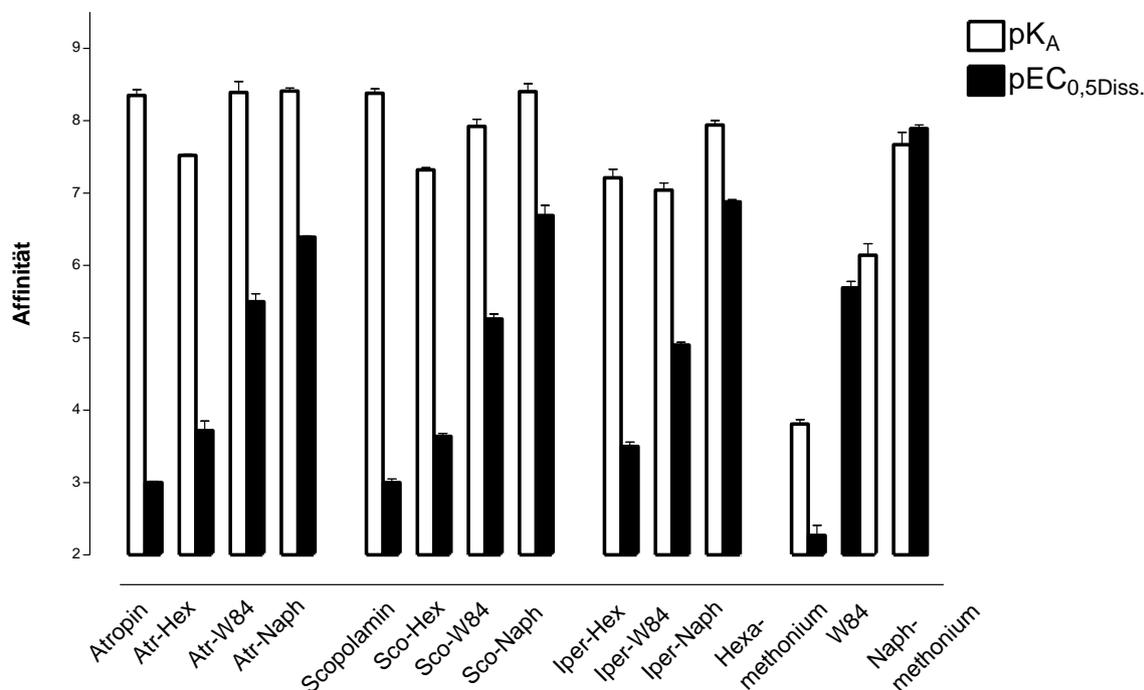


Abb. 3.35: Affinitäten der Hybridantagonisten zum freien (pK_A) und zum $[^3H]$ NMS-besetzten M_2 -Rezeptor ($pEC_{0,5Diss.}$).

Ordinate: Affinität der Verbindung in negativer logarithmischer Darstellung, *Abszisse:* Hybridantagonisten sowie deren allo- und orthosterische Bausteine.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-11 Experimenten. Die Parameterwerte sind in den vorangegangenen Kapiteln dieser Arbeit aufgeführt.

Der Affinitätsunterschied zwischen dem freien und dem besetzten Rezeptor war bei den orthosterischen Liganden Atropin und Scopolamin am stärksten ausgeprägt. Im Konzentrationsbereich der orthosterischen Interaktion konnte keine Dissoziationsverzögerung detektiert werden. Bei den beiden allosterischen Modulatoren W84 und Naphmethonium fand sich ein anderes Bild. Hier waren die Affinitäten für den freien und den besetzten Rezeptor fast gleich, im Fall von Naphmethonium war der Unterschied sogar nicht signifikant verschieden.

Eine Ausnahme stellte Hexamethonium dar. Obwohl die Substanz als allosterischer Modulator gilt (z.B. Prilla Dissertation 2006), ist ihre Affinität zum freien Rezeptor deutlich größer als zum $[^3H]$ NMS-besetzten. Dieser Befund deutet eine orthosterische Interaktion an. Die Bindungstopographie von Hexamethonium ist in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht

weiter untersucht worden, möglich wären hierfür z.B. Bindungsstudien an der Mutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala.

Die Hybridantagonisten stellten eine Mischform zwischen der rein ortho- und der rein allosterischen Orientierung dar. Bei allen untersuchten Hybridverbindungen war die Affinität zum freien Rezeptor deutlich größer als zum NMS-besetzten. Der Unterschied wurde mit steigendem allosterischen Anteil geringer, da die Affinität zum NMS-besetzten Zustand zunahm. Die beiden Affinitäten erreichten aber nicht annähernd dasselbe Niveau.

Dadurch dass der Affinitätsunterschied zwischen freiem und besetztem Rezeptor bei den Hybridliganden so stark ausgeprägt ist, kann darauf geschlossen werden, dass der orthosterische oder der dualsterische Bindungsmodus gegenüber der Ausbildung ternärer Komplexe überwiegt. Dies ist kongruent mit der ausgeprägten Abhängigkeit der Hybridbindung vom orthosterischen Epitop M₂¹⁰⁴Tyr. Diese Befunde zeigen eine bevorzugte Interaktion der Hybride mit dem orthosterischen Haftareal.

3.1.7 Kinetik der Rezeptorinteraktion von ausgewählten Substanzen

Die allosterischen Bausteine der Hybridliganden verfügen über dissoziationsverzögernde Eigenschaften (siehe Kapitel 3.1.6, Seite 169). Bei der Betrachtung der Interaktion von z.B. Naphmethonium mit NMS zeigt sich eine fast vollständig aufgehobene Dissoziation des Orthosters durch Zugabe des allosterischen Modulators. Dies brachte die Frage auf, ob der allosterische Molekülteil der Hybridliganden die Dissoziation des orthosterischen Molekülanteils und damit die Gesamtkinetik der Hybridspezies verzögert. Es wäre möglich, dass sich das Hybrid ähnlich wie Tiotropium als „LAMA“ (long acting muscarinic antagonist) verhält (Casarosa et al., 2010). Solch ein Verhalten ist für den β_2 -Agonisten Salmeterol beschrieben. Dieser wird durch einen langen Substituenten am Rezeptor „verankert“, da über die Wechselwirkung mit einer zweiten Bindungsstelle die Dissoziation verlangsamt wird (aus Lüllmann, Mohr und Hein, 2010). Dies führt zur langen Wirkdauer von Salmeterol.

Eine direkte Messung der Kinetik ist in Radioligandbindungsexperimenten nicht möglich, weil hierfür die Hybridspezies markiert werden müsste (z.B. radioaktiv). Eine Alternative ist die Durchführung von Radioligand-Assoziationsexperimenten nach Motulsky und Mahan (1983, siehe Kapitel 2.4.8.3, Seite 51). Bei dieser Methode kann durch einen gleichzeitigen Zusatz eines radioaktiv markierten Liganden auf die Assoziations- und Dissoziationskonstanten einer unmarkierten Substanz geschlossen werden. Steigt die [^3H]NMS-Bindung in Anwesenheit einer Testsubstanz langsamer an als unter Kontrollbedingungen (ohne Testsubstanz), so sind Assoziation und Dissoziation der „kalten“ Substanz schneller als die des Radioliganden. Ergibt sich unter Einfluss der Testsubstanz ein Peak der [^3H]NMS-Bindung, so verfügt die Testsubstanz über eine langsamere Kinetik als der Radioligand (z.B. Tiotropium am M_3 -Rezeptor, Dowling und Charlton, 2006). Zu beachten ist, dass auch im aufsteigenden Bereich der Assoziationskurve Dissoziations- und Assoziationsvorgänge parallel ablaufen. Die Bindungs-Kurve gibt die beobachtete Assoziationskurve k_{obs} wieder ($k_{\text{obs}} = (k_{+1} \cdot [L]) - k_{-1}$). Die Parameter k_{+1} und k_{-1} wurden durch die globale Analyse nach Gleichung 25 erhalten. Über Gleichung 24 kann aus den Geschwindigkeitskonstanten die Halbwertszeit der Assoziation bzw. Dissoziation berechnet werden. Aus dem Verhältnis von k_{+1} und k_{-1} kann nach Gleichung 7 die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D berechnet werden, welche ein Maß für die Affinität der Verbindung darstellt. Exemplarisch wurden die

Versuche mit Atr-Naph und mit dessen orthosterischem Baustein Atropin durchgeführt. Atr-Naph wurde ausgewählt, weil es sich am stärksten von dem klassischen orthosterischen Bindungsmodus unterschied.

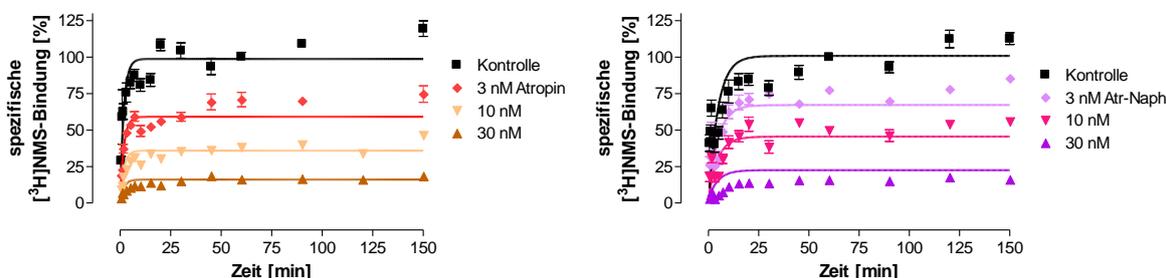


Abb. 3.36: Assoziationskinetik von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bei gleichzeitigem Zusatz von Atropin (links) und Atr-Naph (rechts) am M_2 -Rezeptor.

Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden in Prozent, 100% entspricht dem Plateau der Kontrollkurve ohne Testsubstanz, 0% der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Zeit in Minuten, in der Testsubstanz und Radioligand an den Rezeptor binden konnten. Die Versuche wurden an stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durchgeführt. Die Kurvenanpassung erfolgte nach dem Modell von Motulsky und Mahan (Gleichung 25). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4-5 unabhängigen Einzelerperimenten in Doppelbestimmung.

In Abb. 3.36 sind die Assoziationskurven von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bei gleichzeitigem Zusatz von Atropin (links) und Atr-Naph (rechts) dargestellt. Sowohl Atropin als auch Atr-Naph senkten konzentrationsabhängig die spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung (analog Gleichgewichtsexperimenten). Die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindungs-Kurven in Gegenwart beider Verbindungen schienen nach ~ 25 min ein Plateau zu erreichen, es zeigte sich kein sichtbarer Unterschied durch die Hybridbildung.

In jedem Versuch wurde zur Kontrolle die Assoziation von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ ohne Zusatz der Testsubstanz gemessen. Die in Tab. 3.24 aufgeführten Vergleichswerte wurden in kinetischen Zweipunktexperimenten (k_{+1} bzw. $\text{HWZ}_{\text{Disso NMS}}$, siehe Tab. 7.5, Seite 266) bzw. in Gleichgewichtsbindungsexperimenten (pK_D bzw. pK_A , siehe Tab. 3.6 und Tab. 3.8, Seite 111 bzw. 118) ermittelt. Aus diesen bereits bekannten Daten kann ein k_{+1} -Wert berechnet werden. Die für $[^3\text{H}]\text{NMS}$ in den Kontrollversuchen der Assoziationsversuche bestimmten Parameterwerte k_{+1} und k_{-1} unterschieden sich nicht signifikant von den Vergleichswerten. Allerdings war die Streuung bei den Assoziationskinetiken deutlich größer (siehe z.B. k_{+1} -Werte unter Kontrollbedingungen).

Das Ergebnis der globalen Analyse der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Assoziationsverläufe in Gegenwart der unterschiedlichen Atropinkonzentrationen stimmte mit den Messpunkten zufriedenstellend überein ($R^2 = 0,90$). In den Versuchen mit Atr-Naph war auffällig, dass die berechnete Kurve

die Datenpunkte der höchsten Atr-Naph Konzentration nicht gut beschrieb ($R^2 = 0,85$). Dies fand sich auch bei den Einzelversuchen.

Die errechneten Affinitätswerte (pK_D) für Atropin und Atr-Naph waren in derselben Größenordnung wie bei Gleichgewichtsuntersuchungen, für Atr-Naph konnte aber ein signifikanter Unterschied zwischen dem pK_D aus den kinetischen Versuchen und dem pK_A -Wert aus den Gleichgewichtsbindungsexperimenten festgestellt werden.

	Atropin	[³ H]NMS (Kontrolle)	Atr-Naph	[³ H]NMS (Kontrolle)
k_{+1} [$\text{min}^{-1} \cdot \text{nM}^{-1}$]	2,33 ± 0,13	1,15 ± 48,3	41,6 ± 18,8*	51,7 ± 82,3
log k_{+1}	9,37 ± 0,41	9,06 ± 0,15	8,62 ± 0,17	8,71 ± 0,49
HWZ _{Asso} [$\text{min}^{-1} \cdot \text{nM}^{-1}$]	8,26 ± 4,02	0,75 ± 0,22	2,09 ± 0,82	8,92 ± 8,34
Vergleich k_{+1} (k_{+1} / K_D) [$\text{min}^{-1} \cdot \text{nM}^{-1}$]		0,81		0,81
k_{-1} [min^{-1}]	7,48 ± 24,0	0,31 ± 0,03	2,56 ± 1,68	0,41 ± 0,06
log k_{-1}	0,87 ± 0,40 ^s	-0,50 ± 0,05	0,41 ± 0,17 ^s	-0,38 ± 0,06
HWZ _{Disso} [min]	0,28 ± 0,14 ^s	2,28 ± 0,30	0,32 ± 0,08 ^s	1,72 ± 0,20
Vergleich HWZ _{Disso} (2-Punkt) [min]		2,00 ± 0,04		2,00 ± 0,04
pK_D	8,49 ± 0,09	9,57 ± 0,15	8,21 ± 0,10 [#]	9,10 ± 0,46
Vergleich pK_D (Gleichgewicht)	8,30 ± 0,08	9,37 ± 0,04	8,55 ± 0,02	9,37 ± 0,04

Tab. 3.24: Parameterwerte der Kinetik der Rezeptorinteraktion von Atropin und Atr-Naph am M₂-Rezeptor.

Alle Versuche wurden nach der Analyse von Motulsky und Mahan (Gleichung 25) ausgewertet. Die Versuche mit Atropin sind in fünf, die von Atr-Naph in vier unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung durchgeführt worden, es sind jeweils die NMS-Kontrollen aus den jeweiligen Versuchen angegeben. Die Vergleichsdaten stammen aus Gleichgewichtsexperimenten. Aufgeführt sind Mittelwerte ± Standardfehler.

k_{+1} : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation, k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation, HWZ: Halbwertszeit, pK_D : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D . Die Vergleichswerte stammen aus Gleichgewichts- und aus Dissoziationsexperimenten.

^s: Signifikanter Unterschied zwischen Testsubstanz und Kontrolle (t-Test, $p < 0,05$).

*: Signifikanter Unterschied zwischen Atropin und Atr-Naph (t-Test, $p < 0,05$).

[#]: Signifikanter Unterschied zwischen dem Ergebnis der Assoziationsanalyse und den Gleichgewichtsexperimenten (t-Test, $p < 0,05$).

[³H]NMS zeigte eine langsamere Assoziationskinetik als Atropin und Atr-Naph, sowie eine deutlich langsamere Dissoziation. Die langsame Lösung vom Rezeptor schien folglich die

Erklärung für die hohe Affinität zu sein. Bei allen drei Verbindungen war die Dissoziation der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Einstellung eines Reaktionsgleichgewichts.

Von Interesse bei diesem Versuchsansatz war der Vergleich der kinetischen Parameterwerte von Atropin und Atr-Naph. Statistisch zeigte nur der k_{+1} -Wert einen Unterschied, was eine schnellere Assoziation von Atr-Naph im Gegensatz zu Atropin bedeutet. Die Dissoziationsgeschwindigkeit wurde durch den allosterischen Anker des Hybridliganden nicht herabgesetzt.

Die Gleichung ist für die kompetitive Interaktion zweier Orthostere entwickelt worden. Die Tatsache, dass die Kurvenanpassung mit Atropin, aber nicht mit Atr-Naph funktioniert, kann ein Hinweis auf den unterschiedlichen Bindungsmodus sein. In der höchsten eingesetzten Konzentration von 30 nM wurden in Dissoziationsverzögerungsexperimenten erste Effekte detektiert (~ 7% Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation). Auch dies kann eine Erklärung für die nicht stimmige Kurvenanpassung sein. Weil es bis zu dem jetzigen Zeitpunkt noch kein Modell für die Analyse einer kinetischen Interaktion von Hybridliganden gibt, wurden die vorliegenden Daten wie Atropin nach dem Modell von Motulsky und Mahan ausgewertet.

Mit der vorliegenden Methode konnte kein Hinweis auf eine veränderte Bindungskinetik des Hybridliganden im Vergleich zu Atropin erkannt werden, da diese bei den untersuchten Liganden so schnell war, dass die Konstanten nicht exakt aufgelöst werden konnten. Entweder müssten die Inkubationsbedingungen so verändert werden, dass kinetische Prozesse langsamer ablaufen (z.B. Absenkung der Temperatur), oder es müsste eine andere Messmethode eingesetzt werden. Hier wären das System der dynamischen Massenumverteilung (siehe Kapitel 3.1.8.3, Seite 197), welches allerdings ebenfalls nur im Minutenmaßstab auflösen kann, oder Fluoreszenz-basierte Methoden (z.B. nach Maier-Peuschel et al., 2010) zu nennen. In dieser Arbeit konnte jedoch sicher gezeigt werden, dass Atr-Naph kein „LAMA“ ist, sich also nicht durch eine sehr lange Rezeptorinteraktion von mehreren Stunden auszeichnet.

Zusätzlich muss beachtet werden, dass die Orientierung des allosterischen Bausteins des Hybridliganden im rein allosterischen Bindungsmodus verschieden ist von der Orientierung im dualsterischen Modus. Folglich kann es sein, dass der allosterische Baustein in der Position der dualsterischen Bindung keine dissoziationsverzögernden Eigenschaften besitzt.

3.1.8 Nachweis des invers agonistischen Verhaltens der allo-/orthosterischen Hybridliganden

Wie in Abb. 1.7 (Seite 13) vorgestellt, handelt es sich bei den neuen Hybridliganden um Konstrukte aus Atropin bzw. Scopolamin und Hexamethonium, W84 oder Naphmethonium. All diese Verbindungen sind inverse Agonisten (z.B. Atropin, NMS, W84 und Naphmethonium in Kellershohn, Dissertation 2008). Die Verknüpfung zweier inverser Agonisten sollte wieder zu einem inversen Agonisten führen. Um diese Hypothese zu belegen, sind funktionelle Untersuchungen auf G Protein-Ebene ($[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$, Kapitel 3.1.8.1 und 3.1.8.2, ab Seite 191) und Ganzzellversuche (DMR, Kapitel 3.1.8.3, Seite 197) durchgeführt worden.

3.1.8.1 Einfluss von Atr-Naph auf die Acetylcholin-vermittelte M_2 -Aktivierung

Der klassische Ansatz, um Antagonismus in funktionellen Untersuchungen nachzuweisen, ist die Schild-Analyse (Arunlakshana und Schild, 1959). Um Zeit und Proben einzusparen, ist in der vorliegenden Arbeit die weiterentwickelte Methode nach Waud (Waud et al., 1978) angewandt worden. Bei dieser Analyse werden für den Einfluss der Testsubstanz nur wenige Punkte und keine kompletten Kurven vermessen. Die Steigung wird von der Kontrollkurve (ohne Antagonistzusatz) übernommen. Im vorliegenden Fall wurden zusätzlich das untere und das obere Niveau unter Einfluss der Testsubstanz punktartig bestimmt, um eventuelle Veränderungen erkennen zu können.

Für diese Methode ist –wie in Kapitel 3.1.8.3- Atr-Naph exemplarisch untersucht worden. Die Ergebnisse der Waud-Analyse sind in Abb. 3.37 dargestellt. Zum Vergleich ist auf Basis der zugrundegelegten Konzentrations-Effekt-Beziehungen und den daraus resultierenden Wendepunkten eine Analyse nach Schild im rechten Teil der Abbildung aufgetragen.

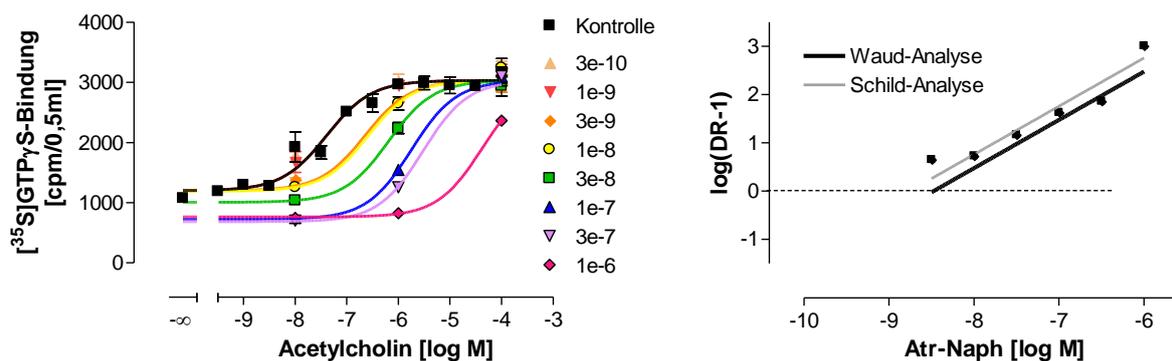


Abb. 3.37: Einfluss des Hybridliganden Atr-Naph auf die Acetylcholin-vermittelte Aktivierung des M_2 -Rezeptors.

Links: Einfluss des Antagonisten auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin. Dargestellt sind aufsteigende molare Konzentrationen von Atr-Naph. *Ordinate:* Gesamtbindung $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ in cpm (*counts per minute*) pro Versuchsansatz von 0,5 ml. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration. Die Datensätze wurden nach Gleichung 26 (Analyse nach Waud) ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten CHO M_2 -Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) mit einem Zusatz von $10\ \mu\text{M}$ GDP in Gegenwart von $0,07\ \text{nM}$ $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ durchgeführt, der Membranproteingehalt betrug $40\ \mu\text{g/ml}$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Rechts: Auftragung der aus der linken Abbildung ermittelten Verschiebefaktoren ($\log[\text{DR}-1]$) gegen die logarithmische Konzentration des Hybridliganden Atr-Naph. Die schwarze Linie wurde durch die Analyse nach Waud (Gleichung 26) berechnet. Die graue Linie entspricht der Punkteanpassung nach Arunlakshana und Schild (1959).

Die Analyse nach Waud zeigte eine deutliche Absenkung der durch $1\ \mu\text{M}$ Acetylcholin induzierten $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Atr-Naph, woraus auf eine Rechtsverschiebung der Kurvenschar geschlossen wird. Die nicht sättigbare Parallelverschiebung ist charakteristisch für einen Antagonisten. Auch bei hohen Atr-Naph-Konzentrationen konnte durch Erhöhung der Acetylcholin-Konzentration das obere Plateau erreicht werden. Das untere Plateau in Abwesenheit von Acetylcholin hingegen wurde durch Atr-Naph erniedrigt. Diese Absenkung der basalen Bindung ist typisch für inverse Agonisten. Die Überprüfung der anderen Hybridliganden auf inversen Agonismus ist in Kapitel 3.1.8.2 (Seite 194) dargestellt.

Die Parameterwerte der globalen Waud-Analyse (Tab. 3.25) unterschieden sich nicht von den entsprechenden Ergebnissen aus $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindungsversuchen (Atr-Naph, Tab. 3.3, Seite 97) bzw. von klassisch durchgeführten $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Experimenten (Acetylcholin, Tab. 3.33, Seite 227). Die berechnete Steigung der Schildgeraden war nicht signifikant verschieden von 1. Somit kann von einer Parallelverschiebung der Kurven ausgegangen und der pA_2 -Wert als Affinitätsmaß des Antagonisten betrachtet werden.

Aus der berechneten Steigung in der Waud-Analyse und dem pA_2 -Wert kann analog der Schild-Auftragung eine Gerade generiert werden. Zum Vergleich sind aus den Einzelkurven Verschiebefaktoren (*dose ratios*, DR) berechnet worden:

$$DR = \frac{EC_{50}(\text{mit Antagonist})}{EC_{50}(\text{Kontrolle})}$$

Bei einer Schild-Analyse wird durch diese Verschiebefaktoren in Abhängigkeit von der Antagonistkonzentration eine Gerade beschrieben. Der Schnittpunkt mit der Abszisse gibt den pA_2 -Wert an. In Abb. 3.37 ist ein Vergleich der Geraden nach Waud und nach Schild dargestellt. Beide Geraden beschreiben die Datenpunkte zufriedenstellend und die Schätzwerte der Antagonistaffinität beider Modelle unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Mit den dargestellten Ergebnissen ließ sich der Antagonismus von Atr-Naph nachweisen und auch ein inverser Agonismus konnte erkannt werden. Bei höheren Atr-Naph-Konzentrationen ist eine Sättigung des antagonistischen Effekts durch die allosterische Komponente der Hybridsubstanz zu erwarten. In den hier untersuchten Konzentrationsbereich überwog die orthosterische Interaktion.

	pEC_{50} (ACh)	pA_2 (Atr-Naph)	Steigung (Schild-Gerade)
Waud-Analyse	$7,37 \pm 0,15$	$8,48 \pm 0,12$	$1,21 \pm 0,13$
Schild-Analyse	$7,36 \pm 0,14$	$8,76 \pm 0,12$	$0,89 \pm 0,14$
klassisches Verfahren	$7,70 \pm 0,07$ ($[^{35}S]$ GTP γ S)	$8,41 \pm 0,04$ ($[^3H]$ NMS-Gleichgewicht-Bindungsexperiment)	

Tab. 3.25: Pharmakologische Parameterwerte der Beeinflussung der Acetylcholin-vermittelten $[^{35}S]$ GTP γ S-Bindung durch Atr-Naph.

1. Zeile: Auswertung mit der globalen Analyse nach Waud (Waud et al., 1978).

2. Zeile: Auswertung mit der Analyse nach Arunlakshana und Schild (1959).

3. Zeile: Affinitätswerte aus anderen Verfahren, Acetylcholin: $[^{35}S]$ GTP γ S, siehe Tab. 3.33, Seite 227, Atr-Naph: $[^3H]$ NMS-Gleichgewicht-Bindungsexperiment, siehe Tab. 3.3, Seite 97.

pEC_{50} (ACh): Wendepunkt der Acetylcholin-Kurve (oben: globale Analyse, unten: Einzelanalyse),

pA_2 : Schnittpunkt der Schild-Geraden mit der Abszisse, Maß für die Affinität des Antagonisten,

Steigung: Steigung der Schild-Geraden. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

3.1.8.2 Bestimmung der invers agonistischen Eigenschaften der Hybridliganden in modifizierten [³⁵S]GTPγS-Experimenten

Die Absenkung der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung lässt sich in einem Milieu ohne einwertige Kationen am besten ermitteln, da hierbei die Spontanaktivität der Rezeptoren gefördert wird (Hilf und Jakobs 1992). Um zu überprüfen, ob die Verknüpfung zweier inverser Agonisten ebenfalls zu invers agonistischen Hybridliganden führt, wurden [³⁵S]GTPγS-Experimente mit den Atropin- und Scopolamin-haltigen Hybridverbindungen in einem Na⁺-armen Na,Mg,HEPES-Puffer (L 11) durchgeführt. Im Puffer verblieb wegen des HEPES/HEPES-Na⁺-Puffersystems ein Restnatriumgehalt von 4,2 mM. Da primär der maximale Effekt von Interesse war, wurden Konzentrationen eingesetzt, die in Gleichgewichtsbindungsstudien die [³H]NMS-Bindung vollständig inhibieren konnten. Die Effekte von je 1 μM, 3 μM und 10 μM auf die Basalaktivität des M₂-Rezeptors ist in Abb. 3.38 dargestellt. Die tagesaktuelle [³⁵S]GTPγS-Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz wurde als 100%, und die [³⁵S]GTPγS-Bindung in Gegenwart von 1 μM Atropin wurde als 0% definiert.

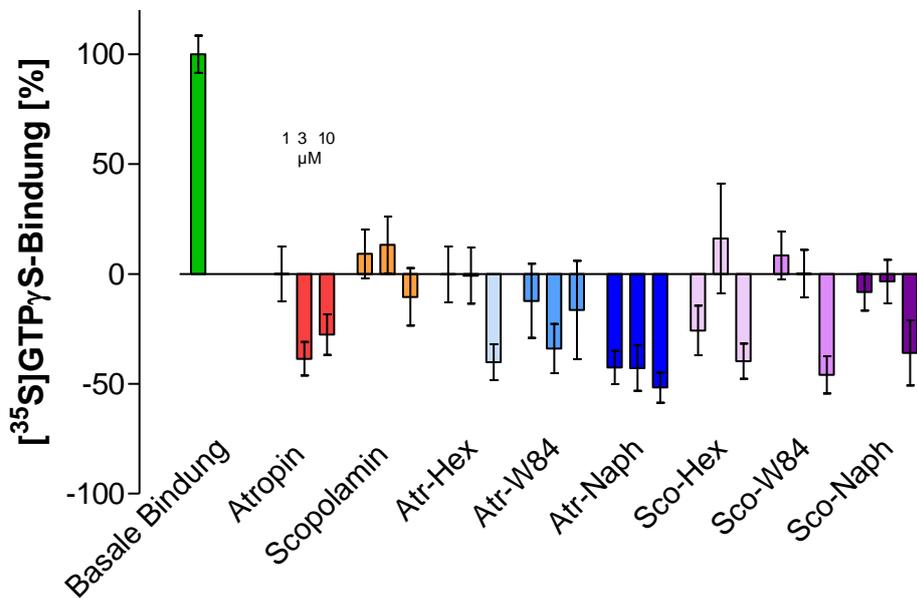


Abb. 3.38: Reduktion der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung durch verschiedene inverse Agonisten am M₂-Rezeptor.

Dargestellt sind maximale Effekte von Atropin, Scopolamin, sowie von diesen abgeleiteten Hybridliganden. Von links nach rechts sind jeweils die Effekte von 1 μM, 3 μM und 10 μM einer jeden Substanz abgebildet.

100% entspricht der basalen Bindung, 0% entspricht der [³⁵S]GTPγS-Bindung in Gegenwart von 1 μM Atropin des entsprechenden Versuchstages. Die Experimente wurden mit stabil trans-fiziertem CHO-Zellen in Na⁺-armem Na,Mg,HEPES-Puffer (L 11) mit einem Zusatz von 10 μM GDP in Gegenwart von 0,07 nM [³⁵S]GTPγS durchgeführt, der Proteingehalt betrug 50 μg/ml.

In Abb. 3.38 wird deutlich, dass keine der Verbindungen M_2 -Rezeptoren aktivieren konnte. Alle reduzierten signifikant in den eingesetzten Konzentrationen die Agonist-unabhängige Spontanaktivität. Es handelt sich offenbar bei allen Liganden um inverse Agonisten.

Angemerkt sei, dass meist angenommen wird, dass 1 μM Atropin zu einem maximalen invers agonistischen Effekt führt (Hilf und Jakobs, 1992). Im vorliegenden Testsystem konnte die [^{35}S]GTP γS -Bindung jedoch sowohl durch Atropin als auch durch die Hybridliganden noch weiter abgesenkt werden. Die Reduktion der Basalaktivität in Prozent sowie die statistischen Unterschiede sind in Tab. 3.26 aufgeführt.

	1 μM		3 μM		10 μM	
	Rezeptor-aktivierung [%]	n	Rezeptor-aktivierung [%]	n	Rezeptor-aktivierung [%]	n
Atropin	0,00 \pm 12,5	8	-38,6 \pm 7,60 ^{s1}	7	-27,6 \pm 9,18	7
Scopolamin	9,11 \pm 11,2	7	13,23 \pm 19,96	5	-10,5 \pm 10,0	5
Atr-Hex	-0,24 \pm 12,7	7	-0,74 \pm 12,8	8	-40,2 \pm 8,17 ^{s1}	8
Atr-W84	-12,2 \pm 16,9	6	-33,9 \pm 11,1	5	-16,4 \pm 22,4	3
Atr-Naph	-42,6 \pm 7,59 ^{s1}	6	-42,9 \pm 10,4 ^{s1}	6	-51,7 \pm 6,90 ^{s1}	6
Sco-Hex	-25,7 \pm 11,2	5	16,1 \pm 25,0	4	-39,6 \pm 8,03 ^{s1}	5
Sco-W84	8,44 \pm 10,9 ^{s10}	7	0,16 \pm 10,8	6	-45,9 \pm 8,49 ^{s1}	6
Sco-Naph	-8,29 \pm 8,42	6	-3,47 \pm 9,85	3	-35,94 \pm 14,8	4

Tab. 3.26: Einfluss der inversen Agonisten auf die spontane Rezeptoraktivierung des M_2 -Rezeptors in Na^+ -armem Puffer.

Die Rezeptoraktivität ohne Einfluss einer Testsubstanz (basale Bindung) entspricht 100%. 1 μM Atropin wurde verwendet, um den inaktiven Rezeptor darzustellen, dieser Wert wurde gleich 0% gesetzt. Die anderen Messungen wurden tagesaktuell auf diese beiden Fixpunkte bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

^{s1}: Signifikant verschieden von Atropin 1 μM (t-Test, $p < 0,05$).

^{s10}: Signifikant verschieden von Atropin 10 μM (t-Test, $p < 0,05$).

In Abb. 3.38 und in Tab. 3.26 zeigte sich die verhältnismäßig große Streuung der Versuchsergebnisse. Diese könnte dadurch erklärt werden, dass im Na^+ -armen Puffer die Spontanaktivität der Muskarinrezeptoren stark schwankt (siehe Kapitel 7.5, Seite 272). Durch die Prozentualisierung werden Messschwankungen weiter vergrößert. Wegen der starken Variabilität zwischen den Versuchstagen und mangelnder Reproduzierbarkeit konnten nur für

einige Hybridantagonisten Konzentrations-Effekt-Kurven aufgenommen werden. Die erhobenen Daten sind in Abb. 3.39 dargestellt.

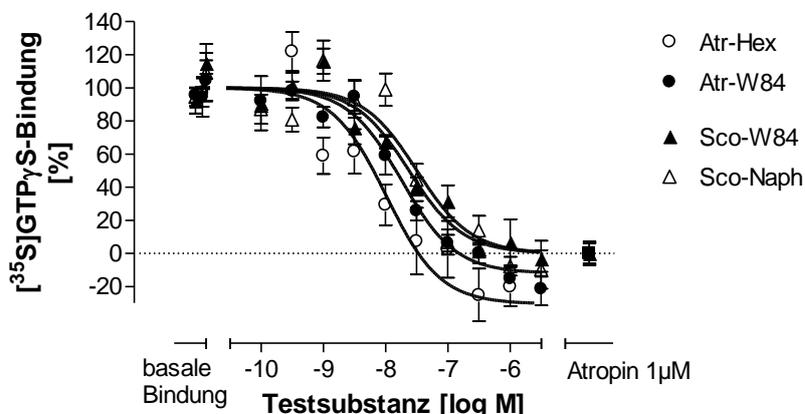


Abb. 3.39: Inhibition der basalen Bindung durch Hybridantagonisten am M_2 -Rezeptor.

Ordinate Gesamtbindung von $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht dem Effekt von $1\ \mu\text{M}$ Atropin, welcher als gepunktete Linie eingezeichnet ist. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten CHO-Zellen in Na^+ -armem $\text{Na},\text{Mg},\text{HEPES}$ -Puffer (L 11) mit einem Zusatz von $10\ \mu\text{M}$ GDP in Gegenwart von $0,07\ \text{nM}$ $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ durchgeführt, der Proteingehalt betrug $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Die beiden Hybridliganden Sco-W84 und Sco-Naph senkten die $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung bis auf den Wert von $1\ \mu\text{M}$ Atropin ab (unteres Plateau nicht signifikant verschieden von 0%). Die beiden untersuchten Atropin-Hybride waren an einigen Versuchstagen –sowie in der gezeigten Mittelwertskurve– in der Lage, den M_2 -Rezeptor stärker zu inaktivieren als $1\ \mu\text{M}$ Atropin.

Es kann gefolgert werden, dass die untersuchten Hybridliganden funktionell inverse Agonisten sind (Abb. 3.38, Seite 194). Die Kombination aus zwei inversen Agonisten führte wie erwartet ebenfalls zu inversen Agonisten.

