

**Hybridverbindungen aus dem Superagonisten
Iperoxo und konventionellen inversen Agonisten
zeigen Partialagonismus am muskarinischen
Acetylcholin-Rezeptor M₂ in CHO-Zellen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

Daniel Paul Bannenber

aus

Hamburg

Bonn 2021

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

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christian Tränkle
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Günther Weindl

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Mai 2022

Erscheinungsjahr: 2022

Die vorliegende Arbeit wurde von 2014 bis 2021 in der Abteilung Pharmakologie & Toxikologie des Pharmazeutischen Institutes der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr und Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christian Tränkle angefertigt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren.....	1
1.2	Aktivierung und Signaltransduktion muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren.....	2
1.3	Ligandbindungsstellen der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren.....	5
1.4	Dualsterische Liganden.....	5
1.4.1	Orthosterisch-allosterische Liganden.....	6
1.4.2	Orthosterisch-orthosterische Liganden.....	7
1.5	Fragestellung.....	8
2	Materialien.....	10
2.1	Verbindungen.....	10
2.1.1	Radioliganden.....	10
2.1.2	Muskarinische Agonisten.....	11
2.1.3	Muskarinische Antagonisten / inverse Agonisten.....	11
2.1.4	Dualsterische Liganden aus Iperoxo und Atropin.....	12
2.1.5	Dualsterische Liganden aus Iperoxo und Scopolamin.....	13
2.1.6	Agonist-Fragmente der dualsterischen Liganden.....	14
2.1.7	Sonstige Verbindungen.....	14
2.2	Reagenzien und Chemikalien.....	15
2.3	Lösungen und Puffer.....	17
2.4	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.5	Geräte.....	23
2.6	Computerprogramme.....	25
2.7	Herstellerverzeichnis.....	25
3	Methoden.....	29
3.1	Zellbiologische Arbeiten.....	29
3.1.1	Auftauen der Zellen.....	29

3.1.2	Kultivierung der Zellen	30
3.1.3	Kryokonservierung der Zellen	30
3.1.4	Membranpräparation der Zellen.....	31
3.2	Proteinbestimmung nach Lowry	32
3.3	Radioligand-Bindungsstudien.....	33
3.3.1	Theoretische Grundlagen der Rezeptor-Ligand-Bindung.....	33
3.3.1.1	Szintillationsverfahren.....	35
3.3.2	Homologe Konkurrenzexperimente	36
3.3.2.1	Durchführung homologer Konkurrenzexperimente.....	40
3.3.3	Heterologe Konkurrenzexperimente	43
3.3.3.1	Heterologe Konkurrenzexperimente mit dem antagonistischen Radioliganden [³ H]NMS und orthosterischen Konkurrenten	43
3.3.3.2	Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente mit dem agonistischen Radioliganden [³ H]peroxo und putativ orthosterischen Testverbindungen.....	45
3.3.3.3	Durchführung heterologer Konkurrenzexperimente.....	47
3.3.4	Kinetische Untersuchungen der Radioliganddissoziation	48
3.3.4.1	Durchführung von kompletten Dissoziationskinetiken.....	50
3.3.4.2	Durchführung von „2-Punkt-Kinetiken“.....	51
3.4	Funktionelle Untersuchungen.....	53
3.4.1	[³⁵ S]GTPγS-Experimente	54
3.4.1.1	Theoretische Grundlagen der [³⁵ S]GTPγS-Experimente	54
3.4.1.2	Durchführung von [³⁵ S]GTPγS-Experimenten	55
3.4.1.3	[³⁵ S]GTPγS-Experimente zur Erfassung des Einflusses von Antagonisten auf die Rezeptoraktivierung	56
3.4.2	Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (cAMP-Experiment)	58
3.4.2.1	Theoretische Grundlagen des cAMP-Experimentes.....	58
3.4.2.2	Durchführung einer Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (cAMP-Experiment)	59

3.5	„Bias“-Berechnung.....	60
3.6	Statistische Methoden	63
3.6.1	Deskriptive Statistik.....	64
3.6.1.1	Berechnung des arithmetischen Mittels	64
3.6.1.2	Berechnung der Streuung.....	64
3.6.2	Statistische Prüfverfahren	65
3.6.2.1	T-Test und ANOVA-Analyse.....	65
3.6.2.2	F-Test.....	66
4	Ergebnisse	68
4.1	Bindungsverhalten der Hybridsubstanzen gegenüber orthosterischen Radioliganden des M ₂ -Rezeptors.....	68
4.1.1	Beeinflussung des Bindungsverhaltens der Testverbindungen zum M ₂ -Rezeptor durch den verwendeten Radioliganden.....	68
4.1.2	Iperoxo-Atropin und Iperoxo-Scopolamin Hybride zeigen Radioligand-abhängiges Bindungsverhalten	70
4.1.3	Der antagonistische Baustein bewirkt Unterschiede der Affinitätsparameter der Hybridsubstanzen im Bindungsgleichgewicht.....	72
4.1.4	Die Agonist-Fragmente Iper-4 und Iper-8 zeigen Biphasizität ihres Bindungsverhaltens	75
4.1.5	Einfluss der Verkettungslänge auf die Bindungsaffinität der Hybridsubstanzen.....	77
4.2	Bindungsverhalten der Hybridsubstanzen an der allosterischen Bindungsstelle des M ₂ -Rezeptors	81
4.2.1	Bindungsneigung von Iperoxo und Atropin zur allosterischen Bindungsstelle	81
4.2.2	Bindungsneigung von Iperoxo-Atropin- und Iperoxo-Scopolamin-Hybriden für die allosterischen Bindungsstelle	83
4.3	Aktivierung des G _i -Signalweges des M ₂ -Rezeptors.....	87
4.3.1	Iperoxo-Atropin Hybride zeigen Verkettungslängen-abhängigen Partialagonismus auf dem G _i -Signalweg	87

4.3.2	Iperoxo-Scopolamin Hybride zeigen keinen Verbindungsketten-abhängigen Partialagonismus auf dem G _i -Signalweg	91
4.3.3	Die Fragmente Iperoxo-4 und Iperoxo-8 sind Vollagonisten auf dem G _i -Signalweg	94
4.4	Einfluss des antagonistischen Bausteins auf die Rezeptoraktivierung im G _i -Signalweg	97
4.4.1	Iperoxo-Atropin Hybride zeigen antagonistisches Verhalten im modifizierten [³⁵ S]GTPγS-Experiment	98
4.4.2	Iperoxo-Scopolamin Hybride zeigen kein antagonistisches Verhalten im modifizierten [³⁵ S]GTPγS-Experiment	101
4.5	Aktivierung des G _s -Signalweges des M ₂ -Rezeptors	102
4.5.1	Iperoxo-Atropin Hybride zeigen Verbindungsketten-abhängigen Partialagonismus oder inversen Agonismus auf dem G _s -Signalweg	104
4.5.2	Iperoxo-Scopolamin Hybride zeigen Verbindungsketten-abhängigen Partialagonismus auf dem G _s -Signalweg	109
4.5.3	Die Hybridfragmente Iperoxo-4 und Iperoxo-8 sind starke Partialagonisten auf dem G _s -Signalweg	113
4.6	Bestimmung des „Ligand-Bias“	115
5	Diskussion	123
5.1	Die Bindungsaffinität der Hybridliganden zeigt sowohl Abhängigkeit von der Länge der Verbindungskette als auch vom antagonistischen Baustein	123
5.2	Hybridsubstanzen besitzen eine geringe Affinität für die allosterische Bindungsstelle des M ₂ -Rezeptors	130
5.3	Iperoxo-Atropin Hybride zeigen eine kettenlängenabhängige G _i -Signalwegaktivierung	132
5.4	Darstellung des antagonistischen Effektes von Atropin	135
5.5	Kettenlängen-gesteuerter Partialagonismus der Hybridsubstanzen auf dem G _s -Signalweg	137
5.6	G _i -Bias von Iperoxo-6-Scopolamin und dem Fragment Iperoxo-8.....	139
6	Zusammenfassung	142

7	Literaturverzeichnis	146
8	Veröffentlichungen.....	158
9	Danksagung	159

1 Einleitung

Das vegetative Nervensystem steuert unter anderem über die Feinabstimmung von Sympathikus und Parasympathikus lebenswichtige Funktionen im menschlichen Organismus. Man bezeichnet das vegetative Nervensystem auch als autonomes Nervensystem, da diese Regulation unwillkürlich und nicht willentlich beeinflussbar vorgenommen wird. Bei sympathisch innervierten Neuronen ist der wichtigste Überträgerstoff am Zielorgan das Katecholamin Noradrenalin. Handelt es sich um Neurone des Parasympathikus, so übernimmt der Neurotransmitter Acetylcholin die Aufgabe der Signaltransduktion. Zur Vermittlung des Effektes kann Acetylcholin grundsätzlich an zwei wichtige transmembranäre Proteinstrukturen binden: An nikotinische Acetylcholin-Rezeptoren, welche als Ligand-gesteuerte Ionenkanäle zur Gruppe der ionotropen Rezeptoren gehören, oder an muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren. Diese gehören als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zur Gruppe der metabotropen Rezeptoren und setzen nach Aktivierung eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang.

1.1 Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren

Die muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren (mAChR) gehören zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), welche mit rund 800 Mitgliedern die größte Proteinfamilie des humanen Genoms darstellt (Lagerstrom und Schioth 2008). Man spricht aufgrund ihrer strukturellen Bauweise, die allen Vertretern dieser Proteinfamilie gemein ist, auch von heptahelikalen oder sieben transmembranären (7-TM) Rezeptoren: Ein unverzweigter Proteinfaden windet sich mit insgesamt sieben α -Helices durch die Membran der Zelle, wodurch sich sowohl auf intrazellulärer als auch auf extrazellulärer Seite drei Schleifen ausbilden (Caulfield und Birdsall 1998; Jensen und Spalding 2004). Im Intrazellulärraum befindet sich dabei das carboxyterminale Ende des Proteins, der Aminoternus liegt auf der extrazellulären Seite. Die GPCR werden weiter unterteilt in Klasse A (Rhodopsin-ähnliche), Klasse B (Sekretin-ähnliche) und Klasse C (Glutamat-ähnliche) G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Außerdem findet eine Einteilung in Adhäsions-Rezeptoren und Frizzled-Taste-2-Rezeptoren statt (Fredriksson et al. 2003; Cherezov et al. 2007). Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren weisen die Bindungsstelle ihres endogenen Liganden im

Bereich der transmembranären Domäne auf, weswegen sie zur Klasse A der GPCR gezählt werden. Die Aminosäuresequenz im Bereich dieser Bindungsstelle ist über alle Subtypen der mAChR hinweg stark konserviert (Hulme et al. 1990a). In den Bereichen der extrazellulären Schleifen wurden hingegen markante Unterschiede in der Anordnung der Aminosäuren identifiziert (Kubo et al. 1986; Bonner et al. 1987; Peralta et al. 1988). Aufgrund dieser Unterschiede in der Proteinsequenz als auch wegen unterschiedlich starker, gewebsabhängiger Expression wurde eine Einteilung der mAChR in fünf Subtypen vorgenommen (M₁ – M₅).

1.2 Aktivierung und Signaltransduktion muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren

Unterschiedliche Subtypen der mAChR rekrutieren nach der Rezeptoraktivierung im Zuge der Signaltransduktion verschiedene G-Proteine auf der Innenseite der Zellmembran. Es resultieren unterschiedliche Signalkaskaden. Die Subtypen M₁, M₃ und M₅ aktivieren nach einer vorhergehenden Konformationsänderung durch Agonist-Bindung G_{q/11}-Proteine. Diese stimulieren die Phospholipase C, welche die Umsetzung von Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-Triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert. Dies führt zu einer Zunahme der intrazellulären Ca²⁺-Ionen-Konzentration (Eglen 2006). Werden die Subtypen M₂ und M₄ von einem Agonisten gebunden, so führt die Konformationsänderung des Rezeptorproteins zur Rekrutierung und Aktivierung von inhibitorisch wirkenden G_{i/o}-Proteinen. Diese haben hemmenden Einfluss auf die membranständige Adenylylcyclase (AC), die Adenosintriphosphat zur Signalweiterleitung in cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umwandelt. Außerdem können von den Subtypen M₂ und M₄ auch G_s-Proteine aktiviert werden, welche stimulatorischen Einfluss auf die AC ausüben. Dies geschieht vor allem in Anwesenheit hoher Konzentrationen eines Agonisten und ist daher nicht nur von experimenteller, sondern auch von physiologischer Bedeutung (Antony et al. 2009). Auch die Rekrutierung von G_{q/11}-Proteinen durch mAChR vom Subtyp M₂ und M₄ wurde bereits beschrieben (Griffin et al. 2007; Michal et al. 2007). Die Rezeptor-vermittelte Aktivierung von mehr als nur einer G-Protein-Unterfamilie wird in der Literatur als promiskuitive Signalwegsaktivierung („promiscuous signaling“) beschrieben (Kebig et al. 2009). Außerdem sind GPCR in der Lage, G-Protein-

unabhängige Signalkaskaden in Gang zu setzen (Violin und Lefkowitz 2007) wie die Signalübertragung durch β -Arrestine, die normalerweise für die Entkopplung des aktivierten und phosphorylierten Ligand-Rezeptor-Komplexes zuständig sind (Drake et al. 2008). Dies kann sich z.B. durch Rezeptordesensibilisierung nach Ausbildung Clathrin-beschichteter Vesikel und anschließender Endocytose des Rezeptors oder in einer Aktivierung Mitogen-aktiver Proteinkinasen (MAP-Kinasen) und deren nachgeschalteter Regulationsmechanismen äußern (Lefkowitz und Shenoy 2005; DeWire et al. 2007). Die Verteilung durch Expression in den verschiedenen Geweben des Organismus und die Aufgaben der jeweiligen Rezeptorsubtypen sind in nachstehender Tabelle dargestellt (vgl. Tab. 1).

G_{q/11}-gekoppelte mAChR**G_{i/o}-gekoppelte mAChR**

<i>Funktion:</i>	M₁ Hemmung striataler Dopaminfreisetzung, Förderung der Ganglienerregung	M₂ Parasympathisch vermittelte Herzwirkungen, Antinozizeption, Erhöhung der Kontraktilität glatter Muskulatur, inhibitorischer Auto-/Heterorezeptor
	<i>Lokalisation:</i> ZNS (Kortex, Hippocampus, Striatum), Peripherie (Drüsengewebe, sympathische Ganglien)	
<i>Funktion:</i>	M₃ Parasympathisch vermittelte Regulierung der Kontraktilität glatter Muskulatur, Speichelproduktion	M₄ Antinozizeption, motorische Kontrolle, inhibitorischer Auto-/Heterorezeptor
<i>Lokalisation:</i>	ZNS, Peripherie (glatte Muskulatur, Drüsengewebe)	ZNS (Striatum, Kortex, Hippocampus)
<i>Funktion:</i>	M₅ Motorische Kontrolle, Teil des Belohnungssystems, Erhöhung der striatalen Freisetzung von Dopamin, Vasodilatation	
<i>Lokalisation:</i>	ZNS (Substantia nigra, Striatum)	

Tabelle 1: Übersicht über Funktion und Lokalisation der fünf mAChR-Subtypen.