	Atr-Hex	Atr-W84	Sco-W84	Sco-Naph
n	3	5	4	4
pEC₅₀	7,71 ± 0,52	7,95 ± 0,26	7,41 ± 0,21	7,44 ± 0,19
unteres Plateau	-36,2 ± 16,3 ⁺	-9,63 ± 7,49 ⁺	-8,23 ± 10,0	-15,8 ± 10,4
unteres Plateau ≠ 0	2/3	2/5	0/4	0/4

Tab. 3.27: Parameterwerte der Inhibition der spontanen Rezeptoraktivierung durch inverse Agonisten. Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. pEC₅₀: Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve, unteres Plateau ≠ 0: Anzahl der Einzelversuche, bei denen das untere Plateau signifikant verschieden von 0 war.
⁺: Das untere Plateau ist signifikant verschieden von 0% (F-Test, p<0,05).

3.1.8.3 DMR-Messungen

Alle bis jetzt dargestellten Ergebnisse sind an Rezeptoren aus Membranpräparationen durchgeführt worden. Sowohl durch die mechanischen Kräfte während der Präparation, als auch durch die gesteigert Expression durch Butyrat-haltiges Medium könnte die Rezeptor-umgebung verändert sein. Einflüsse auf dem G Protein nachgeschalteter Prozesse können an Membranpräparationen nicht gezeigt werden. Um den Einfluss eines ausgewählten Hybrid-antagonisten (Atr-Naph) an lebenden Zellen zu detektieren, wurde das System der dynamischen Massenumverteilung gewählt (DMR, Theorie und Durchführung siehe Kapitel 2.5.5, Seite 58). Die Signale einer Testsubstanz werden in diesem System in Echtzeit aufgezeichnet, so dass neben den funktionellen Effekten auch kinetische Eigenschaften bestimmt werden können.

Da sich die Originalregistrierungen zwischen den einzelnen Versuchstagen in ihrer Form leicht unterscheiden, sind in den folgenden Abbildungen repräsentative Einzelversuche dargestellt.

Aktivierung von M₂-Rezeptoren durch Acetylcholin

Um den Einfluss eines klassischen Agonisten auf die dynamische Massenumverteilung des M₂-Rezeptors zu detektieren, wurde der konzentrationsabhängige Einfluss von Acetylcholin bestimmt. Nach der Messung der Grundlinie über 100 s wurde die Testsubstanz zugegeben.

Acetylcholin führt bei CHO-Zellen zu einem aufwärts gerichteten Signal (Kebig et al., 2009), was einer Zunahme der optischen Dichte im detektierbaren Bereich entspricht. Dieser Effekt ist sensitiv gegenüber dem selektiven G_i-Inhibitor Pertussistoxin (Kebig et al., 2009, auch in

dieser Arbeit gezeigt in Abb. 3.52, Seite 210). Dadurch kann das Signal aus Abb. 3.40 als G_i -vermittelter Effekt interpretiert werden.

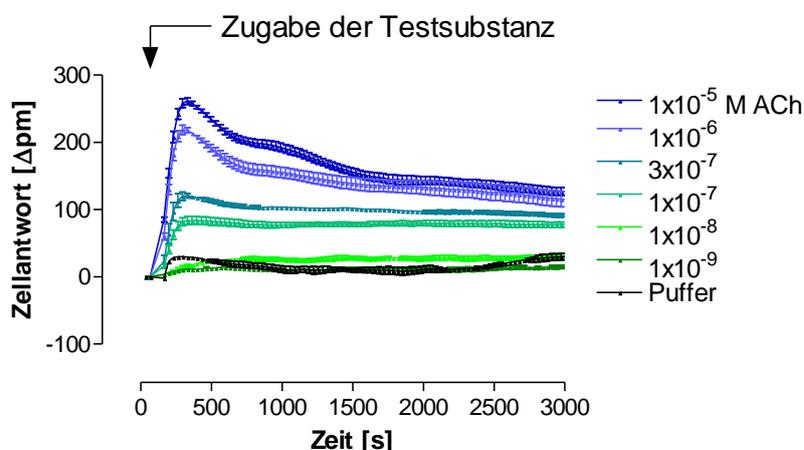


Abb. 3.40: Dynamische Massenumverteilung an CHO-M₂-Zellen durch aufsteigende Konzentrationen von Acetylcholin.

Dargestellt sind Originalregistrierungen eines repräsentativen Einzelversuchs in Vierfachbestimmung (Mittelwert \pm S.E:M.), die in analoger Weise an drei weiteren Versuchstagen wiederholt werden konnten. Die Datenpunkte wurden mit einer Linie verbunden. Die Versuche wurden an stabil transfizierten FlpIn CHO-M₂-Zellen in HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) durchgeführt. *Ordinate*: Zellantwort, detektiert als Wellenlängenverschiebung in pm. *Abszisse*: Zeit in s.

Der Effekt des Lösungsmittels (Puffer) befand sich auf dem Niveau der Zellantwort niedriger Acetylcholinkonzentrationen und zeigte keine deutliche Änderung gegenüber der Grundlinie. Die Konzentrationsabhängigkeit des Signals von Acetylcholin vier unabhängiger Einzelversuche ist in Abb. 3.41 dargestellt.

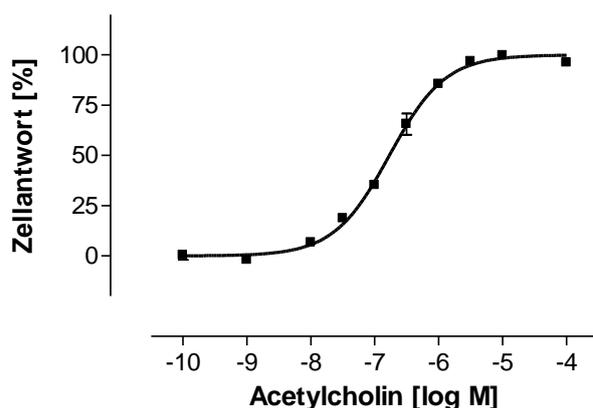


Abb. 3.41: Konzentrations-Effekt-Kurve der zellulären dynamischen Massenumverteilung an CHO-M₂-Zellen durch Acetylcholin.

Die Kurvenanpassung erfolgte nach Gleichung 11. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-M₂-Zellen in HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) durchgeführt. *Ordinate*: Zellantwort, detektiert als Wellenlängenverschiebung, normiert auf das obere und das untere Plateau. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Acetylcholinkonzentration. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Die Kurven der einzelnen Versuchstage wurden jeweils auf das obere und untere Plateau normiert worden. Das untere Plateau könnte auch auf den Puffer bezogen werden. Da an manchen Versuchstagen das Puffersignal jedoch erhöht war, zeigte sich das untere Plateau als der robustere Parameter.

Aus den vier Einzelversuchen ergibt sich für den Acetylcholineffekt ein pEC_{50} von $6,79 \pm 0,09$. Die Steigung der Kurve war mit $1,11 \pm 0,11$ nicht signifikant verschieden von 1. A. Kebig fand in ihrer Dissertation (2010) einen pEC_{50} für Acetylcholin von $7,53 \pm 0,09$. Dieser Wert ist signifikant größer als in der vorliegenden Arbeit, die Größenordnung konnte jedoch ungefähr bestätigt werden. Für die zusammengeführten Rohdaten ergab sich für das untere Plateau eine durchschnittliche Wellenlängenverschiebung von $12,48 \pm 3,37$ pm, was einem üblichen Puffersignal entspricht. Der Maximalwert lag bei 234 ± 14 pm.

Einfluss von Atropin, Naphmethonium, Atr-Naph und Forskolin auf CHO-M₂-Zellen

Der Einfluss der Hybridsubstanz Atr-Naph auf die M₂-Rezeptoraktivität sollte mit der Methode der dynamischen Massenumverteilung bestimmt werden. Die einzelnen Bausteine Atropin und Naphmethonium wurden als Vergleichssubstanzen mitgeführt.

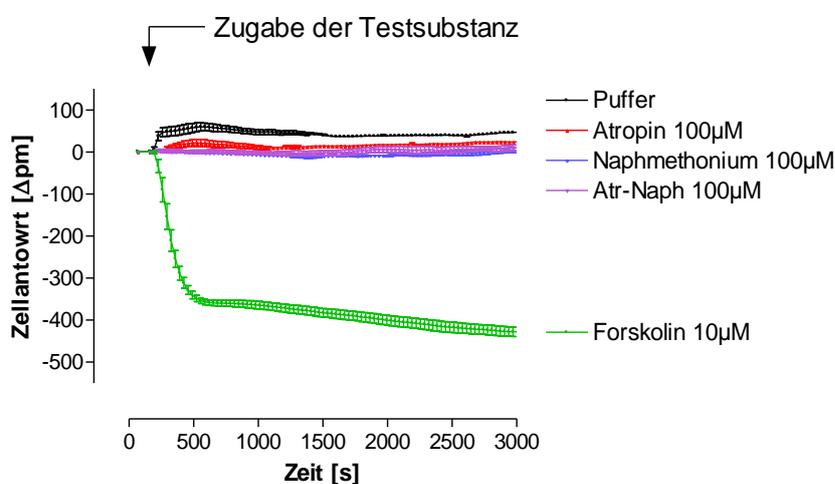


Abb. 3.42: Dynamische Massenumverteilung an CHO-M₂-Zellen durch die angegebenen Testsubstanzen.

Dargestellt sind Originalregistrierungen eines repräsentativen Einzelversuchs in Vierfachbestimmung (Mittelwert \pm S.E.M.), die in analoger Weise an mindestens zwei weiteren Versuchstagen wiederholt werden konnten. Die Versuche wurden an stabil transfizierten FlpIn CHO-M₂-Zellen in HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) durchgeführt. *Ordinate*: Zellantwort, detektiert als Wellenlängenverschiebung in pm. *Abszisse*: Zeit in s.

In Abb. 3.42 wird deutlich, dass keine der Testsubstanzen eine Veränderung gegenüber der Grundlinie bewirken konnte. Offenbar sind die Muskarinrezeptoren in CHO-Zellen nicht spontan aktiv, ansonsten hätte ein Einfluss durch der inversen Agonisten detektiert werden

müssen. Der direkte Adenylylcyclaseaktivator Forskolin zeigte ein nach unten gerichtetes Signal, was einer Abnahme der optischen Dichte im detektierbaren Bereich entspricht. Forskolin stimuliert in dieser Konzentration die Adenylylcyclase maximal (A. Kebig et al., 2009) und dauerhaft, was an dem ausgebildeten Plateau zu erkennen ist.

Einfluss von Atr-Naph auf die Acetylcholin-induzierte CHO-M₂-Aktivierung

Analog der [³⁵S]GTPγS-Versuche kann auch im System der dynamischen Massenumverteilung der Effekt von Antagonisten indirekt über den Einfluss auf die Agonist-induzierten Signale erfasst werden. Hierzu wurden zu den CHO-M₂-Zellen in einem ersten Schritt verschiedene Konzentrationen von Atr-Naph gegeben. Anschließend wurde die Signalhöhe von 1 μM Acetylcholin gemessen. Die graphischen Ergebnisse sind in Abb. 3.43 dargestellt.

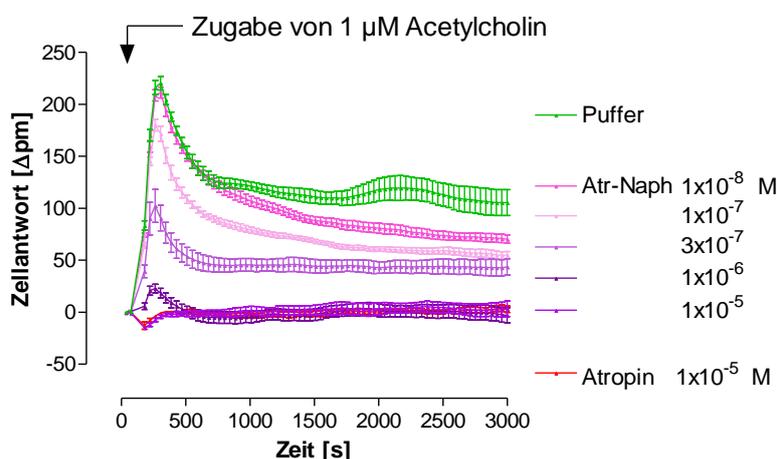


Abb. 3.43: Dynamische Massenumverteilung an CHO-M₂-Zellen durch 1 μM Acetylcholin nach Vorinkubation verschiedener Konzentrationen von Atr-Naph.

Dargestellt sind Originalregistrierungen eines repräsentativen Einzelversuchs in Vierfachbestimmung (Mittelwert ± S.E.M.), die in analoger Weise an drei weiteren Versuchstagen wiederholt werden konnten. Die Datenpunkte wurden mit einer Linie verbunden. Die Versuche wurden an stabil transfizierten FlpIn CHO-M₂-Zellen in HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) durchgeführt. *Ordinate*: Zellantwort, detektiert als Wellenlängenverschiebung in pm. *Abszisse*: Zeit in s.

Wie im [³⁵S]GTPγS-Versuch war Atr-Naph konzentrationsabhängig in der Lage, den Acetylcholin-vermittelten Effekt auf das DMR-Signal zu reduzieren. Bei niedrigen Atr-Naph Konzentrationen war die Signalhöhe äquivalent mit einem Versuchsansatz, bei dem die Rezeptoren mit dem Inkubationspuffer vorbehandelt worden sind. Eine hohe Atropindosis von 10 μM veränderte nicht die Basislinie. Bei hohen Konzentrationen von Atr-Naph konnte 1 μM Acetylcholin wie unter Atropinzusatz den M₂-Rezeptor nicht mehr aktivieren. Die quantitative Auswertung erfolgte nach Waud (Waud et al., 1978) (siehe Abb. 3.44).

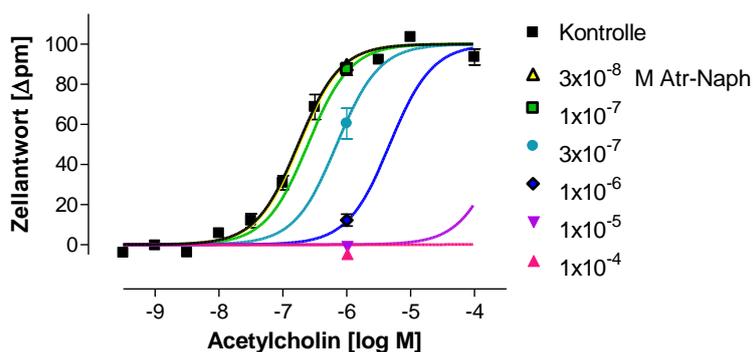


Abb. 3.44: Einfluss des Hybridliganden Atr-Naph auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M₂-Zellen.

Dargestellt ist der Effekt aufsteigender molarer Konzentrationen von Atr-Naph auf die durch 1 μ M Acetylcholin-induzierte DMR sowie eine Acetylcholin Konzentrations-Effekt-Kurve in Abwesenheit der Testsubstanz. *Ordinate:* Zellantwort, detektiert als Wellenlängenverschiebung, normiert auf das obere und das untere Plateau. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration. Die Datensätze wurden nach Gleichung 26 (Analyse nach Waud) ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten CHO-M₂-Zellen in HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Aus der Analyse nach Waud ergab sich für Acetylcholin ein pEC₅₀-Wert von $6,73 \pm 0,05$ und für Atr-Naph ein pA₂-Wert von $6,72 \pm 0,14$. Das Steilheitsmaß der berechneten Schildgeraden war signifikant steiler als 1.

Inhibition vorstimulierter M₂-Rezeptoren durch Atropin, Naphmethonium und Atr-Naph im DMR-Versuch

Um den Effekt von inversen Agonisten sichtbar zu machen, wurden die CHO-M₂-Zellen vor der Antagonistzugabe für ca. 10 min mit 10 μ M Acetylcholin vorstimuliert. Dieser Zeitpunkt lag nach dem anfänglichen transienten Maximaleffekt (\sim 200 s nach der Zugabe) und zu dieser Zeit wies der DMR-Verlauf meist ein Plateau auf (siehe z.B. in Abb. 3.40, Seite 198). Dies war von Interesse, um eine möglichst gleichmäßige Stimulation und ein kleines Hintergrundsignal bei der Messung des Antagonist-Effekts zu erreichen.

Für die praktische Durchführungen waren zwei separate Messungen nötig. In einem ersten Schritt wurde das Signal von Acetylcholin aufgenommen, dann wurde der Versuch abgebrochen und die Platte mit den Testsubstanzen gewechselt. In einem zweiten Lauf wurde der Effekt der Testsubstanz auf die vorstimulierten Zellen aufgenommen. Eine beispielhafte Originalregistrierung von Atr-Naph nach ACh-Vorstimulation ist in Abb. 3.45 dargestellt.

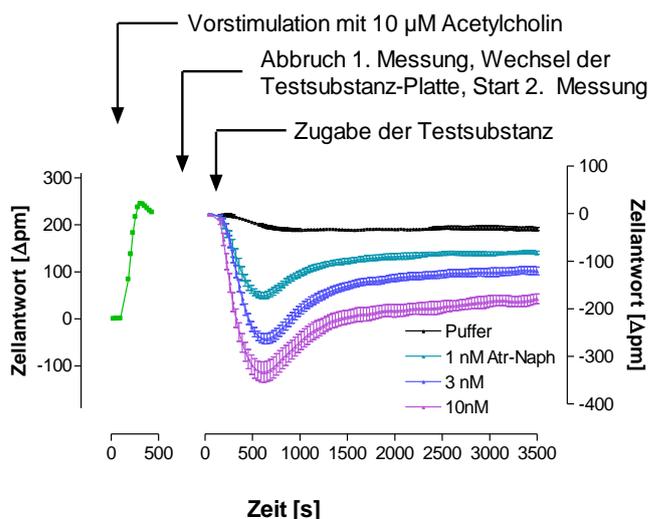


Abb. 3.45: Aufbau der Messung des Einflusses antagonistischer Testsubstanzen auf mit 10 µM Acetylcholin vorstimulierte CHO-M₂-Zellen.

Dargestellt sind Originalregistrierungen repräsentativer Einzelversuche in Vierfachbestimmung (Mittelwert ± S.E.M.), die in analoger Weise an mindestens zwei weiteren Versuchstagen wiederholt werden konnten. Die Datenpunkte wurden mit einer Linie verbunden. Die Versuche wurden an stabil transfizierten FlpIn CHO-M₂-Zellen in HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) durchgeführt, die in einem ersten Schritt mit 10 µM Acetylcholin für ~600 s vorinkubiert wurden. *Ordinate*: Zellantwort, detektiert als Wellenlängenverschiebung in pm. *Abszisse*: Zeit in s.

Bei jeder Messung wird der Startwert auf 0 s und 0 pm festgesetzt (siehe Abb. 3.45). Um beide Läufe in einer Graphik abbilden zu können, wurde der Mittelwert des letzten gemessenen Acetylcholin-Wertes als Ausgangspunkt für die Messung der Testsubstanz angenommen und auf die Messwerte addiert. Der Zeitpunkt der zweiten Messung wurde um die Zeit korrigiert, die bereits seit dem Start der ersten Messung verstrichen war.

Die so modifizierten Effekte von Atropin, Naphmethonium und Atr-Naph auf aktivierte CHO-M₂-Zellen sind in Abb. 3.46 dargestellt.

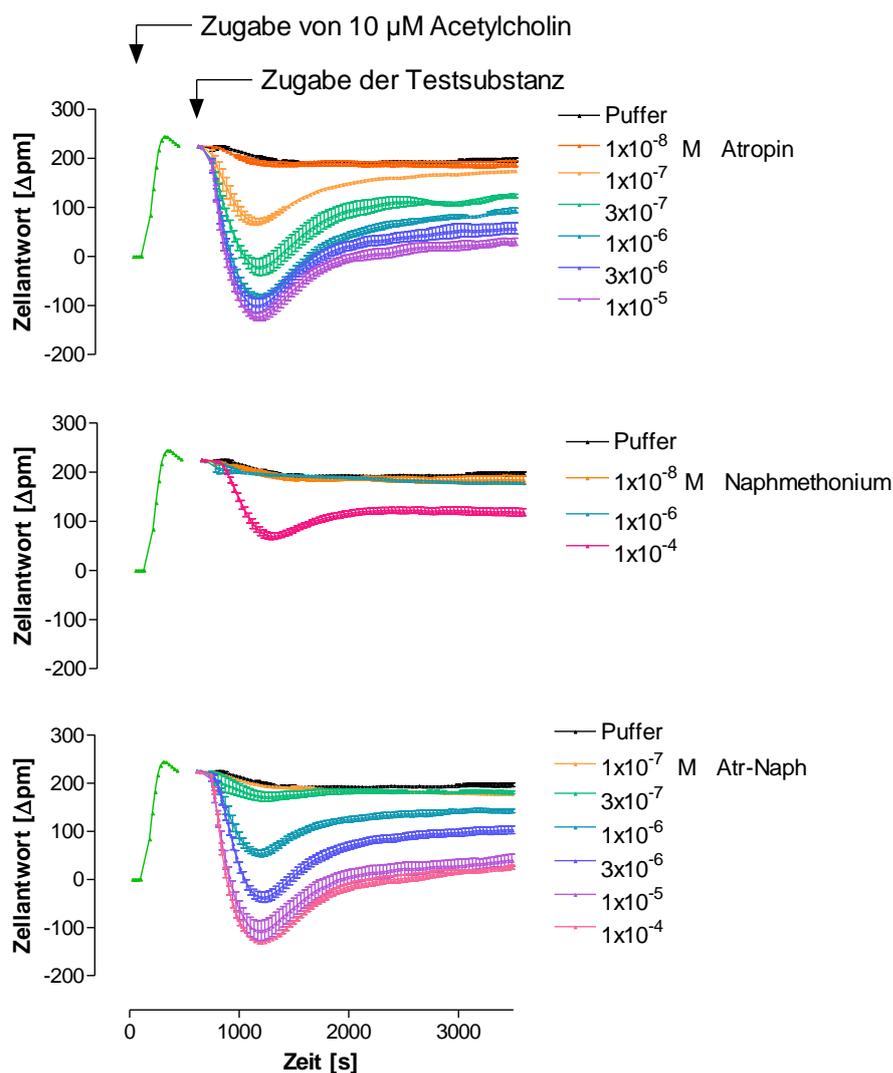


Abb. 3.46: Beeinflussung der Acetylcholin-induzierten dynamischen Massenumverteilung durch Atropin, Naphmethonium und Atr-Naph in CHO-M₂-Zellen.

Dargestellt sind modifizierte Originalregistrierungen repräsentativer Einzelversuche in Vierfachbestimmung (Mittelwert \pm S.E:M.), die in analoger Weise an mindestens zwei weiteren Versuchstagen wiederholt werden konnten. Die Datenpunkte wurden mit einer Linie verbunden. Die Versuche wurden an stabil transfizierten FlpIn CHO-M₂-Zellen in HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) durchgeführt, die in einem ersten Schritt mit 10 μ M Acetylcholin für ~600 s vorinkubiert wurden. *Ordinate:* Zellantwort, detektiert als Wellenlängenverschiebung in pm. *Abszisse:* Zeit in s.

Alle drei inversen Agonisten senkten das Acetylcholinsignal konzentrationsabhängig. Bei Atropin und Atr-Naph wurde das Signal anfänglich stärker als der Ausgangswert gesenkt. Dies lässt auf eine Gegenregulation der Zellen nach der starken Agoniststimulation schließen. Auch Naphmethonium inhibierte das Agonistsignal. Da Konzentrationen über 100 μ M in DMR-Messungen unspezifische Effekte induzierten, konnte hier der Maximaleffekt nicht bestimmt werden.

Die maximalen Wellenlängenverschiebungen der ersten 1000 s nach Zugabe des Antagonisten wurden bestimmt und sind als Konzentrations-Effekt-Kurve in Abb. 3.47 dargestellt.

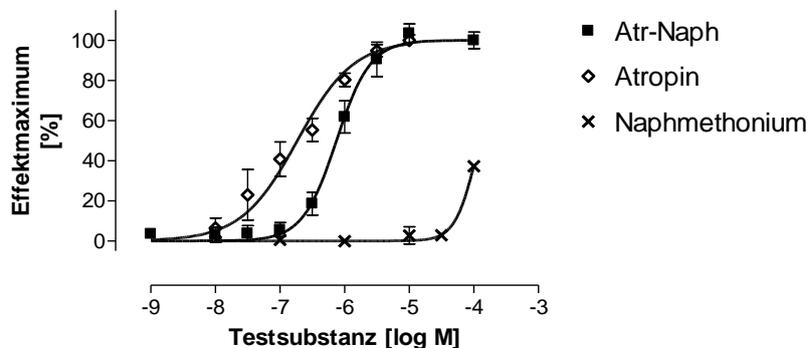


Abb. 3.47: Konzentrations-Effekt-Kurven des inhibitorischen Effekts der drei Antagonisten auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO-M₂-Zellen.

Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-M₂-Zellen in HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) nach Vorstimulation mit 10 μ M Acetylcholin durchgeführt. *Ordinate*: Effektmaxima, detektiert als Wellenlängenverschiebung, normiert auf das obere und das untere Plateau. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Tests substanz. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Wie bereits in Abb. 3.46 (Seite 203) zu erkennen war, sind die Effekte von Atropin und Atr-Naph auf vorstimulierte M₂-Rezeptoren ähnlich. In Abb. 3.47 zeigte sich zwar eine höhere Affinität von Atropin, die allerdings nicht signifikant war. Die Steigung der Konzentrations-Effekt-Kurve von Atr-Naph war signifikant verschieden von 1. Einige Einzelkurven konnten zwar mit einer Steilheit von 1 angepasst werden, die freilaufende Anpassung entsprach jedoch immer einem steilen Kurvenverlauf. Die aus den Konzentrations-Effekt-Kurven berechneten Parameterwerte sind in Tab. 3.28 aufgeführt.

10 μ M Acetylcholin ist eine „supramaximal“ wirksame Konzentration. Um den Effekt dieser hohen Konzentration aufzuheben, sind weit höhere Konzentrationen durch inverse Agonisten erforderlich als für eine halbmaximale Rezeptorbesetzung in Abwesenheit eines Agonisten. Dementsprechend sind die in Tab. 3.28 aufgeführten pEC₅₀-Werte deutlich höher als die Bindungskonstanten der inversen Agonisten (pK_A, in Tab. 3.28 als Vergleich angegeben). Dennoch ist bemerkenswert, dass die invers agonistische Wirksamkeit von Naphmethonium im DMR-Versuch um ca. 3 Dekaden niedriger ist als die von Atropin und Atr-Naph, während die pK_A-Werte sich nur um etwa 1 Dekade unterschieden. Dies könnte durch den Wechsel der Inkubationsbedingungen vom Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10), welcher in den Gleichgewichts-

bindungsexperimenten verwendet wurde, zum HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) in den DMR-Ansätzen erklärt werden. Der in der DMR verwendete Puffer weist eine höhere Ionenstärke auf. Straßmann (Dissertation 2007) konnte zeigen, dass allosterische Modulatoren beim Wechsel der Inkubationsbedingungen zu einer höheren Ionenstärke deutlich an Affinität verloren, wohingegen die Bindung von orthosterischen Antagonisten unbeeinflusst blieb. Dies ist kongruent mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen. Die Tatsache, dass Atropin durch den Wechsel der Inkubationsbedingungen weniger an Affinität verliert als Atr-Naph (1,3 bzw. 2,4 Dekaden) kann als weiterer Hinweis für eine dualsterische Interaktion angesehen werden.

	Atropin	Naphmethonium	Atr-Naph
n	3	2	3
n_H	0,95 ± 0,16	k.A.	1,57 ± 0,09 [#]
pEC₅₀	6,97 ± 0,45	3,75 ± 0,03 ^E	6,12 ± 0,14
pK_A	8,30 ± 0,08	7,70 ± 0,12	8,55 ± 0,02

Tab. 3.28: Pharmakologische Parameterwerte des Effekts von Antagonisten auf die dynamische Massenumverteilung von CHO-M₂-Zellen, die zuvor mit 10 µM Acetylcholin vorstimuliert wurden.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, pEC₅₀: Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve, pK_A: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A (Werte aus Tab. 3.7 und Tab. 3.8, Seite 113 bzw. 118), k.A.: Die Kurvensteilheit war nicht sinnvoll zu bestimmen, da nur ein Teil der Kurve erfasst wurde.

[#]: Steilheitsmaß n_H signifikant verschieden von 1 (F-Test, p<0,05).

^E: Extrapolierter Wert.

Um die kinetischen Eigenschaften der einzelnen Bausteine mit denen des Hybridliganden zu vergleichen, sind in Abb. 3.48 die Signale der drei Antagonisten übereinander gelegt. Links sind die detektierten Maximaleffekte, rechts die ungefähr halbmaximalen Signale gezeigt.

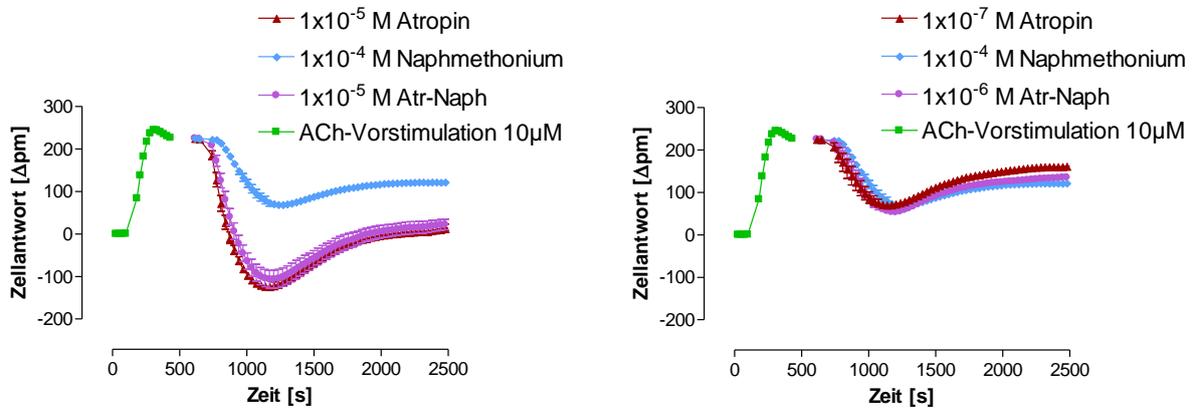


Abb. 3.48: Vergleich des maximalen (links) und des halbmaximalen (rechts) Effekts der untersuchten Antagonisten auf mit ACh-vorstimulierte CHO-M₂-Zellen eines Versuchstages. Dargestellt sind die Effektverläufe der angegebenen Konzentrationen aus Abb. 3.46 (Seite 203), zu Versuchsbedingungen siehe dortige Legende. *Ordinate:* Zellantwort, detektiert als Wellenlängenschiebung in pm. *Abszisse:* Zeit in s.

Aus Abb. 3.48 ergab sich kein Hinweis auf eine langsamere Effektkinetik des Hybridantagonisten im Verhältnis zu den Ausgangsverbindungen.

Es ist bislang nicht bekannt, was der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für den Signalverlauf bei der DMR-Messung ist. Neben der Bindung der Testsubstanzen an den Rezeptor sind auch Diffusionswege oder Signaltransduktionsprozesse wie die Umstrukturierung von intrazellulären Bestandteilen als entscheidende Faktoren denkbar. So ist nicht auszuschließen, dass die Rezeptorkinetik von Atr-Naph langsamer ist als die der Muttersubstanz Atropin ohne dass sich dies in der Effektkinetik bemerkbar macht.

Zusammengefasst konnte weder in den Assoziationsexperimenten (Kapitel 3.1.7, Seite 187) noch in DMR-Messungen eine verzögerte Rezeptorkinetik des Hybridliganden Atr-Naph im Vergleich zu Atropin detektiert werden. Für die Beantwortung dieser Fragestellung wären Techniken nötig, die nicht im Minutenmaßstab messen, sondern wenige Sekunden oder Millisekunden auflösen können. Dies könnte z.B. mit der FRET-Methode (Förster Resonanzenergietransfer) erfolgen (Maier-Peuschel et al., 2010).

Einfluss einer Vorstimulation mit Forskolin auf die Interaktion von Acetylcholin, Atropin und Atr-Naph mit M_2 -Rezeptoren

Wie bereits in Abb. 3.42 (Seite 199) gezeigt kommt es in Anwesenheit des direkten Adenylylcyclaseaktivators Forskolin an CHO-Zellen zu einem negativen DMR-Signal. Da Forskolin die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht, sollte ein Inhibitor der cAMP-Bildung unter dieser Bedingung eine besonders deutliche DMR-Antwort erzielen. Tatsächlich steigt unter einer Vorstimulation für 2 h mit 10 μM Forskolin das G_i -Signal von muskarinischen Vollagonisten an M_2 -Rezeptoren aus CHO-Zellen an (Kebig et al., 2009). Dies ist für Acetylcholin in Abb. 3.49 illustriert.

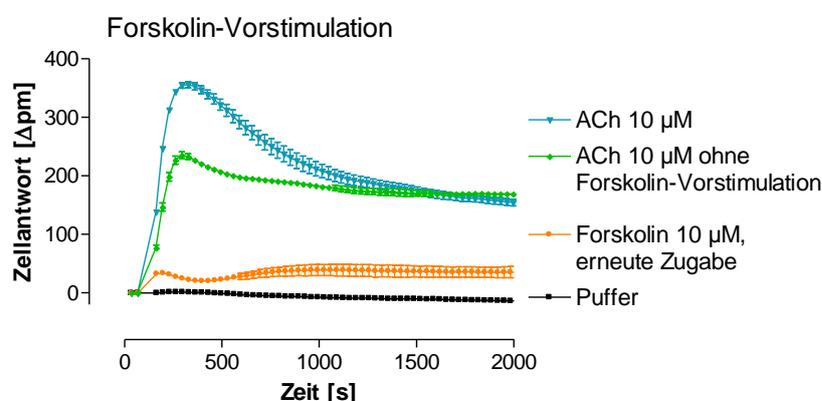


Abb. 3.49: Einfluss einer Vorstimulation mit Forskolin auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung an CHO- M_2 -Zellen.

Beeinflussung des Acetylcholinsignals durch eine Vorstimulation mit 10 μM Forskolin für 2 h. Dargestellt sind Originalregistrierungen repräsentativer Einzelversuche in Vierfachbestimmung (Mittelwert \pm S.E.:M.), die in analoger Weise an mindestens zwei weiteren Versuchstagen wiederholt werden konnten. Die Datenpunkte wurden mit einer Linie verbunden. Die Versuche wurden an stabil transfizierten FlpIn CHO- M_2 -Zellen in HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) durchgeführt. *Ordinate:* Zellantwort, detektiert als Wellenlängenverschiebung in pm. *Abszisse:* Zeit in s.

Durch die Vorstimulation mit Forskolin wird die Adenylylcyclase maximal aktiviert und die nachgeschalteten Signalwege sind aktiv. Eine erneute Zugabe von Forskolin führte zu keinem weiteren Effekt. Das Acetylcholinsignal nahm von einem Maximaleffekt von ~ 250 pm auf knapp 400 pm durch die Vorstimulation mit Forskolin zu. Das Puffersignal blieb unbeeinflusst.

In diesem Kapitel soll untersucht werden, ob Atr-Naph auch das erhöhte Acetylcholinsignal nach Forskolin-Vorstimulation antagonisieren kann. Die entsprechenden Registrierungen sind in Abb. 3.50 dargestellt.

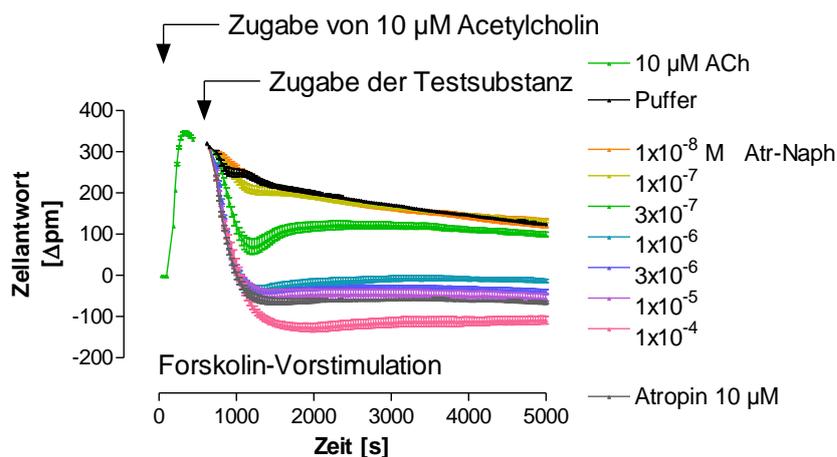


Abb. 3.50: Beeinflussung der durch Forskolin verstärkten Acetylcholin-induzierten dynamischen Massenumverteilung durch Atr-Naph an CHO-M₂-Zellen.