Die Subtypen M1, M3 und M5 aktivieren vornehmlich G_{q/11}-Proteine, die Subtypen M2 und M4 G_{i/o}-Proteine. (Modifiziert nach Wess 2003, 2004; Eglén 2005).

1.3 Ligandbindungsstellen der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren

Bei muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren liegt die Bindungsstelle ihres endogenen Liganden Acetylcholin im Bereich der transmembranären Domänen der Rezeptoren. Sie wird als orthosterische (*griech.*: orthos = richtig; steros = Ort) Bindungsstelle bezeichnet (Neubig et al. 2003). Innerhalb der fünf Subtypen der mAChR ist die Proteinsequenz der orthosterischen Bindungsstelle sehr homolog. Daher weisen orthosterische Liganden, endogen sowie exogen, eine ähnlich hohe Bindungsaffinität zu allen fünf Subtypen ($M_1 - M_5$) auf und besitzen damit keine therapeutisch ausnutzbare Subtypselektivität. Neben der orthosterischen Bindungsstelle, wurde bei mAChR eine weitere Bindungsstelle nachgewiesen, die sich räumlich getrennt von der orthosterischen Bindungstasche befindet und daher als allosterische (*griech.*: allos = anders; steros = Ort) Bindungsstelle bezeichnet wird (Kords et al. 1968; Clark und Mitchelson 1976; Stockton et al. 1983). Sie befindet sich im extrazellulären Bereich der mAChR, über dem Eingang zur orthosterischen Bindungsstelle. Auch bei anderen GPCR wurden bereits allosterische Bindungsareale identifiziert und untersucht, wie für die Adrenorezeptoren α_{1A} und α_{2A} (Leppik und Birdsall 2000; Leppik et al. 2000), die Dopamin D_2 -Rezeptoren (Hoare und Strange 1996), die Chemokin-Rezeptoren (Sabroe et al. 2000), die Adenosin A_1 -Rezeptoren (Kollias-Baker et al. 1997; Gao und Ijzerman 2000) und für die Ca^{2+} -Rezeptoren (Miedlich et al. 2004; Petrel et al. 2004; Nagano und Nemeth 2005; Mos et al. 2019).

1.4 Dualsterische Liganden

Das große Problem bei der Entwicklung subtypselektiver und spezifisch bindender Liganden für mAChR ist die breite Homologie der orthosterischen Bindungsstelle unter allen Subtypen ($M_1 - M_5$). Allosterische Modulatoren eröffneten auf diesem Gebiet daher ganz neue Möglichkeiten, da die allosterische Bindungsstelle der mAChR weniger konserviert ist als das orthosterische Haftareal. Um eine Subtypselektivität und / oder Partialagonismus zu erreichen wurde daher neben der Synthese rein allosterisch bindender und wirkender Liganden auch die Synthese dualsterischer Hybridagonisten und Hybridantagonisten vorangetrieben (Disingrini et al. 2006; Antony et al. 2009; Schmitz et al. 2014; Chen et al. 2015; Schramm et al. 2019). Die

Synthese dualsterischer Liganden mit einem orthosterisch bindenden Molekülteil mit intrinsischer Aktivität sowie einer allosterisch bindenden Struktur, welche die Subtypselektivität ausmacht, erlaubte damit eine selektive Modulation von mAChR (Antony et al. 2009). Diese Art dualsterischer Hybridliganden werden im folgenden orthosterisch-allosterische Liganden genannt und kommen nur in einer heterobivalenten Form vor, d.h. orthosterischer und allosterischer Molekülteil sind von unterschiedlicher chemischer Struktur (siehe Kapitel 1.4.1). Dynamische bipharmakophore Liganden, welche im Gegensatz dazu zwei orthosterisch bindende Pharmakophore besitzen, werden als orthosterisch-orthosterische Liganden bezeichnet und unterteilen sich in heterobivalente Liganden und homobivalente Liganden (siehe Kapitel 1.4.2).

1.4.1 Orthosterisch-allosterische Liganden

Dualsterische Hybride, welche als Bipharmakophore zu den orthosterisch-allosterischen Liganden zählen bestehen aus einem orthosterisch bindenden Molekülteil, der über eine kovalente Bindung (sog. Verbindungskette oder „linker“) mit einem allosterisch bindenden Molekülteil verknüpft ist. Da die beiden Molekülteile dieser Art von dualsterischen Liganden strukturell unterschiedlich sind, können sie auch als heterobivalente Liganden bezeichnet werden. Der Theorie nach, lässt sich über die intrinsische Aktivität des orthosterischen Bausteins das Ausmaß der Aktivierung des Rezeptors bestimmen und durch den allosterischen Molekülteil kann eine gewisse Selektivität zu Gunsten eines Rezeptorsubtyps ($M_1 - M_5$) erreicht werden (Bock et al. 2014b). Für diese Verbindungen sind zwei unterschiedliche Bindungsmodi denkbar: Eine dualsterische bzw. bitopische Bindungspose, bei welcher sowohl die allosterische als auch die orthosterische Bindungsstelle des Rezeptors vom jeweiligen Molekülteil der Hybridsubstanz besetzt sind (Steinfeld et al. 2007; Bock und Mohr 2013) und eine rein allosterische Bindungspose (vgl. Abb. 1). Hierbei geht nur der allosterische Molekülteil des Hybridliganden eine Bindung mit dem allosterischen Haftareal des Rezeptors ein, die orthosterische Bindungstasche bleibt jedoch frei. Welche dieser Bindungsposen von dem Hybridliganden eingenommen wird, hängt von der Affinität der Einzelbausteine für ihre jeweilige Bindungsstelle ab (Bock et al. 2014a). Heterobivalente Hybridliganden, bei denen nur der orthosterische Molekülteil intrinsische Aktivität aufweist, sind daher in der Lage – je nach Bindungsmodus –

unterschiedliche Rezeptorzustände zu stabilisieren. In der dualsterischen Bindung wird der Rezeptor in seiner aktiven Konformation gehalten, die rein allosterische Bindung stabilisiert den Rezeptor in seinem inaktiven Zustand. Dieses Phänomen wurde als dynamisches Bindungsverhalten („dynamic ligand binding“) von dualsterischen Liganden bezeichnet, wobei das letztlich resultierende Ausmaß der Rezeptoraktivierung vom Verhältnis der unterschiedlich (aktiv oder inaktiv) stabilisierten Rezeptoren im System abhängt (Bock et al. 2014a).

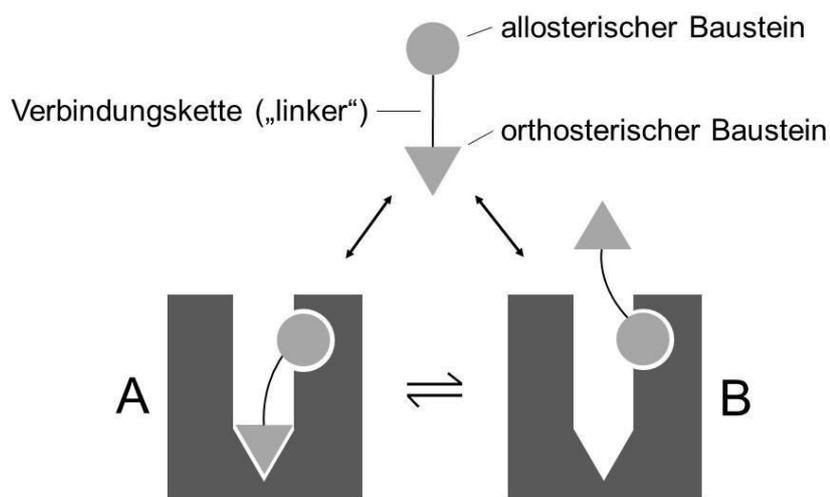


Abbildung 1: Allgemeines Bauprinzip und Bindungsmodi eines dualsterischen, heterobivalenten Hybridliganden. Oben: der Ligand besteht aus einem allosterischen Baustein (hellgrauer Kreis), einem orthosterischen Baustein (hellgraues Dreieck) und einer Verbindungskette (schwarzer Strich). Unten: der Ligand bindet entweder im dualsterischen Bindungsmodus (A) oder im rein allosterischen Bindungsmodus (B) an den Rezeptor (dunkelgraue rechteckige Struktur). Die Rezeptorzustände unterliegen einem dynamischen Gleichgewicht (Pfeilsymbole). (Nach Bock et al. 2014b)

1.4.2 Orthosterisch-orthosterische Liganden

Als orthosterisch-orthosterische Liganden werden solche bipharmakophore Verbindungen bezeichnet, die zwei orthosterisch bindende Pharmakophore besitzen. Hierbei werden heterobivalente von homobivalenten Liganden unterschieden, also solche mit zwei strukturell unterschiedlichen Pharmakophoren von denen mit strukturell gleichartigen Pharmakophoren. Die Eigenschaften orthosterisch-orthosterischer Liganden reichen von Subtypselektivität und Signalwegsbevorzugung

(„Ligand-bias“; siehe Kapitel 3.5) über Affinitätsunterschiede bis hin zu definierter intrinsischer Aktivität. Methoctramin, eine dualsterische, homobivalente Hybrids substanz wies selektiven Antagonismus am M₂-Rezeptor auf (Melchiorre et al. 1987; Melchiorre et al. 1989). Hybrids substanz heterobivalenter Art aus einem β -adrenergen Agonisten und Antagonisten zeigten eine Ligand-spezifische Bevorzugung bestimmter Signalwege am β_1 - und β_2 -Adrenorezeptor (Stanek et al. 2019). Homobivalente Hybride aus zwei Agonisten für mAChR (Carbachol, Xanomelin oder Arecaidinpropylester) zeigten eine unterschiedliche Affinität und intrinsische Aktivität, abhängig von der Struktur der Einzelbausteine sowie der Länge der Verbindungskette (Moser et al. 1995; Christopoulos et al. 2001; Rajeswaran et al. 2001; Matucci et al. 2016). Bindungssimulationen legen nahe, dass abhängig von der Länge der Verbindungskette dualsterischer Liganden auch orthosterische Pharmakophore mit der allosterischen Bindungstasche interagieren können und so den Rezeptor modulieren (Matucci et al. 2016). Zwei agonistische Strukturen in einem Molekül gehen also nicht zwingend mit einer Erhöhung der Affinität oder intrinsischen Aktivität einher. Außerdem sind homo- oder heterobivalente Liganden mit mindestens einer agonistischen Struktur nicht unbedingt in der Lage eine Aktivierung des Rezeptors hervorzurufen (Disingrini et al. 2006; Antony et al. 2009). Auch für orthosterisch-orthosterische Liganden wurde postuliert, dass, wie für orthosterisch-allosterische Liganden bereits beschrieben, das Phänomen des dynamischen Bindungsverhaltens der Verbindungen Grundlage ihres Partialagonismus sein könnte (Bock et al. 2014b). Dieser offenen Frage wird in der vorliegenden Arbeit durch Bearbeitung der im nächsten Kapitel folgenden Fragestellungen auf den Grund gegangen.

1.5 Fragestellung

Aufgrund der vielfältigen Eigenschaften, die orthosterisch-orthosterische Liganden aufweisen können (siehe Kapitel 1.4.2), erschien es interessant, diese Art von Hybrids substanz auch am mAChR vom Subtyp 2 zu testen. Speziell orthosterisch-orthosterische Liganden, bestehend aus einem Agonisten und einem Antagonisten, wurden am M₂-Rezeptor bislang noch nicht untersucht. Gegenstand dieser Arbeit waren daher Experimente zur Rezeptor-Bindung und -Funktion mit Hybrids substanz aus dem Superagonisten Iperoxo und den Antagonisten Atropin bzw. Scopolamin,

welche unterschiedlich starke Affinitäten für die orthosterische Bindungsstelle des M₂-Rezeptors aufweisen. Beide Pharmakophore der jeweiligen Hybridsubstanzen sind mit aliphatischen Linker-Ketten unterschiedlicher Länge kovalent verbunden.

Speziell wurden die folgenden Fragestellungen bearbeitet:

- Sind die Verbindungen in der Lage den Rezeptor zu aktivieren? Lässt sich mit den Verbindungen Partialagonismus modulieren? (vgl. Kapitel 4.3 und 4.5)
- Welchen Einfluss haben die unterschiedlichen antagonistischen Bausteine und die Länge der Verbindungskette auf die Rezeptormodulation? (vgl. Kapitel 4.3, 4.4 und 4.5)
- Welchen Bindungsmodus nehmen die unterschiedlichen Hybridverbindungen ein? Ist auch eine allosterische Bindung wahrscheinlich? (vgl. Kapitel 4.1 und 4.2)
- Welcher Signalweg wird durch die Verbindungen bevorzugt aktiviert und ist dies abhängig vom verwendeten Antagonisten bzw. der Länge der Verbindungskette? (vgl. Kapitel 4.6)

Und damit:

- Ist durch Einsetzen von Bausteinen mit unterschiedlichen Affinitäten für die orthosterische Bindungsstelle und in ihrer Länge angepassten Verbindungsketten eine gezielte Modulation des M₂-Rezeptors möglich?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen wurden die Verbindungen aus Iperoxo und Atropin bzw. Iperoxo und Scopolamin mit unterschiedlich langen Verbindungsketten von unseren Kooperationspartnern aus der Pharmazeutische Chemie (Arbeitsgruppe um Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe, Würzburg) synthetisiert und freundlicherweise für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

2 Materialien

2.1 Verbindungen

2.1.1 Radioliganden

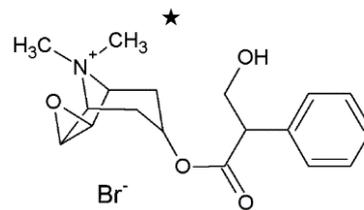
[³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS)

MG: 398,3 g/mol

Hersteller: Perkin Elmer

Artikelnr.: NET636001MC

★ Position der radioaktiven Markierung



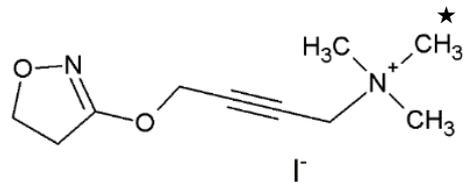
[³H]Iperoxo

MG: 324,2 g/mol

Hersteller: Perkin Elmer

Lot Nr.: 100226

★ Position der radioaktiven Markierung



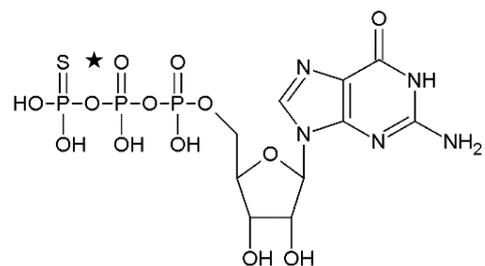
[³⁵S]GTPγS

MG: 539,2 g/mol

Hersteller: Perkin Elmer

Lot Nr.: 0617

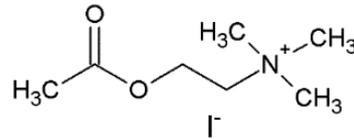
★ Position der radioaktiven Markierung



2.1.2 Muskarinische Agonisten

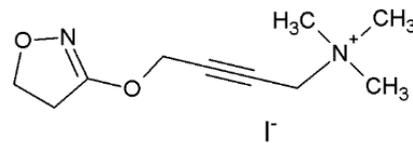
Acetylcholin (Ach)

MG: 273,1 g/mol
Hersteller: Sigma Aldrich
Artikelnr.: A7000



Iperoxo (Ipx)

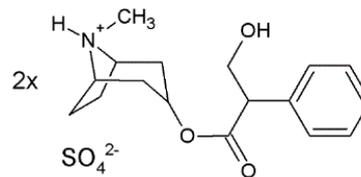
MG: 342,2 g/mol
Hersteller: AK Holzgrabe,
Universität Würzburg, Deutschland



2.1.3 Muskarinische Antagonisten / inverse Agonisten

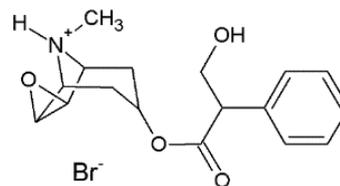
Atropin (Atr)

MG: 694,8 g/mol
Hersteller: Sigma Aldrich
Artikelnr.: A0257



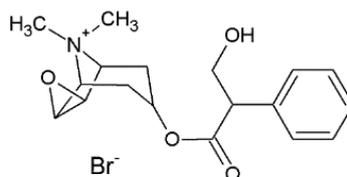
Scopolamin (Scop)

MG: 384,3 g/mol
Hersteller: Sigma Aldrich
Artikelnr.: S1875



N-Methylscopolamin (NMS)

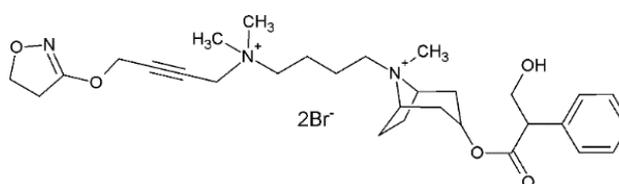
MG: 398,3g/mol
Hersteller: Sigma Aldrich
Artikelnr.: S8502



2.1.4 Dualsterische Liganden aus Iperoxo und Atropin

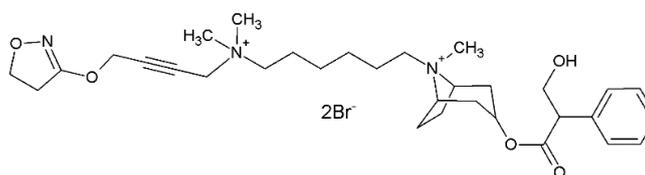
Iperoxo-C₄-Atropin (Iper-4-Atr)

MG: 687,5 g/mol
Hersteller: AK Holzgrabe,
Universität Würzburg,
Deutschland



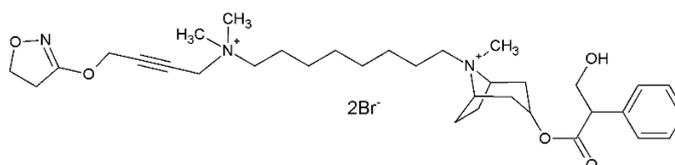
Iperoxo-C₆-Atropin (Iper-6-Atr)

MG: 715,6 g/mol
Hersteller: AK Holzgrabe,
Universität Würzburg,
Deutschland



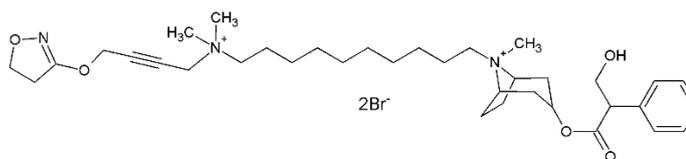
Iperoxo-C₈-Atropin (Iper-8-Atr)

MG: 743,6 g/mol
Hersteller: AK Holzgrabe,
Universität Würzburg,
Deutschland



Iperoxo-C₁₀-Atropin (Iper-10-Atr)

MG: 771,7 g/mol
Hersteller: AK Holzgrabe,
Universität Würzburg,
Deutschland

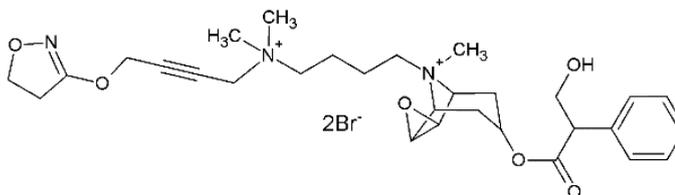


2.1.5 Dualsterische Liganden aus Iperoxo und Scopolamin

Iperoxo-C₄-Scopolamin

(Iper-4-Scop)

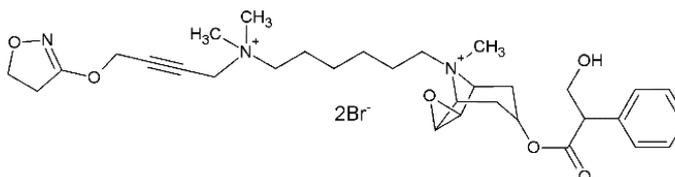
MG: 701,5 g/mol
Hersteller: AK Holzgrabe,
Universität Würzburg,
Deutschland



Iperoxo-C₆-Scopolamin

(Iper-6-Scop)

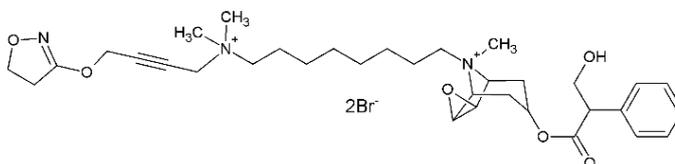
MG: 729,6 g/mol
Hersteller: AK Holzgrabe,
Universität Würzburg,
Deutschland



Iperoxo-C₈-Scopolamin

(Iper-8-Scop)

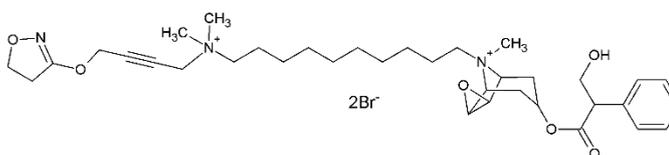
MG: 757,6 g/mol
Hersteller: AK Holzgrabe,
Universität Würzburg,
Deutschland



Iperoxo-C₁₀-Scopolamin

(Iper-10-Scop)

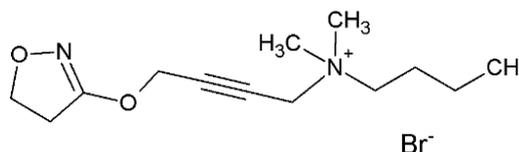
MG: 785,7 g/mol
Hersteller: AK Holzgrabe,
Universität Würzburg,
Deutschland



2.1.6 Agonist-Fragmente der dualsterischen Liganden

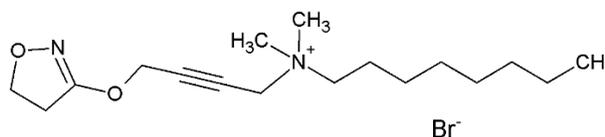
Iperoxo-C₄

MG: 370,16 g/mol
Hersteller: AK Holzgrabe,
Universität Würzburg, Deutschland



Iperoxo-C₈

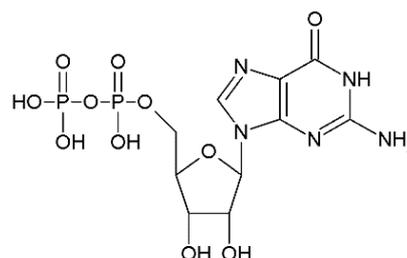
MG: 426,16 g/mol
Hersteller: AK Holzgrabe,
Universität Würzburg, Deutschland



2.1.7 Sonstige Verbindungen

Guanosindiphosphat (GDP)

MG: 443,2 g/mol
Hersteller: Sigma Aldrich
Artikelnr.: SLBT1542



2.2 Reagenzien und Chemikalien

	Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
R1	Aqua dest.	k. A.	Millipore
R2	Aqua pro analysi	k. A.	Millipore
R3	Dimethylsulfoxid (DMSO; 78,1 g/mol)	D5879	Sigma
R4	Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (DPBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺)	7250616	PAN
R5	Emulsifier Safe™	6013389	PerkinElmer
R6	Ethylendiaminotetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA-Natrium; 100mM)	20271	Grüssing
R7	Fetales Kälberserum (FBS)	F7524	Sigma
R8	Folin-Ciocalteu Phenolreagenz	1.09001.0500	Merck
R9	L-Glutaminlösung (200 mM)	G7513	Sigma
R10	Guanosin-5'-diphosphat-Natrium (GDP)	G7127	Sigma
R11	Hanks' balanced salt solution (HBSS) (1,26 mM CaCl ₂ , 0,5 mM MgCl ₂ , 0,4 mM MgSO ₄ , 5,3 KCl, 0,44 mM KH ₂ PO ₄ , 4,2 mM NaHCO ₃ , 137,9 mM NaCl, 0,34 mM Na ₂ HPO ₄ , 5,56 mM D-Glucose)	14025-050	Invitrogen
R12	HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)-Säure	A1069,0250	AppliChem
R13	HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), Pufferlösung, 1 M	15630056	Life
R14	HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)-Natriumsalz	A1070,0100	AppliChem

R15	HTRF®-cAMP dynamic 2-kit	62AM4PEC	Cisbio
R16	Humanes Serumalbumin	A1653	Sigma
R17	3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	I5879	Sigma
R18	Isopropanol 100%	k. A.	ZVE
R19	Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat (CuSO ₄ x 5 H ₂ O)	1.027.900.250	Merck
R20	Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	31413	Riedel-de-Haën
R21	Natriumbutyrat	A11079	AlfaAesar
R22	Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	A3900,0500	AppliChem
R23	Natriumchlorid (NaCl)	1.06404.1000	Merck
R24	Natronlauge (NaOH; 1 M)	35256	Fluka
R25	Natronlauge (NaOH; 0,1 M)	35263	Fluka
R26	Nutrient Mixture F-12 Ham	N4888	Sigma
R27	Penicillin / Streptomycin-Lösung (PenStrep)	P0781	Sigma
R28	Pertussistoxin (PTX)	BP0372	Biotrend
R29	Polyethylenimin-Lösung (PEI) 50%	P3143	Fluka
R30	ThermoClean Blau	002522-0100	Bioanalytic
R31	Trypsin-EDTA	T3924	Sigma

2.3 Lösungen und Puffer

L1 Arbeitslösung Proteinbestimmung nach Lowry

100 Teile	2 %ige Natriumcarbonat-Lösung in 0,1 N NaOH
1 Teil	2 %ige Natriumkaliumtartrat-Lösung
1 Teil	1 %ige wässrige Kupfer(II)sulfat-Lösung

Lagerung: Raumtemperatur

L2 Folin-Ciocalteu-Reagenz für die Proteinbestimmung nach Lowry

1 Teil	Folin-Ciocalteu Phenolreagenz
3 Teile	Aqua dest.

Lagerung: Raumtemperatur

L3 GDP-Stammlösung (10 mM)

4,65 mg	Guanosin-5'-diphosphat-Natrium
1,0 ml	Aqua dest.

Lagerung: 50 µl Aliquota bei -20°C

L4 HBSS + 20 mM HEPES Puffer

490 ml	HBSS
10 ml	HEPES-Stammlösung (1 M)

Lagerung: Raumtemperatur

L5 HEPES-Puffer (12,5 mM)

1,085 g	HEPES-Natriumsalz
1,986 g	HEPES-Säure
2,541 g	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
7,305 g	Natriumchlorid
q.s.	1 M NaOH bis pH 7,4
Ad 1,0 l	Aqua dest.

Lagerung: 2-8°C

L6 HEPES-Stammlösung (200 mM)

17,353 g	HEPES-Natriumsalz
31,773 g	HEPES-Säure
q.s.	1 M NaOH bis pH 7,4
ad 1,0 l	Aqua dest.

Lagerung: 2-8°C

L7 Homogenisierungspuffer (20 mM HEPES; 10 mM Na₂EDTA)

50 ml	HEPES Stammlösung (200 mM)
50 ml	EDTA-Natrium-Lösung (100 mM)
Ad 500 ml	Aqua dest.

Lagerung: 2-8°C

L8 IBMX-Puffer

1,998 ml	HBSS + HEPES 20 mM Puffer
2 µl	IBMX-Stammlösung

Lagerung: sofortige Nutzung

L9 IBMX-Stammlösung (1 M)

2,1 mg	IBMX
9,45 µl	DMSO

L10 Nährmedium Flp-In™-CHO-Zellen

500 ml	Nutrient Mixture F-12 Ham
50 ml	Fetales Kälberserum
6 ml	L-Glutaminlösung
5 ml	Penicillin / Streptomycin-Lösung

Lagerung: 2-8°C

L11 Natriumbutyrrathaltiges Nährmedium Flp-In™-CHO-Zellen

1 Flasche Nährmedium Flp-In™-CHO-Zellen

28 ml Natriumbutyrat-Stammlösung (steril filtriert)

Lagerung: sofortige Nutzung

L12 Natriumbutyrat-Stammlösung (100 mM)

1,101 g Natriumbutyrat

100 ml Aqua dest.

Lagerung: 2-8°C

L13 Polyethylenimin-Stammlösung (PEI) 1%

10 g Polyethylenimin-Lösung 50%

Ad 500 ml Aqua dest.

Lagerung: 2-8°C

L14 Polyethylenimin-Lösung (PEI) 0,1%

50 ml Polyethylenimin-Stammlösung (PEI) 1%

Ad 500 ml Aqua dest.

Lagerung: 2-8°C

L15 Zentrifugationspuffer (20 mM HEPES; 0,1 mM Na₂EDTA)

50 ml	HEPES Stammlösung (200 mM)
0,5 ml	EDTA-Natrium-Lösung (100 mM)
Ad 500 ml	Aqua dest.