Dargestellt sind modifizierte Originalregistrierungen eines repräsentativen Einzelversuchs in Vierfachbestimmung (Mittelwert \pm S.E.:M.), die in analoger Weise an zwei weiteren Versuchstagen wiederholt werden konnten. Die Datenpunkte wurden mit einer Linie verbunden. Die Versuche wurden an stabil transfizierte FIpIn CHO-M₂-Zellen in HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) durchgeführt, deren M₂-Rezeptoren in einem ersten Schritt mit 10 μ M Acetylcholin für ~600 s vorinkubiert wurden. Vor dem Versuch erfolgte eine Stimulation mit 10 μ M Forskolin für 2 h. *Ordinate*: Zellantwort, detektiert als Wellenlängenverschiebung in pm. *Abszisse*: Zeit in s.

Aus Abb. 3.50 ist ersichtlich, dass der Hybridantagonist Atr-Naph auch das durch Forskolin verstärkte Acetylcholinsignal vollständig inhibieren konnte. Die Modifikation der Originaldaten erfolgte wie bei Abb. 3.45 beschrieben. Es deutete sich wieder ein Überschwingen des Effektes an, das in diesem Fall jedoch anhielt, das heißt, dass es sich nicht nach wenigen Minuten wieder auf das Ausgangsniveau zurückbildete.

Die aus Abb. 3.50 resultierende Konzentrations-Effekt-Kurve ist in Abb. 3.51 dargestellt.

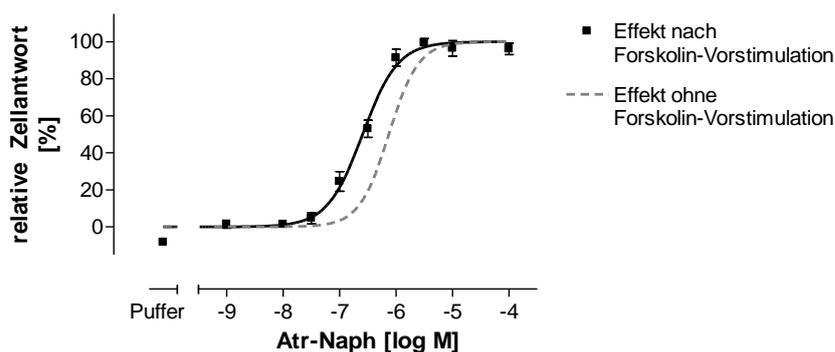


Abb. 3.51: Konzentrations-Wirkungs-Kurve des inhibitorischen Effekts von Atr-Naph auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung nach Forskolinvorstimulation an CHO-M₂-Zellen.

Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-M₂-Zellen in HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) nach Vorstimulation mit 10 μM Acetylcholin durchgeführt. Vor dem Versuch erfolgte eine Stimulation mit 10 μM Forskolin für 2 h. Zum Vergleich ist die Atr-Naph-Kurve ohne Forskolin-Vorbehandlung aus Abb. 3.47 (Seite 204) als gestrichelte Linie abgebildet. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. *Ordinate*: relative Zellantwort, detektiert als Wellenlängenverschiebung, normiert auf das obere und das untere Plateau. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Atr-Naph. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Der Wendepunkt des Effekts unter Forskolin-Vorbehandlung war mit $pEC_{50} = 6,63 \pm 0,10$ signifikant höher als die Wirksamkeit unter Kontrollbedingungen ($pEC_{50} = 6,12 \pm 0,14$). Die Parameterwerte sind in Tab. 3.29 (Seite 212) aufgeführt.

Einfluss von Pertussistoxin auf die Interaktion von Acetylcholin, Atropin und Atr-Naph mit M₂-Rezeptoren

Die in den vorherigen Abbildungen gezeigten aufwärts gerichteten Signale wurden als G_i-vermittelte Effekte interpretiert. Zum Nachweis dieser These wurden Versuche mit Pertussistoxin (PTX) durchgeführt (Antony et al., 2009). PTX ist ein direkter Hemmstoff der G_i-Proteine, die durch Ribosylierung der α-Untereinheit irreversibel geschädigt werden. Folglich kann die mit PTX behandelte Zelle die Adenylylcyclase nicht mehr über G_i Protein gekoppelte Rezeptoren inhibieren.

Da für M₂-Rezeptoren in der Literatur sowohl eine Kopplung an G_i als auch an stimulierende G_s-Proteine beschrieben ist (Mistry et al., 2005; Antony et al., 2009), sollte diese Promiskuität im folgenden Kapitel gezeigt werden. Es galt zu untersuchen, ob die Hybridverbindung Atr-Naph wie Atropin G_s vermittelte Signalwege antagonisieren kann. Die Hybridagonisten Iper-W84 und Iper-Naph können die Zelle nur über den G_i Weg aktivieren, und zeigten keine Effekte an PTX-vorbehandelten Zellen (Antony et al., 2009).

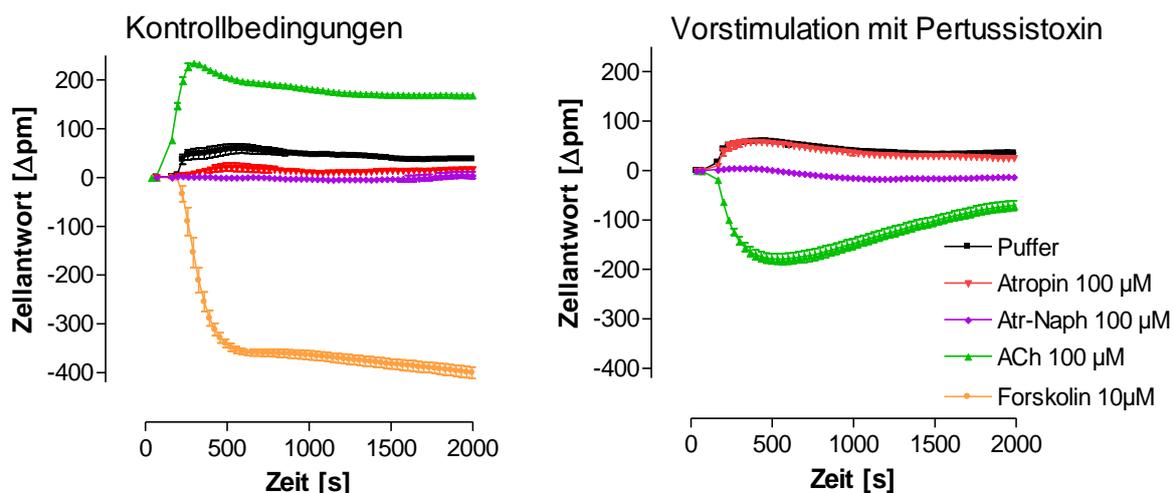


Abb. 3.52: Einfluss einer Vorstimulation mit Pertussistoxin auf die dynamische Massenumverteilung an CHO-M₂-Zellen.

Links: Kontrollbedingungen ohne Vorstimulation, **rechts:** Beeinflussung des Acetylcholinsignals durch eine Vorstimulation mit 100 ng/ml Pertussistoxin für 20 h. Dargestellt sind Originalregistrierungen repräsentativer Einzelversuche in Vierfachbestimmung (Mittelwert ± S.E.:M.), die in analoger Weise an mindestens zwei weiteren Versuchstagen wiederholt werden konnten. Die Datenpunkte wurden mit einer Linie verbunden. Die Versuche wurden an stabil transfizierten FlpIn CHO-M₂-Zellen in HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) durchgeführt. *Ordinate:* Zellantwort, detektiert als Wellenlängenverschiebung in pm. *Abszisse:* Zeit in s.

In Abb. 3.52 ist der Einfluss von Pertussistoxin auf die Signale verschiedener muskarinergere Liganden sowie auf Forskolin im Vergleich zu Kontrollbedingungen dargestellt. Der deutlichste Unterschied zeigte sich im Acetylcholinsignal. Unter Kontrollbedingungen ergab sich eine positive Massenverschiebung, die einer G_i-Aktivierung entsprach. Nach der Behandlung mit Pertussistoxin zeigte sich eine negative Massenverschiebung wie unter Forskolin. Folglich kann dieses Signal als Anstieg von cAMP in der Zelle gedeutet werden, der durch eine G_s-Aktivierung induziert wurde. Atropin und Atr-Naph zeigten keine Effekte. Der Einfluss von Atr-Naph auf das Acetylcholin-induzierte G_s-Signal ist in Abb. 3.53 dargestellt. Die Modifikation der Abbildung erfolgte wie eingangs erläutert.

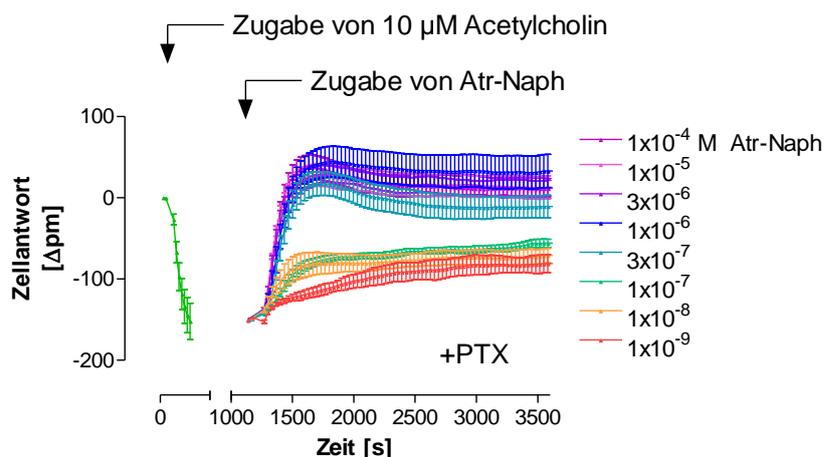


Abb. 3.53: Beeinflussung der Acetylcholin-induzierten dynamischen Massenumverteilung durch Atr-Naph an CHO-M₂-Zellen nach Vorstimulation mit Pertussistoxin.

Dargestellt sind modifizierte Originalregistrierungen eines repräsentativen Einzelversuchs in Vierfachbestimmung (Mittelwert \pm S.E.M.), die in analoger Weise an zwei weiteren Versuchstagen wiederholt werden konnten. Die Datenpunkte wurden mit einer Linie verbunden. Die Versuche wurden an stabil transfizierten FlpIn CHO-M₂-Zellen in HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) durchgeführt, deren M₂-Rezeptoren in einem ersten Schritt mit 10 μ M Acetylcholin für \sim 1000 s vorinkubiert wurden. Vor dem Versuch erfolgte eine Stimulation mit 100 ng/ml Pertussistoxin für 20 h. *Ordinate*: Zellantwort, detektiert als Wellenlängenverschiebung in pm. *Abszisse*: Zeit in s.

In Abb. 3.53 zeigte sich, dass der Hybridligand Atr-Naph auch das Acetylcholin-vermittelte G_s-Signal konzentrationsabhängig antagonisieren konnte. Die resultierende Konzentrations-Effekt-Beziehung ist in Abb. 3.54 dargestellt.

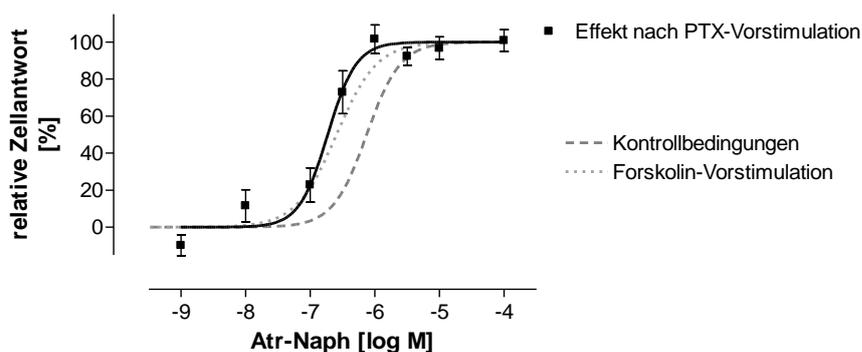


Abb. 3.54: Konzentrations-Wirkungs-Kurve des inhibitorischen Effekts von Atr-Naph auf die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung nach PTX-Vorstimulation an CHO-M₂-Zellen.

Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-M₂-Zellen in HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) nach Vorstimulation mit 10 μ M Acetylcholin durchgeführt. Vor dem Versuch erfolgte eine Stimulation mit 100 ng/ml Pertussistoxin für 20 h. Zum Vergleich sind die Kurven nach Forskolin-Vorstimulation und unter Kontrollbedingungen abgebildet. *Ordinate*: relative Zellantwort, detektiert als Wellenlängenverschiebung, normiert auf das obere und das untere Plateau. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Atr-Naph. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Sowohl in Abb. 3.54 als auch in Tab. 3.29 wird ersichtlich, dass Atr-Naph die Acetylcholin-vermittelte dynamische Massenverschiebung unter allen untersuchten Bedingungen in nahezu denselben Konzentrationen inhibierte. Die Kurvenverläufe waren immer steiler als 1.

Zusammengefasst konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass sich Atr-Naph –wie erwartet- funktionell als Antagonist verhält, der darüber hinaus an aktivierten M₂-Rezeptoren eine invers agonistische Wirkung aufweist. Dies gilt sowohl für den G_i- als auch für den G_s-Weg des M₂-Rezeptors.

	Kontrollbedingungen	Forskolin-Vorstimulation	Pertussistoxin-Vorstimulation
n	3	3	2
pEC₅₀	6,12 ± 0,14	6,63 ± 0,10 ^s	6,75 ± 0,02 ^s
n_H	1,57 ± 0,09 [#]	1,62 ± 0,50 [#]	2,19 ± 1,00 [#]

Tab. 3.29: Pharmakologische Parameterwerte des Effekts von Atr-Naph auf die dynamische Massenumverteilung mit ACh vorstimulierter CHO-M₂-Zellen.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, pEC₅₀: Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve.

^s: Wert signifikant verschieden von den Kontrollbedingungen (t-Test, p<0,05).

[#]: Steilheitsmaß n_H signifikant verschieden von 1 (F-Test, p<0,05).

Kontrollversuche der DMR-Messungen an untransfizierten FlpIn CHO-Zellen

Zur Überprüfung, ob die in Kapitel 3.1.8.3 (Seite 197) erhobenen Signale spezifisch durch den M₂-Rezeptor hervorgerufen wurden, wird im Folgenden der Einfluss der Testsubstanzen auf untransfizierte CHO-Zellen dargestellt.

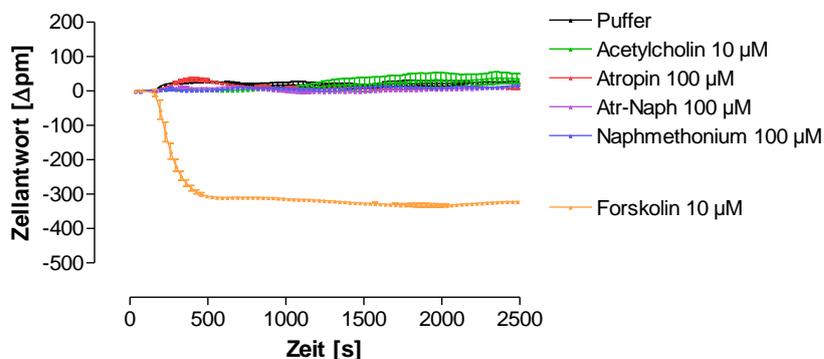


Abb. 3.55: Dynamische Massenumverteilung an untransfizierten CHO-Zellen durch die angegebenen Testsubstanzen.

Dargestellt sind Originalregistrierungen eines repräsentativen Einzelversuchs in Vierfachbestimmung, die in analoger Weise an mindestens zwei weiteren Versuchstagen wiederholt werden konnten. Die Versuche wurden an untransfizierten FlpIn CHO-Zellen in HBSS-Puffer mit 20 mM HEPES (L 7) durchgeführt. *Ordinate*: Zellantwort, detektiert als Wellenlängenverschiebung in pm. *Abszisse*: Zeit in s.

Keiner der muskarinischen Liganden löste in Abb. 3.55 eine vom Puffer verschiedene Massenverschiebung aus. Folglich wurden die zuvor dargestellten Signale spezifisch über den M₂-Rezeptor ausgelöst. Auch durch eine Vorstimulation der Zellen mit Acetylcholin, Forskolin oder Pertussistoxin wurde keine Zellantwort detektiert (Daten nicht gezeigt). Forskolin als direkter Stimulator der Adenylylcyclase führte auch an untransfizierten Zellen zu einer negativen Massenumverteilung.

3.2 Beeinflussung der Agonistbindung durch Anwesenheit von Guanosindiphosphat

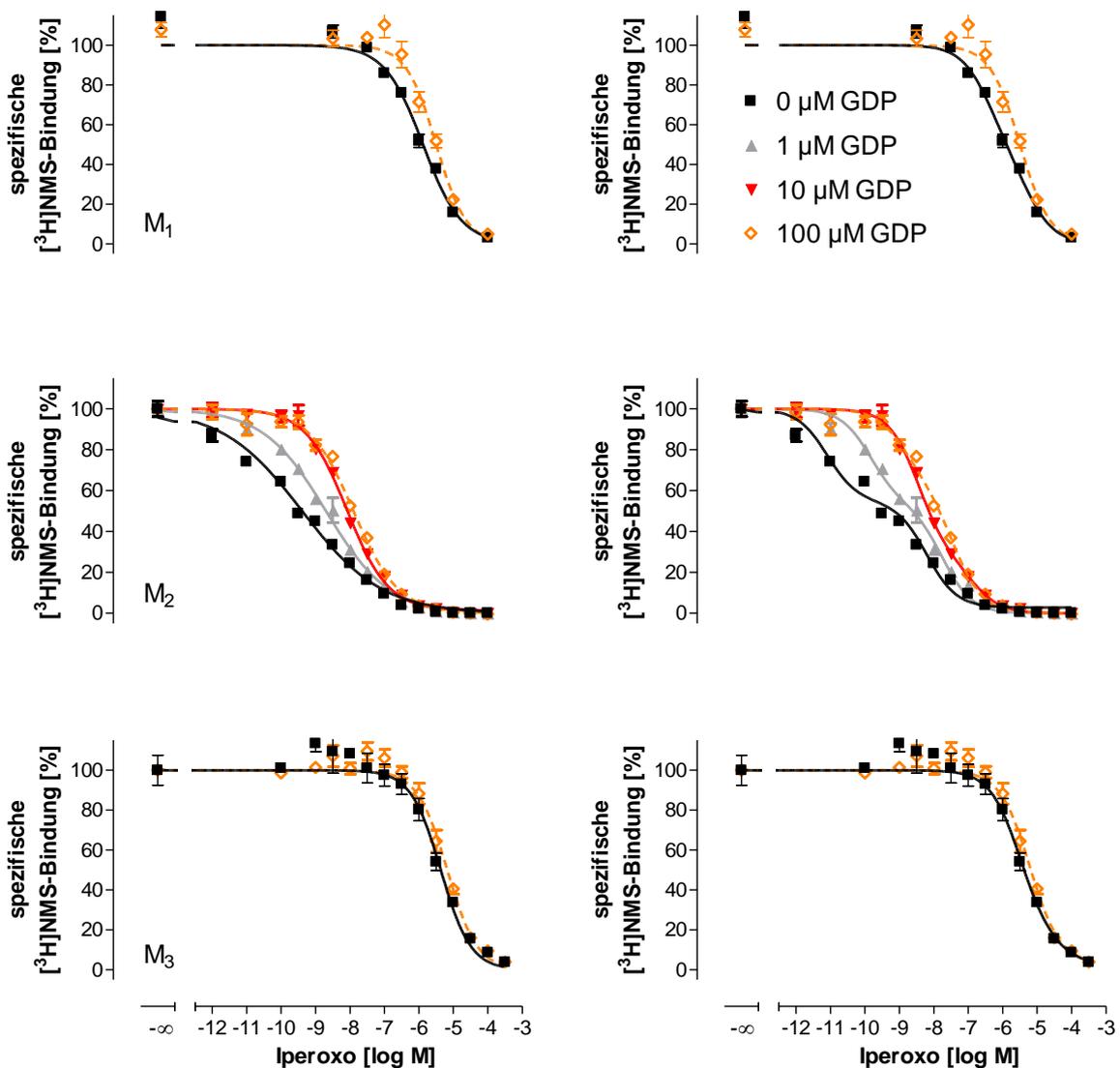
Die Eigenschaften von G Protein-gekoppelten Rezeptoren sind abhängig von der Nukleotidkonzentration im Medium (Giersbergen und Leppik, 1995). In Versuchsansätzen zur Messung der [³⁵S]GTP γ S-Bindung wurde standardmäßig GDP zugesetzt. Im folgenden Kapitel wird der Einfluss von GDP auf [³H]NMS-Bindungsexperimente beschrieben, um die Vergleichbarkeit der beiden Systeme zu untersuchen. Giersbergen und Leppik (1995) fanden durch die Anwesenheit von GDP sowohl einen Einfluss auf die Affinität agonistischer Liganden zu Muskarinrezeptoren, als auch auf die Kurvensteilheit. GDP hatte keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften von Atropin.

Der Effekt erhöhter GDP-Konzentrationen im Versuchsansatz auf neuartige Muskarinrezeptoragonisten und auf Hybridliganden wird im Folgenden geschildert. Auch der Einfluss auf die orthosterische Mutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala wurde untersucht.

3.2.1 Einfluss von GDP auf die Testsubstanzaaffinität an Wildtyprezeptoren

Iperoxo

Mit Iperoxo wurde am M₂- und am M₅-Rezeptor die maximal wirksame GDP-Konzentration bestimmt. Die resultierenden Kurven ohne GDP bzw. mit 1, 10 oder 100 µM GDP sind in Abb. 3.56 dargestellt.



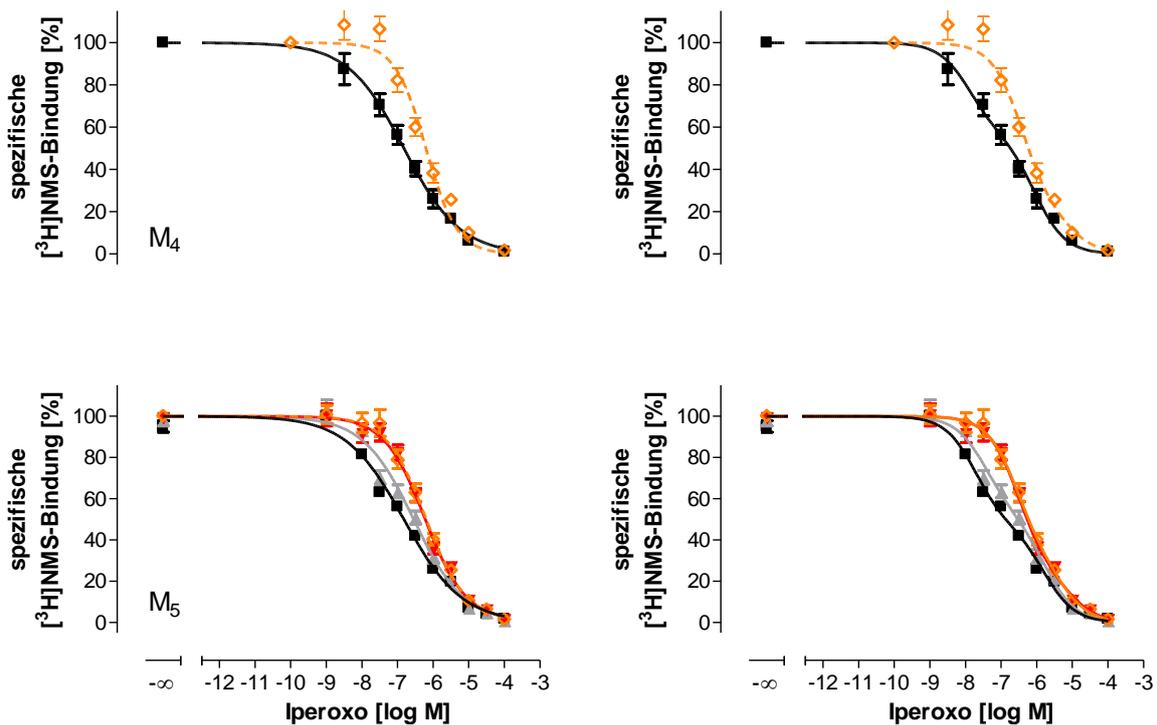


Abb. 3.56: Einfluss verschiedener GDP-Konzentrationen auf die [³H]NMS-Inhibitionskurven durch Iperoxo an M₁-M₅-Rezeptoren.

Die Versuche wurden mit stabil transfizierten CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM [³H]NMS durchgeführt. *Ordinate:* spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Konzentration von Iperoxo. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Datensätze wurden monophasisch (links, Gleichung 11) und biphasisch (rechts, Gleichung 16) ausgewertet.

Wie bei Giersbergen und Leppik (1995) wurden die Konzentrations-Effekt-Kurven durch Zusatz von GDP steiler und nach rechts verschoben (siehe Tab. 3.30). Eine Konzentration von 10 µM GDP erreichte am M₅-Rezeptor den Maximaleffekt. Da die Affinität des M₂-Rezeptors mit 100 µM GDP noch weiter abgesenkt wurde, wurden die folgenden Versuche mit 100 µM GDP durchgeführt. Bei dieser Konzentration konnte davon ausgegangen werden, dass eine weitere Erhöhung der GDP-Konzentration die Kurven nicht weiter nach rechts verschieben würde. Die Kurven in Gegenwart von 100 µM GDP waren alle monophasisch und konnten teilweise nicht mit einem biphasischen Modell ausgewertet werden.

Die beiden G_i gekoppelten Rezeptoren M₂ und M₄ wurden durch den GDP-Zusatz am stärksten beeinflusst. Die aus Abb. 3.56 berechneten Parameterwerte sind in Tab. 3.30 dargestellt.

Beeinflussung der Agonistbindung durch Anwesenheit von Guanosindiphosphat

		n_H	$n_H \neq -1$	pK_{app}	ΔpK_{app}
M₁	ohne GDP	$-0,67 \pm 0,07^\#$	3/3	$6,20 \pm 0,12$	-
	100 μM GDP	$-0,98 \pm 0,04^+$	0/3	$5,74 \pm 0,05^+$	-0,46
M₂	ohne GDP	$-0,37 \pm 0,02^\#$	3/3	$9,57 \pm 0,04$	-
	1 μM GDP	$-0,43 \pm 0,04^\#$	3/3	$8,83 \pm 0,12^+$	-0,74
	10 μM GDP	$-0,75 \pm 0,14^\#$	2/3	$8,24 \pm 0,01^+$	-1,33
	100 μM GDP	$-0,72 \pm 0,01^{\#\dagger}$	2/3	$7,98 \pm 0,02^+$	-1,59
M₃	ohne GDP	$-0,92 \pm 0,02^\#$	2/4	$5,55 \pm 0,06$	-
	100 μM GDP	$-1,01 \pm 0,10$	1/5	$5,38 \pm 0,09$	-0,17
M₄	ohne GDP	$-0,51 \pm 0,05^\#$	3/3	$7,18 \pm 0,20$	-
	100 μM GDP	$-0,82 \pm 0,06^+$	1/3	$6,42 \pm 0,13^+$	-0,76
M₅	ohne GDP	$-0,54 \pm 0,01$	3/3	$6,92 \pm 0,06$	-
	1 μM GDP	$-0,63 \pm 0,02^+$	3/3	$6,65 \pm 0,15$	-0,27
	10 μM GDP	$-0,74 \pm 0,10$	2/3	$6,34 \pm 0,08^+$	-0,58
	100 μM GDP	$-0,75 \pm 0,08^\#$	2/3	$6,39 \pm 0,12^+$	-0,53

		biph>mono	pK _{app} (high)	pK _{app} (low)	F
M ₁	ohne GDP	1/3	6,79 ± 0,13	5,56 ± 0,09	0,44 ± 0,06
	100 µM GDP	0/3	Versuche nicht sinnvoll biphasisch auswertbar (n _H = -1)		
M ₂	ohne GDP	1/3	10,9 ± 0,18	8,15 ± 0,14	0,49 ± 0,04
	1 µM GDP	1/3	10,0 ± 0,31	7,85 ± 0,23	0,49 ± 0,09
	10 µM GDP	0/3	8,95 ± 0,32 ⁺	7,29 ± 0,43	0,56 ± 0,20
	100 µM GDP	0/3 ^M	9,10 ± 0,26	7,56 ± 0,11	0,26 ± 0,07
M ₃	ohne GDP	1/4	7,56 ± 0,77	5,19 ± 0,06	0,31 ± 0,12
	100 µM GDP	0/5	Versuche nicht sinnvoll biphasisch auswertbar (n _H = -1)		
M ₄	ohne GDP	3/3	8,41 ± 0,47	6,12 ± 0,19	0,51 ± 0,10
	100 µM GDP	0/3	6,67 ± 0,18 ⁺	5,20 ± 0,16 ⁺	0,80 ± 0,05
M ₅	ohne GDP	2/3	7,79 ± 0,11	5,86 ± 0,12	0,54 ± 0,04
	1 µM GDP	2/3	7,46 ± 0,16	5,86 ± 0,09	0,50 ± 0,07
	10 µM GDP	1/3	7,41 ± 0,88	5,34 ± 0,40	0,62 ± 0,22
	100 µM GDP	0/3	6,61 ± 0,22 ⁺	5,14 ± 0,20 ⁺	0,78 ± 0,08

Tab. 3.30: Bindungscharakteristika von Iperoxo an den angegebenen Rezeptoren bei variierenden GDP-Konzentrationen.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. **1. Teil:** Monophasische Auswertung nach Gleichung 11, **2. Teil:** Biphasische Auswertung nach Gleichung 16. Alle Werte wurden anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. pK_{app}: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_{app} nach monophasischer Analyse, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, ΔpK_{app}: pK_{app}-Differenz zwischen dem Versuchsansatz mit GDP und dem ohne GDP, pK_{app}(high) bzw. pK_{app}(low): negativer dekadischer Logarithmus von K_{app}(high) der hochaffinen Fraktion bzw. von K_{app}(low) der niedrigaffinen Fraktion, F: Anteil der hochaffinen Fraktion an der Gesamtbindung.

⁺: Wert signifikant verschieden im Vergleich zum entsprechenden Wert ohne GDP (t-Test, p<0,05).

[#]: Steilheitsmaß n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test, p<0,05).

^M: Dargestellt sind Daten der Mittelwertskurve, da die Einzelkurven nicht biphasisch auswertbar waren.

Iper-W84

Zur Überprüfung, ob dualsterische Agonisten in derselben Weise durch GDP beeinflusst werden, wurde Iper-W84 am M_2 -Rezeptor mit 10 und 100 μM GDP untersucht, am M_5 -Rezeptor wurde nur die maximale GDP-Konzentration von 100 μM eingesetzt. Die Konzentrations-Effekt-Kurven von Iper-W84 am M_2 - und M_5 -Wildtyprezeptor sind in Abb. 3.57 dargestellt.

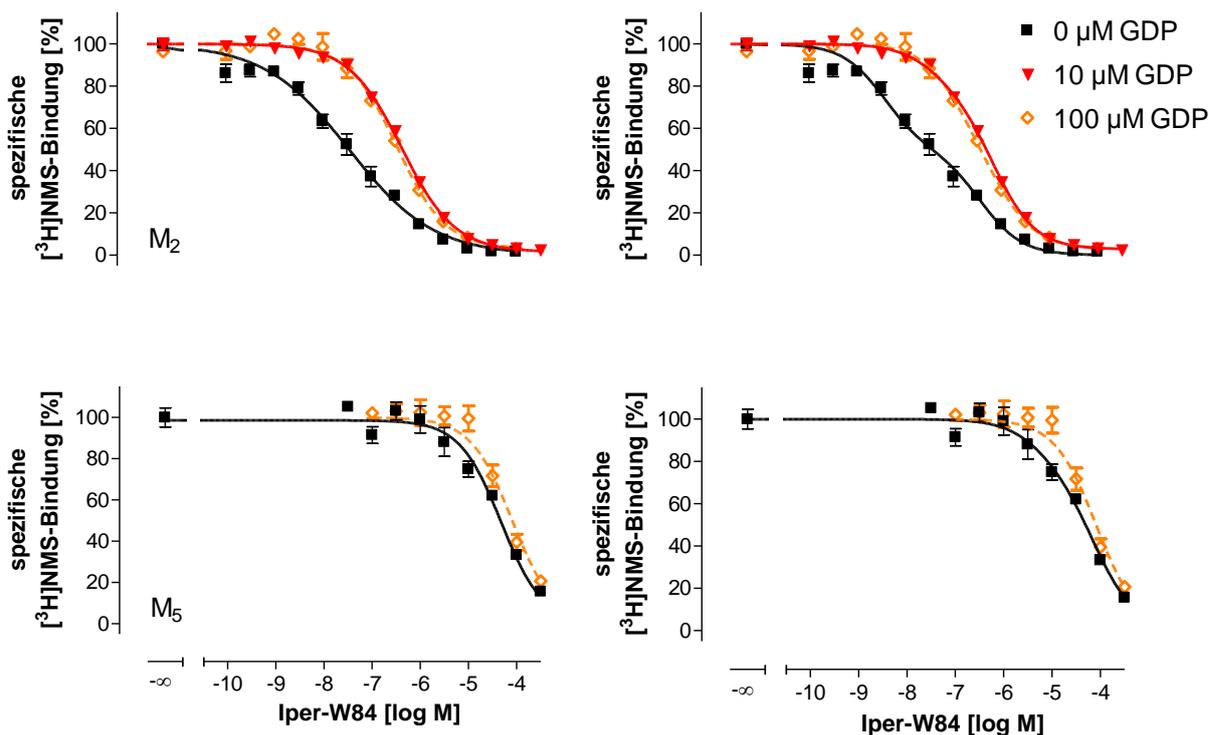


Abb. 3.57: Einfluss verschiedener GDP-Konzentrationen auf die $[^3\text{H}]$ NMS-Gleichgewichtsbindung von Iper-W84 an den M_2 - und M_5 -Rezeptoren.

Die Versuche wurden mit stabil transfizierten CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM $[^3\text{H}]$ NMS durchgeführt. *Ordinate:* spezifische $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der Konzentration von Iper-W84. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden monophasisch (links, Gleichung 11) und biphasisch (rechts, Gleichung 16) ausgewertet.

Wie bei Iperoxo kam es bei dem Hybridagonisten Iper-W84 zu einem Affinitätsabfall durch die Zugabe von GDP, der am M_2 -Rezeptor stärker ausgeprägt war als am M_5 -Rezeptor. Durch GDP wurden die Kurvenverläufe steiler ($n_H \downarrow$) und die hochaffine Fraktion nahm ab. Folglich war der Einfluss von GDP an orthosterischen und dualsterischen Agonisten gleich. Die für Iper-W84 berechneten Parameterwerte sind in Tab. 3.31 dargestellt.

		n_H	$n_H \neq -1$	pK_{app}	ΔpK_{app}
M₂	ohne GDP	$-0,55 \pm 0,06^\#$	3/3	$7,56 \pm 0,25$	-
	1 μM GDP	$-0,66 \pm 0,04^\#$	4/4	$6,58 \pm 0,04$	-0,98
	100 μM GDP	$-0,87 \pm 0,15$	2/3	$6,55 \pm 0,08$	-1,01
M₅	ohne GDP	$-0,78 \pm 0,15$	1/3	$4,52 \pm 0,09$	-
	100 μM GDP	$-1,28 \pm 0,47$	3/3	$4,16 \pm 0,15$	-0,36

		biph>mono	$pK_{app}(\text{high})$	$pK_{app}(\text{low})$	F
M₂	ohne GDP	1/3	$8,61 \pm 0,41$	$6,40 \pm 0,27$	$0,50 \pm 0,15$
	1μM GDP	3/4	$9,48 \pm 0,14$	$6,42 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,03$
	100 μM GDP	0/3	$7,22 \pm 0,36$	$6,32 \pm 0,09$	$0,32 \pm 0,07$
M₅	ohne GDP	1/3	$5,37 \pm 0,65$	$4,18 \pm 0,09$	$0,32 \pm 0,08$
	100 μM GDP	0/3	Versuche nicht sinnvoll biphasisch auswertbar ($n_H = -1$)		

Tab. 3.31: Bindungscharakteristika von Iper-W84 an den angegebenen Rezeptoren bei variierenden GDP-Konzentrationen.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. **oben:** Monophasische Auswertung nach Gleichung 11, **unten:** Biphasische Auswertung nach Gleichung 16. Alle Werte wurden anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. pK_{app} : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_{app} nach monophasischer Analyse, n_H : Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, ΔpK_{app} pK_{app} -Differenz zwischen dem Versuchsansatz mit GDP und dem ohne GDP, $pK_{app}(\text{high})$ bzw. $pK_{app}(\text{low})$: negativer dekadischer Logarithmus von $K_{app}(\text{high})$ der hochaffinen Fraktion bzw. von $K_{app}(\text{low})$ der niedrigaffinen Fraktion, F: Anteil der hochaffinen Fraktion an der Gesamtbindung.