Lagerung: 2-8°C

2.4 Verbrauchsmaterialien

	Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller
V1	Aluminiumfolie Ja!	k.A.	Rewe
V2	Cell Assay Plate, 384 well	5040	Corning
V3	Cellstar®, Cell culture dishes, 145 x 20 mm	639160	Greiner
V4	Cellstar®, Cell culture dishes, 100 x 20 mm	664160	Greiner
V5	Cellstar®, Tubes, 50 ml / 15 ml	227 261 188 271	Greiner
V6	Finntip Stepper 0,5; 1,25; 2,5 ; 5,0; 12,5 ml	9404-170; 180; -190; 200; -210	- ThermoForma
V7	Injekt® 5 ml, Luer Solo	4606051V	B.Braun
V8	MultiLex™ A, 73 x 109 mm	1450-441	PerkinElmer
V9	Nalgene® System 100™ Cryogenic Tubes	5000-1012	Thermo Fisher
V10	NORM-JECT® Einmalspritzen 20 ml, Luer	42000.000V0	HSW
V11	Parafilm® M Laboratory Film	PM-996	Bemis

V12	Pasteurpipetten Glas	7477 15	Brand
V13	Pipettenspitzen 0,5 – 5,0 ml	702600	Brand
V14	Printed Filtermat A, 90 x 120 mm	1450-421	PerkinElmer
V15	Reaction Tubes 1,5 ml	616 201	Greiner
V16	Sample Bag MicroBeta™	1450-432	PerkinElmer
V17	Szintillationsgefäß 20 ml	73.662.500	Sarstedt
V18	Serologische Pipette 5 ml, 10 ml, 25 ml	86.1685.001, 86.1254.001, 86.1253.001	Sarstedt
V19	Sterican® Einmalkanüle zur i.m. Injektion (0,9 x 70 mm)	4665791	B.Braun
V20	Storage Plate, 384 well	3657	Corning
V21	Storage Plate; 96 well; 1,2 ml	12114172 AB-0564	ThermoFisher
V22	Whatman™ Filter Unit 0,2 µM	10 462 200	GE
V23	Zellschaber 25 cm	83.1830	Sarstedt
V24	1000 µl Blue, Graduated Tip	S1111-2021	Starlab
V25	200 µl Yellow, Bevelled Tip	S1111-1006	Starlab

2.5 Geräte

	Bezeichnung	Hersteller
G1	AccuJet® Pipettierhilfe	Brand
G2	Analysenwaage AG 285	Mettler
G3	Avanti® J-20 XP Zentrifuge	Beckman
G4	Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss
G5	Beckman Coulter LS 6000 Multi-Purpose Scintillation Counter	Beckman
G6	Beckman Coulter LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter	Beckman
G7	Binder C 150 E2 CO ₂ -Inkubator	Binder
G8	Dri-Block® DB-2A	Techne
G9	Filtermattenkassette für Microbeta® Trilux	PerkinElmer
G10	Eismaschine AF-100	Scotsman
G11	Elix® Wasseraufbereiter	Millipore
G12	Eppendorf Pipette (0,1 – 1,0 µl)	Eppendorf
G13	Eppendorf Centrifuge 5417C Tischzentrifuge	Eppendorf
G14	Finnpipette Stepper	ThermoForma
G15	Finnpipette 4500 (1-5ml, 200-500µl, 20-200µl, 5-50µl, 1-10µl, 0,2-2µl)	ThermoForma
G16	Harvester 96® (Mach III M, Tomtec, Nr.: 963589)	PerkinElmer
G17	Harvester 96® (Mach III M, Tomtec, Nr.: 990607010)	PerkinElmer
G18	Herasafe Werkbank HS15, Klasse II	Heraeus
G19	Inkubationswasserbad GFL 1083	GFL

G20	Laboklav® 135 MSLV Dampfsterilisator	SHP
G21	Mikrowelle NN-E205W EPG	Panasonic
G22	Mikrotiterplatte, 384 well, 788093	Greiner
G23	Milli-Q® Reinstwasseraufbereitung	Millipore
G24	MS1 Minishaker, 05.002940	IKA
G25	Mithras LB 960	Berthold
G26	Mithras ² LB 943	Berthold
G27	Mr. Frosty 5100 Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene
G28	Neubauer Zählkammer	VWR
G29	pH-Meter EC-30 pH	Phoenix
G30	Pipetus®-akku Pipettierhilfe	Hirschmann
G31	Polytron Homogenisator pT 10-35	Kinematica
G32	Präzisionsküvetten 100-QS	Hellma
G33	Präzisionswaage PB403-S	Mettler
G34	Stickstoffgefrierbehälter LS4800, Lager- und Transportbehälter XL-100	Taylor-Wharton
G35	Thermo Forma Series II Water Jacketed CO ₂ -Inkubator	ThermoForma
G36	Ultrospec 3300 pro UV/Visible Spectrophotometer	Biochrom
G37	Varioklav® Dampfsterilisator Typ 135 S	SHP
G38	Variomag® Monotherm Magnetrührer mit Heizplatte	SHP
G39	Wasserbad Julabo TW12 (beheizbar)	Julabo
G40	1450-Microbeta® Trilux Liquid Scintillation & Luminescence Counter	PerkinElmer

2.6 Computerprogramme

	Bezeichnung	Hersteller
P1	ACD/ChemSketch® 2015.2.5	ACD/Labs
P2	Adobe Photoshop CC 2017	Adobe
P3	Citavi 4.4	Swiss Academic
P4	GraphPad Prism® 5.03	GraphPad
P5	Microsoft® Office Excel 2016	Microsoft
P6	Microsoft® Office PowerPoint 2016	Microsoft
P7	Microsoft® Office Word 2016	Microsoft

2.7 Herstellerverzeichnis

Abkürzung	Anschrift
ACD/Labs	Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, Canada
Adobe	Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Ireland
AlfaAesar	Alfa Aesar GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
AppliChem	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
B.Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Beckman	Beckman Coulter Incorporated, Fullerton, CA, USA
Berthold	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland
Binder	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland

Bioanalytic	Bioanalytic GmbH, Umkirch/Freiburg, Deutschland
Biochrom	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
Biotrend	Biotrend Chemicals AG, Wangen, Zürich
Brand	BRAND GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Cisbio	Cisbio Bioassays, Codolet, Frankreich
Corning	Corning, Inc., NY, USA
Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fluka	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
GE	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
GraphPad	GraphPad Software Incorporated, Dan Diego, CA, USA
Greiner	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Grüssing	Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Hellma	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland
Heraeus	Heraeus, Hilden, Deutschland
Hirschmann	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
HSW	HENKE SASS WOLF, Tuttlingen, Deutschland
IKA	IKA® Works do Brasil Ltd a, Taquara, RJ, Brasilien
Invitrogen	Invitrogen AG, Darmstadt, Deutschland
Julabo	Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland
Kinematica	KINEMATICA AG, Luzern, Schweiz
Life	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Merck	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Mettler	Mettler-Toledo AG, Gießen, Deutschland
Microsoft	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Millipore	Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland
Nalgene	Nalgene Nunc International Corporation, Rochester, NY, USA
PAN	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Panasonic	Panasonic Manufacturing U.K. Ltd., Cardiff, UK
PerkinElmer	PerkinElmer LAS GmbH, Rodgau, Germany und PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA
Phoenix	Phoenix Instrument, Garbsen, Deutschland
REWE	REWE Markt, Köln, Deutschland
Riedel-de-Haën	Riedel-de-Haën, seit 2008 Vertrieb der Chemikalien unter Sigma-Aldrich
Roche	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Sarstedt	Sarstedt AG Co., Nümbrecht, Deutschland und Sarstedt Inc., Newton, NC, USA
Scotsman	Scotsman Ice Systems, Bettolino di Pogliano, Mailand, Italien
SHP	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, Deutschland
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland, bzw. Taufkirchen, Deutschland
Starlab	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Swiss Academic	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
Taylor-Wharton	Taylor-Wharton, Theodore (Alabama), USA
Techne	Techne AG, Jahnsdorf, Deutschland
ThermoFisher	Thermo Fisher SCIENTIFIC, Rochester, NY, USA
ThermoForma	ThermoForma SCIENTIFIC, Marietta, USA

VWR	VWR International, Langenfeld, Deutschland
Whatman	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Zeiss	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
ZVE	Zentrale Chemikalienversorgung Eendenich, Universität Bonn, Deutschland

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Arbeiten

Die, in dieser Arbeit untersuchten, in stabil transfizierten Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters (*Cricetulus griseus*) vorliegenden humanen muskarinischen Acetylcholinrezeptoren vom Subtyp M₂ (im Folgenden M₂-Rezeptor genannt), standen zur Durchführung von Bindungsexperimenten sowie von funktionellen Untersuchungen bereits zur Verfügung. Funktionelle Untersuchungen mit Hilfe von [³⁵S]GTPγS sowie alle Arten von radioaktiven Bindungsexperimenten wurden mit Membransuspensionen der genannten Zellen (CHO-M₂) realisiert. Der Expressionsvektor wurde mit Hilfe des Flp-InTM-Systems von Invitrogen in das Genom der CHO-Zellen eingebracht, namentlich CHO-Flp-InTM-Zellen. Da nicht transfizierte CHO-Zellen natürlicherweise keinerlei muskarinische Acetylcholinrezeptoren exprimieren (Lazareno & Birdsall, 1995), ist davon auszugehen, dass die gewonnenen Forschungsergebnisse auf den gentechnisch eingeführten M₂-Rezeptor zurückzuführen sind.

Alle notwendigen zellbiologischen Arbeiten wurden unter aseptischen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank der Klasse II (G18) durchgeführt.

3.1.1 Auftauen der Zellen

Die transfizierten CHO-Zellen wurden zur Langzeitkonservierung in DMSO-haltigem Nährmedium (L10) bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Um gefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen wurde ein Kryovial (V9) aus dem Stickstofftank (G34) entnommen und die enthaltene Zellsuspension rasch mit Handwärme aufgetaut. Eine Zellkulturschale (V3) mit 20 ml Nährmedium (L10) wurde bereitgehalten und die Zellsuspension, sobald diese aufgetaut war, in die Zellkulturschale (V3) gegeben. Nach homogener Verteilung der Zellsuspension in dem vorgelegten Medium (L10) wurde die Zellkulturschale (V3) über Nacht im Inkubator (G7) inkubiert. Wenn die Zellen am folgenden Tag am Kulturschalen-Boden hafteten, wurde das Nährmedium (L10) erneuert und die Zellen am nächsten Tag, wie im folgenden Kapitel 3.1.2 beschrieben, weiter kultiviert.

3.1.2 Kultivierung der Zellen

Die in Kultur gehaltenen Zellen wurden immer bei einer Konfluenz von ungefähr 90% passagiert. Als erstes wurde das Nährmedium abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml DPBS-Puffer (R4) gewaschen, um abgelöste Zellen und Rückstände des Nährmediums zu entfernen. Auch der DPBS-Puffer wurde wieder abgesaugt. Anschließend wurden 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (R31) auf den Zellrasen aufgebracht und gleichmäßig verteilt. Nach einer 3-minütigen Inkubation, konnten die Zellen durch leichtes Klopfen an der Schale (V3) vom Boden abgelöst werden. Die Protease-Aktivität der Trypsin-EDTA-Lösung (R31) wurde dann durch Zugabe von 7 ml Nährmedium (L10) gestoppt und die Zellsuspension homogenisiert. Ein je nach gewünschtem Einsatzzeitpunkt der Konfluenz ausgewähltes Volumen an Zellsuspension wurde im letzten Schritt auf eine mit 15 – 20 ml Nährmedium (L10) gleichmäßig benetzte Zellkulturschale (V3) gegeben und bis zur Homogenität geschwenkt. Die Zellen wurden bis zum Zeitpunkt der nächsten Passage im Inkubator (G7) bei konstanten Bedingungen von 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

3.1.3 Kryokonservierung der Zellen

Zur Konservierung der Zellen über lange Zeiträume wurden diese in Nährmedium (L10) mit einem Zusatz von 10% DMSO (R3) in flüssigem Stickstoff (G34) bei -196°C aufbewahrt. Um dies zu erreichen wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, erst gewaschen, dann abgelöst und mit Nährmedium versetzt. Die erhaltenen 10 ml Zellsuspension wurden von der Zellkulturschale (V3) in ein 15 ml Falcon (V5) überführt und bei Raumtemperatur für 4 Minuten mit 800 rpm (*revolutions per minute*) zentrifugiert (G3, Rotor JS 4.3). Das erhaltene Zellpellet wurde in 900 µl Nährmedium (L10) resuspendiert und in ein Kryovial (V9) überführt. 100 µl DMSO wurden langsam so hinzugegeben, dass die Flüssigkeit, am Rand herunterfließend, die Zellsuspension erreichte. Gleichzeitig wurde das Kryovial (V9) vorsichtig geschwenkt. Der DMSO-Zusatz verhindert die Zerstörung der Zellstruktur durch Kristallwachstum während des Phasenüberganges. Zum Einfrieren wurde das Kryovial (V9) in ein Einfrierbehältnis (G27) überführt, welches ein langsames Absinken der Temperatur von 1 °C pro Minute bewerkstelligte. Auch dies erschwert Kristallwachstum und verhindert das Ruptieren von Zellen im Zellhomogenat. Das Einfrierbehältnis (G27) wurde bei -80°C für 24

Stunden gelagert. Anschließend konnte das Kryovial (V9) in flüssigen Stickstoff (G33) zur Langzeitlagerung bei -196°C überführt werden.