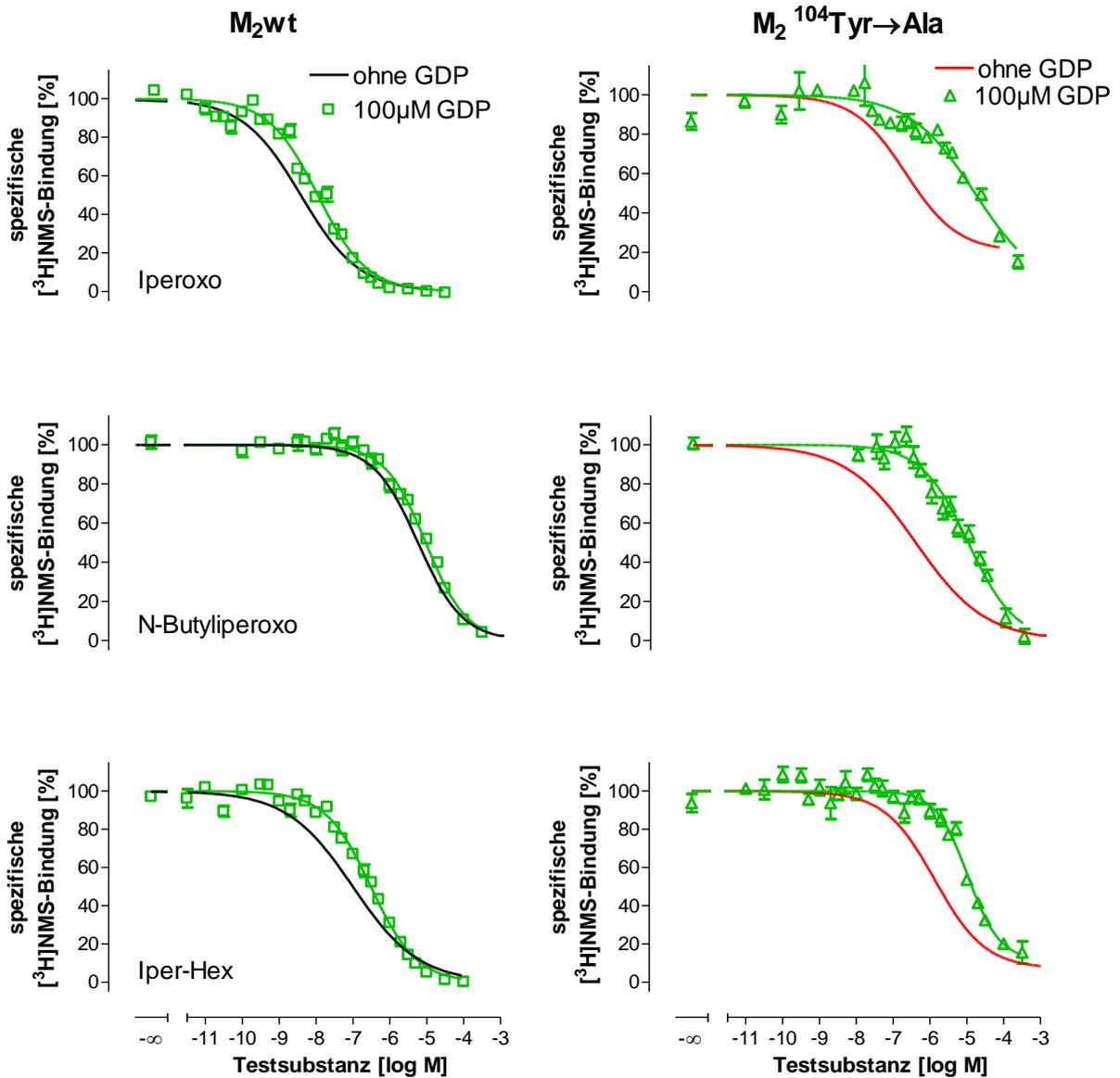
⁺: Wert signifikant verschieden im Vergleich zum entsprechenden Wert ohne GDP (t-Test, $p < 0,05$).

[#]: Steilheitsmaß n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test, $p < 0,05$).

3.2.2 Einfluss von GDP auf die Testsubstanzaffinität an der Mutante **M₂¹⁰⁴Tyr→Ala**

Neben dem Effekt von GDP auf die Wildtyprezeptoren wurde die Abhängigkeit der Testsubstanzaffinität an der orthosterischen Mutanten **M₂¹⁰⁴Tyr→Ala** von der Gegenwart von 100 μ M GDP untersucht. Ziel war es zu überprüfen, ob die GDP-Abhängigkeit an orthosterisch mutierten Rezeptoren zum Wildtyp analog ist. Die Konzentrations-Effekt-Kurven für **M₂wt**-Rezeptoren in An- und Abwesenheit von 100 μ M GDP sind in Abb. 3.58 in der linken Spalte, die Kurven der orthosterischen Mutante in der rechten Spalte dargestellt. Alle Kurven

sind monophasisch ausgewertet worden, da sich bei Iperoxo und Iper-W84 gezeigt hat, dass die Kurvenverläufe unter Einfluss von GDP signifikant besser nach einem einphasischen Modell anpassen ließen.



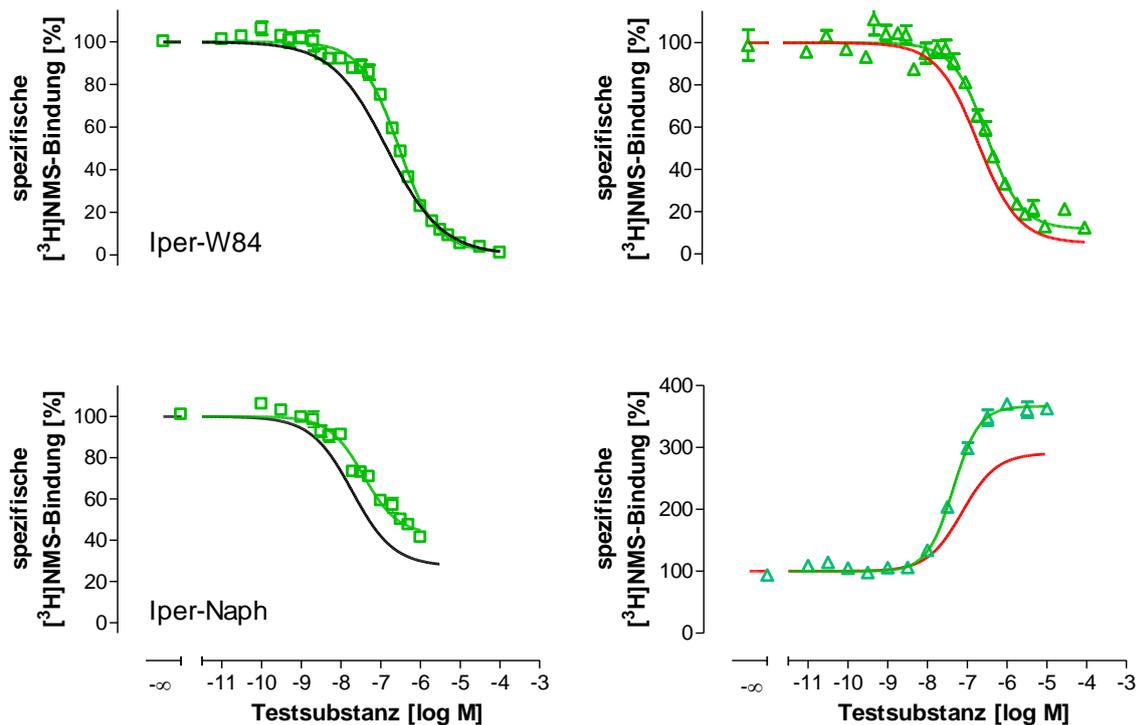


Abb. 3.58: Einfluss von 100 μM GDP auf die [^3H]NMS-Gleichgewichtsbindung von Iperoxo und seinen Derivaten an orthosterisch punktmutierten Rezeptoren im Vergleich zum M_2wt .

Von oben nach unten wurden die Strukturen schrittweise vom reinen Orthoster Iperoxo ausgehend über eine Butyl- und Hexylammoniumkette zu allo-/orthosterischen Hybridliganden verlängert. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 1,0 nM ($\text{M}_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$) bzw. 0,2 nM (M_2wt) [^3H]NMS durchgeführt. *Ordinate:* Spezifische [^3H]NMS-Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 (monophasisch) ausgewertet.

Sowohl am Wildtyp als auch an der Mutante $\text{M}_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ kam es –außer bei Iper-Naph– durch die Anwesenheit von GDP zu einem Affinitätsabfall. N-Butyliperoxo, welches unter Kontrollbedingungen eine größere Affinität zu der orthosterischen Mutante $\text{M}_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ als zum M_2wt (siehe Kapitel 3.1.3.4, Seite 118) aufwies, hatte in Anwesenheit von GDP zu beiden untersuchten Rezeptoren dieselbe Affinität. Bei den anderen Liganden war der Affinitätsabfall durch GDP-Zugabe schwächer als durch die Mutation, so dass sich folgende allgemeine Affinitätsreihenfolge ergab: M_2wt (Kontrolle) > M_2wt (100 μM GDP) > $\text{M}_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ (Kontrolle) > $\text{M}_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ (100 μM GDP). Außer bei den beiden dualsterischen Liganden Iper-W84 und Iper-Naph zeigte sich an den orthosterisch mutierten Rezeptoren ein größerer Einfluss durch GDP als an den Wildtyprezeptoren.

Folglich konnte auch an der orthosterischen Rezeptormutante $\text{M}_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ durch die Anwesenheit von GDP wie am Wildtyp ein Affinitätsabfall induziert werden, der mit steileren

Kurvenverläufen (siehe Tab. 3.32) und einer Abnahme der Fraktion der hochaffinen Bindung einherging (hier nicht gezeigt, da bei den Datensätzen nach GDP-Zugabe meist die monophasische Auswertung bevorzugt wurde). Die Parameterwerte aus Abb. 3.58 sind in Tab. 3.32 aufgeführt. Die Anzahl der signifikant besser monophasisch auszuwertenden Einzelversuche ist in der Spalte „mono>biph“ angegeben. Hier zeigte sich, dass vor allem die Kurven in Anwesenheit von GDP in den meisten Fällen nicht biphasisch waren.

Beeinflussung der Agonistbindung durch Anwesenheit von Guanosindiphosphat

			mono>biph	n _H	pK _{app}	ΔpK _{app}
Iperoxo	M₂wt	ohne GDP	3/4	-0,56 ± 0,05	8,60 ± 0,05	-
		100μM GDP	3/3	-0,65 ± 0,02	8,17 ± 0,03 ⁺	-0,43
	M₂ ¹⁰⁴Tyr→Ala	ohne GDP	4/4	-0,62 ± 0,06	6,59 ± 0,07	-
		100μM GDP	4/4	-0,54 ± 0,09	4,91 ± 0,17 ⁺	-1,68
N-Butyl-Iperoxo	M₂wt	ohne GDP	2/3	-0,71 ± 0,05	5,42 ± 0,08	-
		100μM GDP	3/3	-0,79 ± 0,03	5,25 ± 0,03	-0,17
	M₂ ¹⁰⁴Tyr→Ala	ohne GDP	2/3	-0,45 ± 0,02	6,48 ± 0,14	-
		100μM GDP	2/3	-0,71 ± 0,08 ⁺	5,05 ± 0,15 ⁺	-1,43
Iper-Hex	M₂wt	ohne GDP	1/4	-0,50 ± 0,03	7,21 ± 0,12	-
		100μM GDP	2/3	-0,70 ± 0,02 ⁺	6,73 ± 0,01 ⁺	-0,48
	M₂ ¹⁰⁴Tyr→Ala	ohne GDP	3/3	-0,65 ± 0,02	5,89 ± 0,04	-
		100μM GDP	4/4	-1,38 ± 0,41	5,06 ± 0,07 ⁺	-0,83
Iper-W84	M₂wt	ohne GDP	2/4	-0,64 ± 0,02	7,04 ± 0,10	-
		100μM GDP	3/3	-0,94 ± 0,09 ⁺	6,76 ± 0,02	-0,28
	M₂ ¹⁰⁴Tyr→Ala	ohne GDP	3/3	-0,88 ± 0,13	6,69 ± 0,05	-
		100μM GDP	3/3	-1,12 ± 0,18	6,51 ± 0,02	-0,18
Iper-Naph	M₂wt	ohne GDP	3/3	-0,85 ± 0,06	7,94 ± 0,06	-
		100μM GDP	5/5	-1,04 ± 0,16	7,60 ± 0,10	-0,34
	M₂ ¹⁰⁴Tyr→Ala	ohne GDP	3/3	+0,91 ± 0,07	7,18 ± 0,08	-
		100μM GDP	4/4	+1,46 ± 0,17 ⁺	7,40 ± 0,03 ⁺	0,22

Tab. 3.32: Bindungscharakteristika von Iperoxo und seinen Derivaten an der orthosterischen Mutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala unter Einfluss von GDP im Vergleich zum M₂wt.

Die aufgeführten Parameterwerte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden monophasisch nach Gleichung 11 ausgewertet und anschließend dem Cheng-Prusoff-Verfahren (Gleichung 13) unterzogen. pK_{app}: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_{app} nach monophasischer Analyse, n_H: Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse, ΔpK_{app}: pK_{app}-Differenz zwischen dem Versuchsansatz mit GDP und dem ohne GDP.

⁺: Wert signifikant verschieden im Vergleich zum entsprechenden Wert ohne GDP (t-Test, p<0,05).

3.3 Einfluss der Mutation M₂¹⁰⁴Tyrosin zu Alanin auf die Rezeptoraktivierbarkeit

Die Aminosäure M₂¹⁰⁴Tyr hatte sich (Kapitel 3.1.3.4 und 3.2.2, Seite 118 bzw. 220) als wichtiges Epitop für die Bindung von agonistischen Liganden am M₂-Rezeptor erwiesen. Es sollte geklärt werden, ob diese Mutation auch die Rezeptoraktivierung beeinflusst. Hierzu wurden [³⁵S]GTPγS-Experimente an Wildtyp- und an punktmutierten Rezeptoren unter Einsatz verschiedener orthosterischer und dualsterischer Agonisten durchgeführt. Die resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abb. 3.59 gezeigt.

Die Versuche wurden alle auf einen Membranproteingehalt von 40 µg/ml eingestellt, um eine gleichbleibende Konzentration von G-Proteinen zu gewährleisten, das Ausmaß der Rezeptorexpression schien für die maximale [³⁵S]-GTPγS-Bindung von nachrangiger Bedeutung gewesen zu sein (siehe Kapitel 7.6, Seite 275).

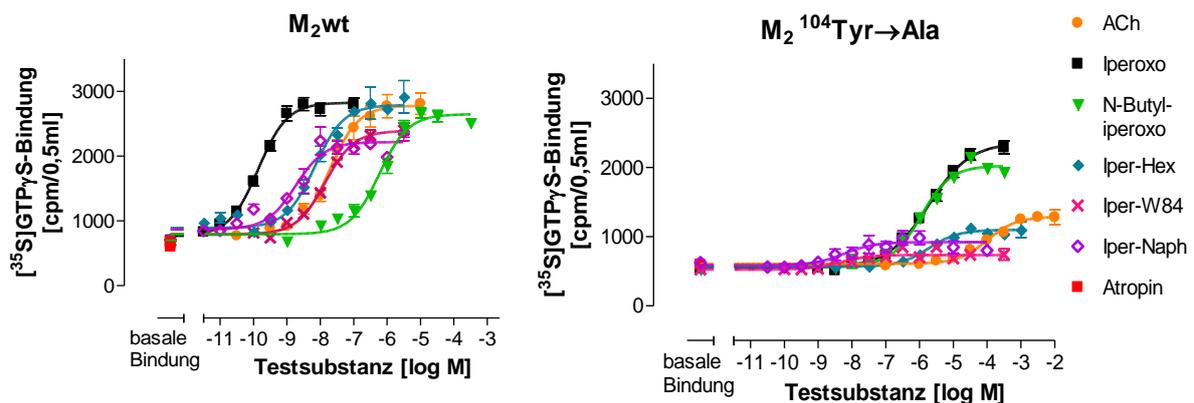


Abb. 3.59: Aktivierung von M₂-Wildtyp- und orthosterisch mutierten Rezeptoren durch orthosterische Agonisten und Hybridagonisten.

Ordinate: Gesamtbindung von [³⁵S]GTPγS pro Versuchsansatz von 0,5 ml in cpm (*counts per minute*). *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) mit einem Zusatz von 10 µM GDP in Gegenwart von 0,07 nM [³⁵S]GTPγS durchgeführt, die Membranproteinkonzentration betrug 40 µg/ml. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-7 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Die vier Vollagonisten Acetylcholin, Iperoxo, N-Butyliperoxo und Iper-Hex aktivierten den M₂wt-Rezeptor maximal, die Hybridliganden Iper-W84 und Iper-Naph erweisen sich als starke Partialagonisten (~75% des Iperoxo-Effekts). An der orthosterischen Mutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala hingegen zeigten sich Unterschiede zwischen den Vollagonisten. Iperoxo und N-Butyliperoxo wiesen die höchste intrinsische Aktivität auf, welche ungefähr 80 % der

Aktivität am M₂wt entsprach. Acetylcholin und Iper-Hex verloren deutlich an intrinsischer Aktivität, diese erreichte nur 30-40% des Iperoxo-Niveaus. Im Falle der beiden Hybridagonisten Iper-W84 und Iper-Naph war kaum noch eine Rezeptor-Aktivierung detektierbar (Abb. 3.60, Tab. 3.33).

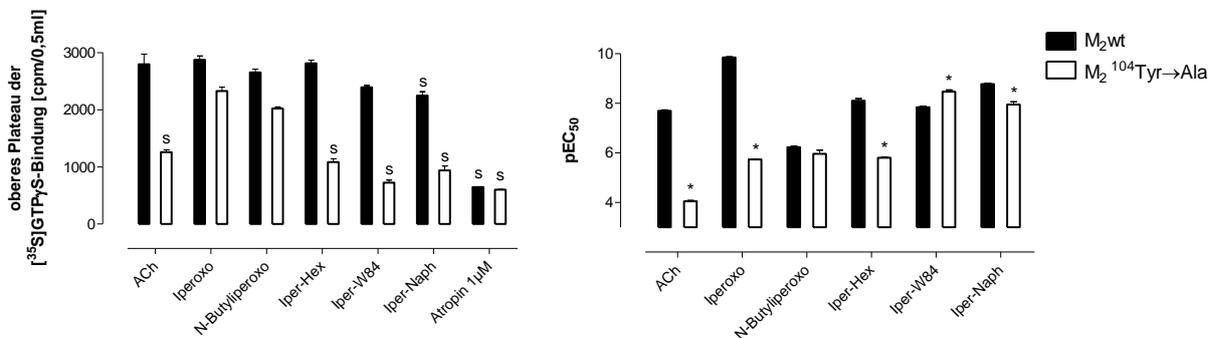


Abb. 3.60: Vergleich der maximalen [³⁵S]GTPγS-Bindung (links) und des Wendepunktes der Konzentrations-Effekt-Kurve der genannten Agonisten (rechts) zwischen der orthosterischen Mutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala und dem M₂wt.

Dargestellt sind die oberen Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven in cpm (*counts per minute*) pro Versuchsansatz von 0,5 ml (links) und die pEC₅₀-Werte (rechts) aus Abb. 3.59 (Seite 225) als Mittelwerte ± Standardfehler, zur Versuchsdurchführung siehe dortige Legende.

s: Signifikanter Unterschied der oberen Plateaus der Kurven von Iperoxo und der Testsubstanz am entsprechenden Rezeptor (t-Test p<0,05).

*: Signifikanter Unterschied des pEC₅₀Wertes zwischen M₂wt und Mutante (t-Test p<0,05).

Iperoxo besaß am M₂-Wildtyp die höchste Wirksamkeit. Die anderen drei Vollagonisten folgten in der Reihenfolge Iper-Hex > Acetylcholin > N-Butyliperoxo (Abb. 3.60, Tab. 3.33). Iper-Naph besaß eine höhere Wirksamkeit als Iper-W84, die Wirksamkeit von Iper-W84 unterschied sich nicht signifikant von der von Acetylcholin.

An der orthosterischen Mutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala verloren Acetylcholin, Iperoxo und Iper-Hex gegenüber dem M₂wt stark an Affinität (> 2 Dekaden, siehe Tab. 3.33, Seite 227). Wie zuvor gezeigt verlor Acetylcholin auch deutlich an intrinsischer Aktivität, folglich ist dieses Epitop essentiell für die Aktivierung des M₂-Rezeptors durch Acetylcholin. Die Wirksamkeit der beiden Hybridliganden Iper-W84 und Iper-Naph veränderte sich zwar signifikant, aber wesentlich schwächer als bei den zuvor genannten Agonisten, wobei Iper-W84 sogar eine Wirksamkeitszunahme zeigte. Eine Sonderposition nahm N-Butyliperoxo ein. Es war die einzige Verbindung, deren Fähigkeit zur Rezeptoraktivierung sowohl im Hinblick auf Wirksamkeit als auch Maximaleffekt durch die Mutation M₂¹⁰⁴Tyr→Ala nicht verändert wurde.

	M ₂ wt			M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala			Differenz	
	n	pEC ₅₀	Top (%)	n	pEC ₅₀	Top (%)	pEC ₅₀	Top (%)
ACh	4	7,70 ± 0,07	96,50	4	4,05 ± 0,06	37,9	-3,65 ^{s.}	58,6
Iperoxo	7	9,85 ± 0,07	100,0	6	5,74 ± 0,04	100,0	-4,11 ^{s.}	0,0
N-Butyl- iperoxo	3	6,23 ± 0,07	90,2	5	5,96 ± 0,34	82,2	-0,27	8,0
Iper-Hex	3	8,10 ± 0,16	97,3	4	5,80 ± 0,07	27,9	-2,30 ^{s.}	69,4
Iper-W84	4	7,84 ± 0,10	78,5	5	8,47 ± 0,16	6,9	0,63 ^{s.}	71,5
Iper-Naph	4	8,78 ± 0,07	72,0	5	7,95 ± 0,25	19,3	-0,83 ^{s.}	52,6

Tab. 3.33: Einfluss der orthosterischen Mutation M₂¹⁰⁴Tyr→Ala auf die Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung im Vergleich zum M₂wt.

Der Wert des oberen Plateaus von Iperoxo am jeweiligen Rezeptor wurde als 100% festgesetzt. 1μM Atropin wurde gleich 0% gesetzt. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung. pEC₅₀: Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve, Top: oberes Plateau.

^{s.}: Signifikant verschieden vom entsprechenden pEC₅₀-Wert von Iperoxo (t-Test, p<0,05).

Im Vergleich mit den erhobenen Bindungsdaten dieser Verbindungen an der Mutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala (siehe Kapitel 3.1.3.4, Seite 118), verhielten sich die Affinitäten und Wirksamkeiten der Vollagonisten Acetylcholin, Iperoxo und Iper-Hex ähnlich (siehe Abb. 3.61). Durch den Austausch der orthosterischen Aminosäure sanken sowohl Affinität als auch Wirksamkeit.

Die Affinität und die Wirksamkeit der dualsterischen Agonist-Hybride Iper-W84 und Iper-Naph wurde durch die Mutation M₂¹⁰⁴Tyr→Ala nur minimal reduziert. Folglich kann geschlossen werden, dass dieses Epitop essentiell für die Interaktion mit Vollagonisten ist, an der Aktivierung durch Partialagonisten jedoch weniger beteiligt ist.

N-Butyliperoxo gewinnt durch die Mutation M₂¹⁰⁴Tyr→Ala im Bindungsversuch zwar an Affinität, die Wirksamkeit auf die [³⁵S]GTPγS-Rekrutierung wird jedoch nicht signifikant verändert. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Verbindung durch die N-Butylseitenkette mehr freies Volumen innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle benötigt, welches sie an der Mutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala wegen des Fehlens der Aromaten vorfindet. Parallel wird der Rezeptor durch die meisten Agonisten jedoch auch schwerer aktivierbar, was durch den Verlust von intrinsischer Aktivität der Vollagonisten sichtbar wird. Eventuell

könnten sich diese beiden gegenläufigen Effekte bei N-Butylperoxo kompensieren, so dass seine Wirkung am Wildtyp und an der Mutante unverändert erscheint.

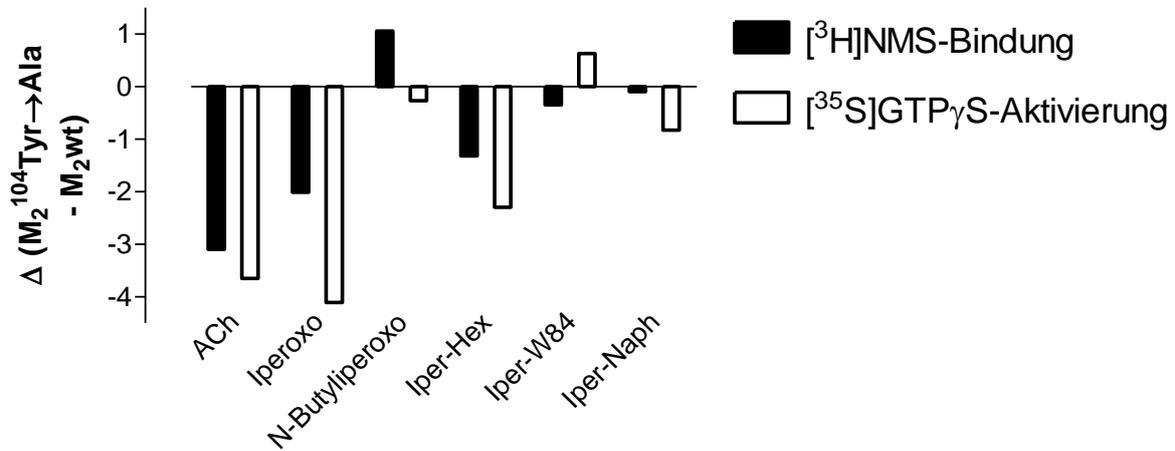


Abb. 3.61: Vergleich der Affinitäts- und Wirksamkeitsdifferenzen zwischen M_2^{wt} und $M_2^{104Tyr \rightarrow Ala}$ der agonistischen Liganden im [³H]NMS-Bindungsversuch und im [³⁵S]GTP_γS-Bindungsexperiment.

Die zugrunde liegenden Experimentalbefunde sind in Kapitel 3.1.3.4 bzw. 3.3 (Seite 118 bzw. 225) dargestellt. Es sind keine Streuungsmaße angegeben, da die Bildung der Differenz auf Basis der Mittelwerte durchgeführt wurde.

Das Epitop M_2^{104Tyr} war folglich sowohl für die Affinität der Bindung der Agonisten (siehe Kapitel 3.1.3.4, Seite 118), als auch für die Rezeptoraktivierung in ligandabhängiger Weise von großer Bedeutung. Durch den Austausch dieses Epitops wurde es möglich, zwischen dem „intrinsic Potential“ verschiedener Vollagonisten zur Rezeptoraktivierung zu differenzieren. Iperoxo zeigte sich in diesen Versuchen insofern als „Super-Agonist“, als dass es auch den orthosterisch mutierten Rezeptor noch fast vollständig aktivieren konnte.

4 Diskussion

Aus den vorausgegangenen Kapiteln lassen sich folgende Kernbefunde der vorliegenden Arbeit ableiten:

1. Die Struktur-Wirkungs-Beziehungen am M₂-Rezeptor waren zwischen strukturell modifizierten Atropin-, Scopolamin- und Iperoxo-Derivaten parallel, was auf eine analoge Orientierung im Rezeptor schließen lässt. Für die Iperoxo-Derivate war zuvor eine dualsterische Bindung gezeigt worden (Antony et al., 2009).
2. Für die Atropin-haltigen Hybridantagonisten zeigten sich eine M₂/M₅-Subtypprävalenz und eine Abhängigkeit der Wirkstoffbindung von orthosterischen und allosterischen M₂-Rezeptor-Epitopen.
3. Der allosterische Molekülteil der Hybridliganden behielt im rein allosterischen Bindungsmodus seine [³H]NMS-dissoziationsverzögernden Eigenschaften. Affinität und Epitopabhängigkeit dieser Interaktion glichen den mit den entsprechenden allosterischen Bausteinen erhobenen Befunden.
4. Die Einführung einer N-Alkylkette am tertiären Stickstoff von Atropin beeinflusste zwar die Affinität, führt aber nicht zu einem dualsterischen Bindungsmodus. Eine Substitution mit einer Ammoniumhexyl-Struktur führte zu einem ähnlichen Befund. Erst das Einbringen allosterischer Bausteine wie bei Atr-W84 und Atr-Naph ergab klare Hinweise auf eine dualsterische Bindung.
5. Die Kinetik der Bindung von Atropin und der Hybridverbindung Atr-Naph war in Radioligandbindungsexperimenten an Membransuspensionen und bei der Messung der dynamischen Massenverschiebung an intakten CHO-hM₂-Zellen ähnlich. Die bivalente Rezeptorinteraktion scheint somit die Bindungskinetik nicht zu verlangsamen.
6. Alle untersuchten Atropin- und Scopolamin-haltigen Hybridliganden waren inverse Agonisten.

7. Die Bindungseigenschaften von Iper-Hex zeigten keinerlei Hinweis auf einen von Iperoxo verschiedenen Bindungsmodus. Damit stimmen die Struktur-Wirkungsbeziehungen mit denen der Antagonisten überein, da auch dort der zweite quartäre Stickstoff nicht für eine dualsterische Bindung ausreichte.
8. Die Bestimmung der Subtypselektivität von agonistischen Verbindungen ist in Radioligandbindungsexperimenten nicht möglich, da Agonisten wie Acetylcholin, die sich in Organbadversuchen als unselektiv erweisen, im vorliegenden Versuchsansatz an Zellmembranen eine M₂-Subtypselektivität zeigten.
9. Die orthosterischen Agonisten Acetylcholin und Iperoxo veränderten ihre Bindungsaffinität bei Mutation von Epitopen, die am inaktiven Rezeptor als allosterisch identifiziert wurden und die von orthosterischen Antagonisten nicht genutzt wurden. Folglich kann eine Umorientierung dieser Epitope, der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Gln, ⁴²²Trp und ⁴²³Thr, bei der Rezeptoraktivierung in Richtung auf die orthosterische Bindungsstelle postuliert werden. Somit könnte durch Annäherung der beiden Bindungsstellen am aktiven Rezeptor eine dualsterische Bindung erleichtert sein. Am inaktiven Rezeptor könnte das Problem eines größeren Abstandes durch Einsatz von Antagonist-Hybriden mit einer verlängerten Zwischenkette kompensiert und die Subtypselektivität verstärkt werden.
10. Orthosterische Vollagonisten an Muskarinrezeptoren verloren durch die Mutation M₂¹⁰⁴Tyr→Ala sowohl in [³H]NMS-Bindungsversuchen als auch im [³⁵S]GTPγS-Experiment an Affinität. Das Bindungsverhalten dualsterischer Liganden wurde nicht in diesem Ausmaß von der Mutation beeinflusst. Hinsichtlich der intrinsischen Aktivität hatte die Mutation M₂¹⁰⁴Tyr→Ala Agonist-abhängig einen unterschiedlichen Effekt, indem Agonisten wie Acetylcholin intrinsische Aktivität verlieren, andere wie Iperoxo hingegen nahezu unbeeinflusst bleiben.

Einige dieser Aspekte seien im Folgenden eingehender betrachtet.

4.1 Evidenz für eine dualsterische Bindung von Antagonist-Hybriden

Das Hauptthema der vorliegenden Arbeit war die Beantwortung der Frage, ob am inaktiven wie am aktiven Rezeptor eine dualsterische Bindung von allo-/orthosterischen Hybridliganden möglich ist. Die Hauptbefunde zu diesem Thema werden im Folgenden erläutert.

4.1.1 Parallele Strukturwirkungsbeziehungen bei agonistischen und antagonistischen Hybridliganden

Die dualsterische Bindung der Agonist-Hybride Iper-W84 und Iper-Naph am M₂-Rezeptor gilt als erwiesen (Antony et al., 2009). Wenn die Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Bindungsaffinität von Antagonist-Hybriden parallel zu denen der Iperoxo-haltigen Verbindungen ist, kann dies als ein Hinweis für eine parallele Bindungstopographie angesehen werden.

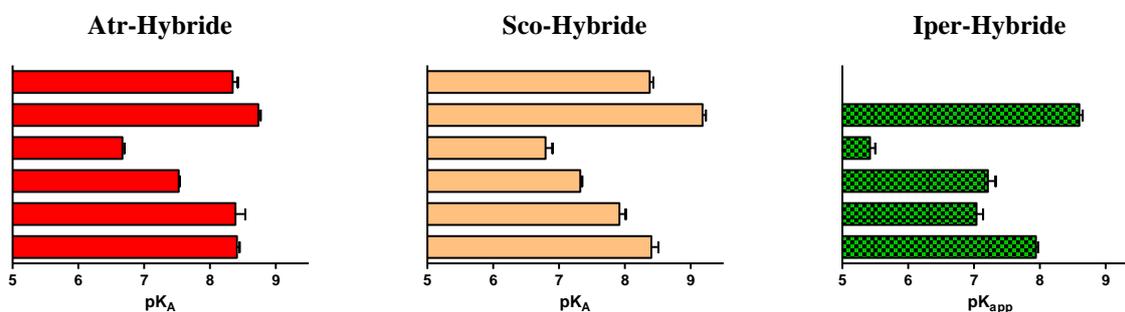


Abb. 4.1: Darstellung der Struktur-Wirkungsbeziehungen der Derivate von Atropin, Scopolamin und Iperoxo (von links nach rechts).

Dargestellt sind die Affinitäten (siehe Tab. 3.5, Seite 107) der schrittweise vergrößerten Derivate an Membransuspensionen von hM₂-CHO-Zellen. Von oben nach unten stehen die Balken für die tertiären, dann für die quartären Ausgangsverbindungen. Es folgen die N-Butyl- und die N-Hexylammonium- und schließlich die W84- und Naphmethonium-Derivate.

Abszisse: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A (Antagonisten) bzw. K_{app} (Agonist). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-21 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

In Abb. 4.1 ist deutlich erkennbar, dass alle drei Substanzreihen parallele Strukturwirkungsbeziehungen aufweisen, was auf analoge Bindungsmodi am aktiven und am inaktiven Rezeptor schließen lässt. Der Affinitätseinbruch infolge des Austauschs der N-Methylgruppe gegen einen N-Butylrest könnte durch eine sterische Hinderung innerhalb der orthosterischen

Bindungsstelle begründet sein. Wird die Zwischenkette weiter verlängert und ein zweiter quartärer Stickstoff eingebracht, so steigt die Bindungsneigung wieder an. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass neue Interaktionsmöglichkeiten entstehen, welche nah der allosterischen Bindungsstelle liegen dürften.

Bei weiterer Vergrößerung der Struktur um ein Phthalimid bzw. Naphthalimid wurde die Affinität weiter erhöht. Folglich können diese vergrößerten Hybridliganden zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Rezeptor eingehen verglichen mit dem Hexylammoniumderivat. Die quartären Methyl-derivate von Atropin und Scopolamin wiesen eine signifikant höhere M_2 -Affinität auf als die tertiären Ausgangsverbindungen. Für Iperoxo konnte dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden, da die schwierig zu synthetisierende tertiäre Base nicht zur Verfügung stand.

Somit kann durch die parallelen Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen den drei Substanzreihen auf einen ähnlichen Bindungsmodus geschlossen werden. Folglich sollten auch die Antagonist-Hybride über einen dualsterischen Bindungsmodus verfügen.

4.1.2 Subtypselektivität bei Atropin-haltigen Hybridliganden

Ziel des Entwurfs von Hybridliganden war es, M_2 -selektive Verbindungen zu erhalten. Die M_2/M_5 -Affinitäten der orthosterischen Ausgangsverbindungen Atropin und Scopolamin sowie von den schrittweise verlängerten Hybridliganden sind in Abb. 4.2 dargestellt.