3.1.4 Membranpräparation der Zellen

Die in dieser Arbeit durchgeführten Radioligand-Bindungsstudien sowie funktionelle Experimente mit [³⁵S]GTPγS wurden nicht an ganzen Zellen, sondern an sogenannten Zellhomogenaten durchgeführt. Die Herstellung eines solchen Zellhomogenates wird auch Membranpräparation genannt und soll im Folgenden erläutert werden. Für ein komplettes CHO-Flp-InTM-Zellhomogenat wurden 40 Zellkulturschalen (V3) bis zu einer Konfluenz von ungefähr 80% kultiviert (siehe Kapitel 3.1.2). Dann wurde das übliche Nährmedium (L10) aller Schalen abgesaugt und durch 14,5 ml Natriumbutyrat-haltiges Nährmedium (L11) ersetzt. Natriumbutyrat (R21) wirkt auf CHO-M2-Zellen dahingehend ein, als dass ihre Zellproliferation gemindert und ihre Proteinbiosynthese und damit die Expression der M₂-Rezeptoren gesteigert wird (Kruh 1982). Mit dem Ziel der Rezeptorüberexpression, kann dann nach 16 – 20 Stunden die eigentliche Membranpräparation beginnen. Von fünf Zellkulturschalen (V3) wurde das Nährmedium abgesaugt und durch 2,4 ml kalten Homogenisierungspuffer (L7) pro Schale (V3) ersetzt. Nun wurde der Zellrasen mit Hilfe eines Zellschabers (V23) vom Boden der Zellkulturschalen (V3) abgelöst und in einem in Eis gelagerten Zentrifugenröhrchen (V5) vereinigt. Mit weiteren 6 ml Homogenisierungspuffer wurden alle fünf Schalen (V3) gespült und auch die Spülflüssigkeit in das Zentrifugenröhrchen (V5) überführt. Mit den verbleibenden Schalen (V3) wurde analog verfahren. Anschließend wurden die acht gefüllten Zentrifugenröhrchen (V5) durch Anwendung des Polytron-Homogenisators (G31) in zwei Durchgängen von 20 und 25 Sekunden auf Stufe 6 homogenisiert. Zwischen den Durchgängen wurden die Zentrifugenröhrchen für 4 Minuten auf Eis pausiert. Die erhaltenen Membransuspensionen wurden nun bei 40.000 x g und 2 °C für 10 Minuten zentrifugiert (G3, Rotor JA 25.5). Nach dem Abgießen des Überstandes wurden die Pellets in 15 ml kaltem Zentrifugationspuffer (L15) resuspendiert und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurden alle Zellmembran-Pellets nach gründlichem Absaugen des Überstandes in einem Gesamtvolumen von 40 ml HEPES-Puffer (L5) resuspendiert

und zu 0,5 ml und 1,0 ml Volumen in Reaktionsgefäße (1,5 ml, V14) aliquotiert. Die Aliquota wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Um den Proteingehalt eines Membranhomogenates zu bestimmen, wurde die Methode nach Lowry (1951) genutzt. Da die mit dem M2-Rezeptor stabil transfizierten CHO-Flp-InTM-Zellen auch nur diesen Rezeptortyp exprimierten, korrelierte die Proteinkonzentration des Homogenates mit der Anzahl der M2-Rezeptoren und wurde daher als Näherung für diese herangezogen. Die Bestimmung nach Lowry beruht auf zwei Reaktionen. Im ersten Schritt bildet sich ein blauvioletter Farbstoffkomplex zwischen den Peptidbindungen der Proteine und den Kupfer(II)-Ionen (Biuretreaktion). Diese werden im zweiten Schritt durch die Peptidbindungen zu Kupfer(I) reduziert, welches wiederum das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz (L2) zu Molybdänblau reduziert. Molybdänblau kann photometrisch erfasst werden und seine Farbintensität korreliert proportional mit dem Proteingehalt der vermessenen Membransuspension. Die Durchführung der Lowry-Proteinbestimmung gestaltete sich wie folgt. Als erstes musste eine Eichgerade erhoben werden, mit Hilfe deren Geradengleichung dann die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet werden konnten. Hierfür wurde eine Kalibrierlösung von humanem Serumalbumin (R16) in HEPES-Puffer (L5) erstellt. Die Konzentrationen betragen zwischen 0,25 und 2 mg/ml. Die Proben des Membranhomogenates wurden in Verdünnungen mit HEPES-Puffer (L5) von 1:8, 1:4, 1:2 und unverdünnt vermessen. Alle Messungen fanden in Form von Doppelbestimmungen zweier unabhängiger Ansätze statt. Für die Farbreaktion wurden 200 µl der Kalibrierlösungen sowie der Probenlösungen mit jeweils 2,0 ml Arbeitslösung (L1) vermischt und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde unter Schütteln 200 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz (L2) hinzugegeben und abermals bei gleichen Bedingungen für 30 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnten alle Ansätze, also die Proben der Eichgeraden und die Proben mit unbekanntem Inhalt mit einem UV/Vis-Spektrometer (G36) bei einer Wellenlänge von 500 nm vermessen werden. Durch die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes lieferte die Auftragung der Absorption der Proben mit bekanntem Inhalt gegen ihre Proteinkonzentration eine Eichgerade. Mit der

Geradengleichung der Eichgeraden und der für die Homogenatproben gemessenen Absorption konnte deren unbekannte Konzentration rechnerisch bestimmt werden.

3.3 Radioligand-Bindungsstudien

3.3.1 Theoretische Grundlagen der Rezeptor-Ligand-Bindung

In dieser Arbeit wurden radioaktiv markierte Testsonden für die Untersuchung der Interaktion zwischen neuartigen Hybridliganden und dem M2-Rezeptor genutzt. Der Austausch eines Atoms gegen ein radioaktives Atom zum Erhalt einer Testsonde, verändert nicht die biochemischen Eigenschaften jenes Moleküls, wodurch sich dieses verhält wie sein nicht radioaktiv markiertes Gegenstück (Schrage et al. 2014). Eingesetzte Testsonden waren hier der tritiierte inverse Agonist N-Methyl-Scopolamin ($[^3\text{H}]\text{NMS}$) und der tritiierte M₂ Superagonist Iperoxo ($[^3\text{H}]\text{Iperoxo}$, beide siehe Kapitel 2.1.1). Durch geeignete Filtrationsverfahren lässt sich der gebundene Anteil von Liganden an Rezeptoren isolieren und mit Hilfe von Szintillationsdetektoren quantifizieren. Die Interaktion des freien Liganden L mit dem freien Rezeptor R zum Rezeptor-Ligand-Komplex RL folgt, sofern die Gesamtzahl der Rezeptoren endlich ist (d.h. es gilt: $[\text{R}]_{\text{total}} (\text{B}_{\text{max}}) = [\text{RL}] + [\text{R}] = \text{konstant}$), dem Massenwirkungsgesetz:



[R]: freier Rezeptor

[L]: freier Ligand

[RL]: Rezeptor-Ligand-Komplex

k_{+1} : Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

k_{-1} : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Die Geschwindigkeit der Assoziation v_{Ass} und die der Dissoziation v_{Diss} lässt sich wie folgt berechnen:

$$v_{\text{Ass}} = k_{+1} \cdot [\text{R}] \cdot [\text{L}] \quad \text{Gleichung 2}$$

$$v_{\text{Diss}} = k_{-1} \cdot [\text{RL}] \quad \text{Gleichung 3}$$

Sobald das System aus Rezeptor [R], Ligand [L] und Rezeptor-Ligand-Komplex [RL] im Gleichgewicht ist, nehmen v_{Ass} und v_{Diss} gleiche Werte an. Es gilt:

$$v_{\text{Ass}} = v_{\text{Diss}} = k_{+1} \cdot [\text{R}] \cdot [\text{L}] = k_{-1} \cdot [\text{RL}] \quad \text{Gleichung 4}$$

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D ist definiert als der Quotient aus der Dissoziationsgeschwindigkeit k_{-1} und der Assoziationsgeschwindigkeit k_{+1} . Ihr reziproker Wert liefert die Gleichgewichtsassoziationskonstante K_A :

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[\text{R}] \cdot [\text{L}]}{[\text{RL}]} = \frac{1}{K_A} \quad \text{Gleichung 5}$$

Sobald sich die Hälfte aller möglichen Rezeptor-Ligand-Komplexe gebildet hat gilt:

$$K_D = \frac{[R]_{total}}{2} = [L] \quad \text{Gleichung 6}$$

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D entspricht demnach der Ligand-Konzentration $[L]$, bei der die Hälfte aller Rezeptoren an Liganden gebunden $[RL]$ vorliegt und ergibt sich aus dem Quotienten der Assoziationsgeschwindigkeit k_{+1} und der Dissoziationsgeschwindigkeit k_{-1} . Daraus folgt, dass je kleiner der K_D -Wert (mol/l) ist, desto höher ist die Affinität K_A des Liganden zum untersuchten Rezeptor.

3.3.1.1 Szintillationsverfahren

Die Energie ionisierender Strahlung kann mit Hilfe von Szintillationsdetektoren gemessen werden. Für diese Arbeit wurden Flüssig- und Feststoffsintillationsverfahren genutzt, um Radioaktivität quantitativ zu bestimmen. Bei den verwendeten Isotopen handelte es sich um Tritium [^3H] und das radioaktive Isotop [^{35}S] des Schwefels. Beide werden als β -Strahler klassifiziert und emittieren demnach Elektronenstrahlung mit geringer Energie, die von Materie stark absorbiert wird. Charakteristisch ist bei den Betastrahlern ein Überschuß an Neutronen, wodurch ihre Atomkerne ein ungünstiges Verhältnis aus Protonen und Neutronen aufweisen. Dies führt zur Instabilität der Kerne und diese zerfallen unter Umwandlung eines Neutrons in ein Proton, wobei ein Elektron und ein Antineutrino ausgesendet werden. Der Kern geht dadurch in einen stabileren Zustand über. Die ausgesendeten Elektronen regen bei der Feststoffsintillation die Szintillatorsubstanz direkt an, wohingegen beim Flüssigkeitssintillationsverfahren zunächst organische Lösungsmittelmoleküle entlang der Bahn des emittierten Teilchens angeregt werden und dann ihre Energie auf den Szintillator übertragen. Die Hüllenelektronen der Szintillatorsubstanzen gehen in einen angeregten Zustand über und emittieren Fluoreszenzlicht, wenn sie in den Grundzustand zurück fallen. Mittels einer Koinzidenzschaltung und eines Photomultipliers werden die emittierten Photonen dann in elektrische Impulse und damit in zählbare Ereignisse umgewandelt. Die

Frequenz der Impulse ist demnach proportional zur Zahl freigesetzter Elektronen des primären Strahlungsteilchens.

3.3.2 Homologe Konkurrenzexperimente

Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der hergestellten Membranhomogenate wurden homologe Konkurrenzexperimente durchgeführt. Mit diesen war es möglich die Affinität des tritiierten orthosterischen Antagonisten [³H]NMS und des tritiierten orthosterischen Agonisten [³H]Iperoxo für den im Homogenat enthaltenen M2-Rezeptor in Form seines K_D -Wertes zu bestimmen. Außerdem konnte die maximale Anzahl der Rezeptorbindungsstellen B_{max} (synonym mit $[R]_{total}$, vergl. 3.3.1) ermittelt werden. In dieser Art von Experiment konkurrierte [³H]NMS bzw. [³H]Iperoxo mit dem strukturidentischen, nicht markierten Liganden NMS bzw. Iperoxo (Strukturformeln siehe Kapitel 2.1.2 und 2.1.3) um die orthosterische Bindungsstelle des M2-Rezeptors. Die Konzentration des Radioliganden blieb konstant, die des Kompetitors wurde stufenweise erhöht. Mit steigender Konzentration des Kompetitors wurden mehr Rezeptoren von diesem, statt von dem Radioliganden besetzt, wodurch das gemessene radioaktive Signal folglich abnahm. Durch Auftragung des radioaktiven Signals gegen die logarithmische Konzentration des Kompetitors wurde eine Kurve mit sigmoidalem Verlauf erhalten.

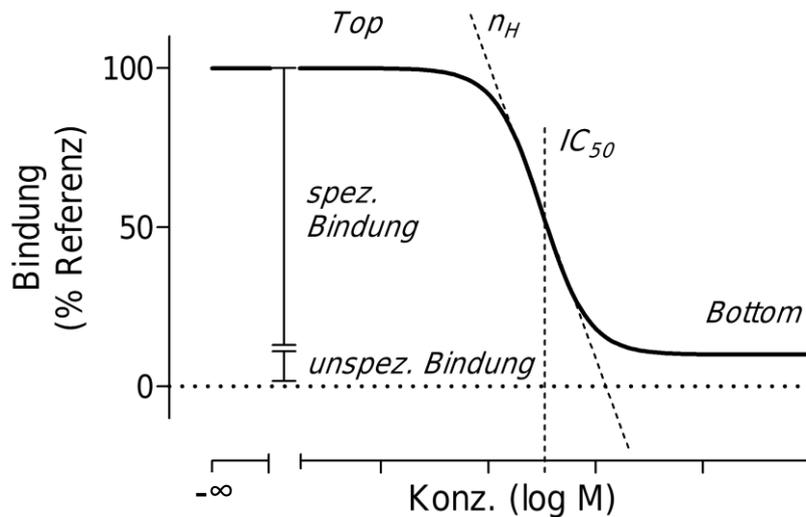


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Konkurrenzexperimentes

Ordinate: Bindung des Radioliganden in Prozent einer Referenzsubstanz. **Abszisse:** Molare Konzentration des Kompetitors in logarithmischer Auftragung. **Top** (oberes Kurvenplateau) entspricht der Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit des Kompetitors. **Bottom** (unteres Kurvenplateau) entspricht der **unspezifischen Bindung** des Radioliganden in Anwesenheit eines Kompetitors, der alle orthosterischen Bindungsstellen besetzt. Die **spezifische Bindung** ergibt sich aus dem Top (oberes Kurvenplateau) abzüglich der unspezifischen Bindung. Der **IC_{50} -Wert** entspricht der Konzentration des Kompetitors, bei der die Hälfte aller verfügbaren Bindungsstellen durch diesen besetzt ist; aus ihm kann seine Affinität errechnet werden (vgl. Kapitel 4.1). Der **Hill-Koeffizient n_H** gibt die Kurvensteilheit an. Weicht dieser Wert nicht signifikant von 1 bzw. -1 ab, so lässt sich auf eine bimolekulare Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor schließen (Verhältnis 1:1), die dem Massewirkungsgesetz folgt und an einer homogenen Klasse von Rezeptoren stattfindet.

Eine solche Kurve eines Bindungsexperimentes aber auch Kurven von funktionellen Untersuchungen (vgl. Kapitel 3.4) lassen sich mit der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ (Barlow und Blake 1989) auswerten.

$$B = Bottom + \frac{Top - Bottom}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{10[X]}\right)^{n_H}}$$

Gleichung 7

B:	Gesamtbindung des Radioliganden
Bottom:	Unteres Kurvenplateau
Top:	Oberes Kurvenplateau
IC ₅₀ :	Konzentration des Kompetitors, bei der die Hälfte der maximal verfügbaren Bindungsstellen durch diesen besetzt sind
[X]:	Konzentration des Kompetitors
n _H :	Hill-Koeffizient, Kurvensteilheit

Das obere Kurvenplateau (Top) entspricht der Gesamtbindung des Radioliganden, die in Abwesenheit eines Inhibitors gemessen wird. Das untere Kurvenplateau (Bottom) entspricht der unspezifischen Bindung des Radioliganden in Anwesenheit eines Kompetitors in einer ausreichend hohen Konzentration (z.B. Atropin, 1000 x K_{D,Atropin}, d.h. 1 µM), sodass dieser „kalte“ Ligand alle orthosterischen Bindungsstellen des Rezeptors besetzt. Demnach handelt es sich um unspezifische Bindungsvorgänge des radioaktiven Liganden an nicht charakterisierte Bindungsstellen des Rezeptorproteins, andere zelluläre Bestandteile oder an das Filtermaterial. Die spezifische Bindung ergibt sich aus dem oberen Kurvenplateau abzüglich der unspezifischen Bindung. Der IC₅₀-Wert entspricht dem Wendepunkt der Kurve und ist die Konzentration des Inhibitors, bei der die Hälfte aller verfügbaren Bindungsstellen durch diesen besetzt ist. Dieser Wert wird als Maß für die Affinität des Inhibitors zum Rezeptor herangezogen. Der sogenannte Hill-Koeffizient n_H gibt die Kurvensteilheit an. Weicht dieser Wert nicht signifikant von 1 bzw. -1 ab, so lässt sich auf eine bimolekulare Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor schließen (Verhältnis 1:1). Außerdem kann hierdurch von einem homogenen Rezeptorkollektiv ausgegangen werden. Unter diesen Voraussetzungen kann der Inhibitor als Kompetitor gelten. Wurden die Messwerte unter Gleichgewichtsbedingungen erhoben, so gilt nach der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973):

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

Gleichung 8

- K_I: Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Inhibitorbindung
 IC₅₀: Wendepunkt der sigmoidalen Inhibitionskurve
 [L]: Konzentration des Radioliganden
 K_D: Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Radioliganden

Da in diesem speziellen Fall des homologen Wettbewerbsexperimentes der Radioligand und der Inhibitor die gleiche chemische Struktur aufweisen, nehmen die Parameter K_I und K_D identische Werte an. Dies rührt daher, dass die Tritiiierung des Liganden dessen physikochemische Eigenschaften nicht beeinflusst und damit der Radioligand und der Inhibitor gleiche Bindungseigenschaften aufweisen. Hierdurch kann die Gleichung wie folgt vereinfacht werden:

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

Gleichung 9

Die maximale Anzahl an Bindungsstellen für einen gegebenen Liganden in einem System wird als B_{max} (synonym mit [R]_{total}) bezeichnet. Bei diesem System handelt es sich, in der vorliegenden Arbeit, um Membranhomogenate. Die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor ist also sättigbar und B_{max} lässt sich auch berechnen. Hierzu wird Gleichung 9 unter Einbeziehung der spezifischen Bindung des Radioliganden (entspricht der Differenz Top – Bottom der Bindungskurve, vgl. Gleichung 7) umgeformt. Daraus ergibt sich nach DeBlasi et al. 1989 folgende Gleichung:

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

B_{max} : maximale Anzahl der Bindungsstellen für den Liganden

B_0 : spezifische Bindung des Liganden in Abwesenheit des Kompetitors

Für die Anwendung dieser Analyse müssen neben dem schon erwähnten Reaktionsgleichgewicht, einer bimolekularen Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor und dem homogenen Rezeptorkollektiv auch noch einige weitere Voraussetzungen erfüllt sein. Die Bindung zwischen Ligand und Rezeptor darf nicht irreversibel sein und um die Endkonzentration des Radioliganden mit der eingesetzten Konzentration gleichsetzen zu können, dürfen maximal 10% des Radioliganden an Rezeptoren gebunden vorliegen. Der Parameter B_{max} wird dann in fmol/ml angegeben und repräsentiert damit die Anzahl der Bindungsstellen pro Volumeneinheit. Bei bekannter Proteinkonzentration des Membranhomogenates lässt sich auch die Anzahl der Bindungsstellen pro Masseinheit in fmol/mg angeben. Für jedes neu hergestellte Membranhomogenat wurden die Parameter K_D und B_{max} bestimmt.

3.3.2.1 Durchführung homologer Konkurrenzexperimente

Für die homologen Konkurrenzexperimente wurde entweder tritiiertes N-Methyl-Scopolamin ($[^3H]NMS$) in einer Konzentration von 0,2 nM oder tritiiertes Iperoxo ($[^3H]Iperoxo$) in einer Konzentration von 0,07 nM eingesetzt (Strukturformeln Kapitel 2.1.1). Die Radioliganden konkurrierten mit ihren nicht radioaktiv markierten Formen (NMS bzw. Iperoxo, vgl. Kapitel 2.1.2 und 2.1.3) um dieselbe Bindungsstelle im Rezeptorprotein. Zur Bestimmung der Gesamtbindung des jeweiligen Radioliganden wurde diese in Abwesenheit von nicht markiertem NMS bzw. Iperoxo gemessen, sodass alle spezifischen Bindungsstellen der Rezeptorproteine verfügbar waren. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart einer hohen Konzentration von Atropin (10 μM) gemessen, wodurch alle spezifischen Rezeptorbindungsstellen besetzt waren und damit nur noch unspezifische Bindungsstellen zur Verfügung standen. Als

Inkubationsmedium wurde HEPES-Puffer (L5) verwendet. Auch das verwendete Membranhomogenat wurde mit HEPES-Puffer soweit verdünnt, dass eine Endkonzentration von 15 µg/ml im Ansatz resultierte. Mit dieser Proteinkonzentration konnte ein ausreichend hohes Messsignal zwischen 200 und 800 cpm/500µl erzielt werden. Die einzelnen Komponenten des Versuchsansatzes wurden, wie in nachstehender Tabelle aufgelistet, in die Kavitäten einer Mikrotiterplatte (V21) einpipettiert. Durch abschließende Zugabe des Membranhomogenates wurde der Versuch gestartet.

Komponente [µl]	Gesamtbindung	Unspezifische Bindung	Homologe Konkurrenz	Eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
[³ H]NMS bzw. [³ H]Iperoxo in Wasser	50	50	50	2 nM bzw. 0,7 nM	0,2 nM bzw. 0,07 nM
Wasser	50	-	-		
Atropin in Wasser	-	50	-	100 µM	10 µM
NMS bzw. Iperoxo Verdünnungen in Wasser	-	-	50	$x \cdot 10^{-y}$	$x \cdot 10^{-(y+1)}$
Membran in HEPES-Puffer	100	100	100	75 µg/ml	15 µg/ml
HEPES-Puffer	300	300	300	6,25 mM	5 mM
Gesamtvolumen	500	500	500	-	-

Tabelle 2: Pipettierschema für homologe Konkurrenzexperimente Alle Volumina sind in µl angegeben. [³H]NMS, [³H]Iperoxo, NMS, Iperoxo und Atropin wurden in Aqua pro analysi (R2) gelöst. Das Membranhomogenat wurde mit HEPES-Puffer (L5) auf die angegebene Konzentration verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei 30°C für zwei Stunden im Schüttelwasserbad (G19).

Nach dem Einpipettieren aller Komponenten in die Mikrotiterplatte (V21) wurde diese mit Parafilm (V11) verschlossen und der Inhalt mit Hilfe eines Rotationsmischers (G24) aller Kavitäten homogen vermengt. Die anschließende zweistündige Inkubation erfolgte in einem Schüttelwasserbad (G19) bei einer Temperatur von 30 °C. Während dieser Zeit konnte sich in den Versuchsansätzen ein Gleichgewicht einstellen, da

Gleichgewichtsbedingungen nach fünf Dissoziationshalbwertszeiten des Radioliganden erreicht werden können, sofern der Inhibitor nicht allosterisch dissoziationsverzögernde Wirkung (vergl. Kapitel 3.3.4.2) besitzt. Kurz vor der Filtration wurde die Glasfaserfiltermatte (V14) in eiskalter PEI-Lösung 0,1 % (L14) eingelegt, da Polyethylenimin (PEI) die unspezifische Bindung reduziert. Dann wurde die Filtermatte (V14) in der halbautomatischen Vakuum-Filtrationsanlage Harvester 96® Tomtec (G17) platziert und nach Ablauf der zweistündigen Inkubationszeit wurden alle Proben in den Kavitäten der Mikrotiterplatte (V21) zeitgleich filtriert. Die Filtration stoppt die Reaktion und sorgt für eine Trennung von membrangebundenem und freiem Radioliganden. Anschließend wurden die Filter noch zwei Mal mit 500 µl eiskaltem Aqua dest. (R1) gespült, um die unspezifische Bindung zu minimieren. Der biomembrangebundene Radioligand befand sich nun in der Filtermatte (V14) und konnte detektiert werden. Hierzu wurde die Filtermatte (V14) bei 400 Watt in einer Mikrowelle (G21) getrocknet und dann eine Platte aus Szintillationswachs (V8) mit dem Heizblock (G8) auf ihr geschmolzen, sodass das Wachs einsintern konnte. Nach dem Erkalten, wurde die Einheit aus Filtermatte und Wachs mit einer Klarsichthülle (V16) umschlossen und in eine Filtermattenkassette (G9) eingebracht. Das Wachs dient hier zur Detektion der in der Filtermatte retinierten Radioaktivität mittels eines Szintillationsmessgerätes (Microbeta® Trilux 1450, G40).

Die Auswertung der so gewonnenen Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism® (P4) unter Verwendung der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ (Gleichung 7). Mit den erhaltenen EC₅₀-Werten konnten nun die Parameter K_D und B_{max} durch Anwendung von Gleichung 9 bzw. Gleichung 10 errechnet werden. Sofern der Hill-Koeffizient n_H der erhaltenen sigmoidalen Kurve nicht signifikant von n_H = -1 abwich (F-Test, P > 0,05, vgl. Kapitel 3.6.2.2), wurden die Werte anhand der mit n_H=1 festgesetzten Kurve berechnet. Alle angegebenen K_D- und B_{max}-Werte wurden errechnet als Mittelwert mit Standardfehler (siehe Kapitel 3.6.1) der Parameter aus drei voneinander unabhängigen Experimenten mit zwei verschiedenen Verdünnungsreihen. Alle Experimente wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.3.3 Heterologe Konkurrenzexperimente

Wenn es sich beim eingesetzten Inhibitor des Radioliganden nicht um ein strukturgleiches Molekül handelt, nennt man die Art von Gleichgewichtsbindungsversuch ein heterologes Inhibitionsexperiment. Die Gleichung von Cheng und Prusoff (1973) (vgl. Gleichung 8) kann auch in diesem Fall Anwendung finden, sie erlaubt die Bestimmung von K_i . Wichtig ist es hierbei, den Bindungsmodus der Testsubstanz zu beachten, sofern dieser bekannt ist. Es ist möglich, dass die Testsubstanz genau wie die Radioliganden [^3H]NMS und [^3H]Iperoxo (Strukturformeln siehe Kapitel 2.1.1) am orthosterischen Haftareal des Rezeptorproteins binden. Es ist aber auch denkbar, dass eine allosterische Bindung stattfindet. Des Weiteren könnten Hybridsubstanzen, zu denen die in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen zählen, auch einen dualsterischen Bindungsmodus einnehmen. Hierbei bindet das Molekül sowohl orthosterisch als auch allosterisch. Jede dieser beiden Bindungsarten beeinflusst das Bindungsverhalten des konkurrierenden Radioliganden und ergibt demnach unterschiedliche Bindungskurven. Konkurrieren beide Liganden um die gleiche Bindungsstelle, so spricht man von kompetitiver Interaktion. Da in dieser Arbeit Hybridsubstanzen untersucht wurden, die aus zwei bekanntermaßen orthosterisch bindenden Bausteinen bestehen, ist die kompetitive Interaktion hier von größter Bedeutung.

3.3.3.1 Heterologe Konkurrenzexperimente mit dem antagonistischen Radioliganden [^3H]NMS und orthosterischen Konkurrenten

Werden einer fixen Konzentration an Radioligand steigende Konzentrationen eines orthosterischen Konkurrenten zugegeben, so verringert sich die Bindung des Radioliganden an den Rezeptor und es bindet vermehrt nicht-radioaktiver Konkurrent. Folglich nimmt auch die messbare Radioaktivität mit steigender Konkurrent-Konzentration ab. Wird, wie in dieser Arbeit, das [^3H]NMS (Strukturformel siehe Kapitel 2.1.1) als Radioligand verwendet, so markiert dieser sowohl G-Protein gekoppelte als auch nicht G-Protein gekoppelte Rezeptorproteine. Dies wird in der Literatur meist als sogenannten hochaffinen bzw. niedrigaffinen Rezeptorzustand beschrieben (Christopoulos und El-Fakahany 1999; Schrage et al. 2013). Ein Antagonist als Konkurrent bindet an beide Rezeptorzustände mit gleicher Affinität (Kent et al. 1980;

Lean et al. 1980) und es wird eine monophasische Bindungskurve erhalten. Hingegen bindet ein Agonist mit höherer Affinität an den hochaffinen Bindungszustand und mit geringerer Affinität an den niedrigaffinen Rezeptorzustand (Hulme et al. 1990b). Er deckt also das heterogene Rezeptorkollektiv auf, das sich in einem Hill-Koeffizienten, der erhaltenen Gleichgewichtsinhibitionskurve, von $n_H < 1$ niederschlägt. Die Kurven sind dementsprechend flacher. Eine derart flache Inhibitionskurve kann unter Anwendung eines Modells mit zwei kompetitiv interagierenden Bindungsstellen eine biphasische Regressionskurve mit zwei Wendepunkten ergeben.

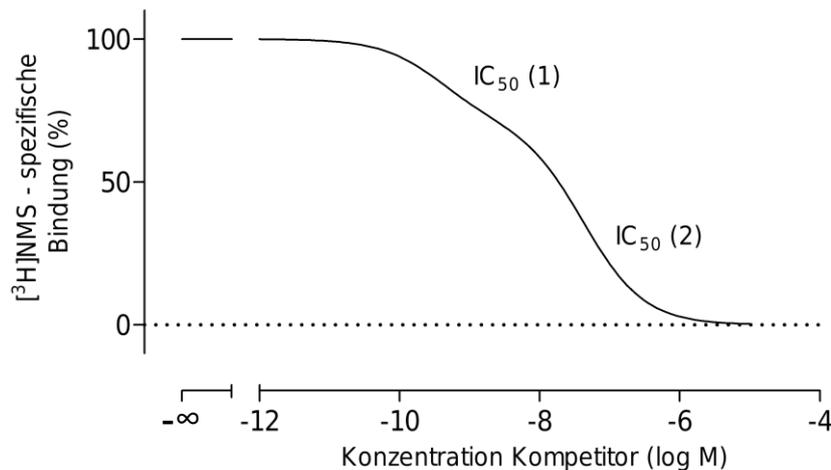


Abbildung 3: Schematische Darstellung einer biphasischen Gleichgewichtsbindungskurve Ordinate: Spezifische Bindung des Radioliganden in Prozent. Abszisse: Eingesetzte Konzentration des agonistischen Kompetitors als dekadischer Logarithmus seiner molaren Konzentration. $IC_{50} (1)$ zeigt die Affinität für die Kapazität des hochaffinen Rezeptorzustandes. $IC_{50} (2)$ zeigt die Affinität für die Kapazität des niedrigaffinen Rezeptorzustandes der Bindungskurve.