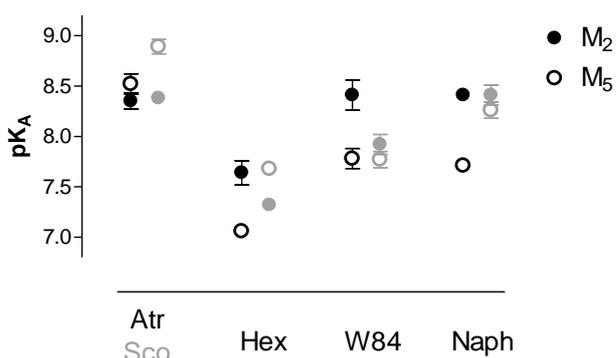


Abb. 4.2: M_2/M_5 -Subtypselektivität von Atropin, Scopolamin und den Hybridliganden.

In schwarz sind die Affinitätswerte zum M_2 - und zum M_5 -Rezeptor (Mittelwerte \pm Standardfehler, $n = 3-6$, aus Tab. 3.3, Seite 97) der Atropin-haltigen Strukturen, in grau die der Scopolamin-haltigen dargestellt. pK_A: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten. Wenn keine Fehlerbalken sichtbar sind, so sind diese vom Symbol verdeckt.

Die Ausgangsverbindung Atropin konnte nicht zwischen den fünf Subtypen unterscheiden (siehe Kapitel 3.1.1.1, Seite 89). Durch Einführung eines zweiten quartären Stickstoffs und allosterischer Bausteine wurde bei den Atropin-Derivaten schrittweise eine M_2 -Prävalenz erreicht, welche im Fall von Atr-Naph einen Faktor 5 betrug.

Scopolamin hingegen zeigte eine signifikant höhere Affinität zu M_5 als zu M_2 . Dieser Unterschied verringerte sich durch Einbringung allosterischer Bestandteile. Bei den Hybridliganden Sco-W84 und Sco-Naph bestand kein signifikanter Affinitätsunterschied. Eine Erklärung für die unerwartete M_5 -Prävalenz des orthosterischen Liganden Scopolamin zu finden war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Das N-methylierte Derivat N-Methylscopolamin wies an allen fünf Subtypen dieselbe Affinität auf.

Zusammengefasst gewannen beide Substanzreihen durch die Einführung allosterischer Bausteine mehr Affinität am M_2 -Rezeptor als am M_5 -Rezeptor.

4.1.3 Abhängigkeit der Bindungsaffinität ortho-/allosterischer Hybridliganden von allosterischen und orthosterischen Rezeptorepitopen

Eine dualsterische Bindung sollte von ortho- und allosterischen Rezeptorepitopen abhängen. In diesem Abschnitt wird die Epitopabhängigkeit der Naph-Hybride der drei Hybridreihen miteinander verglichen.

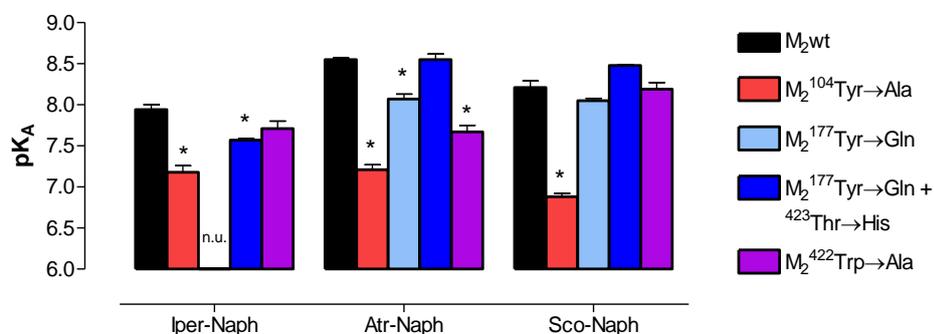


Abb. 4.3: Vergleich der Epitopabhängigkeit der Naphmethonium-haltigen Hybridliganden.

Die Affinitätswerte sind für den M_2 wt, das orthosterische Epitop (rot) und drei allosterische Epitope (blau) angegeben. Die Befunde befinden sich in den entsprechenden Abschnitten in Kapitel 3, für Iper-Naph sind die Daten der monophasischen Analyse angegeben. pK_A : negativer dekadischer Logarithmus der (apparenten) Gleichgewichtsdissoziationskonstanten. n.u.: nicht untersucht.

*: Die Affinitätswerte der Substanz unterschieden sich signifikant zwischen M_2 wt und der entsprechenden Punktmutante (t-Test, $p < 0,05$).

Iper-Naph zeigte im Na,Mg,HEPES-Puffer (siehe Kapitel 3.1.3.4 und 3.1.4.1, Seite 118 bzw. 125), sowie im 5 mM Na,K, P_i -Puffer (Antony et al., 2009) eine augenfällige qualitative Abhängigkeit von ortho- und von allosterischen Epitopen, da es sich bei dem orthosterisch

mutierten Rezeptor $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ als positiver allosterischer Modulator und an der allosterischen Doppelmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ als (formal) kompetitiver Inhibitor verhielt. Neben diesen qualitativen Unterschieden veränderte sich auch die Affinität durch die Mutationen signifikant. Diese Verbindung schien am $M_2\text{wt}$ beide Epitope simultan zu erreichen.

Beide Antagonist-Hybride zeigten einen signifikanten Affinitätsverlust beim Austausch der orthosterischen Aminosäure $M_2^{104}\text{Tyrosin}$ zu Alanin. Somit kann für beide Verbindungen eine orthosterische Interaktion angenommen werden. Die Affinität der reinen Allosteren W84 und Naphmethonium hingegen änderte sich nicht durch den Austausch der orthosterischen Aminosäure $M_2^{104}\text{Tyrosin}$ (siehe Kapitel 3.1.3.2, Seite 112).

Das Atropin-Hybrid Atr-Naph erreichte mit seinem allosterischen Baustein wahrscheinlich allosterische Epitope, denn es fanden sich signifikante Affinitätsverluste an den Mutanten $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ und $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$. An der allosterischen Doppelmutante ergab sich hingegen keine Affinitätsänderung von Atr-Naph. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Hybridligand bei der Doppelmutation seine allosterische Haftung verliert und dadurch tiefer in den Rezeptor rutschen kann, was ihm bessere Interaktionsmöglichkeiten mit der orthosterischen Bindungsstelle bietet und damit die Affinität erhält.

Die Scopolamin-haltigen Hybridliganden zeigten alle keine Affinitätsänderung beim Austausch allosterischer Epitope. Eine völlig andere Lokalisation im Rezeptor erscheint durch die Molekülgröße und Ähnlichkeit zu den Atropin-Hybriden jedoch unwahrscheinlich. Eine unterschiedliche stereochemische Verknüpfung am chiralen Stickstoff zwischen den Atropin- und den Scopolaminderivaten konnte durch NMR-Spektroskopie-Messungen (*nuclear magnetic resonance spectroscopy*) ausgeschlossen werden (Dipl. Chem. Jessica Klöckner, mündliche Mitteilung). Die Epoxid-Struktur des Scopolamins könnte eine Wasserstoffbrücken-Bindung mit $^{104}\text{Tyrosin}$ eingehen (Dr. Jasmin Schrobang, mündliche Mitteilung, Grundlage der Aussage: Docking Simulation). Dadurch befände sich das Molekül tiefer in der orthosterischen Bindungstasche und würde daher allosterische Epitope nicht erreichen. Analoga mit einer verlängerten Zwischenkette sollten demnach die allosterische Bindungsstelle erreichen können. Dies zu klären, wird das Ziel zukünftiger Untersuchungen sein.

In Abb. 4.4 sind Dockingsimulationen der drei Naphmethonium-haltigen Hybridliganden nebeneinander dargestellt (erstellt von Dr. Jasmin Schrobang). In der oberen Reihe ist jeweils

ein Ausschnitt des M₂-Rezeptors mit eingebetteter Testsubstanz von der Seite abgebildet. Alle drei Verbindungen weisen dieselbe Orientierung im Rezeptor auf.

In der unteren Reihe ist der Bereich des allosterischen Haftareals vergrößert dargestellt. Hier wird der Rezeptor von der extrazellulären Seite her betrachtet. Es ist zu erkennen, dass Sco-Naph mit dem Stickstoff des allosterischen Bausteins die beiden dargestellten allosterischen subtypselektivitätsgebenden Epitope M₂¹⁷⁷Tyr und M₂⁴²²Trp nicht erreichen kann, daher erscheint die fehlende M₂/M₅-Selektivität nicht verwunderlich. Die Ammoniumstruktur des Iper-Naph hingegen interagiert „sandwich-artig“ mit den beiden abgebildeten aromatischen Aminosäuren ¹⁷⁷Tyrosin und ⁴²²Tryptophan. Atr-Naph befindet sich mit seiner Ammoniumgruppe zwar nicht ganz so nah an den beiden dargestellten allosterischen Aminosäuren wie Iper-Naph, aber deutlich näher als die Ammoniumgruppe von Sco-Naph. Eventuell würde auch beim Atropin-Hybrid eine Verlängerung der Zwischenkette um 1-2 C-Atome eine bessere Nutzung allosterischer Epitope bewirken.

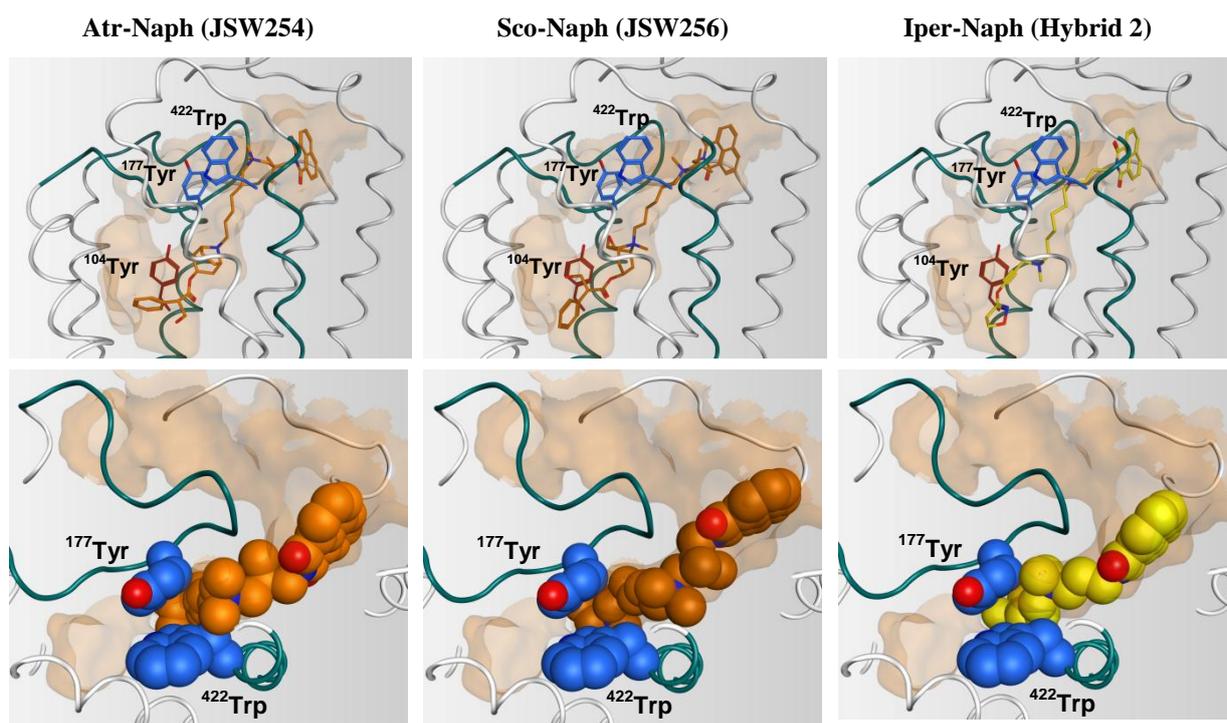


Abb. 4.4: Docking-Simulationen von Naphmethonium-haltigen Hybridliganden am M₂wt-Rezeptor. Oben: Seitenansicht des M₂-Rezeptors mit dem entsprechenden Hybridmolekül. unten: Aufsicht auf den M₂-Rezeptor von der extrazellulären Seite. Farbgebung: grau bzw. dunkelgrün: Proteinerückgrat des M₂-Rezeptors, bräunlich: freies Volumen, gelb bzw. orange: eingebettete Teststruktur, rot: orthosterische Aminosäure (¹⁰⁴Tyrosin), blau: allosterische Aminosäuren (¹⁷⁷Tyrosin, ⁴²²Tryptophan). Die Dockingsimulationen und Abbildungen sind dankenswerter Weise von Dr. Jasmin Schrobang erstellt worden.

4.2 Einfluss unterschiedlicher Substituenten am Stickstoff von Atropinderivaten auf die M₂-Affinität

Die Übergangsregion zwischen der ortho- und der klassischen allosterischen Bindungsstelle wird zu einem Großteil von hydrophoben Aminosäuren gebildet. Diese können entweder Kation- π - oder van-der-Waals-Wechselwirkungen eingehen. Für die Affinität ist es nicht von Relevanz, ob eine bisquartäre oder eine hydrophobe aliphatische Verbindung vorliegt, da neben dem Hexylammonium-Derivat von Atropin (Atr-Hex) auch N-Heptyl- und N-Octylatropin gegenüber N-Butylatropin an Affinität gewinnen (siehe Abb. 4.5). Jedoch erreichen nur die beiden Hybridliganden Atr-W84 und Atr-Naph wieder vollständig das Affinitätsniveau von Atropin.

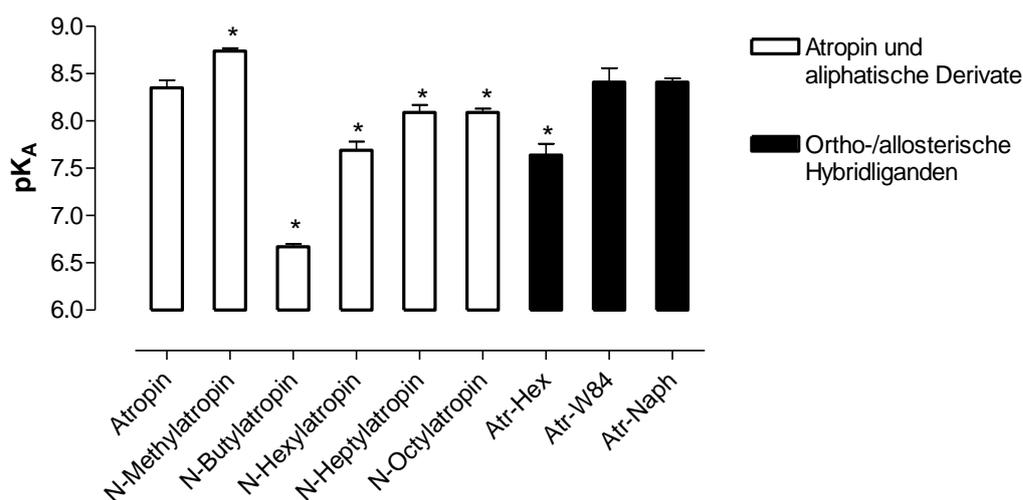


Abb. 4.5: Bindungsaffinität von Atropin und dessen Derivaten zum M₂-Rezeptor.

Dargestellt sind die Affinitäten (siehe Tab. 3.5, Seite 107) der schrittweise vergrößerten Derivate am M₂-Rezeptor. *Abszisse:* Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

*: Die Affinität der Substanz unterschied sich signifikant von der von Atropin (t-Test, $p < 0,05$).

Die Affinität von N-Hexylammonium-Atropin (Atr-Hex) unterschied sich nicht signifikant von der Affinität von N-Hexylatropin. Da für Atr-Hex auch keine Interaktion mit bekannten allosterischen Epitopen gezeigt werden konnte, erscheint ein dualsterischer Bindungsmodus im Sinn des Designkonzepts unwahrscheinlich.

Es scheint, dass sich die aliphatischen Substituenten am Stickstoff im Übergangsbereich zwischen orthosterischer und allosterischer Bindungsstelle befinden. Hinweise auf eine Interaktion mit dem allosterischen Epitop $M_2^{422}\text{Trp}$ konnten im Rahmen dieser Arbeit für N-Butyl- und N-Hexylatropin, sowie für die Hybridliganden gezeigt werden (Kapitel 3.1.4.5, Seite 157). Da diese Derivate jedoch keine M_2/M_5 -Subtypselektivität und keine Abhängigkeit von Subtypselektivität-gebenden Aminosäuren $M_2^{177}\text{Tyr}$ und $M^{423}\text{Thr}$ aufweisen, erreichen nur die Hybridliganden Atr-W84 und Atr-Naph die gewünschte dualsterische Bindungstopographie.

4.3 Bindungseigenschaften von Iper-Hex

Hexamethonium ist das Pharmakophor allosterischer Modulatoren vom Alkanbisammonium-Typ und verfügt selbst über eine M_2/M_5 -Subtypselektivität (siehe Kapitel 3.1.1.2, Seite 91). Von daher könnte auch diese Struktur einen allosterisch-bindenden Baustein für Hybridliganden darstellen. In der Moleküldynamik-Simulation der M_2 -Rezeptorbindung von Iper-W84 (Antony et al., 2009) befindet sich der quartäre Stickstoff zwischen den beiden allosterischen Aminosäuren $M_2^{177}\text{Tyr}$ und $M_2^{423}\text{Thr}$, eine direkte Interaktion der Phthalimidstruktur mit allosterischen Epitopen war nicht zu detektieren. Folglich erschien es möglich, den Phthalimidoethyl-Rest wegzulassen und das Molekül damit auf die Hexamethonium-Kette zu verkleinern.

Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen mit Iper-Hex und der Ausgangsverbindung Iperoxo bzw. der dualsterischen Verbindung Iper-W84 ergaben jedoch, dass sich Iper-Hex eher wie Iperoxo verhielt und keine Anzeichen auf eine dualsterische Bindung aufwies:

1. Das Affinitätsmuster von Iper-Hex zu den fünf Rezeptorsubtypen korrelierte gut mit den Mustern von Acetylcholin und Iperoxo (siehe Abb. 4.7, Seite 239), jedoch nicht mit der Affinitätsreihenfolge von Iper-W84.
2. Iper-Hex war wie Iperoxo ein Vollagonist am M_2 wt-Rezeptor. Es verlor zwar durch die Substitution gegenüber Iperoxo stark an Affinität, die intrinsische Aktivität war jedoch nicht verändert. Die beiden dualsterischen Hybride Iper-W84 und Iper-Naph hingegen waren Partialagonisten (siehe Kapitel 3.3, Seite 225).

3. A. Kebig (Dissertation 2010) konnte für Iper-Hex sowohl G_i - als auch G_s -Aktivierung mittels dynamischer Massenumverteilung an CHO-hM₂-Zellen detektieren. Dies war für die dualsterischen Liganden Iper-W84 und Iper-Naph nicht möglich, diese waren selektiv für den G_i -Weg.
4. Die Affinität von Iper-Hex wurde durch die Mutation des orthosterischen Epitops M₂¹⁰⁴Tyr→Ala stark herabgesetzt. Dies war bei Iper-W84 und Iper-Naph in diesem Ausmaß nicht der Fall. Außerdem verlor Iper-Hex an der allosterischen Doppelmutante nicht an Affinität.

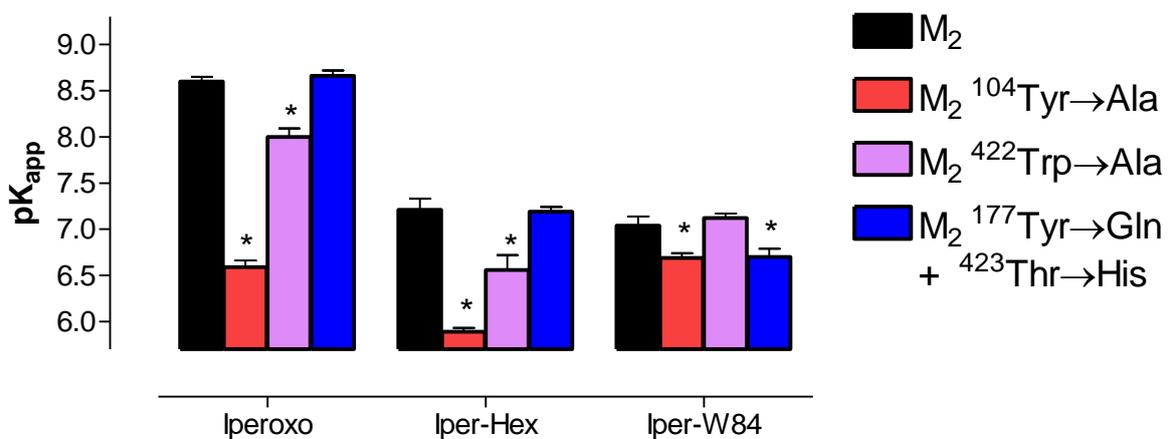


Abb. 4.6: Vergleich der Epitopabhängigkeit der aufgeführten Agonisten.

Die Affinitätswerte sind für den M₂wt, das orthosterische Epitop (rot) und zwei allosterische Epitope (blau) angegeben. Die Befunde befinden sich in den entsprechenden Abschnitten in Kapitel 3, es sind die Daten der monophasischen Analyse angegeben. pK_{app}: negativer dekadischer Logarithmus der apparenten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_{app}.

*: Die Affinitätswerte der Substanz unterschieden sich signifikant zwischen M₂wt und der entsprechenden Punktmutante (t-Test, p<0,05).

4.4 Subtypeselektivitätsbestimmung in Radioligandbindungsstudien

Antony et al. (2009) haben die Subtypeselektivität der Hybridagonisten Iper-W84 und Iper-Naph aus Organbadversuchen und Radioligandbindungsversuchen an M_2 - und M_5 -Rezeptoren abgeleitet. In den Bindungsversuchen zeigten die Hybridagonisten eine um den Faktor 100 stärkere Affinität zu M_2 als zu M_5 . Jedoch waren auch Iperoxo und Acetylcholin in Radioligandbindungsversuchen mit Membransuspensionen am M_2 -Rezeptor zehnfach affiner als am M_5 -Rezeptor, obwohl diese Liganden in Versuchen an isolierten Organen nicht zwischen den Subtypen unterschieden (Dallanoce et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde systematisch die Affinität verschiedener Agonisten an allen fünf Muskarinrezeptorsubtypen in Radioligandbindungsexperimenten bestimmt (siehe Kapitel 3.1.1.4, Seite 98). In Abb. 4.7 sind die Affinitätswerte von Acetylcholin an den fünf Subtypen mit den Werten der anderen Verbindungen korreliert. Die Ergebnisse der linearen Regression sind in Tab. 4.1 aufgeführt.

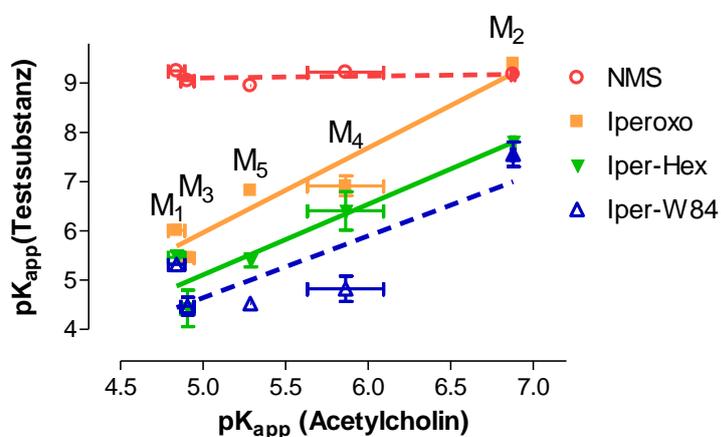


Abb. 4.7.: Korrelation der Affinität von Acetylcholin an den fünf Muskarinrezeptorsubtypen mit den Affinitäten anderer Agonisten sowie von NMS an denselben Rezeptoren.
Ordinate: Bindungsaffinität der Testsubstanzen zu den angegebenen Rezeptoren als pK_{app} -Wert (bzw. pK_A bei NMS), *Abszisse:* Affinität von Acetylcholin als pK_{app} -Wert. Die dargestellten Affinitätswerte stammen aus [3H]NMS-Inhibitionskurven der Testsubstanz nach monophasischer Analyse an stabil transfizierten CHO M_1 - M_5 -Zellen. Die Parameterwerte sind in Kapitel 3.1.1 (ab Seite 277) dargestellt.

	Steigung	Steigung \neq 0? p-Wert	R ²
N-Methylscopolamin	0,04 \pm 0,08	0,68 ^{ns}	0,06
Iperoxo	1,72 \pm 0,28	0,01 ^s	0,93
Iper-Hex	1,43 \pm 0,28	0,01 ^s	0,90
Iper-W84	1,25 \pm 0,50	0,09 ^{ns}	0,68

Tab. 4.1: Parameterwerte der linearen Regressionsanalyse aus Abb. 4.7.

Steigung: Steigungsmaß der Regressionsgeraden, Steigung \neq 0?: statistische Auswertung, ob die Steigung signifikant verschieden von 0 ist (F-Test, $p < 0,05$), R²: Korrelationskoeffizient.

Die Affinitätswerte von Acetylcholin korrelierten gut mit denen von Iperoxo und Iper-Hex. Die Affinitätsreihenfolge war für diese Substanzen ähnlich ($M_3 < M_1 < M_5 < M_4 < M_2$). NMS als Antagonist hingegen unterschied nicht zwischen den Subtypen; die Affinitätswerte von NMS an den fünf Subtypen befinden sich auf einer Horizontalen. Angemerkt sei, dass die Affinitäten der anderen orthosterischen Antagonisten Atropin und Scopolamin zwar teilweise signifikante Unterschiede zwischen den Subtypen aufwiesen, die Unterschiede waren jedoch so gering, dass eine Regressionsgerade das gleiche Resultat ergab wie im Falle von NMS (siehe Kapitel 3.1.1.1, Seite 89).

Weiterhin sei erwähnt, dass die in Organbadversuchen unselektiv wirkenden Agonisten in Radioligandbindungsexperimenten zwischen den Subtypen deutlich unterscheiden. Diese Messungen werden jedoch an Membranhomogenaten durchgeführt und damit unter unphysiologischen Bedingungen. Dennoch erlauben sie einen Vergleich, der zeigt, dass die Affinitätswerte von Iper-W84 nicht mit denen von Acetylcholin korrelieren. Die Steigung der Regressionsgeraden ist nicht signifikant verschieden von 0, das heißt die Punkte ließen sich ebenso gut mit einer Parallelen zur Abszisse beschreiben. Die fehlende Korrelation zeigt, dass Iper-W84 im Vergleich zu den nicht dualsterischen Agonisten veränderte Bindungseigenschaften hat.

Die Differenzierung zwischen den Subtypen durch Acetylcholin unter den Bedingungen von Radioligand-Bindungsuntersuchungen an Membransuspensionen ist bereits in der Literatur beschrieben (Lazareno und Birdsall, 1995; Sennwitz, Dissertation 2006; Vistoli et al., 2007). Eine ausgeprägte M₂-Prävalenz von 2-3 Dekaden wurde auch für Carbachol und Oxotremorin M publiziert (Giersbergen und Leppik, 1995). Vistoli et al. (2007) postulierten für Acetylcholin, dass die Affinität zum M₂-Rezeptor größer als zu M₁ oder M₅ ist, weil der M₂-

Rezeptor weniger starr ist und verschiedene Konformationen einnehmen kann, die von einem flexiblen Molekül wie Acetylcholin vielfältig genutzt werden können.

Jakubik et al. (1997) und andere (z.B. Christopoulos et al., 2000) führten Radioligand-Bindungsuntersuchungen an Membransuspensionen in Gegenwart von Guanylnukleotiden durch, die physiologischerweise von intrazellulär auf das Rezeptorprotein einwirken. Dies senkt die Agonist-Affinität und nivelliert Affinitätsunterschiede in Bezug auf die Subtypen (siehe Kapitel 4.4.1).

4.4.1 Einfluss von Guanylnukleotiden auf die Subtypselektivität von Agonisten in Radioligandbindungsexperimenten

Im Versuchsansatz eines Radioligandbindungsexperimentes an Membransuspensionen sind die Rezeptoren zwar in ihrer Membranumgebung vorhanden, es fehlt jedoch an Liganden der G-Proteine wie GDP oder GTP. Physiologisch verfügt eine Zelle über einen GTP-Gehalt von ~500 μM , die GDP-Konzentration ist ungefähr um den Faktor 10 geringer (Millman und Andrews, 1997). Aus diesem Grund ist in der Literatur eine Vielzahl von experimentellen Bedingungen für Bindungsexperimente mit agonistischen Liganden in der Gegenwart von GTP bzw. von dessen hydrolysestabilem Analogon Gpp(NH)p (Guanylylimidophosphat) beschrieben worden. Durch den Zusatz von GTP oder seinen Analoga in hoher Konzentration werden die G-Proteine mit Nukleotiden gesättigt. Dadurch befinden sich mehr Rezeptoren im G-Protein-entkoppelten Status, der die niedrig affine Fraktion der Agonistbindung darstellt (Christopoulos et al., 2000). Folglich sollten die Inhibitionskurven eines Agonisten gegenüber einem antagonistischen Radioliganden in Gegenwart eines Guanylnukleotidüberschusses steiler als in der Abwesenheit der Nukleotide verlaufen, im Idealfall wird eine Steilheit von -1 erreicht. Dieser G-Protein-entkoppelte Zustand könnte der „zellulären“ Realität eher entsprechen, allerdings ist die Wirksamkeit von Agonisten an intakten zellulären Systemen erheblich höher als in Bindungsuntersuchungen an Membranhomogenaten in Gegenwart von Guanylnukleotiden. Insgesamt scheint der Zusammenhang zwischen Rezeptorkonformation, Agonist-Bindung und Wirkung noch nicht zufriedenstellend geklärt zu sein.

Jakubik et al. (1997) beschrieben in Gegenwart von 500 μM GTP für Acetylcholin an Membranen von M_1 - M_4 -Rezeptoren Inhibitionskurven, deren Steilheiten nicht signifikant

verschieden von -1 waren, sowie keinen signifikanten Unterschied in der Affinität zwischen den Subtypen aufwiesen. Christopoulos et al. (2000) hingegen fanden nur für die Bindung von Acetylcholin am M₂-Rezeptor einen Einfluss von 100 µM Gpp(NH)p auf die Affinität, die Bindung zum G_q-koppelnden M₁-Rezeptor hingegen blieb unbeeinflusst. Die Affinität von Acetylcholin zum M₂-Rezeptor war hier ohne Nukleotidüberschuss ungefähr um den Faktor 20 größer als zum M₁-Rezeptor, unter Nukleotidzugabe verringerte sich dieser auf einen Faktor 10.

In der vorliegenden Arbeit war bereits mit 100 µM GDP für den Agonisten Iperoxo kein weiterer „GDP-shift“ zu beobachten, jedoch erreichten die Inhibitionskurven weder alle eine Steilheit von -1 (siehe Tab. 3.30, Seite 218), noch war die Affinität zwischen den Subtypen identisch. Die erhaltenen Affinitätswerte für Iperoxo in An- und Abwesenheit von 100 µM GDP sind in Abb. 4.8 aufgeführt.

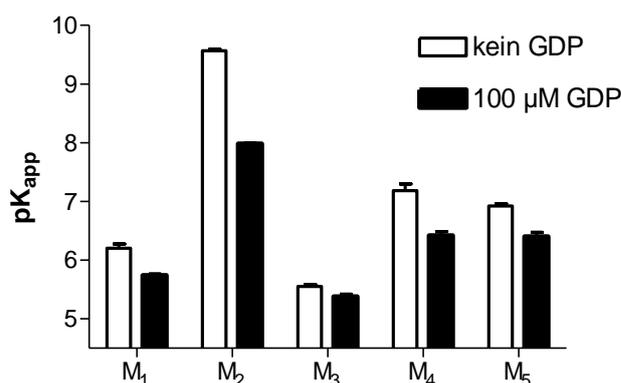


Abb. 4.8: Bindungsaffinität von Iperoxo zu den angegebenen Rezeptoren in An- und Abwesenheit von 100 µM GDP.

Dargestellt sind die Affinitäten (siehe Tab. 3.30, Seite 218) von Iperoxo nach monophasischer Analyse. *Ordinate*: Negativer dekadischer Logarithmus der apparenten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_{app} . Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

Wie in der Publikation von Christopoulos et al. (2000) ließen sich auch in der vorliegenden Arbeit durch den Zusatz von Guanylnukleotiden die Ergebnisse aus Organbadversuchen nicht auf das System der Radioligandbindungsstudien übertragen. Der Affinitätsunterschied zwischen den fünf Subtypen verringerte sich zwar, blieb aber bestehen. Eine weitere Erhöhung der GDP-Konzentration erschien nicht sinnvoll, da bereits beim Wechsel von 10 zu 100 µM kaum eine Veränderung sichtbar war (siehe Abb. 3.56, Seite 216).

Da der Zusatz von GDP die Komplexität des vorliegenden Systems nicht auflöste, wurden die meisten Versuche ohne den Zusatz von GDP durchgeführt, um die Affinität der Agonisten sowohl zur hochaffinen, G-Protein-gekoppelten, als auch zur niedrigaffinen, G-Proteintenkoppelten Fraktion messen zu können.

4.5 Komplexität der Begriffe „orthosterisch“ und „allosterisch“

Die Bindungsstelle, an welche der endogene, physiologische Ligand bindet, wird als orthosterische Bindungsstelle bezeichnet. Eine allosterische Interaktion findet an einer anderen Stelle als an der des natürlichen Liganden statt (Gregory et al., 2007). Nach dieser Definition sind alle Epitope an Muskarinrezeptoren orthosterisch, die eine Interaktion mit dem endogenen Agonisten Acetylcholin zeigen.

Viele Untersuchungen zur Lokalisation und Funktion der allosterischen Bindungsstelle sind am inaktiven Rezeptor mit der Radiosonde [³H]N-Methylscopolamin durchgeführt worden (z.B. Stockton et al., 1983). Von Buller et al. (2002) und Voigtländer et al. (2003) wurden die beiden Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin als Grundlage der M₂/M₅-Subtypselektivität allosterischer Modulatoren identifiziert. Prilla et al. (2006) zeigten, dass ⁴²³Threonin selbst nicht an der Bindung allosterischer Modulatoren beteiligt ist, sondern das korrespondierende Histidin an derselben Stelle im M₅-Rezeptor die Bindung von Allosteren räumlich behindert. Desweiteren wurde von Prilla et al. (2006) die konservierte Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan als wichtiges Epitop für die Basisaffinität allosterischer Modulatoren identifiziert. Folglich sind die Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin, ⁴²²Tryptophan und ⁴²³Threonin an der Bindung „typischer“ allosterischer Modulatoren beteiligt. Daher wurden sie zur allosterischen Bindungsstelle gezählt, und werden auch in der vorliegenden Arbeit als allosterisch bezeichnet.

Die von Jäger et al. (2007) erhobenen Befunde zeigen jedoch, dass die Situation komplexer ist. Das am Antagonist-besetzten inaktiven Rezeptor als allosterisch klassifizierte Epitop ⁴²²Tryptophan ist auch wichtig für die Bindungsaffinität des endogenen Agonisten Acetylcholin. Folglich müsste dieses Epitop nach der eingangs gegebenen Definition am aktiven Rezeptor als orthosterisch klassifiziert werden. Ein möglicher Erklärungsansatz für den Funktionswechsel dieses Epitops ist, dass sich bei der Rezeptoraktivierung die Konformation der orthosterischen Bindungsstelle ändert. Damit verbunden verändern im Ruhezustand des Rezeptors allosterische Epitope ihre Lokalisation und fungieren als orthosterische Affinitätsgeber.

Neben der Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan sind in der vorliegenden Arbeit auch die beiden allosterischen Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und ⁴²³Threonin betrachtet worden. Die Affinitäten der

beiden orthosterischen Agonisten Acetylcholin (ACh) und Iperoxo sowie der orthosterischen Antagonisten Atropin, Scopolamin und N-Methylscopolamin (NMS) zu den im allosterischen Bereich mutierten M_2 -Rezeptoren sind in Abb. 4.9 dargestellt.