Der erste Wendepunkt liegt bei einer geringeren Konzentration des agonistischen Kompetitors und erlaubt rechnerischen Zugang zur Affinität der Verbindung zum hochaffinen Rezeptorzustandes. Der zweite Wendepunkt liegt weiter rechts, bei einer höheren Konzentration des Kompetitors, und beschreibt die Affinität des niedrigaffinen Rezeptorzustandes. Zur Auswertung biphasischer Kurven mit Hilfe eines Modells für zwei unabhängige kompetitive Bindungsstellen (two site competitive binding model) wurde folgende Gleichung verwendet:

$$[B] = \text{bottom} + \left(\text{Span} \cdot \frac{F1}{1 + 10^{[x] - \log IC_{50}(1)}} \right) + \left(\text{Span} \cdot \frac{1 - F1}{1 + 10^{[x] - \log IC_{50}(2)}} \right) \quad \text{Gleichung 11}$$

- B: Bindung Radioligand
 Span: bottom + top
 F1: Fraktion 1 (Anteil der hochaffinen Fraktion an der Gesamtbindung)
 IC₅₀ (1): Wendepunkt der hochaffinen Bindung
 IC₅₀ (2): Wendepunkt der niedrigaffinen Bindung

Mit Hilfe von Gleichung 8 (Cheng und Prusoff 1973) wurden anschließend die für beide Kapazitäten erhaltenen IC₅₀-Werte in K_i-Werte umgerechnet. Diese sind unabhängig von der Konzentration und Affinität des Radioliganden und lassen dadurch Vergleiche mit Literaturwerten oder Werten aus anderen Quellen zu. Um zu prüfen, ob sich der Kurvenverlauf besser durch ein monophasisches oder ein biphasisches Modell beschreiben lässt, wurde der F-Test (siehe Kapitel 3.6.2.2) verwendet.

3.3.3.2 Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente mit dem agonistischen Radioliganden [³H]lperoxo und putativ orthosterischen Testverbindungen

Auch bei Verwendung eines agonistisch wirkenden Radioliganden, wie dem in dieser Arbeit genutzte [³H]lperoxo (Strukturformel siehe Kapitel 2.1.1), werden in Gleichgewichtsbindungsexperimenten einer fixen Konzentration an Radioligand steigende Konzentrationen einer Testsubstanz zugesetzt. [³H]lperoxo bindet, genau wie [³H]NMS (Strukturformel siehe Kapitel 2.1.1), an die orthosterische Bindungsstelle des M2-Rezeptors. Der Unterschied zwischen den beiden Radioliganden besteht jedoch darin, dass es sich bei [³H]NMS um einen Antagonisten handelt und bei [³H]lperoxo um einen Agonisten. Als agonistisch wirkender Ligand markiert [³H]lperoxo den hochaffinen Bindungszustand, also den G-Protein gekoppelten Rezeptor. Als Konsequenz werden in homologen Kompetitionen mit [³H]lperoxo Bindungskurven

erhalten, die monophasisch sind und mit ihrem einzelnen Wendepunkt nur die hochaffine Bindung zeigen.

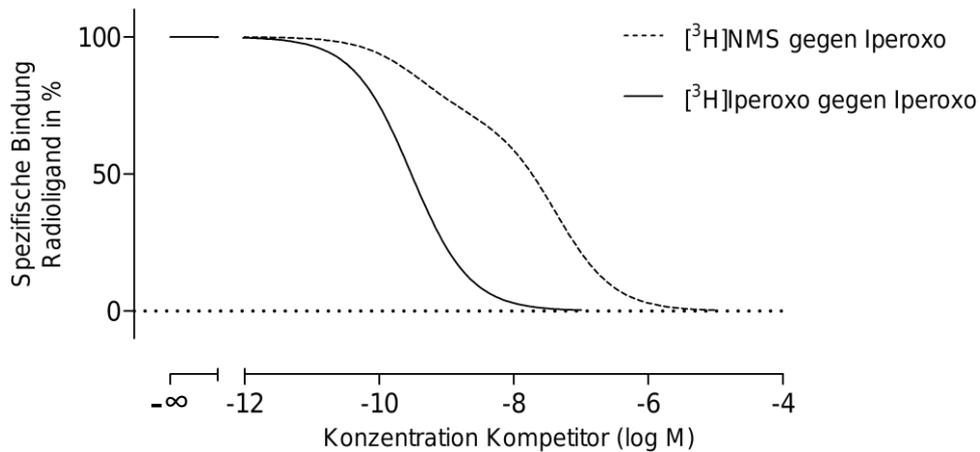


Abbildung 4: Gegenüberstellung simulierter Gleichgewichtsbindungskurven für die Interaktion von Iperoxo mit $[^3\text{H}]$ NMS sowie $[^3\text{H}]$ Iperoxo Ordinate: Spezifische Bindung des Radioliganden in Prozent des Wertes in Abwesenheit von Iperoxo. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Iperoxo-Konzentration. Die gestrichelte Kurve (---) zeigt den mit Hilfe von Gleichung 12 simulierten biphasischen Verlauf eines Bindungsexperimentes von $[^3\text{H}]$ NMS gegen Iperoxo ($\text{IC}_{50,1} = 9,4$, $\text{IC}_{50,2} = 7,3$). Die durchgehende Kurve (—) veranschaulicht den monophasischen Verlauf eines Konkurrenzexperimentes zwischen Iperoxo und $[^3\text{H}]$ Iperoxo mittels Gleichung 7 ($\text{IC}_{50} = 9,5$). Der Wendepunkt der monophasischen Kurve (—) ist nicht signifikant verschieden von dem der hochaffinen Bindung der biphasischen Kurve (---).

Im Gegensatz zu den besprochenen Vollagonisten zeigen partialagonistisch wirksame Verbindungen sowohl im Inhibitionsbindungsexperiment gegen einen Radioantagonisten als auch gegen einen Radioagonisten monophasische Kurven. Dies ist so zu erklären, dass die Affinität von Partialagonisten zu G-Protein-freien und an G-Protein gebundene Rezeptoren sehr ähnlich ist (Tota und Schimerlik 1990). Detektierbar ist hingegen trotzdem eine Zunahme der Affinität von Partialagonisten in Gleichgewichtsbindungsexperimenten mit $[^3\text{H}]$ Iperoxo im Vergleich zu $[^3\text{H}]$ NMS Bindungsexperimenten (Schrage et al. 2014).

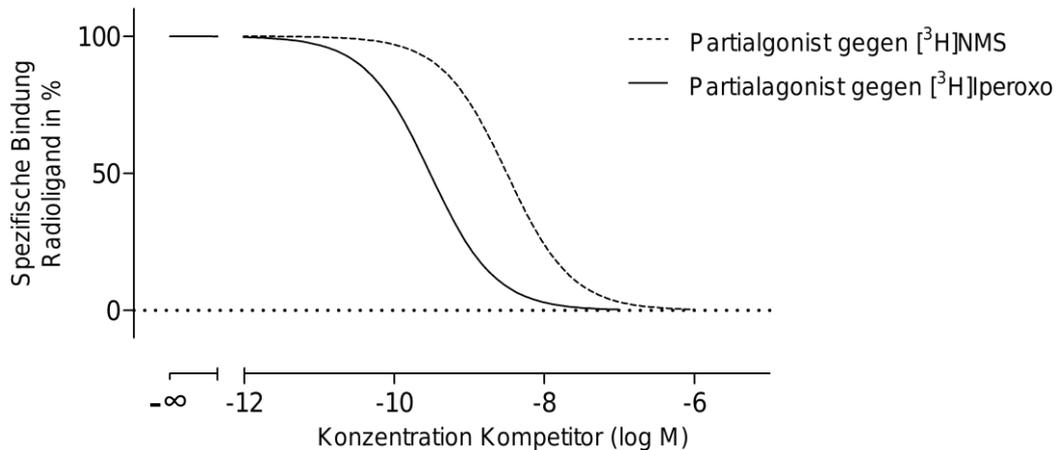


Abbildung 5: Gegenüberstellung simulierter Gleichgewichtsbindungskurven für die Interaktion eines Partialagonisten mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ sowie $[^3\text{H}]\text{lperoxo}$ Ordinate: Spezifische Bindung des Radioliganden in Prozent des Wertes in Abwesenheit des Partialagonisten. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Partialagonisten. Die gestrichelte Kurve (---) zeigt den mit Hilfe von Gleichung 7 simulierten monophasischen Verlauf eines Bindungsexperimentes von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ gegen einen Partialagonisten. Die durchgehende Kurve (—) simuliert den monophasischen Verlauf eines Wettbewerbsexperimentes zwischen $[^3\text{H}]\text{lperoxo}$ und einem Partialagonisten. Der Wendepunkt (IC_{50}) der durchgehenden Kurve (—) ist gegenüber dem Wendepunkt (IC_{50}) der gestrichelten Kurve (---) nach links verschoben und repräsentiert eine höhere Affinität des partialagonistischen Kompetitors in Gegenwart von $[^3\text{H}]\text{lperoxo}$.

Demnach ist es mit diesem Verfahren möglich, Vollagonisten von Antagonisten zu unterscheiden und Hinweise auf Partialagonismus im Bindungsexperiment zu erhalten. Diese Unterscheidung wurde bislang nur durch Anwendung funktioneller Experimente realisiert (Schrage et al. 2014). Da im Rahmen dieser Arbeit Hybridsubstanzen aus einem agonistischen und einem antagonistischen Teil untersucht wurden, bietet die vorgestellte Methode jedoch eine zusätzliche Möglichkeit, potentiellen Partialagonismus unter den Versuchsverbindungen zu eruieren.

3.3.3.3 Durchführung heterologer Wettbewerbsexperimente

Der Versuchsaufbau, die Durchführung und die Auswertung der Ergebnisse erfolgte analog zu dem in Kapitel 3.3.2.1 beschriebenen Protokoll für die homologen Wettbewerbsexperimente.

3.3.4 Kinetische Untersuchungen der Radioliganddissoziation

Kinetische Experimente zur Untersuchung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Radioantagonisten [^3H]NMS von M_2 -Rezeptoren wurden zu dem Zweck durchgeführt, den Einfluss von Testverbindungen auf diese zu untersuchen. Sie stellen eine wichtige Methode dar, um eine mögliche allosterische Interaktion einer Testsubstanz mit dem Rezeptorprotein aufzudecken und zu quantifizieren, da eine allosterisch bindende Testverbindungen die Dissoziation des orthosterischen Radioliganden verzögert (Stockton et al. 1983; Lazareno und Birdsall 1995; Kostenis und Mohr 1996; Christopoulos und Kenakin 2002). Wird die Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der [^3H]NMS Dissoziation gegen die log Konzentration der Testsubstanz aufgetragen, gibt der Parameter $\text{EC}_{0,5 \text{ diss}}$ die Konzentration des Allostere an, welche die Dissoziation des Radioliganden vom Rezeptor um die Hälfte reduziert. Im Gegensatz zu den Konkurrenzexperimenten, die in Kapitel 3.3.2 und 3.3.3 beschrieben wurden, finden Dissoziationskinetiken unter Ungleichgewichtsbedingungen statt.

Der allgemeine Versuchsablauf gestaltete sich so, dass das Membranhomogenat der M_2 -Rezeptoren mit einer hohen Konzentration des Radioliganden vorinkubiert wurde. Dadurch wurden alle orthosterischen Bindungsstellen der Rezeptoren besetzt. Durch zeitgleiche Zugabe eines Überschusses Atropin (100 μM) mit der Testsubstanz zum Versuchsansatz, wurde das Experiment gestartet. Wenn ein Radioligand-Molekül von der orthosterischen Bindungsstelle eines Rezeptors dissoziiert, wird – durch den zugesetzten Überschuss an Atropin – seine orthosterische Reassoziations durch ein Atropin-Molekül verhindert. Über den Verlauf der Zeit dissoziieren immer mehr Radioligand-Moleküle vom Rezeptor und werden auf diese Weise durch nicht-radioaktiv markiertes Atropin ersetzt. Wird die gebundene Radioaktivität zu mehreren Zeitpunkten nach Starten des Experimentes gemessen, nimmt diese exponentiell ab. Wenn der Radioligand ungehindert dissoziieren kann, nimmt die rezeptor- gebundene spezifische Radioaktivität über den Verlauf der Zeit schneller ab. Wird seine Dissoziation hingegen durch eine allosterisch bindende Versuchssubstanz verzögert, so nimmt die gebundene Radioaktivität verzögert ab.

Da es sich bei der Bestimmung vollständiger Dissoziationskinetiken um sehr zeitaufwendige Experimente handelt, wurde eine vereinfachte Methode entwickelt, die sogenannte „2-Punkt-Kinetik“ (Kostenis und Mohr 1996). Hierbei werden zu lediglich zwei verschiedenen Zeitpunkten Messwerte der gebundenen Radioaktivität erhoben.

Dies erlaubt mehrere, meist steigende Konzentrationen der Testsubstanz einzusetzen. Zur Bestimmung der Radioligand-Bindung zum Zeitpunkt 0 min, der Gesamtbindung, wird ein Ansatz ohne Atropin und ohne Testsubstanz für 30 min vorinkubiert. Der zweite Messpunkt wird nach 1,5 Halbwertszeiten der Radioliganddissoziation unter Kontrollbedingungen (d.h. unter alleiniger Zugabe von Atropin) erhoben. Aufgrund der exponentiellen Abnahme der gebundenen Radioaktivität können die beiden Messpunkte mit folgender Gleichung zum einphasischen und exponentiellen Zerfall zu einer kompletten Dissoziationskurve extrapoliert werden:

$$[RL]_t = [RL]_0 \cdot e^{k_{-1} \cdot t} \quad \text{Gleichung 12}$$

- [RL]_t: Komplex aus Radioligand und Rezeptor zum Zeitpunkt t
- [RL]₀: Komplex aus Radioligand und Rezeptor zum Zeitpunkt 0
- k₋₁: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
- t: beliebiger Zeitpunkt nach dem Zeitpunkt t=0

Die Halbwertszeit t_{1/2} der Radioliganddissoziation lässt sich unter Einbeziehung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k₋₁ berechnen:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{-1}} \quad \text{Gleichung 13}$$

$$k_{-1} = \frac{\ln 2}{t_{1/2}} \quad \text{Gleichung 14}$$

t_{1/2}: Halbwertszeit

Die Werte für die Halbwertszeit der Radioliganddissoziation in Abwesenheit und Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der Testsubstanz und die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante wurden mit der Software GraphPad Prism® (P4) berechnet. Da eine Testsubstanz, die allosterisch bindet, die Dissoziationskinetik des orthosterischen Radioliganden beeinflussen kann und im Fall der vorliegenden Arbeit verlangsamt, nimmt die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante bei steigenden Konzentrationen der Testsubstanz kleinere Werte an. Alle k_{-1} -Werte wurden auf die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Abwesenheit einer Testsubstanz bezogen. Die Prozentwerte aus dieser Normierung wurden dann gegen die logarithmierten Konzentrationen der Testsubstanz aufgetragen. Aus der sigmoidalen Kurve ließ sich anschließend mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ der $EC_{0,5\text{ diss}}$ -Wert aus dem Wendepunkt bestimmen. Dieser Wert gilt als Maß für die Affinität einer Verbindung zu dem durch ein Radioorthoster besetzten Rezeptor und damit zur allosterischen Bindungsstelle.