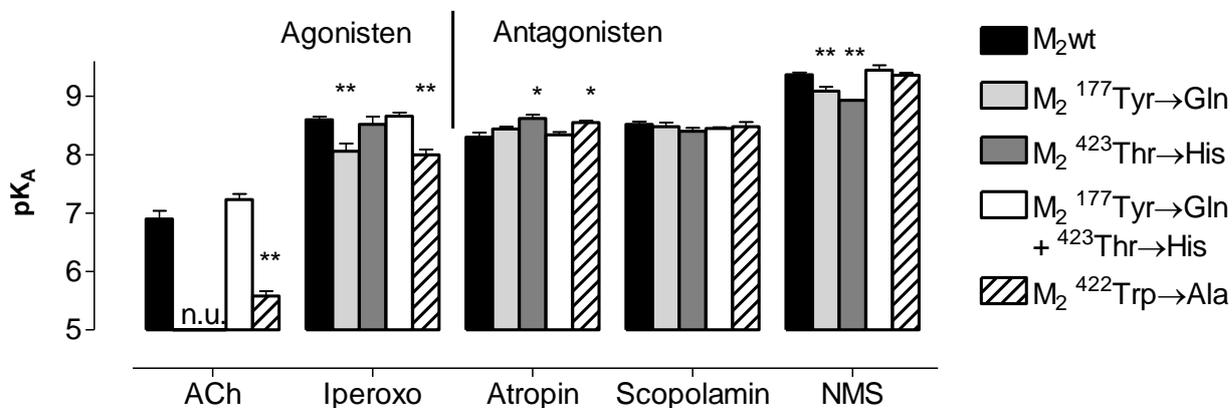


Abb. 4.9: Einfluss des Austauschs allosterischer Epitope des M_2 -Rezeptors auf die Bindungsaffinität orthosterischer Liganden.

Die Experimentalbefunde sind in den entsprechenden Abschnitten in Kapitel 3 dargestellt, für die Agonisten sind die Daten der monophasischen Analyse angegeben. pK_A : negativer dekadischer Logarithmus der (apparenten) Gleichgewichtsdissoziationskonstanten. n.u.: nicht untersucht.

*: Die Affinitätsparameter der Substanz unterschieden sich signifikant zwischen M_2 wt und der entsprechenden Punktmutante (t-Test, $p < 0,05$).

** : Die Affinitätsparameter der Substanz unterschieden sich sehr signifikant zwischen M_2 wt und der entsprechenden Punktmutante (t-Test, $p < 0,01$).

Aus Abb. 4.9 wird deutlich, dass beide untersuchten Agonisten Acetylcholin und Iperoxo durch den Austausch von ⁴²²Tryptophan gegen Alanin hoch signifikant an Affinität verlieren. Die Affinität von Iperoxo wurde durch die Mutation M_2 ¹⁷⁷Tyr→Ala in ähnlichem Ausmaß abgesenkt. J. Antony fand im 5 mM Na,K,P_i-Puffer ebenfalls eine Affinitätsabnahme von Acetylcholin, Iperoxo und des Partialagonisten Pilocarpin durch die Mutation dieser beiden Epitope (Dissertation 2007). Folglich kann eine Beteiligung dieser beiden Aminosäuren an der Bindung von Agonisten postuliert werden.

Bei den Antagonisten gibt es zwar auch signifikante Affinitätsänderungen, die allerdings geringer sind als bei den Agonisten und keinem einheitlichen Muster folgen. Atropin zeigte bei zwei der untersuchten Mutationen eine Affinitätszunahme, NMS bei zweien eine Affinitätsabnahme, und die Bindung von Scopolamin blieb durch die allosterischen Mutationen unbeeinflusst. Daher kann für die orthosterischen Antagonisten keine allgemeingültige Aussage über die Interaktion mit den hier betrachteten Epitopen getroffen werden. Die beobachteten Änderungen der Affinität könnten auch indirekt infolge von Konformationsänderungen des Rezeptors durch die Punktmutation aufgetreten sein.

Zusammengefasst scheint die funktionelle Zuordnung von Rezeptorepitopen am ortho-/allosterischen Übergangsbereich in Abhängigkeit vom Aktivitätszustand des Rezeptors zu wechseln, der aktive und der inaktive Rezeptor weisen also im Bereich der ortho- und der allosterischen Bindungsstelle verschiedene Konformationen auf. Da die beiden Haftareale am aktiven Rezeptor einen geringeren Abstand zueinander aufweisen als am inaktiven Rezeptor, ist eine dualsterische Bindung am aktiven Rezeptor erleichtert. Für Hybrid-Agonisten war eine Kettenlänge von sechs Methylengruppen bereits eine passend, für Hybrid-Antagonisten muss dies noch durch Strukturvariationen optimiert werden. Auch wenn eine verlängerte Zwischenkette zu besseren Eigenschaften der Hybrid-Antagonisten wie z.B. einer erhöhten M₂-Selektivität führen kann, so konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch erstmals gezeigt werden, dass auch am inaktiven Rezeptor eine dualsterische Bindung möglich ist.

5 Zusammenfassung

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Sie verfügen über zwei räumlich benachbarte Bindungsstellen. Die orthosterische Acetylcholinbindungsstelle befindet sich zwischen den transmembranären Domänen und ist unter den fünf bekannten Subtypen (M_1 - M_5) hoch konserviert. Das allosterische Haftareal ist auf der extrazellulären Seite des Rezeptors im Eingangsbereich zur orthosterischen Tasche lokalisiert. Die Aminosäuresequenz in diesem Bereich variiert zwischen den Subtypen.

Hybridliganden aus dem muskarinischen orthosterischen Agonisten Iperoxo und einem allosterischen M_2 -selektiven Modulatorbaustein wiesen in vorangegangenen Untersuchungen eine M_2 -selektive Rezeptoraktivierung auf. Eine überlappende Bindung an die orthosterische und an die allosterische Bindungsstellen konnte mit Hilfe verschiedener experimenteller Ansätze gezeigt werden. Dieser ortho-/allosterische Bindungsmodus wurde dualsterisch genannt (Antony et al., FASEB J 2009, (23): 1-9).

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob das Konzept der dualsterischen Rezeptorbesetzung auf Antagonisten übertragbar ist. Zu diesem Zweck wurden im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutisches Institut, Universität Würzburg) neuartige Hybridliganden synthetisiert, bei denen der orthosterische Agonist-Baustein der dualsterischen Liganden gegen einen der beiden unselektiven inversen Agonisten Atropin (8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-yl)-3-hydroxy-2-phenylpropanoat oder Scopolamin ((-)-(S)-3-hydroxy-2-phenylpropionicacid(1R,2R,4S,7S,9S)-9-methyl-3-oxa-9-azatricyclo[3.3.1.0^{2,4}]non-7-yl-ester) ausgetauscht ist. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rezeptorinteraktion dieser neuen Verbindungen in Bezug auf Subtypselektivität, Bindungstopographie, Bindungskinetik und intrinsische Aktivität charakterisiert.

Für die Untersuchung der Subtypselektivität der Hybridliganden wurden Radioligand-bindungsstudien mit dem orthosterischen Radioantagonisten [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS) an Membransuspensionen aus stabil transfizierten humanen M_2 - und M_5 -Rezeptoren durchgeführt. Im Fall der atropinhaltigen Hybridliganden Atr-W84 (N-[(1,3-dioxo-isoindol-2-yl)-propyl]-6-[3-(3-hydroxy-2-phenylpropoxy)-8-methyl-8-azoniabicyclo-

[3.2.1]oct-8-yl]-N,N-dimethyl-hexane-1-aminium dibromide) und Atr-Naph (N-[3-(benzo[de]isoquinolin-2-yl)-2,2-dimethylpropyl]-6-[3-(3-hydroxy-2-phenylpropoxy)-8-methyl-8-azoniabicyclo[3.2.1]oct-8-yl]-N,N-dimethyl-hexane-1-aminium dibromide) zeigte sich eine M₂-Prävalenz, nicht jedoch bei den Scopolamin-Analoga.

Im allosterischen Teil systematisch modifizierte Substanzreihen, die von den orthosterischen Antagonisten Atropin und Scopolamin als auch vom orthosterischen Agonisten Iperoxo ausgingen, ergaben parallele Strukturwirkungsbeziehungen für die Bindungsaffinität am M₂-Rezeptor. Somit kann geschlossen werden, dass der Bindungsmodus der Hybridantagonisten im Prinzip ebenso dualsterisch ist wie von Antony et al. (2009) für die Hybridagonisten nachgewiesen.

In Versuchen mit punktmutierten M₂-Rezeptoren zeigten die *Atropin*-Hybride Atr-W84 und Atr-Naph einen Affinitätsabfall sowohl an der orthosterischen Mutation M₂¹⁰⁴Tyr→Ala als auch an den beiden allosterischen Mutationen M₂¹⁷⁷Thr→Gln und M₂⁴²²Trp→Ala. Diese Befunde stützen die Hypothese eines dualsterischen Bindungsmodus der Hybridantagonisten. Die *Scopolamin*-Hybride wiesen nur einen Affinitätsverlust an der orthosterischen Mutante auf. Dies ist im Einklang mit der fehlenden M₂/M₅-Subtyp-Selektivität der Scopolamin-Hybride.

Die funktionellen Untersuchungen wurden mit Atr-Naph durchgeführt, da diese Verbindung die deutlichsten Hinweise auf einen dualsterischen Bindungsmodus aufwies. Im [³⁵S]GTPγS-Experiment an Membransuspensionen aus stabil transfizierten CHO-hM₂-Zellen verhielt sich die Substanz als inverser Agonist, indem es die spontane Aktivität des Rezeptors zu reduzieren vermochte. Dies war erwartet worden, da die beiden Bausteine des Hybrids, Atropin und Naphmethonium [2-[3-[1-[6-[1,1-Dimethyl-1-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihydroisoindol-2-yl)propyl]ammonium]hexyl]-1,1-dimethylammonium]-2,2-dimethylpropyl]benzo[de]isoquinolin-1,3-dion], jeweils inverse Agonisten darstellen.

Messungen der dynamischen Massenumverteilung an lebenden CHO-hM₂-Zellen zeigten einen raschen Eintritt der antagonistischen Wirkung des Hybrids Atr-Naph gegenüber Acetylcholin, der dem seiner Bausteine Atropin und Naphmethonium entsprach. Dies ist bemerkenswert, weil die Bindungskinetik orthosterischer Liganden an muskarinischen Rezeptoren durch allosterische Modulatoren charakteristischerweise verzögert wird.

Zusammengefasst stützen die Befunde die Hypothese, dass auch am inaktiven Muskarin-M₂-Rezeptor eine dualsterische Bindung möglich ist. Zukünftige Untersuchungen werden klären müssen, ob es möglich ist, durch geeignete Strukturvariationen eine stärkere Subtypselektivität dualsterischer Antagonisten zu erreichen.

6 Literaturverzeichnis

Antony J., Kellershohn K, Mohr-Andrä M., Kebig A., Prilla S., Muth M., Heller E., Disingrini T., Dallanoce C., Bertoni S., Schrobang J., Tränkle C., Kostenis E., Christopoulos A., Höltje H.-D., Brocelli E., De Amici M., Holzgrabe U., Mohr K. Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signalling selectivity. *FASEB J.* 2009; (23): 1-9

Antony J. Bindungstopographie allosterisch/orthosterischer Hybridagonisten am M₂-Acetylcholinrezeptoren. Dissertation 2007, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn

Arunlakshana O und Schild HO. Some quantitative uses of drug antagonists. *Brit J Pharmacol* 1959; (14): 48-58

Ballesteros JS, Weinstein H. Analysis and refinement of criteria for predicting the structure and relative orientations of transmembranal helical domains. *Biophys* 1992; (62): 107-109

Barlow R und Blake JF. Hill coefficients and the logistic equation. *Trends Pharmacol Sci* 1989; (10): 440-441

Birdsall N J, Farries T, Gharagozloo P, Kobayashi S, Kuonen D, Lazareno, S, Popham A, Sugimoto M. Selective allosteric enhancement of the binding and actions of acetylcholine at muscarinic receptor subtypes. *Life Sci* 1997; (60): 1047–1052

Birdsall NJ, Lazareno S. Allosterism at muscarinic receptors: Ligands and mechanisms. *Mini Rev Med Chem* 2005; (5): 523-543

Block GA, Martin KJ, de Francisco AL, Turner SA, Avram MM, Suranyi MG, Hercz G, Cunningham J, Abu-Alfa AK, Messa P, Coyne DW, Locatelli F, Cohen RM; Evenepoel P, Moe SM, Fournier A, Braun J, McCary LC, Zani VJ, Olson KA, Druke TB, Goodman WG. Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* 2004; (350): 1516-1525

Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 1987; (237): 527-532

- Buller S, Zlotos DP, Mohr K, Ellis J. 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* 2002; (61): 160-168
- Casarosa P, Bouyssou T, Germayer S, Schnapp A, Gantner F, Pieper M. Preclinical evaluation of long-acting muscarinic antagonists: comparison of tiotropium and investigational drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; (330): 660-668
- Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 1998; (50): 279-290
- Christopoulos A. Assessing the distribution of parameters in models of ligand-receptor interaction. *TiPS* 1998; (19): 351-357
- Christopoulos A, Grant MKO, El-Fakahany EE. Transducer abstraction: A novel approach to the detection of partial agonist efficacy in radioligand binding studies. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000; (43): 55-67
- Christopoulos A, Kenakin T. G protein-receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 2002; (54): 323-374
- Christopoulos A, May LT, Avlani VA, Sexton PM. G-protein coupled receptor allosterism: the promise and the problem(s). *Biochem Soc Trans* 2004; (32): 873-877
- Clark AL, Mitchelson F. The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. *Br J Pharmacol* 1976; (58): 323-331
- Dallanoce C, Conti P, De Amici M, De Micheli C, Barocelli E, Chiavarini M, Ballabeni V, Bertoni S, Impicciatore M. Synthesis and functional characterization of novel derivatives related to oxotremorine and oxotremorine-M. *Bioorg Med Chem* 1999; (7): 1539-1547
- DeBlasi A, O'Reilly K, Motulsky HJ. Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci* 1989; (10): 227-229
- Disingrini T, Muth M, Dallanoce C, Barocelli E, Bertoni S, Kellershohn K, Mohr K, De Amici M, Holzgrabe U. Design, synthesis, and action of oxotremorin-related hybrid-type allosteric modulators of muscarinic acetylcholine receptors. *J Med Chem* 2006; (49): 366-372
- Dorje F, Levery AI, Brann MR. Immunological detection of muscarinic receptor proteins (m_1 - m_5) in rabbit peripheral tissues. *Mol Pharmacol* 1991; (40): 459-462

- Dowling M., Charlton S. Quantifying the association and dissociation rates of unlabelled antagonists at the muscarinic M₃ receptor. *Br J Pharmacol* 2006; (148): 927-937
- Duttaroy A, Gomeza J, Gan JW, Siddiqui N, Basile AS, Harman WD, Smith PL, Felder CC, Levey AI, Wess J. Evaluation of muscarinic agonist-induced analgesia in muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Mol Pharmacol* 2002; (62): 1084-1093
- Eglen RM. Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog med Chem* 2005; (43): 105-136
- Eglen RM. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol* 2006; (26): 219-233
- Ehlert FJ. Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol* 1988; (33): 187-194
- Ellis J, Huyler J, Brann MR. Allosteric regulation of cloned m₁-m₅ muscarinic receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* 1991; (42): 1927-1932
- Ellis J, Seidenberg M, Brann MR. Use of chimeric muscarinic receptors to investigate epitopes involved in allosteric interactions. *Mol Pharmacol* 1993; (44): 583-588
- Ellis J. Allosteric binding sites on muscarinic receptors. *Drug Development Research* 1997; (40): 193-204
- Fang Y. Non-invasive optical biosensor for probing cell signalling. *Sensors* 2007; (7): 2316-2329
- Gaddum JH. Theories of drug antagonism. *Pharmacol Rev* 1957; (9): 211-218
- Giersbergen P., Leppik R. Modulation of agonist binding by guanine nucleotides in CHO cells expressing muscarinic m₁-m₅ receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1995; (352): 166-172
- Gregory KJ, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Neuropharmacol* 2007; (5): 157-167
- Gregory KJ, Hall NE, Tobin AB, Sexton PM, Christopoulos A. Identification of orthosteric and allosteric site mutations in M₂ muscarinic acetylcholine receptors that contribute to ligand-selective signaling bias. *J Biol Chem* 2010; (285): 7459-7474
- Grossmüller M, Antony J, Tränkle C, Holzgrabe U, Mohr K. Allosteric site in M₂ acetylcholine receptors: evidence for a major conformational change upon binding of an orthosteric agonist instead of an antagonist. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2006; (372): 267-276
-

- Hilf G. und Jakobs KH. Agonist-independent inhibition of G protein activation by muscarinic acetylcholine receptor antagonists in cardiac membranes. *Eur J Pharmacol* 1992; (225): 245-252
- Hill AV. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol (Proc)* 1919; (40): iv-vii
- Holzgrabe U, Mohr K. Allosteric modulators of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors. *Drug Discovery Today* 1998; (3): 214-222
- Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; (30): 633-673
- Jacobson AR, Tan SW, Sayre AM. Modification of the enkephalin “message” with an artificial polycationic C-terminus. *J Med Chem* 1991; (34): 2816-2821
- Jäger D, Schmalenbach C, Prilla S, Schrobang J, Kebig A, Sennwitz M, Heller E, Tränkle C, Holzgrabe U, Hölje HD, Mohr K. Allosteric small molecules unveil a role of an extracellular E2/TM7 junction for GPCR activation. *J Biol Chem* 2007; (282): 34968-34976
- Jakubik J, Bacakova L, El-Fakahany EE, Tucek S. Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 1997; (52) 172-179
- Jensen AA, Spalding TA. Allosteric modulation of G-protein coupled receptors. *Eur J Pharm Sci* 2004; (21): 407-420
- Kebig A, Mohr K. Cinacalcet – an allosteric enhancer at the Ca^{2+} -receptor. *Dtsch Med Wochenschr* 2008; (133): 1681-1683
- Kebig A, Kostenis E, Mohr K, Mohr-Andrä M. An optical dynamic mass redistribution assay reveals biased signaling of dualsteric GPCR activators. *J Recept Signal Transduct Res* 2009; (29): 140-145
- Kellershohn K. Allosterisch/orthosterische Hybridliganden des muskarinischen Acetylcholinrezeptors: Rezeptorbindung- und aktivierung. Dissertation 2007, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn
- Klemt D. Allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung an muskarinischen M_2 - und M_4 -Rezeptoren. Dissertation 2005, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn
- Kostenis, E. und Mohr, K. Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation. *Trends Pharmacol Sci* 1996; (8) : 280-283
-

- Krejčí A, Tuček S. Quantitation of mRNAs for M₁ to M₅ subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. *Mol Pharmacol* 2002; (61): 1267-1272
- Kubo T, Maeda A, Sugimoto K, Akiba I, Mikami A, Takahashi H, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K. Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett* 1986; (209): 367-372
- Landgraf D, Barth M, Layer PG, Sperling LE. Acetylcholine as a possible signaling molecule in embryonic stem cells: Studies on survival, proliferation and death. *Chem Biol Interact* 2010; (187): 115-119
- Lanzafame A., Christopoulos A, Mitchelson F. Interactions of agonists with an allosteric antagonist at muscarinic acetylcholine M₂ receptors. *Eur J Pharmacol* 1996; (316): 27-32
- Lazareno S und Birdsall NJM. Estimation of competitive antagonist affinity from functional inhibition curves using the Gaddum, Schild and Cheng-Prusoff equations. *Br J Pharmacol* 1993; (109): 1110-1119
- Lazareno S, Farries T, Birdsall NJ. Pharmacological characterization of guanine nucleotide exchange reactions in membranes from CHO cells stably transfected with human muscarinic receptors m1-m4. *Life Sci* 1993; (52): 449-456
- Lazareno S und Birdsall NJ. Detection, quantitation and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptor: Interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* 1995; (48): 362-378
- Lazareno S, Doležal V, Popham A, Birdsall NJ. Thiochrome enhances acetylcholine affinity at muscarinic M₄ receptors: receptor subtype selectivity via cooperativity rather than affinity. *Mol Pharmacol* 2004; (65): 257-266
- Leppik RA, Miller RC, Eck M, Paquet JL. Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* 1994; (45): 983-990
- Linsel N. Einfluss von Rezeptorglykosylierung und Lipidmembranumgebung auf die Ligandbindung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren unter besonderer Berücksichtigung der allosterischen Bindungsstelle. Dissertation 2008, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; (193): 265-275
- Lu ZL, Saldanha JW, Hulme EC. Seven-transmembrane receptors: crystal clarify. *Trends Pharmacol Sci* 2002; (23): 140-146
-

- Lüllmann H, Ohnesorge FK, Schauwecker GC, Wassermann O. Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *Eur J Pharmacol* 1969; (6): 241-247
- Lüllmann H, Mohr K, Hein L. *Pharmakologie und Toxikologie*. 2010, 17. Auflage, Thieme-Verlag
- Maaß A, Mohr K. Opposite effects of alcuronium on agonist and on antagonist binding to muscarinic receptors. *Eur J Pharmacol* 1996; (305): 231-234
- Maelicke A, Schrattenholz A, Samochocki M, Radina M, Albuquerque EX. Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 2000; (113): 199-206
- Maier-Peuschel M, Frölich N, Dees C, Hommers LG, Hoffmann C, Nikolaev VO, Lohse MJ. A fluorescence resonance energy transfer-based M₂ muscarinic receptor sensor reveals rapid kinetics of allosteric modulation. *J Biol Chem* 2010; (285): 8793 - 8800
- May LT, Leach K, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; (47): 1-51
- May LT, Avlani VA, Langmead CJ, Herdon HJ, Wood MD, Sexton PM, Christopoulos A. Structure-function studies of allosteric agonism at M₂ muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 2007; (72): 463-476
- Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* 2006; (147 Suppl 1): S46-S55
- Millman JS, Andrews DW. Switching the model: A concerted mechanism for GTPases in protein targeting. *Cell* 1997; (89): 673-676
- Mistry R, Dowling MR, Challiss RAJ. An investigation of whether agonist-selective receptor conformations occur with respect to M₂ and M₂ muscarinic acetylcholine receptor signaling via G_{i/o} and G_s proteins. *Br J Pharmacol* 2005; (144): 566-575
- Monod J, Changeux JP, and Jacob F. Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol* 1963; (6): 306-329.
- Mohr K, Tänkle C, Kostenis E, Baroceli E, De Amici M, Holzgrabe U. Rational design of dualsteric GPCR ligands: quests and promise. *Br J Pharmacol* 2010; (159): 997-1008
- Motulsky H., Mahan L. The Kinetics of Competitive Radioligand Binding Predicted by the Law of Mass Action. *Mol Pharmacol* 1983; (25): 1-9
-

- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le TI, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein coupled receptor. *Science* 2000; (289): 739-745
- Peacock M, Bilezikian JP, Klassen PS, Guo MD, Turner SA, Shoback D. Cinacalcet hydrochloride maintains long-term normocalcemia in patients with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; (90): 135-141
- Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Ramachandran J, Capon DJ. Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature* 1988; (334): 434-437
- Pogozheva ID, Lomize AL, Mosberg HI. The transmembrane 7-alpha-bundle of rhodopsin: Distance geometry calculations with hydrogen bonding constraints. *Biophys J* 1997; (72): 1963-1985
- Portoghesi PS, Ronisvalle G, Larson DL, Yim CB, Sayre LM, Takemori AE. Opioid agonist and antagonist bivalent ligands as receptor probes. *Life Sci* 1982; (31): 1282-1286
- Prilla S, Schrobang J, Ellis J, Hölting HD, Mohr K. Allosteric interactions with muscarinic acetylcholine receptors: complex role of the conserved tryptophane M₂⁴²²Trp in a critical cluster of amino acids for baseline affinity, subtype selectivity, an cooperativity. *Mol Pharmacol* 2006; (70): 181-193
- Prilla S. Muskarinische Acetylcholinrezeptoren: Identifizierung einer Kernregion für allosterisch-orthosterische Rezeptorindikation. *Dissertationschrift* 2006, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn
- Redka DS, Pisterzi LF, Wells JW. Binding of orthosteric ligands to the allosteric site of the M₂ muscarinic cholinergic receptor. *Mol Pharmacol* 2008; (74): 834-843
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1977; (74): 5463-5467
- Santos MD, Alkondon M, Pereira EFR, Aracava Y, Eisenberg H M, Maelicke, A, Albuquerque EX. The nicotinic allosteric potentiating ligand galantamin facilitates synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Mol Pharmacol* 2002; (61): 1222-1234
- Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1949; (51): 660-672
- Schmalenbach C. Allosterische Modulation der durch Acetylcholin und weiteren Agonisten ausgelösten Aktivierung von muskarinischen M₂-Rezeptoren. *Dissertation* 2005, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn
-

- Schneider EH, Schnell D, Papa D, Seifert R. High constitutive activity in a G-protein-independent high-affinity state of the human histamine H₄-receptor. *Biochemistry* 2009; (48): 1424-1438
- Sennwitz M. Subtypeselektivität allosterischer Liganden an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren – Untersuchungen mit strukturmodifizierten Alkan-Bisammonium-Verbindungen. Dissertation 2006, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn
- Sieghart W. GABA_A receptors: Ligand-gated Cl⁻ ion channels modulated by multiple drug-binding sites. *Trends Pharmacol Sci* 1992; (13): 446-450
- Spalding TA, Birdsall NJ, Curtis CA, Hulme EC. Acetylcholine mustard labels the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 1994; (269): 4092-4097
- Stockton JM, Birdsall NJ, Burgen AS, Hulme EC. Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. *Mol Pharmacol* 1983; (23): 551-557
- Straßmann V. Rezeptorepitop-Abhängigkeit der Bindung muskarinischer allosterischer Modulatoren unter verschiedenen ionalen Bedingungen. Dissertation 2007, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn
- Tränkle C, Kostenis E, Burgmer U, Mohr K. Search for lead structures to develop new allosteric modulators of muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; (279): 926-933
- Tränkle C, Dittmann A, Schulz U, Weyand O, Buller S, Jöhren K, Heller E, Birdsall NJ, Holzgrabe U, Ellis J, Höltje HD, Mohr K. Atypical muscarinic allosteric modulation: cooperativity between modulators and their atypical binding topology in muscarinic M₂ and M₂/M₅ chimeric receptors. *Mol Pharmacol* 2005; (68): 1597-1610
- Valant C, Sexton PM, Christopoulos A. Orthosteric/Allosteric bitopic ligands: Going hybrid at GPCRs. *Mol Interv* 2009; (9): 125-135
- Voigtländer U, Jöhren K, Mohr M, Raasch A, Tränkle C, Buller S, Ellis J, Höltje HD, Mohr K. Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: Identification of two amino acids in the muscarinic M₂ receptor that account entirely for the M₂/M₅ subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in N-methylscopolamine-occupied receptors. *Mol Pharmacol* 2003; (64): 21-31
- Voigtländer U. Kooperative Interaktionen an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren: Suche nach essentiellen Aminosäuren der allosterischen Bindungsstelle von M₂-Rezeptoren. Dissertation 2003, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Bonn
- Waud DR, Lee Son S, Waud BE. Kinetic and empirical analysis of dose-response curves illustrated with a cardiac example. *Life Sciences* 1978; (22): 1275-1286
-

- Wess J. Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci* 1993; (14): 308-313
- Wess J, Egelin EM, Gautam D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2007; (9): 721-733
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K. The cholinergic `pitfall`: Acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999 ; (26): 198-205

7 Anhang

7.1 Homologe Konkurrenzexperimente

Homologe Konkurrenzexperimente dienen zur Bestimmung der Bindungseigenschaften des eingesetzten Radioliganden an den Rezeptor in einer Membransuspension. Es wurden die Affinität des Radioliganden [³H]NMS zu den Rezeptoren (K_D), sowie die Anzahl an Bindungsstellen (B_{max}) bestimmt, welche auf die Proteinkonzentration der Membransuspensionen bezogen werden kann. Die entsprechenden Parameterwerte der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Membransuspensionen sind in Tab. 7.1 - Tab. 7.3 zusammengefasst. Durchführung und Auswertung sind in Kapitel 2.4.6 bzw. 2.3 erläutert (Seite 33 bzw. 27).

Das Niveau der unspezifischen [³H]NMS-Bindung lag im Durchschnitt bei ca. 2 % der Gesamtbindung, bei der orthosterischen Mutante $M_2^{104Tyr \rightarrow Ala}$ war diese wegen der Erhöhung der Radioligandkonzentration und der Reduktion auf einen Waschschrift bei der Filtration (siehe Kapitel 2.4.6.1 und 7.2.1, Seite 37 bzw. 267) auf ca. 8 % erhöht.

Rezeptor	Tag der Herstellung	n	pK _D	B _{max} [fmol/mg]	Protein- konzentration [mg/ml]
M ₁ wt	05.06.2007 [†]	4	9,30 ± 0,02	2936 ± 77	1,18
	10.08.2007	3	9,18 ± 0,30	8400 ± 4743	1,05
M ₂ wt	22.05.2007 [†]	4	9,12 ± 0,07	3451 ± 309	2,16
	13.07.2007 [†]	3	9,22 ± 0,05	2060 ± 179	1,14
	27.11.2007	4	9,21 ± 0,13	1830 ± 117	1,38
	01.07.2008 I	3	9,10 ± 0,03	1159 ± 551	1,56
	01.07.2008 II	3	9,09 ± 0,01	1328 ± 632	1,40
M ₃ wt	15.05.2009	4	9,50 ± 0,11	2687 ± 402	1,06
	23.01.2007 [†] (Kellershohn)	3	9,17 ± 0,12	6971 ± 1901	2,25
	31.07.2007	4	8,97 ± 0,19	17509 ± 5405	1,09
M ₄ wt	12.07.2007 [†]	3	9,22 ± 0,06	3200 ± 341	1,32
M ₅ wt	03.07.2007 [†]	3	9,11 ± 0,04	4366 ± 576	1,02
	19.02.2008	3	8,79 ± 0,06	3405 ± 395	1,52

Tab. 7.1: Charakteristika der verwendeten Membransuspensionen aus stabil transfizierten CHO-Zellen.

n: Anzahl der unabhängigen Einzelexperimente in Dreifachbestimmung, pK_D: negativer dekadischer Logarithmus des K_D-Werts. Die Versuche wurden mit 0,2 nM [³H]NMS in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) durchgeführt. Die Proteinbestimmungen erfolgten in Einfachbestimmung.

[†]: Diese Versuche wurden in Anwesenheit von GDP (M₂/M₄: 10 μM, M₁/M₃/M₅: 1 μM) durchgeführt.

Homologe Konkurrenzexperimente

Rezeptor	Tag der Herstellung	n	pK _D	B _{max} [fmol/mg]	Protein- konzentration [mg/ml]
Flp M ₂ wt	13.12.2007	4	9,26 ± 0,14	2136 ± 307	1,48
	04.02.2009	3	9,39 ± 0,01	2796 ± 47	1,10
	19.05.2009 I	4	9,50 ± 0,06	2021 ± 215	1,05
	19.05.2009 II	4	9,47 ± 0,07	1919 ± 194	1,03
	04.09.2009	3	9,35 ± 0,05	2331 ± 191	1,25
	19.01.2010	4	9,24 ± 0,06	3568 ± 469	0,97
Flp M ₂ 104Tyr→Ala*	17.04.2008	4	8,19 ± 0,15	752 ± 236	1,58
	20.02.2009	4	7,82 ± 0,06	1483 ± 209	1,36
	18.05.2009	4	7,98 ± 0,06	1066 ± 169	1,27
	24.07.2009	3	7,87 ± 0,07	1840 ± 364	1,13
	04.09.2009	5	8,00 ± 0,07	1058 ± 119	1,66
	04.09.2009 ^Z	5 ^Z	7,96 ± 0,03	3558 ± 204	1,66
Flp M ₂ 177Tyr→Ala	21.12.2007	4	9,24 ± 0,13	2076 ± 414	1,58
Flp M ₂ 177Tyr→Gln	29.07.2008	4	9,11 ± 0,09	5570 ± 747	0,66
	12/2007 (Kebig)	4	9,18 ± 0,09	n.b.	n.b.
Flp M ₂ 422Trp→Ala	23.07.2009	3	9,36 ± 0,04	1037 ± 170	1,14
Flp M ₂ 423Thr→Ala	21.12.2007	3	9,22 ± 0,03	2086 ± 308	1,67
Flp M ₂ 423Thr→His	29.07.2008	3	8,93 ± 0,01	4965 ± 548	0,70

Rezeptor	Tag der Herstellung	n	pK _D	B _{max} [fmol/mg]	Protein- konzentration [mg/ml]
Flp M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	19.09.2008	3	9,45 ± 0,08	1133 ± 226	0,90
	10.02.2009	4	9,52 ± 0,03	2511 ± 120,26	0,96

Tab. 7.2: Charakteristika der verwendeten Membransuspensionen aus stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen

n: Anzahl der unabhängigen Einzelerperimente in Dreifachbestimmung, pK_D: negativer dekadischer Logarithmus des K_D-Werts. Die Versuche wurden mit 0,2 nM [³H]NMS in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) durchgeführt. Die Proteinbestimmungen erfolgten in Einfachbestimmung, n.b.: nicht bestimmt.

*: Diese Versuche wurden mit 1 nM [³H]NMS durchgeführt.

z: Diese Versuche sind mit dem Zentrifugationsverfahren durchgeführt worden.

Rezeptor	Tag der Herstellung	n	pK _D	B _{max} [fmol/mg]	Protein- konzentration [mg/ml]
M ₂ wt	11.09.2009	3	9,58 ± 0,03	498 ± 54	3,68
M ₂ ¹⁷² Glu→Ala	11.09.2009	3	9,44 ± 0,07	793 ± 91	3,47
M ₂ ¹⁷⁵ Glu→Ala	11.09.2009	3	9,59 ± 0,04	558 ± 54	3,84

Tab. 7.3: Charakteristika der verwendeten Membransuspensionen aus transient transfizierten CHO-K1-Zellen

n: Anzahl der unabhängigen Einzelerperimente in Dreifachbestimmung, pK_D: negativer dekadischer Logarithmus des K_D-Werts. Die Versuche wurden mit 0,2 nM [³H]NMS in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) durchgeführt. Die Proteinbestimmungen erfolgten in Einfachbestimmung.

7.2 Bestimmung der Dissoziationshalbwertszeit

Die Dissoziationsgeschwindigkeit des Radioliganden ist eine weitere wichtige Eigenschaft der Ligand-Rezeptor-Interaktion. Dieser Parameter wurde in kinetischen Experimenten in kompletten Dissoziationsverläufen oder in Experimenten nach dem 2-Punkt-Verfahren bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 7.4 - Tab. 7.6 zusammengefasst. Die Durchführung und Auswertung dieser Versuche ist in Kapitel 2.4.8 beschrieben (Seite 46).

Die Halbwertszeit der [³H]NMS-Dissoziation ist für die Berechnung der Inkubationszeit für Untersuchungen im Bindungs-Gleichgewicht essentiell (Gleichung 22). Nach fünf Halbwertszeiten befindet sich die Reaktionsreaktion nahezu vollständig (96,9%) im Gleichgewicht.

Rezeptor	n	k ₁ [min ⁻¹]	t _{1/2} [min]
M ₁ wt	1	0,109	6,34
M ₂ wt	58	0,37 ± 0,01	1,93 ± 0,04
M ₃ wt	9	0,05 ± 0,01	14,79 ± 1,59
M ₄ wt	1	0,05	12,89
M ₅ wt	31	0,04 ± 0,00	17,78 ± 0,63

Tab. 7.4: Dissoziationsgeschwindigkeiten von [³H]NMS von den angegebenen Rezeptoren aus stabil transfizierten CHO-Zellen.
n: Anzahl der unabhängigen Einzelerperimente in Doppelbestimmung, k₁: Geschwindigkeitskonstante, t_{1/2}: Halbwertszeit. Die Versuche wurden mit 2 nM [³H]NMS in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) durchgeführt.

Bestimmung der Dissoziationshalbwertszeit

Rezeptor	n	k_{-1} [min ⁻¹]	$t_{1/2}$ [min]
Flp M ₂ wt	10	0,37 ± 0,03	2,00 ± 0,04
Flp M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala *	2*	2,96 ± 0,36	0,24 ± 0,03
Flp M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Ala	4	0,35 ± 0,00	1,99 ± 0,02
Flp M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	6	0,39 ± 0,06	1,96 ± 0,27
Flp M ₂ ⁴²² Trp→Ala	2*	0,18 ± 0,00	3,92 ± 0,10
Flp M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	9	0,45 ± 0,02	1,56 ± 0,05
Flp M ₂ ⁴²³ Thr→His	6	0,36 ± 0,03	2,02 ± 0,22
Flp M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	10	0,20 ± 0,02	3,76 ± 0,39

Tab. 7.5: Dissoziationsgeschwindigkeiten von [³H]NMS von den angegebenen Rezeptoren aus stabil transfizierten FlpIn CHO-Zellen.

n: Anzahl der unabhängigen Einzelexperimente in Doppelbestimmung, k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante, $t_{1/2}$: Halbwertszeit. Die Versuche wurden mit 2 nM [³H]NMS in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) durchgeführt.

*: Diese Versuche wurden als kompletter Dissoziationsverlauf aufgenommen.

Rezeptor	n	k_{-1} [min ⁻¹]	$t_{1/2}$ [min]
M ₂ wt	1	0,34 ± 0,01	2,02
M ₂ ¹⁷² Glu→Ala	1	0,31 ± 0,01	2,23
M ₂ ¹⁷⁵ Glu→Ala	1	0,30 ± 0,01	2,32

Tab. 7.6: Dissoziationsgeschwindigkeiten von [³H]NMS von den angegebenen Rezeptoren aus transient transfizierten CHO-K1 Zellen.

n: Anzahl der unabhängigen Einzelexperimente in Doppelbestimmung, k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante, $t_{1/2}$: Halbwertszeit. Die Versuche wurden mit 2 nM [³H]NMS in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) als komplette Dissoziationsverläufe aufgenommen.

7.2.1 Kinetik der [^3H]NMS-Dissoziation an der Rezeptormutante $\text{M}_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$

In Tab. 7.5 (Seite 266) ist die [^3H]NMS-Dissoziationshalbwertszeit von der orthosterischen Mutante $\text{M}_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ mit $0,24 \pm 0,03 \text{ min}$ ($\hat{=} 14,4 \text{ s}$) angegeben. Dieser Wert gibt die maximal mögliche Halbwertszeit an, da experimentell kein Dissoziationsverlauf detektiert werden konnte. Die in der vorliegenden Arbeit im Na,Mg,HEPES-Puffer erhobenen Ergebnisse sind in Abb. 7.1 dargestellt.

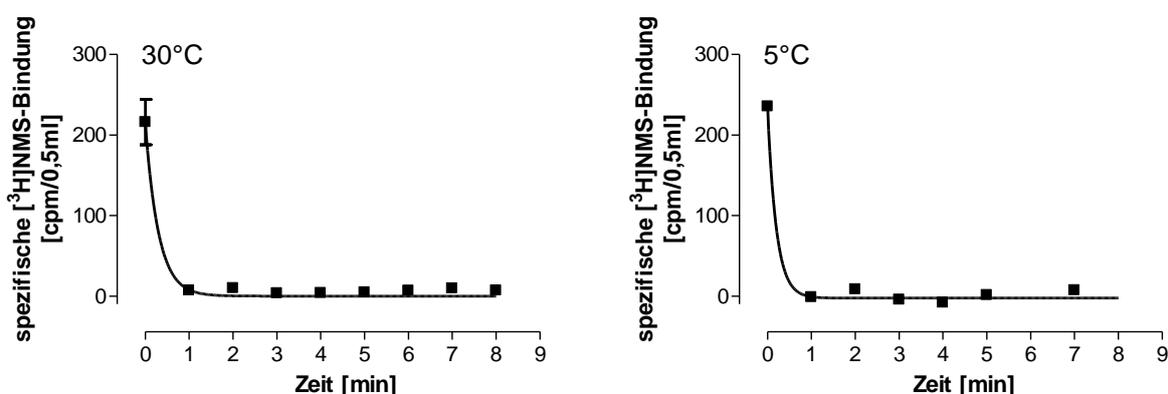


Abb. 7.1: Verlauf der [^3H]NMS-Dissoziation an der orthosterischen Punktmutante $\text{M}_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ bei verschiedenen Temperaturen.

Die Experimente sind mit stabil transfizierten FIpIn CHO-Zellen in einem Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) durchgeführt worden, die Radioligandkonzentration betrug 2 nM. *Ordinate:* spezifische Radioligand-Bindung in *counts per minute* pro Versuchsansatz von 0,5 ml. *Abszisse:* Zeit in min. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes in Vierfachbestimmung. Die Daten wurden nach Gleichung 23 analysiert.

Bereits nach 1 min war bei beiden Temperaturen der Radioligand vollständig abdissoziiert. Auch durch die Absenkung der Inkubationstemperatur auf 5°C (Eisbad) konnte keine sichtbare Verlangsamung der Dissoziation erkannt werden. Folglich kann auf eine Halbwertszeit von $<15 \text{ sec}$ geschlossen werden, der genaue Wert konnte nicht bestimmt werden.

7.3 Vergleich der Bindungsparameter von M₂-Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen

Bei verschiedenen Fragestellungen sind Homogenate aus verschiedenen CHO-Zelllinien verwendet worden (siehe Kapitel 2.1, Seite 17). Dies war in der Verfügbarkeit der einzelnen Rezeptormutanten bzw. -subtypen begründet. In Abb. 7.2 ist ein Vergleich der Ergebnisse für unterschiedliche Liganden gezeigt, die mit Rezeptorhomogenaten aus den beiden mit dem hM₂-Rezeptoren stabil transfizierten CHO-Zelllinien erhalten wurden.

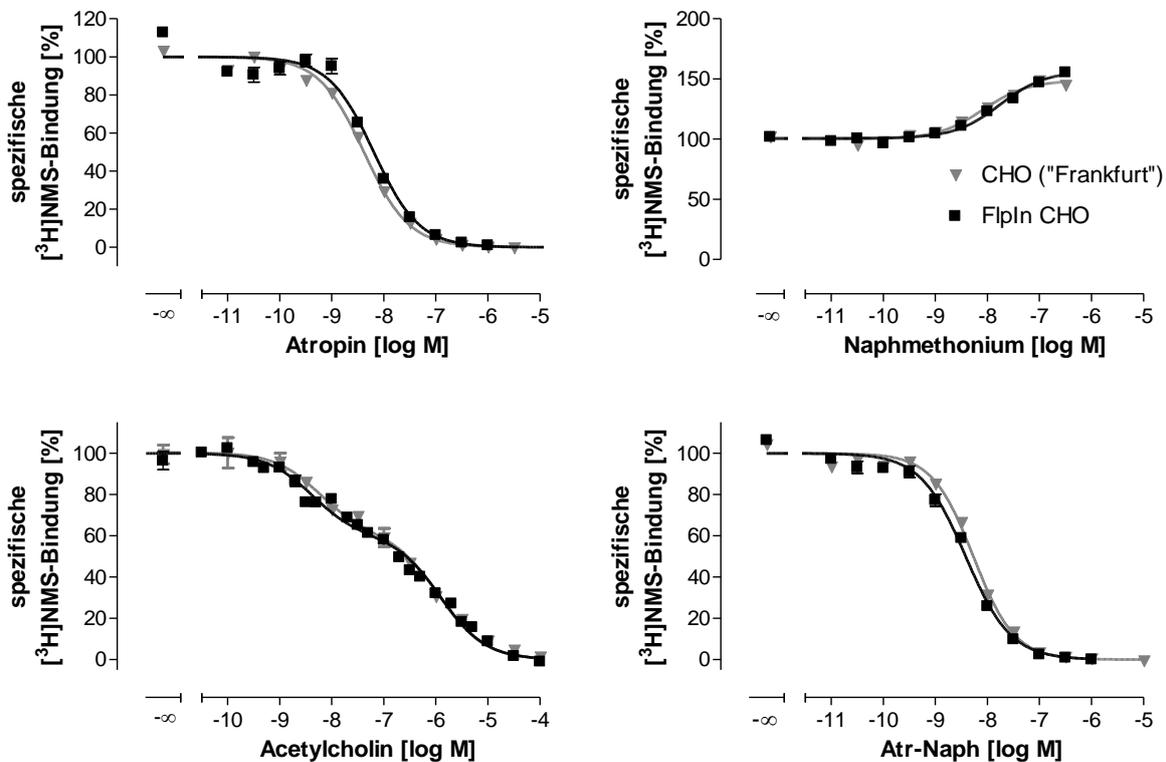


Abb. 7.2: Vergleich der Konzentrations-Effekt-Kurven verschiedener Liganden an M₂-Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen.

Die Versuche wurden mit stabil transfizierten CHO-Zellen unterschiedlicher Herkunft in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 0,2 nM [³H]NMS durchgeführt. *Ordinate:* Spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent des oberen Plateaus, 0% entspricht der unspezifischen Bindung. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 (NMS, Atr-Naph), Gleichung 16 (ACh) oder Gleichung 17 (Naphmethonium) ausgewertet.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit strukturell unterschiedlichen Liganden kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien erkannt werden. Durch die direkte Gegen-

überstellung wird deutlich, dass Daten verglichen werden können, die mit den beiden verschiedenen Expressionssystemen generiert worden sind. Die Parameterwerte aus Abb. 7.2 sind in Kapitel 7.6 (Seite 278, 284, 289 bzw. 286) aufgeführt.

Die Ergebnisse der mit dem hM₂-Rezeptor transient transfizierten CHO-K1-Zellen führten ebenfalls zu denselben Befunden wie die stabilen Zelllinien. Um die versuchsbedingt auftretenden marginalen Unterschiede zu umgehen, wurden in Kapitel 3 die Daten der jeweiligen Subtypen bzw. der punktmutierten M₂-Rezeptoren (wenn nicht anders angegeben) jeweils auf die Daten des M₂-Rezeptors aus dem entsprechenden Expressionssystem bezogen.

7.4 Vergleich von Zentrifugation und Filtration für Radioligand-Bindungsuntersuchungen bei rascher Bindungskinetik

Wie in Kapitel 7.2.1 (Seite 267) dargestellt wurde für die orthosterischen Mutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala eine sehr schnelle [³H]NMS-Dissoziationshalbwertszeit von <<1 min detektiert. Daher muss bei dieser Mutante davon ausgegangen werden, dass auch während der Filtration, bei der der gebundene vom freien Radioliganden abgetrennt wird, und dem nachfolgenden Waschschrift des Filters mit ligandfreier Lösung Radioligand von den Rezeptoren abdissoziiert und mit der Waschflüssigkeit abgesaugt wird. Das Filtrationsprogramm für diese Mutante mit einem Waschschrift mit Aqua dest. (R 4) dauert ca. 20 sec, was mindestens einer Halbwertszeit entspricht. Durch dieses Phänomen kann die spezifische Bindung des Radioliganden nicht quantitativ erfasst werden, die Messwerte werden immer zu niedrig liegen. Dies ist besonders bei der Berechnung der Anzahl der Bindungsstellen (B_{max}) problematisch. Zur Vermeidung ist das Zentrifugationsverfahren etabliert worden (siehe Kapitel 2.4.2, Seite 28). In Abb. 7.3 ist ein Vergleich der beiden Verfahren am Beispiel homologer Konkurrenzexperimente dargestellt. Die [³H]NMS-Bindung ist auf die unverdünnte Membransuspension berechnet (nach Gleichung 2), bei den Vergleichsexperimenten wurde jeweils dieselbe Homogenatcharge eingesetzt.

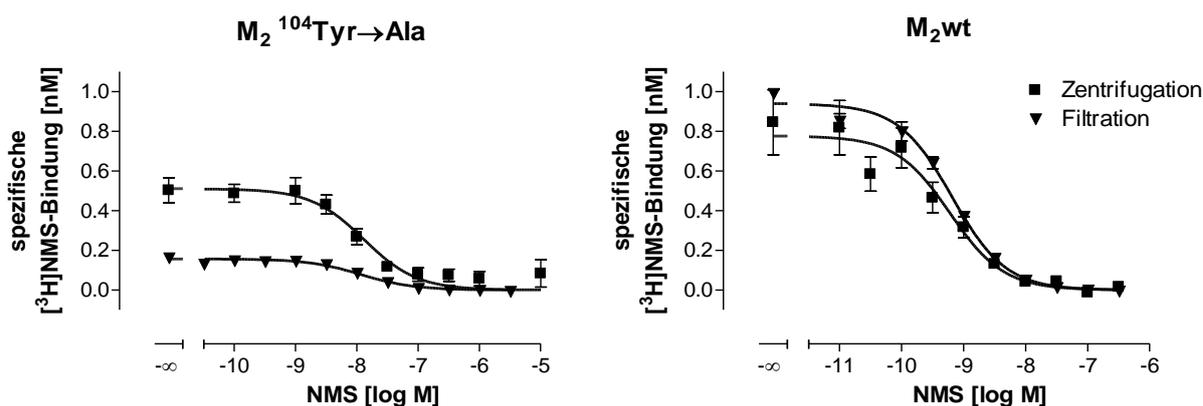


Abb. 7.3: Konzentrations-Bindungs-Kurven homologer Konkurrenzexperimente am M₂wt und an der Mutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala nach dem Zentrifugations- und dem Filtrationsverfahren. Die Versuche wurden mit denselben Membransuspension stabil transfizierter FlpIn CHO-Zellen in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) in Gegenwart von 1,0 (Mutante) bzw. 0,2 nM (M₂wt) [³H]NMS durchgeführt. *Ordinate:* Konzentration der spezifischen [³H]NMS-Bindung in nM als wäre das Homogenat unverdünnt eingesetzt. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von N-Methylscopolamin. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten in Doppel- (Zentrifugation) bzw. Dreifachbestimmung (Filtration). Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet.

An der Punktmutante M₂¹⁰⁴Tyr→Ala veränderte sich die Radioligandaffinität leicht, deutlich war jedoch der Anstieg des B_{max}-Wertes auf über das Dreifache (siehe Tab. 7.7). Folglich fand bei einem Waschschrift von ~2 s beim Zentrifugationsverfahren deutlich weniger Radioligand-Dissoziation statt als bei einem Waschschrift von ~20 s beim Filtrationsverfahren.

	M ₂ wt			M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala		
	n	pK _D	B _{max} [nM]	n	pK _D	B _{max} [nM]
Filtration	3	9,36 ± 0,09	2,63 ± 0,23	5	8,00 ± 0,07	1,76 ± 0,20
Zentrifugation	5	9,67 ± 0,14	1,72 ± 0,17 ^s	5	7,66 ± 0,03 ^s	5,91 ± 0,34 ^s

Tab. 7.7: Parameterwerte homologer Konkurrenzexperimente nach dem Filtrations- und dem Zentrifugationsverfahren an den angegebenen Rezeptoren. Die aufgeführten Daten sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Doppel- (Zentrifugation) bzw. Dreifachbestimmung (Filtration). Die Datensätze wurden nach Gleichung 11 ausgewertet und anschließend wurden die pK_D- bzw. B_{max}-Werten nach Cheng-Prusoff (Gleichung 14) bzw. nach DeBlasi (Gleichung 15) berechnet. n: Anzahl der unabhängigen Einzelerperimente, pK_D: negativer dekadischer Logarithmus des K_D-Werts. ^s: Wert signifikant verschieden vom entsprechenden Wert aus dem Filtrationsexperiments (t-Test, p<0,05).

Das Ausmaß der spezifischen [³H]NMS-Bindung ist beim M₂wt zwischen den beiden Verfahren fast identisch (Abb. 7.3 rechts). Der erhöhte B_{max}-Wert des M₂wt beim Filtrationsverfahren kann dadurch begründet werden, dass durch die Zentrifugation nicht alle

Membranbestandteile pelletiert wurden (Homogenatgewinnung mit 40.000 g, Versuchsdurchführung 20.937 g \triangleq Maximum der verwendeten Tischzentrifuge). Der pK_D -Wert des Wildtyps war bei beiden Verfahren nicht signifikant verschieden voneinander.

Aus den erhobenen Daten für $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ lässt sich ein in Abb. 7.4 skizzierter Dissoziationsverlauf ableiten. Es ergab sich in der simulierten Kurve eine Halbwertszeit von 9,95 s. Dies entspricht weitestgehend dem in Tab. 7.5 (Seite 266) aufgeführten Wert von 0,24 min = 14,4 s.

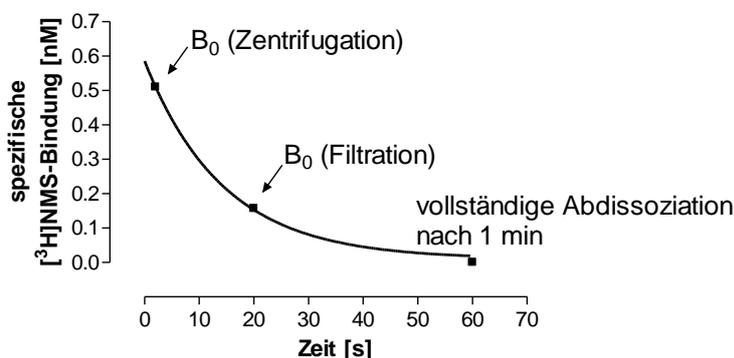


Abb. 7.4: Simulierter Dissoziationsverlauf von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ aus den Bindungsdaten der Zentrifugations- und Filtrationsversuche.

Die oberen Plateaus der in Abb. 7.3 (Seite 270) dargestellten homologen Kompetitions-experimente lieferten die Bindungswerte für die Zeitpunkte 2 und 20 s (ungefähre Zeit der Waschschritte). Aus Abb. 7.1 (Seite 267) war bekannt, dass nach 60 s keine $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung mehr nachweisbar war. *Ordinate:* Konzentration der spezifischen $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in nM. *Abszisse:* Zeit in s.

Die Befunde bestätigen, dass das Filtrationsverfahren für den M_2 -Rezeptor und für weitere Rezeptoren mit einer Halbwertszeit von >1 min gut geeignet ist. Rezeptoren mit einer schnellen Rezeptorkinetik wie die Mutante $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ können besser mit dem Zentrifugationsverfahren vermessen werden. Für kompetitive Interaktionen ist dieser Fehler nicht von Bedeutung, da Testsubstanz und Radioligand im selben Ausmaß während der Filtration bzw. der Filterwaschung abdissoziieren. Bei der Untersuchung von allosterischen Modulatoren und zur Bestimmung der Rezeptordichte B_{max} sollte das Zentrifugationsverfahren Anwendung finden.

7.5 Messung des Effektes inverser Agonisten mit modifizierten [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimenten

Wie in Kapitel 3.1.8.2 (Seite 194) dargestellt, kann bei konstitutiv aktiven Rezeptoren in einem funktionellen Messsystem neben der Agonist-induzierten Rezeptoraktivierung auch eine Inaktivierung durch inverse Agonisten detektiert werden. Muskarinrezeptoren in CHO-Zellen weisen unter Kontrollbedingungen jedoch keine oder nur eine geringe Spontanaktivität auf. Durch Veränderung der Pufferbedingungen wie dem Entfernen einwertiger Kationen oder einer geringeren GDP-Konzentration kann die Spontanaktivität gesteigert werden (Hilf und Jakobs, 1991, Giersbergen und Leppik, 1995, siehe auch Dissertation A. Kebig, 2010). Eine Reduktion von GDP führte im vorliegenden Messsystem lediglich zu einer Erhöhung der gemessenen Werte, ohne die Verhältnisse zu ändern (Daten nicht gezeigt).

Da eine Pufferzusammensetzung wie in Kapitel 3.1.8.2 vorgestellt (L 11, 10 mM HEPES; 100 mM MgCl₂, 4,2 mM NaCl, pH 7,4 mit 10 μ M GDP) zwar die konstitutive M₂-Aktivität erhöhte, allerdings tagesaktuell in unterschiedlichem Ausmaß, war dieses System nicht in der Lage, reproduzierbare Daten zu generieren. Aus diesem Grund wurden andere Pufferzusammensetzungen untersucht, die nach Literaturangaben (Schneider et al., 2009) ebenfalls die spontane Aktivität erhöhen sollten. Außerdem ist der Zeitverlauf der [³⁵S]GTP γ S-Bindung aufgenommen worden, um zu überprüfen, ob ein von einer Inkubationszeit von 60 min abweichendes Protokoll für die Vermessung von inversen Agonisten besser geeignet wäre.

Ein endgültiges Protokoll, mit dem eine reproduzierbare Absenkung der basalen Bindung konzentrationsabhängig gemessen werden kann, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erstellt werden. Für die in Kapitel 3.1.8.2 (Seite 194) dargestellten Befunde wurden nur die Versuchstage ausgewertet, die eine Absenkung der basalen Bindung durch Atropin von mindestens 40% aufwiesen. Versuchsansätze mit veränderten Pufferbedingungen sind in Abb. 7.5 dargestellt. 1 μ M Atropin wurde verwendet, um den M₂-Rezeptor maximal zu inaktivieren, 100 μ M des Vollagonisten Oxotremorin M (R 36) sollten den Rezeptor maximal aktivieren.

Messung des Effektes inverser Agonisten mit modifizierten [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten

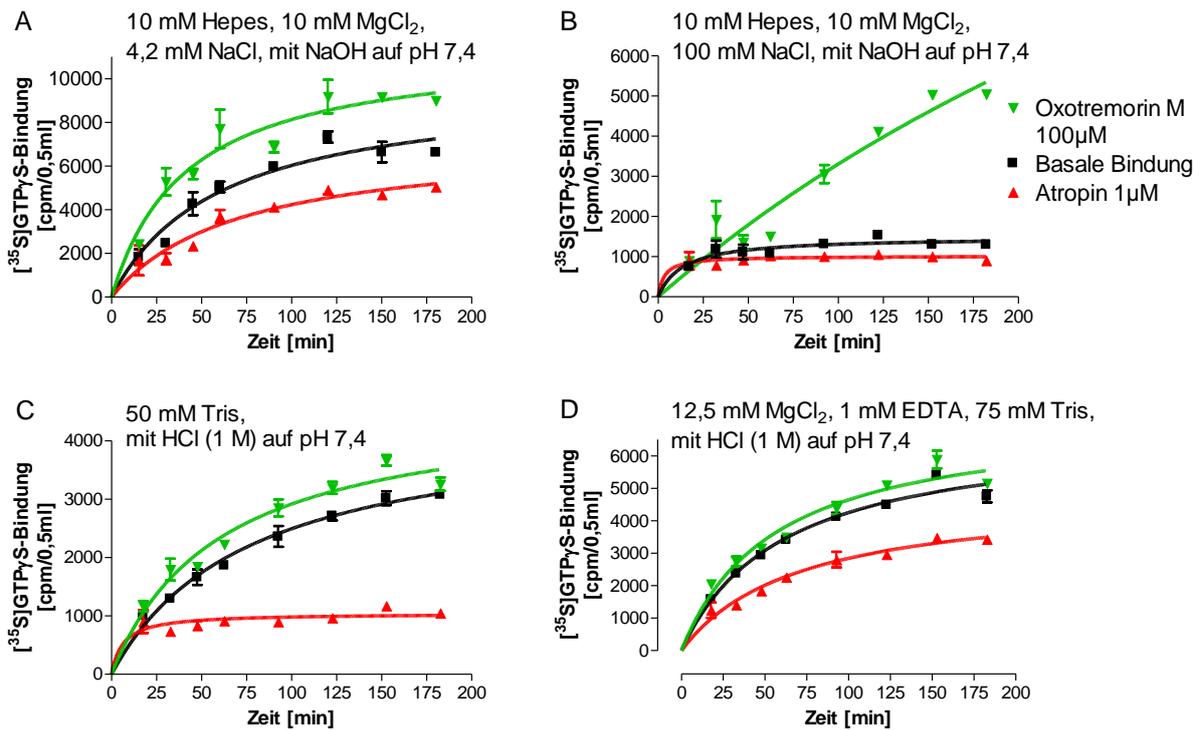


Abb. 7.5: Einfluss verschiedener Pufferzusammensetzungen auf die minimale (Atropin), spontane (basale Bindung) und Agonist-induzierte (Oxotremorin M) [³⁵S]GTPγS-Bindung. Alle Versuche sind an stabil transfizierten CHO-M₂-Zellen bei 30°C mit 10 μM GDP durchgeführt worden, die Radioligandkonzentration betrug 0,08 nM und die Membranproteinkonzentration 40 μg/ml. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler von Einzelversuchen eines Versuchstages in Vierfachbestimmung. Die Datenpunkte wurden mit einer monophasischen Assoziationskurve analysiert (analog Gleichung 23). Ordinate: [³⁵S]GTPγS-Bindung als counts per minute pro Versuchsansatz von 0,5 ml. Abszisse: Zeit in min.

Aus Abb. 7.5 wird ersichtlich, dass die Versuchsansätze A und C die größten Unterschiede zwischen den Kurvenverläufen der basalen Bindung und von Atropin aufwiesen. Bei A, C und D ist bereits nach 60 min eine deutliche Differenzierung zwischen basaler Bindung und der Bindung unter Atropin-Einfluss erkennbar. Die Unterscheidung nimmt mit längerer Inkubationszeit zu.

Neben dem Einfluss auf die Bindung unterschiedlicher Liganden kann in Abb. 7.5 auch auf das Ausmaß des gesamt gebundenen Radioliganden geschlossen werden. So war unter allen Ligandbedingungen die Anzahl der gemessenen Radioaktivität im Na-armen Na,Mg,HEPES-Puffer (A) am größten. Auch wenn die Streuung in diesem Messsystem recht hoch ist, so bietet es ein großes Messfenster.

Neben dem Einfluss verschiedener Puffersysteme wurde der Einfluss von der Radioligand- und der molaren Rezeptorkonzentration bestimmt. Diese Versuche wurden im 50 mM Tris/HCl-Puffer (System C aus Abb. 7.5) durchgeführt, da dieses Messsystem für die

Untersuchung inverser Agonisten zu diesem Zeitpunkt am sinnvollsten erschien. Die Inkubationszeit betrug 3 h.

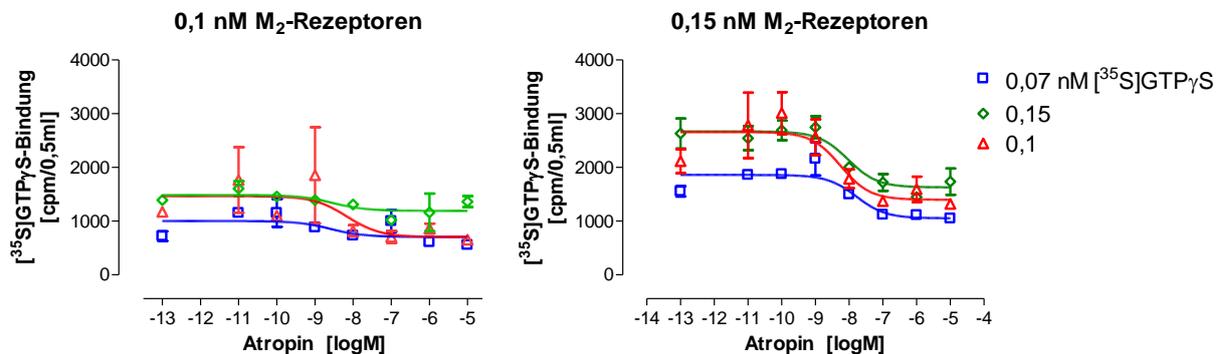


Abb. 7.6: Einfluss verschiedener Rezeptor- und Radioligandkonzentrationen auf die Konzentrations-Effekt-Kurven von Atropin.

Die Versuche sind an stabil transfizierte FlpIn CHO-M₂-Zellen bei 30°C in einem 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) mit 10 μM GDP durchgeführt worden, die Inkubationszeit betrug 180 min. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler von Einzelversuchen eines Versuchstages in Vierfachbestimmung. Die Datenpunkte wurden nach Gleichung 10 analysiert. *Ordinate:* [³⁵S]GTP_γS-Bindung als counts per minute pro Versuchsansatz von 0,5 ml. *Abszisse:* Dekadischer Logarithmus der molaren Atropinkonzentration.

Aus Abb. 7.6 wird ersichtlich, dass eine erhöhte Membranproteinkonzentration von 0,15 nM (entspricht einer Membranproteinkonzentration von 54 μg/ml) die Messung von inversen Agonisten im 50 mM Tris/HCl-Puffer im Gegensatz zu einer Konzentration von 0,1 nM (36 μg/ml) verbesserte, indem der Unterschied der beiden Plateaus vergrößert wurde. Aus diesem Grund wurden die Messungen der inversen Agonisten (Kapitel 3.1.8.2) nicht mit einer Membranproteinkonzentration von 40 μg/ml, sondern mit 50 μg/ml durchgeführt. Die Radioligandkonzentration hatte keinen Einfluss auf die Plateauunterschiede. In Abb. 7.6 wird die ausgeprägte Streuung dieses Versuchsansatzes sichtbar, was die Reproduktion der Konzentrations-Effekt-Kurven von inversen Agonisten neben der schwankenden Spontanaktivität zusätzlich erschwerte.

Da der große Unterschied im Tris/HCl-Puffersystem aus Abb. 7.5 (Seite 273) und Abb. 7.6 an Folgetagen in diesem Ausmaß nicht reproduziert werden konnte, wurde wie in der Dissertation von A. Kebig (2010) beschrieben, der Na-arme Na,Mg,HEPES-Puffer (L 11) für die weiteren Versuche zur Vermessung des inversen Agonismus der Antagonist-Hybride verwendet (Kapitel 3.1.8.2, Seite 194).

7.6 Normierung von Ergebnissen der G-Protein-Aktivierung:

Rezeptorkonzentration vs. Membranproteingehalt

Für den Vergleich verschiedener Rezeptorhomogenate gibt es zwei Möglichkeiten, die Rezeptorsuspension einzustellen: entweder auf den Membranproteingehalt, der mit der Proteinbestimmung nach Lowry (Kapitel 2.3, Seite 27) bestimmt wurde, oder auf die Anzahl der Bindungsstellen B_{\max} (Kapitel 2.4.5, Seite 31). Zur Klärung der Fragestellung, welche der beiden oben genannten Methoden die bessere Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Homogenaten liefert, ist in Abb. 7.7 ein repräsentatives Einzelexperiment dargestellt, bei dem zwei verschiedene Homogenatchargen (als Homogenat 1 bzw. 2 bezeichnet) desselben Rezeptors aus derselben Zelllinie (FlpIn CHO) mit unterschiedlichem Proteingehalt (1,25 bzw. 1,10 mg/ml) und unterschiedlichen B_{\max} -Werten (2,91 bzw. 3,08 nM) verglichen wurden.

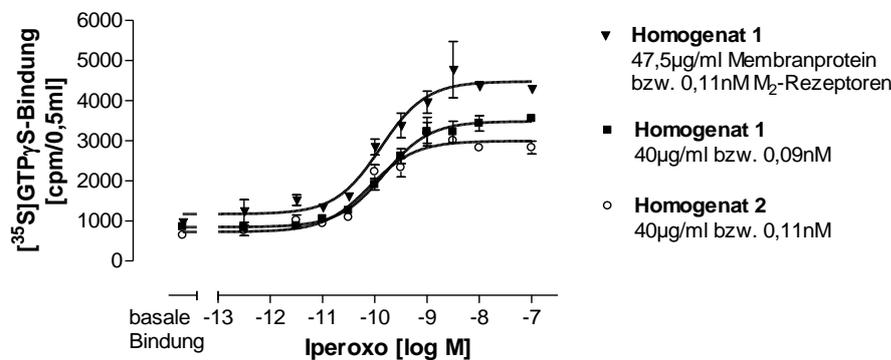


Abb. 7.7: Einfluss verschiedener Membranprotein- bzw. Rezeptorkonzentrationen auf den Maximalwert der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung.

Die Versuche wurden mit stabil transfizierten FlpIn CHO- M_2 -Zellen in einem Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) mit einem Zusatz von 10 μM GDP durchgeführt, die $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Konzentration betrug 0,07 nM. *Ordinate*: $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung als *counts per minute* pro Versuchsansatz von 0,5 ml. *Abszisse*: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Iperoxo. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Einzelexperimentes in Vierfachbestimmung. Die Kurvenanpassung erfolgte nach Gleichung 10.

Homogenat 2 (○) erreichte dasselbe obere Plateau wie Homogenat 1 (■), das auf eine Membranproteinkonzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingestellt war, obwohl der Versuchsansatz von Homogenat 1 bei dieser Verdünnung nur 82 % der Rezeptoranzahl von Homogenat 2 aufwies. Bei dem Ansatz von Homogenat 1 (▼), der auf dieselbe Rezeptorkonzentration wie

Homogenat 2 eingestellt wurde, waren sowohl das untere als auch das obere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve um ca. 30 % erhöht, was ungefähr dem Ausmaß der Veränderung der Proteinkonzentration entsprach. Analoge Ergebnisse zeigten sich auch an weiteren Versuchstagen.

Folglich zeigten zwei Versuchsansätze mit derselben Membranproteinkonzentration, aber unterschiedlicher Rezeptorzahl dasselbe Ausmaß der [³⁵S]GTPγS-Bindung. Daher wurden die Versuche zum Vergleich verschiedener Rezeptormutanten (Kapitel 3.3, Seite 225) auf denselben Membranproteingehalt (jeweils 40 µg/ml) und nicht auf die B_{max}-Werte eingestellt. Eine mögliche Erklärung dieses Zusammenhangs könnte sein, dass die maximal erreichbare [³⁵S]GTPγS-Bindung nicht von der Anzahl der Rezeptoren, sondern der G Protein-Ausstattung der Membransuspension abhängt, da die G_α-Untereinheiten und nicht die Rezeptoren irreversibel radioaktiv markiert werden. Es wäre möglich, dass die Anzahl der aktivierbaren Rezeptoren entscheidend für die Geschwindigkeit der [³⁵S]GTPγS-Bindung ist. Dies ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht worden. Da CHO-Zellen G Proteine endogen exprimieren, scheint der G Protein-Gehalt eher mit der Proteinkonzentration eines Membranhomogenates zu korrelieren als mit der maximalen Anzahl der Bindungsstellen, die von der variablen Rezeptorexpression abhängen.

7.7 Tabellarische Zusammenfassung der erhobenen Bindungsdaten

In den folgenden Tabellen sind die Parameterwerte der durchgeführten Radioligand-Bindungsversuche an den angegebenen Rezeptoren zusammengefasst. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) aus n unabhängigen Einzelversuchen in Dreifachbestimmung. Alle Versuche sind in Na,Mg,HEPES-Puffer (L 10) durchgeführt worden. In den aufeinander folgenden Abschnitten der Tabellen befinden sich die Ergebnisse der stabil transfizierten Wildtyprezeptoren (M_1 - M_5), der stabil transfizierten M_2 -Rezeptormutanten (M_2 wt und Mutanten) sowie die transient transfizierten CHO K1-Zellen ($M_2^{172+175}$ Glu). Bei den agonistischen Verbindungen wird erst die monophasische, dann die biphasische Auswertung dargestellt. Die exakten Versuchsbedingungen sowie die Analyseverfahren befinden sich in den entsprechenden Kapiteln des Ergebnisteils.

Tabellarische Zusammenfassung der erhobenen Bindungsdaten

Die einzelnen Substanzen finden sich wie im Folgenden dargestellt:

Substanz	Seite	Substanz	Seite
Atropin	278	Atr-W84 (JSW253)	285
N-Methylatropin	279	Atr-Naph (JSW254)	286
N-Butylatropin	280	Sco-Hex (JK179)	287
N-Hexyl-, N-Heptyl-, und N-Octylatropin	280	Sco-W84 (JSW257)	287
Scopolamin	281	Sco-Naph (JSW256)	288
N-Methylscopolamin	282	Acetylcholin	289
N-Butylscopolamin	282	Iperoxo	290
Hexamethonium	283	N-Butyliperoxo	292
W84	283	Iper-Hex (JSW236)	293
Naphmethonium	284	Iper-W84 (Hybrid 1)	295
Atr-Hex (JSW258)	285	Iper-Naph (Hybrid 2)	297

- n: Anzahl der unabhängigen Einzelversuche
- $pEC_{0,5Diss}$: negativer dekadischer Logarithmus des Wendepunkts der Konzentrations-Effekt-Kurve der dissoziationsverzögernden Wirkung der Testsubstanz
- n_H : Kurvensteilheit nach freilaufender Analyse
- pK_A : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_A
- pK_{app} : negativer dekadischer Logarithmus der apparenten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_{app}
- $pK_{app}(high)/pK_{app}(low)$: $K_{app}(high/low)$ der hoch-/niedrigaffinen Fraktion
- F: Anteil der hochaffinen Fraktion an der Gesamtbindung
- ΔpK_X : Differenz zwischen dem entsprechenden Wert des jeweiligen Rezeptors und dem M_2 wt.
- ^s: Signifikanter Unterschied zwischen dem Wert am jeweiligen Rezeptor und am M_2 wt.

Atropin

Atropin

	n	pEC_{0,5Diss.}	n_H	ΔpEC_{0,5Diss.}
M₂	3	3,00 ± 0,02	-1,02 ± 0,01	-
M₅	3	2,42 ± 0,16 ^s	-0,78 ± 0,08 ^s	-0,58

	n	pK_A	n_H	ΔpK_A
M₁	3	8,34 ± 0,05	-1,12 ± 0,13	-0,01
M₂	6	8,35 ± 0,08	-1,00 ± 0,06	-
M₃	3	8,15 ± 0,03	-1,00 ± 0,09	-0,20
M₄	3	8,15 ± 0,03	-1,24 ± 0,14	-0,20
M₅	6	8,52 ± 0,10	-0,94 ± 0,06	0,17

M₂wt	3	8,30 ± 0,08	-1,17 ± 0,08	-
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	4	7,89 ± 0,09 ^s	-0,84 ± 0,15	-0,41
M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	3	8,35 ± 0,03	-1,09 ± 0,04	0,05
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	4	8,44 ± 0,04	-0,96 ± 0,04	0,14
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + 423^{Thr}→His	4	8,55 ± 0,03 ^s	-0,94 ± 0,09	0,25
M₂⁴²²Trp→Ala	5	8,41 ± 0,06 ^s	-1,05 ± 0,09	0,11
M₂⁴²³Thr→Ala	4	8,62 ± 0,06	-0,90 ± 0,12	0,32
M₂⁴²³Thr→His	3	8,34 ± 0,05 ^s	-0,95 ± 0,06	0,04

N-Methylatropin

	n	pEC_{0,5Diss.}	n_H
M₂	3	3,22 ± 0,05	-0,99 ± 0,13

	n	pK_A	n_H	ΔpK_A
M₂wt	3	8,74 ± 0,03	-0,99 ± 0,04	-
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	4	7,96 ± 0,08 ^s	-1,10 ± 0,09	-0,78

N-Butylatropin

N-Butylatropin

	n	pEC_{0,5Diss.}	n_H
M₂	3	3,57 ± 0,02	-1,19 ± 0,15

	n	pK_A	n_H	ΔpK_A
M₂	5	6,67 ± 0,03	-0,85 ± 0,04	-
M₂wt	3	6,89 ± 0,08	-1,00 ± 0,05	-
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	6,03 ± 0,10 ^s	-1,06 ± 0,08	-0,86
M₂⁴²²Trp→Ala	4	6,48 ± 0,08 ^s	-0,98 ± 0,04	-0,41

N-Hexyl-, N-Heptyl-, und N-Octylatropin

	n	pK_A	n_H	ΔpK_A
N-Hexylatropin				
M₂wt	3	7,69 ± 0,09	-1,10 ± 0,08	-
Flp M₂⁴²²Trp→Ala	3	7,32 ± 0,06 ^s	-0,98 ± 0,07	-0,37
N-Heptylatropin				
M₂wt	6	8,09 ± 0,08	-0,86 ± 0,05	-
N-Octylatropin				
M₂wt	3	8,09 ± 0,04	-1,08 ± 0,11	-

Scopolamin

Scopolamin

	n	pEC_{0,5Diss.}	n_H	ΔpEC_{0,5Diss.}
M₂	3	3,00 ± 0,05	-1,03 ± 0,12	-
M₅	3	2,10 ± 0,14 ^s	-5,01 ± 4,00	-0,90 ^s

	n	pK_A	n_H	ΔpK_A
M₁	3	8,71 ± 0,05 ^s	-1,03 ± 0,05	0,33
M₂	4	8,38 ± 0,05	-1,08 ± 0,17	-
M₃	3	8,80 ± 0,07 ^s	-1,15 ± 0,17	0,42
M₄	3	8,54 ± 0,08	-1,13 ± 0,06	0,16
M₅	4	8,89 ± 0,07 ^s	-0,98 ± 0,14	0,51

M₂wt	3	8,52 ± 0,05	-0,98 ± 0,02	-
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	7,54 ± 0,06 ^s	-1,14 ± 0,06	-0,98
M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	3	8,45 ± 0,04	-1,00 ± 0,06	-0,07
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	3	8,48 ± 0,07	-0,98 ± 0,12	-0,04
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His	3	8,48 ± 0,08	-1,05 ± 0,05	-0,04
M₂⁴²²Trp→Ala	3	8,40 ± 0,03	-1,08 ± 0,07	-1,20
M₂⁴²³Thr→Ala	3	8,40 ± 0,06	-1,03 ± 0,05	-1,20
M₂⁴²³Thr→His	3	8,45 ± 0,02	-0,92 ± 0,03	-0,07

N-Methylscopolamin

N-Methylscopolamin

	n	pEC_{0,5Diss.}	n_H	
M₂	3	2,80 ± 0,04	-1,05 ± 0,13	

	n	pK_A	n_H	ΔpK_A
M₁	7	9,25 ± 0,12	-1,15 ± 0,06	0,07
M₂	11	9,18 ± 0,05	-1,16 ± 0,05	-
M₃	7	9,05 ± 0,12	-1,04 ± 0,16	-0,13
M₄	3	9,22 ± 0,06	-1,04 ± 0,03	-0,04
M₅	6	8,95 ± 0,08 ^s	-1,06 ± 0,03	-0,23

M₂wt	15	9,41 ± 0,05	-0,97 ± 0,02	-
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	11	8,03 ± 0,07 ^s	-1,09 ± 0,07	-1,39
M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	4	9,24 ± 0,13	-0,99 ± 0,08	-0,17
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	8	9,09 ± 0,07 ^s	-1,19 ± 0,12	-0,32
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + 423Thr→His	3	9,36 ± 0,04	-0,83 ± 0,07	0,05
M₂⁴²²Trp→Ala	3	9,22 ± 0,03	-0,91 ± 0,04	-0,19
M₂⁴²³Thr→Ala	3	8,93 ± 0,01 ^s	-1,23 ± 0,30	-0,48
M₂⁴²³Thr→His	3	9,45 ± 0,08	-1,73 ± 0,22	0,04

CHO K1 M₂wt	3	9,38 ± 0,13	-0,74 ± 0,08	-
M₂¹⁷²Glu→Ala	3	9,48 ± 0,11	-0,87 ± 0,09	0,10
M₂¹⁷⁵Glu→Ala	3	9,59 ± 0,04	-0,82 ± 0,02	0,21

N-Butylscopolamin

	n	pK_A	n_H	ΔpK_A
M₂	4	6,80 ± 0,10	-1,00 ± 0,08	-

M₂wt	3	6,88 ± 0,04	-0,97 ± 0,03	-
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	5,54 ± 0,04 ^s	-1,00 ± 0,01	-1,34
M₂⁴²²Trp→Ala	3	6,75 ± 0,03	-0,98 ± 0,04	-0,13

Hexamethonium

Hexamethonium

	n	n _H	pEC _{0,5Diss.}	p(α · K _A)
M ₂	3	-0,78 ± 0,18	2,27 ± 0,14	2,49

	n	pK _A	pα	ΔpK _A
M ₂	3	3,81 ± 0,06	-1,32 ± 0,12	-
M ₅	3	2,43 ± 0,32 ^s	-0,53 ± 0,15 ^s	-1,38

W84

	n	n _H	pEC _{0,5Diss.}	p(α · K _A)	ΔpEC _{0,5Diss.}
M ₂	4	-1,13 ± 0,23	5,69 ± 0,09	5,22	-
M ₅	4	-0,66 ± 0,14	4,10 ± 0,07 ^s	4,09	-1,59 ^s

	n	pK _A	pα	ΔpK _A
M ₂	3	3,81 ± 0,06	-1,32 ± 0,12	-
M ₅	3	2,43 ± 0,32 ^s	-0,53 ± 0,15 ^s	-1,38

M ₂ wt	3	6,55 ± 0,03	-0,95 ± 0,00	-
M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	3	6,59 ± 0,04	-0,67 ± 0,03 ^s	0,04
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	5	5,47 ± 0,11 ^s	-1,23 ± 0,09 ^s	-1,08

CHO K1 M ₂ wt	3	6,45 ± 0,05	-0,94 ± 0,03	-
M ₂ ¹⁷² Glu→Ala	3	6,17 ± 0,00 ^s	-0,95 ± 0,03	-0,28
M ₂ ¹⁷⁵ Glu→Ala	3	5,68 ± 0,05 ^s	-0,98 ± 0,05	-0,77

Naphmethonium

Naphmethonium

	n	n_H	pEC_{0,5Diss.}	p(α · K_A)	ΔpEC_{0,5Diss.}
M₂	3	-0,88 ± 0,04	7,89 ± 0,05	7,92	-
M₅	5	-0,53 ± 0,12	4,58 ± 0,11 ^s .	4,39	-3,31 ^s .
M₂wt	3	-1,02 ± 0,04	8,01 ± 0,06	7,99	-
M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	3	-1,10 ± 0,05	6,34 ± 0,03 ^s .	6,35	-1,67 ^s .
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	3	-1,00 ± 0,12	6,07 ± 0,05 ^s .	6,23	-1,94 ^s .
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + 423Thr→His	3	-1,09 ± 0,17	5,61 ± 0,05 ^s .	5,40	-2,40 ^s .
M₂⁴²³Thr→Ala	3	-1,06 ± 0,03	7,68 ± 0,01 ^s .	7,69	-0,33 ^s .
M₂⁴²³Thr→His	3	-1,09 ± 0,05	7,03 ± 0,02 ^s .	7,16	-0,98 ^s .
	n	pK_A	pα	ΔpK_A	
M₂	11	7,67 ± 0,17	0,25 ± 0,03	-	
M₅	3	5,05 ± 0,06 ^s .	-0,66 ± 0,06 ^s .	-2,62	
M₂wt	6	7,70 ± 0,12	0,29 ± 0,04	-	
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	5	5,40 ± 0,38	3,04 ± 0,35	-2,30	
M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	5	6,31 ± 0,02 ^s .	0,04 ± 0,02 ^s .	-1,39	
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	3	6,23 ± 0,07 ^s .	-0,00 ± 0,13 ^s .	-1,47	
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + 423Thr→His	5	5,82 ± 0,06 ^s .	-0,41 ± 0,06 ^s .	-1,88	
M₂⁴²³Thr→Ala	4	7,62 ± 0,02	0,07 ± 0,02 ^s .	-0,08	
M₂⁴²³Thr→His	3	7,09 ± 0,08 ^s .	-0,07 ± 0,13 ^s .	-0,61	
CHO K1 M₂wt	3	7,67 ± 0,06	0,46 ± 0,09	-	
M₂¹⁷²Glu→Ala	5	6,95 ± 0,36	0,63 ± 0,14	-0,72	
M₂¹⁷⁵Glu→Ala	5	6,94 ± 0,46	0,44 ± 0,12	-0,73	

Atr-Hex (JSW258)

Atr-Hex (JSW258)

	n	pEC _{0,5Diss.}	n _H	ΔpEC _{0,5Diss.}
M ₂	4	3,72 ± 0,13	-0,74 ± 0,16	-
M ₅	3	2,17 ± 0,27 ^s	-4,56 ± 4,37	-1,55

	n	pK _A	n _H	ΔpK _A
M ₂	3	7,64 ± 0,12	-0,57 ± 0,14	-
M ₅	3	7,06 ± 0,04 ^s	-1,02 ± 0,11	-0,58

M ₂ wt	4	7,79 ± 0,05	-1,01 ± 0,06	-
M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	4	6,82 ± 0,06 ^s	-0,97 ± 0,08	-0,97
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	3	7,73 ± 0,03	-0,96 ± 0,03	-0,06
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3	7,74 ± 0,04	-1,09 ± 0,06	-0,05
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	4	7,26 ± 0,05 ^s	-1,10 ± 0,12	-0,53

CHO K1 M ₂ wt	3	7,57 ± 0,05	-0,86 ± 0,07	-
M ₂ ¹⁷² Glu→Ala	3	7,65 ± 0,49	-0,94 ± 0,11	0,08
M ₂ ¹⁷⁵ Glu→Ala	3	7,57 ± 0,06	-1,04 ± 0,16	0,00

Atr-W84 (JSW253)

	n	pEC _{0,5Diss.}	n _H	ΔpEC _{0,5Diss.}
M ₂	4	5,50 ± 0,11	-1,41 ± 0,24	-
M ₃	4	4,94 ± 0,15 ^s	-1,09 ± 0,45	-0,56
M ₅	4	4,29 ± 0,16 ^s	-1,38 ± 0,34	-1,21

	n	pK _A	n _H	ΔpK _A
M ₂	5	8,41 ± 0,15	-1,21 ± 0,10	-
M ₅	4	7,78 ± 0,10 ^s	-0,92 ± 0,08	-0,63

M ₂ wt	3	8,28 ± 0,07	-1,27 ± 0,05	-
M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	5	8,01 ± 0,07 ^s	-1,38 ± 0,24	-0,27
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	3	8,01 ± 0,01 ^s	-1,08 ± 0,11	-0,27
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	5	8,27 ± 0,04	-1,23 ± 0,23	-0,01
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	6	7,78 ± 0,10 ^s	-1,09 ± 0,03	-0,50

Atr-Naph (JSW254)

Atr-Naph (JSW254)

	n	pEC_{0,5Diss.}	n_H	ΔpEC_{0,5Diss.}
M₂	4	6,33 ± 0,04	-1,13 ± 0,14	-
M₅	4	4,34 ± 0,14 ^s	-1,10 ± 0,25	-1,99
M₂ wt	3	6,54 ± 0,04	-1,08 ± 0,08	-
M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	3	5,88 ± 0,03 ^s	-0,97 ± 0,04	-0,66
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	3	6,14 ± 0,03 ^s	-1,06 ± 0,04	-0,40
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + 423Thr→His	4	5,50 ± 0,03 ^s	-0,97 ± 0,07	-1,04
M₂⁴²³Thr→Ala	3	6,57 ± 0,03	-1,15 ± 0,08	-0,03
M₂⁴²³Thr→His	4	6,37 ± 0,02 ^s	-0,98 ± 0,05	-0,17
	n	pK_A	n_H	ΔpK_A
M₁	5	8,41 ± 0,04	-1,17 ± 0,15	-
M₅	4	7,71 ± 0,03 ^s	-1,19 ± 0,09	-0,70
M₂wt	3	8,55 ± 0,02	-1,00 ± 0,11	-
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	4	7,21 ± 0,06 ^s	-0,92 ± 0,19	-1,34
M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	3	8,16 ± 0,15	-0,95 ± 0,21	-0,39
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	3	8,07 ± 0,06 ^s	-0,93 ± 0,07	-0,48
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + 423Thr→His	4	8,55 ± 0,07	-0,96 ± 0,08	0,00
M₂⁴²²Trp→Ala	4	7,67 ± 0,08 ^s	-1,08 ± 0,05	-0,88
M₂⁴²³Thr→Ala	3	8,66 ± 0,06	-0,89 ± 0,09	0,11
M₂⁴²³Thr→His	3	8,51 ± 0,05	-1,01 ± 0,07	-0,04
CHO K1 M₂wt	3	8,15 ± 0,07	-1,41 ± 0,17	-
M₂¹⁷²Glu→Ala	3	8,32 ± 0,07	-1,50 ± 0,10	0,17
M₂¹⁷⁵Glu→Ala	3	8,31 ± 0,05	-1,18 ± 0,20	0,16

Sco-Hex (JK179)

Sco-Hex (JK179)

	n	pEC _{0,5Diss.}	n _H
M ₂	3	3,64 ± 0,04	-1,43 ± 0,40

	n	pK _A	n _H	ΔpK _A
M ₂	3	7,32 ± 0,03	-1,03 ± 0,04	-
M ₅	4	7,68 ± 0,06 ^s	-0,96 ± 0,04	0,36
M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	4	6,51 ± 0,03 ^s	-1,32 ± 0,10	-0,81
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	3	7,39 ± 0,04	-1,03 ± 0,12	0,07
CHO K1 M ₂ wt	3	7,31 ± 0,08	-1,17 ± 0,05	-
M ₂ ¹⁷² Glu→Ala	3	7,45 ± 0,07	-0,90 ± 0,09	0,14
M ₂ ¹⁷⁵ Glu→Ala	3	7,46 ± 0,04	-1,19 ± 0,03	0,15

Sco-W84 (JSW257)

	n	pEC _{0,5Diss.}	n _H	ΔpEC _{0,5Diss.}
M ₂	4	5,26 ± 0,14	-0,93 ± 0,08	-
M ₅	3	3,66 ± 0,10 ^s	-0,17 ± 0,12	-1,60

	n	pK _A	n _H	ΔpK _A
M ₂	3	7,92 ± 0,10	-1,09 ± 0,10	-
M ₅	3	7,77 ± 0,08	-0,82 ± 0,38	-0,15
M ₂ wt	3	8,09 ± 0,12	-0,98 ± 0,09	-
M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	4	7,30 ± 0,05 ^s	-1,33 ± 0,11	-0,79
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	4	8,15 ± 0,04	-0,87 ± 0,07	0,06
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3	8,15 ± 0,03	-1,02 ± 0,11	0,06
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	4	8,16 ± 0,06	-1,32 ± 0,22	0,07

Sco-Naph (JSW256)

Sco-Naph (JSW256)

	n	pEC_{0,5Diss.}	n_H	ΔpEC_{0,5Diss.}
M₂	4	6,69 ± 0,14	-1,45 ± 0,18	-
M₃	3	4,78 ± 0,06 ^s	-0,92 ± 0,37	-1,91
M₅	3	4,30 ± 0,13 ^s	-1,63 ± 0,56	-2,39

	n	pK_A	n_H	ΔpK_A
M₂	4	8,41 ± 0,10	-1,03 ± 0,16	-
M₅	4	8,26 ± 0,08	-0,94 ± 0,08	-0,15

M₂wt	3	8,21 ± 0,08	-1,04 ± 0,05	-
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	5	6,88 ± 0,04 ^s	-1,03 ± 0,05	-1,33
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	3	8,05 ± 0,03	-1,10 ± 0,01	-0,16
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His	3	8,48 ± 0,01	-0,86 ± 0,10	0,27
M₂⁴²²Trp→Ala	3	8,19 ± 0,08	-1,04 ± 0,09	-0,02

CHO K1 M₂wt	3	8,15 ± 0,10	-0,98 ± 0,19	-
M₂¹⁷²Glu→Ala	3	8,15 ± 0,07	-1,10 ± 0,10	0,00
M₂¹⁷⁵Glu→Ala	3	8,25 ± 0,04	-1,02 ± 0,11	0,10

Acetylcholin

Acetylcholin

	n	pK_{app}	n_H	ΔpK_A
M₁	3	4,84 ± 0,05 ^s	-0,63 ± 0,03	-2,04
M₂	3	6,88 ± 0,10	-0,49 ± 0,01	-
M₃	3	4,91 ± 0,04 ^s	-0,76 ± 0,09	-1,97
M₄	3	5,86 ± 0,23 ^s	-0,50 ± 0,07	-1,02
M₅	3	5,29 ± 0,13 ^s	-0,67 ± 0,05	-1,59
M₂wt	3	6,90 ± 0,14	-0,38 ± 0,01	-
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	3,80 ± 0,03 ^s	-0,55 ± 0,03	-3,10
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His	3	7,23 ± 0,10	-0,47 ± 0,01	0,33
M₂⁴²²Trp→Ala	3	5,58 ± 0,09 ^s	-0,47 ± 0,02 ^s	-1,32
	n	pK_{app}(high)	pK_{app}(low)	F
M₁	3	7,54 ± 1,48	4,51 ± 0,17 ^s	0,62 ± 0,23
M₂	3	8,59 ± 0,17	6,23 ± 0,19	0,31 ± 0,07
M₃	3	7,28 ± 0,87	4,72 ± 0,11 ^s	0,19 ± 0,09
M₄	3	6,91 ± 0,43 ^s	4,80 ± 0,13 ^s	0,49 ± 0,05
M₅	3	7,91 ± 1,47	4,98 ± 0,27 ^s	0,30 ± 0,12
M₂wt	3	8,66 ± 0,08	6,17 ± 0,01	0,40 ± 0,02
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	4,77 ± 0,18 ^s	2,97 ± 0,16 ^s	0,48 ± 0,06
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His	3	8,79 ± 0,05	6,50 ± 0,08 ^s	0,38 ± 0,03
M₂⁴²²Trp→Ala	3	6,73 ± 0,27 ^s	4,51 ± 0,22 ^s	0,51 ± 0,04

Iperoxo

Iperoxo

	n	pK_{app}	n_H	ΔpK_A
M₁	3	6,20 ± 0,12 ^s	-0,67 ± 0,07 ^s	-3,37
M₂	3	9,57 ± 0,04	-0,37 ± 0,02	-
M₃	3	5,55 ± 0,06 ^s	-0,92 ± 0,19 ^s	-4,02
M₄	3	7,18 ± 0,20 ^s	-0,51 ± 0,05	-2,39
M₅	3	6,92 ± 0,06 ^s	-0,54 ± 0,01 ^s	-2,65
M₂wt	4	8,60 ± 0,05	-0,56 ± 0,05	-
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	4	6,59 ± 0,07 ^s	-0,62 ± 0,06	-2,01
M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	4	7,90 ± 0,15 ^s	-0,63 ± 0,04	-0,70
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	4	8,06 ± 0,13 ^s	-0,59 ± 0,05	-0,54
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + 423Thr→His	4	8,66 ± 0,06	-0,50 ± 0,01	0,06
M₂⁴²²Trp→Ala	4	8,00 ± 0,09 ^s	-0,43 ± 0,03	-0,60
M₂⁴²³Thr→Ala	5	8,59 ± 0,27	-0,42 ± 0,05	-0,01
M₂⁴²³Thr→His	3	8,52 ± 0,13	-0,39 ± 0,01 ^s	-0,08
M₂wt mit 100μM GDP	3	8,17 ± 0,03	-0,65 ± 0,02	-
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala mit 100μM GDP	4	4,91 ± 0,17	-0,54 ± 0,09	-3,26

Iperoxo

	n	pK_{app}(high)	pK_{app}(low)	F
M₁	3	6,79 ± 0,13	5,56 ± 0,09	0,44 ± 0,06
M₂	3	10,9 ± 0,19	8,15 ± 0,14	0,49 ± 0,04
M₃	3	7,56 ± 0,77	5,19 ± 0,06	0,31 ± 0,12
M₄	3	8,41 ± 0,47	6,12 ± 0,19	0,51 ± 0,10
M₅	3	7,79 ± 0,11	5,86 ± 0,12	0,54 ± 0,04
M₂wt	4	9,84 ± 0,20	7,95 ± 0,07	0,39 ± 0,03
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	4	7,56 ± 0,25 ^{s.}	5,59 ± 0,49 ^{s.}	0,45 ± 0,07
M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	4	8,99 ± 0,15 ^{s.}	7,28 ± 0,07 ^{s.}	0,38 ± 0,09
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	4	10,1 ± 0,50	7,67 ± 0,11	0,26 ± 0,02 ^{s.}
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + 423^{Thr}→His	4	10,1 ± 0,21	7,99 ± 0,13	0,38 ± 0,04
M₂⁴²²Trp→Ala	4	9,25 ± 0,19	6,85 ± 0,16 ^{s.}	0,52 ± 0,04 ^{s.}
M₂⁴²³Thr→Ala	5	10,0 ± 0,24	7,41 ± 0,08 ^{s.}	0,44 ± 0,06
M₂⁴²³Thr→His	3	10,4 ± 0,09	7,51 ± 0,10 ^{s.}	0,39 ± 0,02
M₂wt mit 100μM GDP	3	11,6 ± 0,34	8,07 ± 0,06	0,15 ± 0,03
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala mit 100μM GDP	4	6,71 ± 0,31	4,39 ± 0,23	0,33 ± 0,07

N-Butylperoxo

N-Butylperoxo

	n	pK_{app}	n_H	ΔpK_A
M₂wt	3	5,42 ± 0,08	-0,71 ± 0,05	-
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	6,48 ± 0,14 ^s	-0,45 ± 0,02 ^s	1,06
M₂⁴²²Trp→Ala	5	5,56 ± 0,13	-0,63 ± 0,04	0,14
M₂wt mit 100μM GDP	3	5,25 ± 0,03	-0,79 ± 0,03	-
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala mit 100μM GDP	3	5,05 ± 0,15	-0,71 ± 0,08	-0,20
	n	pK_{app}(high)	pK_{app}(low)	F
M₂wt	3	6,91 ± 0,36	5,21 ± 0,02	0,20 ± 0,02
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	7,36 ± 0,07	5,02 ± 0,17	0,57 ± 0,00 ^s
M₂⁴²²Trp→Ala	5	6,26 ± 0,16	4,54 ± 0,08 ^s	0,87 ± 0,04 ^s
M₂wt mit 100μM GDP	3	6,43 ± 0,25	4,97 ± 0,10	0,23 ± 0,09
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala mit 100μM GDP	3	5,90 ± 0,14	4,50 ± 0,13	0,41 ± 0,03

Iper-Hex (JSW236)

Iper-Hex (JSW236)

	n	pEC_{0,5Diss.}	n_H	
M₂	6	3,50 ± 0,06	-1,50 ± 0,18	

	n	pK_{app}	n_H	ΔpK_A
M₁	3	5,46 ± 0,13 ^s	-0,63 ± 0,13	-2,35
M₂	3	7,81 ± 0,06	-0,50 ± 0,08	-
M₃	3	4,43 ± 0,37 ^s	-0,86 ± 0,28	-3,38
M₄	3	6,41 ± 0,39 ^s	-0,46 ± 0,04	-1,40
M₅	3	5,40 ± 0,13 ^s	-0,61 ± 0,06	-2,41

M₂wt	4	7,21 ± 0,12	-0,50 ± 0,03	-
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	5,89 ± 0,04 ^s	-0,65 ± 0,02 ^s	-1,32
M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	3	7,81 ± 0,10 ^s	-0,37 ± 0,15	0,60
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	6	7,04 ± 0,12	-0,51 ± 0,03	-0,17
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + 423Thr→His	3	7,19 ± 0,05	-0,50 ± 0,02	-0,02
M₂⁴²²Trp→Ala	4	6,56 ± 0,16 ^s	-0,49 ± 0,01	-0,65
M₂⁴²³Thr→Ala	3	7,99 ± 0,18 ^s	-0,33 ± 0,14	0,78
M₂⁴²³Thr→His	3	7,23 ± 0,12	-0,41 ± 0,04	0,02

M₂wt mit 100μM GDP	3	6,73 ± 0,01	-0,70 ± 0,02	-
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala mit 100μM GDP	4	5,06 ± 0,07 ^s	-1,38 ± 0,41	-1,67

Iper-Hex (JSW236)

	n	pK_{app}(high)	pK_{app}(low)	F
M₁	3	6,87 ± 0,54 ^s	5,12 ± 0,16 ^s	0,26 ± 0,08
M₂	3	9,19 ± 0,47	6,61 ± 0,36	0,53 ± 0,09
M₃	3	5,52 ± 0,46 ^s	3,77 ± 0,69 ^s	0,32 ± 0,13
M₄	3	7,26 ± 0,35 ^s	5,52 ± 0,32	0,42 ± 0,06
M₅	3	6,80 ± 0,40 ^s	4,98 ± 0,22 ^s	0,29 ± 0,06
M₂wt	4	8,62 ± 0,26	6,45 ± 0,13	0,40 ± 0,02
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	7,63 ± 0,08 ^s	5,68 ± 0,06 ^s	0,19 ± 0,04 ^s
M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	3	9,32 ± 0,32	6,39 ± 0,04	0,48 ± 0,04
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	6	8,57 ± 0,18	6,26 ± 0,13	0,37 ± 0,04
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His	3	8,39 ± 0,07	6,31 ± 0,08	0,43 ± 0,05
M₂⁴²²Trp→Ala	4	8,01 ± 0,14	5,90 ± 0,13 ^s	0,39 ± 0,07
M₂⁴²³Thr→Ala	3	9,62 ± 0,22 ^s	6,43 ± 0,02	0,48 ± 0,02 ^s
M₂⁴²³Thr→His	3	8,97 ± 0,16	6,19 ± 0,08	0,42 ± 0,03
M₂wt mit 100μM GDP	3	8,21 ± 0,41	6,39 ± 0,17	0,25 ± 0,11
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala mit 100μM GDP	4	7,38 ± 1,17	4,86 ± 0,26 ⁺	0,03 ± 0,03

Iper-W84 (Hybrid 1)

Iper-W84 (Hybrid 1)

	n	pEC _{0,5Diss.}	n _H	ΔpEC _{0,5Diss.}
M ₁	3	4,18 ± 0,23 ^s	-1,08 ± 0,28	-0,72 ^s
M ₂	3	4,90 ± 0,04	-1,01 ± 0,06	-
M ₃	3	2,83 ± 0,18 ^s	-4,99 ± 3,35	-2,07 ^s
M ₄	3	3,33 ± 0,05 ^s	-1 (festgesetzt)	-1,57 ^s
M ₅	3	2,81 ± 0,07 ^s	-1 (festgesetzt)	-2,09 ^s

	n	pK _{app}	n _H	ΔpK _A
M ₁	3	5,32 ± 0,12 ^s	-0,81 ± 0,13	-2,24
M ₂	3	7,56 ± 0,25	-0,55 ± 0,06	-
M ₃	3	4,47 ± 0,18 ^s	-0,90 ± 0,18	-3,09
M ₄	3	4,82 ± 0,26	-0,61 ± 0,05	-2,74
M ₅	3	4,52 ± 0,09	-0,78 ± 0,15	-3,04

M ₂ wt	4	7,04 ± 0,10	-0,64 ± 0,02	-
M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	3	6,69 ± 0,05 ^s	-0,88 ± 0,13	-0,35
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Ala	3	6,86 ± 0,08	-0,43 ± 0,03 ^s	-0,18
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	4	6,56 ± 0,07	-0,49 ± 0,04 ^s	-0,48
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	4	6,70 ± 0,09 ^s	-0,56 ± 0,02 ^s	-0,34
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	3	7,12 ± 0,05	-0,56 ± 0,01 ^s	0,08
M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	3	7,23 ± 0,29	-0,46 ± 0,05 ^s	0,19
M ₂ ⁴²³ Thr→His	4	6,81 ± 0,07	-0,52 ± 0,04 ^s	-0,23

M ₂ wt mit 100μM GDP	3	6,76 ± 0,02	-0,94 ± 0,09	-
M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala mit 100μM GDP	3	6,51 ± 0,02 ^s	-1,12 ± 0,18	-0,25

Iper-W84 (Hybrid 1)

	n	pK_{app}(high)	pK_{app}(low)	F
M₁	3	7,44 ± 1,12	4,71 ± 0,49 ^s .	0,36 ± 0,25
M₂	3	8,61 ± 0,41	6,40 ± 0,27	0,50 ± 0,15
M₃	3	9,15 ± 0,83	4,33 ± 0,08 ^s .	0,23 ± 0,05
M₄	3	6,50 ± 0,42 ^s .	4,36 ± 0,06 ^s .	0,28 ± 0,12
M₅	3	5,37 ± 0,65 ^s .	4,18 ± 0,09 ^s .	0,32 ± 0,08
M₂wt	4	8,05 ± 0,20	6,54 ± 0,09	0,37 ± 0,02
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala	3	8,01 ± 0,32	6,51 ± 0,17	0,16 ± 0,10
M₂¹⁷⁷Tyr→Ala	3	8,03 ± 0,06	5,80 ± 0,03 ^s .	0,46 ± 0,06
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	4	8,09 ± 0,12	5,80 ± 0,06 ^s .	0,37 ± 0,04
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His	4	7,89 ± 0,19	6,08 ± 0,12 ^s .	0,38 ± 0,03
M₂⁴²²Trp→Ala	3	8,00 ± 0,07	6,04 ± 0,02 ^s .	0,55 ± 0,01 ^s .
M₂⁴²³Thr→Ala	3	8,32 ± 0,19	6,24 ± 0,10	0,47 ± 0,08
M₂⁴²³Thr→His	4	7,83 ± 0,09	5,86 ± 0,03 ^s .	0,48 ± 0,03
M₂wt mit 100μM GDP	3	8,50 ± 0,38	6,66 ± 0,05	0,10 ± 0,07
M₂¹⁰⁴Tyr→Ala mit 100μM GDP	3	7,50 ± 0,47	6,40 ± 0,07	0,11 ± 0,07

Iper-Naph (Hybrid 2)

Iper-Naph (Hybrid 2)

	n	pEC _{0,5Diss.}	n _H
M ₂	3	6,88 ± 0,03	-0,96 ± 0,03

	n	pK _{app}	n _H	ΔpK _A
M ₂ wt	3	7,94 ± 0,06	-0,85 ± 0,06	-
M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	3	7,18 ± 0,08 ^s	-0,91 ± 0,07	-0,76
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3	7,57 ± 0,02 ^s	-0,89 ± 0,00	-0,37
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	4	7,71 ± 0,09	-0,73 ± 0,10	-0,23

M ₂ wt mit 100μM GDP	5	7,60 ± 0,10	-1,04 ± 0,16	-
M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala mit 100μM GDP	4	7,40 ± 0,03	-1,46 ± 0,17	-0,20

	n	pK _{app} (high)	pK _{app} (low)	F
M ₂ wt	3	9,03 ± 0,66	7,34 ± 0,41	0,44 ± 0,23
M ₂ ¹⁰⁴ Tyr→Ala	3	keine biphasische Auswertung möglich		
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3	7,78 ± 0,03	6,64 ± 0,04	0,67 ± 0,03
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	4	8,21 ± 0,14	6,42 ± 0,14	0,63 ± 0,06

7.8 Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
Ala	Alanin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Fsk	Forskolin
GDP	Guanosindiphosphat

Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'-O-[γ -thio]-triphosphat
His	Histidin
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
NMR	NMR-Spektroskopie, nuclear magnetic resonance
NMS	N-Methylscopolamin
PTX	Pertussistoxin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
ZNS	zentrales Nervensystem

8 Abstrakta/Kongressbeiträge

Kaufel D., Muth M, Holzgrabe U., De Amici M, Mohr K.

Subtype-selectivity of an allosteric/orthosteric hybrid agonist at muscarinic receptors

DPhG-Jahrestagung 2007, Erlangen

Kaufel D., Schmitz J., Holzgrabe U., Mohr K.

Interaction of an allosteric/orthosteric hybrid antagonist with muscarinic receptors

DPhG-Jahrestagung 2008, Bonn

Kaufel D., Schmitz J., Holzgrabe U., Mohr K.

Muscarinic receptor interaction of novel allosteric/orthosteric antagonist ligands

Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 2009, **379** (Suppl 1): 14 (Nummer 37)

Kaufel D., Klöckner J., Schmitz J., Holzgrabe U., Mohr K.

Muscarinic allosteric/orthosteric hybrid antagonists: structure-activity-relationships suggest a dualsteric binding topography

DPhG-Jahrestagung 2009, Jena

Klöckner, J., Schmitz, J., Kaufel, D., Mohr, K., Holzgrabe, U.

A novel class of muscarinic receptor ligands: design, synthesis and testing of allosteric/orthosteric hybrid antagonists

DPhG-Jahrestagung 2009, Jena

Kaufel D., Klöckner J., Schmitz J., Holzgrabe U., Mohr K.

Dualsteric binding mode of allo-/orthosteric hybrid antagonists at muscarinic receptors

Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol 2010, **381** (Suppl 1): 12 (Nummer 13)

Klöckner J., Kaufel D., Schmitz J., Mohr K., Holzgrabe U.

Design of allosteric/orthosteric hybrid compounds as antagonists for muscarinic receptors

International symposium on medicinal chemistry 2010, Brüssel

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe eine Promotionsarbeit anzufertigen, sowie für die ausgezeichnete Betreuung. Seine ständige Gesprächsbereitschaft und die konstruktiven Ratschläge haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Kurt Racké danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde und Herrn Prof. Dr. Hanns Häberlein danke ich herzlich für die Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Mein Dank gilt außerdem Frau Prof. Dr. Holzgrave und Herrn Prof. Dr. Marco De Amici sowie deren Mitarbeitern für die Synthese und freundliche Bereitstellung der meisten von mir untersuchten Verbindungen.

Weiterhin danke ich den Forschungsstudenten Frau Agata Nasilowska, Herrn André Wilmer, Herrn Manuel Grundmann, Frau Carolin Frisch und Frau Justine Grzeska, die im Rahmen des Graduiertenkollegs 677 von mir betreut wurden, für die Durchführung von diversen Experimenten, deren Ergebnisse in diese Arbeit mit einbezogen wurden.

Allen ehemaligen und derzeitigen Kollegen der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die gute Zusammenarbeit und die äußerst angenehme Arbeitsatmosphäre. Bei Frau Dr. Jasmin Schrobang möchte ich mich herzlich für die Erstellung der Dockingsimulationen und die konstruktiven Gespräche bedanken und bei Nicole Janßen für die lange schöne Zeit im gemeinsamen Büro.

Mein größter Dank gilt an dieser Stelle meinen Eltern. Durch die bedingungslose Unterstützung und durch den stets vorhandenen Rückhalt war es mir möglich, meinen Weg bis hierher zugehen.