3.3.4.1 Durchführung von kompletten Dissoziationskinetiken

Dem unten abgebildeten Pipettierschema folgend, wurden in die Kavitäten der Mikrotiterplatte (V21) Aqua dest. (V1) und Atropin im Überschuss pipettiert. In die Kavitäten für die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung, wurden außerdem HEPES-Puffer (L5), Radioligand und Membransuspension gefüllt. Die Mikrotiterplatte (V21) wurde anschließend in ein 30°C warmes Schüttelwasserbad (G19) überführt. Der sogenannte „Mastermix“ wurde in einem separaten Reaktionsgefäß (falcon tube, V5) aus Membransuspension, HEPES-Puffer (L5) und Radioligand im angegebenen Verhältnis angesetzt und ebenfalls im Schüttelwasserbad (G19) bei 30°C für 30 Minuten inkubiert. Hierbei wurde die Komplexbildung aus Radioligand und Rezeptor initiiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten ($t = 0 - 40$ Minuten) wurden 400 μl des „Mastermix“ in die Mikrotiterplatte (V21) überführt, um den Dissoziationsvorgang zu starten. Wie in vorangegangenen Kapiteln beschrieben (vgl. Kapitel 3.3.2) wurde die Reaktionszeit durch Filtration beendet und die Filtermatte (V14) entsprechend behandelt und die auf ihr verbliebene Radioaktivität vermessen. Diese Art der Versuchsdurchführung ist notwendig, da die Mikrotiterplatte (V21) nur als Ganzes abfiltriert werden kann.

Komponente [μ l]	Gesamtbindung Zeitpunkt t = 0	Unspezifische Bindung Zeitpunkt t = 0	Dissoziations- verzögerung Zeitpunkt t	Eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
[3 H]NMS	50	50	50	20 nM	2 nM
Atropin	-	50	50	100 μ M	10 μ M
Aqua dest.	50	-	-	-	-
Membran- homogenat	100	100	100	75 μ g/ml	15 μ g/ml
HEPES-Puffer	300	300	300	12,5 mM	10 mM
Gesamtvolumen	500	500	500	-	-

Tabelle 3: Pipettierschema für eine komplette Dissoziationskinetik [3 H]NMS und Atropin sind in Aqua pro analysi (R2) gelöst. Das Membranhomogenat wurde mit HEPES-Puffer (L5) auf die angegebene Proteinkonzentration verdünnt. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Alle Volumina sind in Mikroliter (μ l) angegeben.

Die Berechnung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten und der Halbwertszeit der Dissoziation des Radioliganden erfolgte unter Verwendung der Gleichungen 14 und 15.

3.3.4.2 Durchführung von „2-Punkt-Kinetiken“

Ob und in welchem Maße die in dieser Arbeit behandelten Testverbindungen eine allosterische Bindung mit dem M₂-Rezeptor eingehen, wurde mittels der Methode der „2-Punkt-Kinetik“ (Kostenis und Mohr 1996) untersucht. Das Pipettierschema hierfür gestaltete sich wie folgt:

Komponente [μl]	Gesamtbindung Zeitpunkt t = 0	Unspezifische Bindung Zeitpunkt t = 0	Dissoziations- verzögerung Zeitpunkt t	Kontrolle Zeitpunkte 0 und t	Eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
Testsubstanz	-	-	50	-	$x \cdot 10^{-y}$	$x \cdot 10^{-(y+1)}$
[³ H]NMS	50	50	50	50	20 nM	2 nM
Atropin	-	50	50	50	100 μM	10 μM
Aqua dest.	100	50	-	50	-	-
Membran- homogenat	100	100	100	100	75 μg/ml	15 μg/ml
HEPES-Puffer	250	250	250	250	12,5 mM	10 mM
Gesamtvolumen	500	500	500	500	-	-

Tabelle 4: Pipettierschema für eine „2-Punkt-Kinetik“ [³H]NMS und Atropin sind in Aqua pro analysi (R2) gelöst. Das Membranhomogenat wurde mit HEPES-Puffer (L5) auf die angegebene Proteinkonzentration verdünnt. Die Inkubationstemperatur betrug 30°C. Alle Volumina sind in Mikroliter (μl) angegeben.

Die Durchführung der „2-Punkt-Kinetiken“ geschieht analog zu jener der kompletten Dissoziationskinetiken (siehe Kapitel 3.3.4.1). Der Unterschied besteht darin, dass das Experiment etwa nach dem 1,5-fachen der Halbwertszeit der Radioliganddissoziation durch die Filtration beendet wird. Für den untersuchten Rezeptor, den Wildtyp des humanen muskarinischen M₂-Rezeptors, wurden die Messungen nach 3 bzw. 4 Minuten erhoben (Chirinda 2015; Krebs 2017). Der Versuchsablauf hielt sich an folgenden Zeitplan.

0 Minuten	Start der Vorinkubation des „Mastermix“ aus Membranhomogenat, HEPES-Puffer und Radioligand. Initiierung der Radioligand-Rezeptor-Bindung. Zugabe in die Kavitäten für die Gesamtbindung.
4 Minuten	Zugabe des Membranhomogenates in die Kavitäten der unspezifischen Bindung.
45 Minuten	Zugabe des „Mastermix“ in die mit Atropin und verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz vorbereiteten Kavitäten, die 4 Minuten später abfiltriert werden (nach 1,5 Halbwertszeiten der Dissoziation des Radioliganden).
46 Minuten	Zugabe des „Mastermix“ in die mit Atropin und verschiedenen Konzentrationen an Testsubstanz vorbereiteten Kavitäten, die 3 Minuten später abfiltriert werden.
49 Minuten	Filtration und damit Beendigung der Reaktion.

Table 5: Zeitplan zur Durchführung von „2-Punkt-Kinetiken“ Start der Vorinkubation durch Zugabe des Membranhomogenates zum „Mastermix“. Der Zeitplan stellt sicher, dass nach 45-minütiger Vorinkubation zuzüglich 1,5 Halbwertszeiten der [³H]NMS Dissoziation, also nach 49 Minuten, alle Versuchsansätze zeitgleich filtriert und damit die Reaktionen beendet werden können.

Wie in vorangegangenen Kapiteln beschrieben (vgl. Kapitel 3.3.2) wurde die Filtermatte (V14) nach der Filtration entsprechend behandelt und vermessen.

3.4 Funktionelle Untersuchungen

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Bindung einer Testsubstanz an den M₂-Rezeptor untersucht. Bindungsdaten machen, spezielle Fälle ausgenommen (vgl. Kapitel 3.4.1), aber keinerlei Aussage darüber, ob eine gebundene Verbindung auch einen Effekt auslöst. Das bedeutet, ob diese Verbindung in der Lage ist den gebundenen Rezeptor zu aktivieren und eine nachgeschaltete Signalkaskade in Gang zu setzen, also nicht nur Affinität, sondern auch intrinsische Aktivität besitzt. Um diese Wissenslücke zu füllen, kamen im Anschluss an die Bindungsuntersuchungen funktionelle Untersuchungen zum Einsatz. Durch verschiedene Messprinzipien ist es möglich, die rezeptorvermittelten Effekte an unterschiedlichen Stellen des Signalweges zu quantifizieren. Einerseits wurde in dieser Arbeit die G-Protein-Rekrutierung des M₂-Rezeptors direkt mittels [³⁵S]GTPγS-Experimenten untersucht, andererseits wurde durch die Messung des sekundären Botenstoffes cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) die Aktivierung einer nachgeschalteten Signalkaskade beleuchtet. Diese beiden Methoden werden in den folgenden Kapiteln theoretisch erläutert und anschließend methodisch beschrieben.

3.4.1 [³⁵S]GTPγS-Experimente

3.4.1.1 Theoretische Grundlagen der [³⁵S]GTPγS-Experimente

Um die Funktionsweise des [³⁵S]GTPγS-Experimentes erläutern zu können, ist es notwendig, sich zunächst den G-Protein-Zyklus nach erfolgreicher Aktivierung des Rezeptors durch einen Agonisten anzusehen. Der membranständige M₂-Rezeptor erfährt nach seiner Aktivierung durch einen Agonisten eine Konformationsänderung, die dem intrazellulären, heterotrimeren G-Protein die Bindung ermöglicht. Das G-Protein besteht aus einer βγ-Untereinheit und einer GDP-tragenden α-Untereinheit. Nach Bindung des G-Proteins wird der Austausch von GDP (Guanosindiphosphat) zu GTP (Guanosintriphosphat) an der α-Untereinheit katalysiert. Die Untereinheiten dissoziieren anschließend voneinander und können weitere Effektorproteine aktivieren (Simon et al. 1991; Oldham und Hamm 2008). Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α-Untereinheit wird das gebundene GTP wieder zu GDP hydrolysiert und damit die α-Untereinheit inaktiviert. Anschließend reassoziieren die Untereinheiten, was dann auch eine Inaktivierung der βγ-Untereinheit zur Folge hat (Wess 1997).

Die Funktionsweise des [³⁵S]GTPγS-Experimentes beruht nun darauf, dass der Rezeptor nach Bindung einer agonistisch wirksamen Testsubstanz ein G-Protein rekrutiert, welches im Austausch gegen GDP das GTP bindet. Da im Versuchsansatz eine hohe Konzentration an radioaktiv markiertem GTP ([³⁵S]GTPγS, Strukturformel vgl. Kapitel 2.1.1) vorliegt, wird vermehrt diese Form gebunden. Damit wird der G-Protein-Zyklus unterbrochen, da [³⁵S]GTPγS GTPase-stabil ist und nicht hydrolysiert werden kann. Einmal gebundenes [³⁵S]GTPγS verbleibt also am G-Protein und unterbindet damit eine Reassoziierung zum Ruhezustand. Nach der Filtration ist nun die gebundene Radioaktivität per Feststoffsintillationsmessung quantitativ bestimmbar und proportional zu der Menge an aktivierten Rezeptoren im Versuchsansatz. Sie ist demnach ein Maß für die intrinsische Aktivität einer agonistisch wirkenden Testsubstanz.

Die beschriebene experimentelle Methode eignet sich vornehmlich zur Messung inhibitorischer G_{i/o}-Protein-Aktivierungen z.B. durch den M₂-Rezeptor, was an der im Vergleich zu anderen G-Proteinen weitaus höheren Expressionsrate liegt (Milligan 2003). Damit ist es die präferierte Methode, um die Aktivierung von M₂-Rezeptoren zu quantifizieren. Wird das Ausmaß der Rezeptoraktivierung gegen die eingesetzte log-

Konzentration einer Testsubstanz aufgetragen, werden Konzentrations-Effekt-Kurven mit sigmoidalem Verlauf erhalten. Durch Nutzung der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ (Gleichung 7), werden der Wendepunkt sowie das obere und untere Plateau der Kurve bestimmt. Der Wendepunkt der Kurve ist der EC_{50} -Wert und entspricht derjenigen Konzentration der Testsubstanz, die 50% der Maximalantwort auslöst. Die Maximalantwort ist der Parameter E_{max} und entspricht dem oberen Plateau der Kurve (Top). Das untere Plateau zeigt den Basalwert und damit die, auch ohne Testsubstanz, aktivierten Rezeptoren an. Man spricht hier von spontaner Aktivität der Rezeptoren. Durch Einsatz eines inversen Agonisten wie z.B. Atropin ist der Basalwert reduzierbar, was die Möglichkeit eröffnet auch inversen Agonismus zu identifizieren.

3.4.1.2 Durchführung von [^{35}S]GTP γ S-Experimenten

Die einzelnen Bestandteile des Versuchsansatzes wurden, wie in untenstehender Tabelle abgebildet, in die Kavitäten der Mikrotiterplatte (V21) pipettiert. Der Zusatz von 1 μ M GDP (R10) sättigt leere Nukleotidbindungsstellen der α -Untereinheit ab und führt dadurch zu einem größeren Messfenster, da die basale [^{35}S]GTP γ S-Bindung reduziert wird. Den Startpunkt der Reaktion bildete die abschließende Zugabe des Membranhomogenates. Danach erfolgte eine Inkubation bei 30°C im Schüttelwasserbad (G19) für die Dauer einer Stunde. Wie für die [3H]NMS-Bindungsexperimente beschrieben (siehe Kapitel 3.3.2), wurde die Reaktion durch Filtration gestoppt und die Filtermatte (V14) weiterverarbeitet. Die Filtermatte wurde vor der Filtration für 30 Sekunden in Aqua dest. (R1) eingelegt, um die unspezifische Bindung zu reduzieren. Die Radioaktivität wurde anschließend mittels Feststoffsintillation vermessen. Bei der Auswertung erfolgte die Normierung der Werte auf die Effekte des Referenzagonisten Iperoxo. Dieser ruft als Superagonist an M_2 Rezeptoren eine maximale Systemantwort hervor, die größer ist als die des endogenen Agonisten Acetylcholin (ACh). Das untere und das obere Plateau der erhaltenen Referenzkurve wurden auf 100% bzw. 0% festgesetzt. Um die spontane Aktivität der Rezeptoren zu erfassen wurde eine ausreichend hohe Konzentration des inversen Agonisten Atropin eingesetzt. Die spontane Aktivität wurden erhoben um einen ungewöhnlich hohen Wert, welcher Auswirkungen auf die erhobenen Daten haben könnte, zu identifizieren und den Versuch ggf. auszuschließen.

Komponente [μ l]	Basale Bindung	Inverser Agonist	Orthoster	Eingesetzte Konzentration	Konzentration im Ansatz
Aqua dest.	100	50	50	-	-
Atropin	-	50	-	30 μ M	3 μ M
Testsubstanz oder Iperoxo	-	-	50	$x \cdot 10^{-y}$	$x \cdot 10^{-(y+1)}$
Membranhomogenat	100	100	100	200 μ g/ml	40 μ g/ml
GDP	50	50	50	100 μ M	10 μ M
HEPES-Puffer	200	200	200	12,5 mM	10 mM
[35 S]GTP γ S	50	50	50	0,7 nM	0,07 nM
Gesamtvolumen	500	500	500	-	-

Tabelle 6: Pipettierschema der [35 S]GTP γ S-Experimente [35 S]GTP γ S, GDP und Membranhomogenat wurden mit HEPES-Puffer (L5) verdünnt. Atropin, Iperoxo und die Testsubstanz wurden in Aqua dest. (R1) gelöst. Alle Volumina sind in Mikroliter (μ l) angegeben.

3.4.1.3 [35 S]GTP γ S-Experimente zur Erfassung des Einflusses von Antagonisten auf die Rezeptoraktivierung

Der funktionelle Einfluss des antagonistischen Teils der Hybridsubstanzen konnte durch ein modifiziertes Verfahren des [35 S]GTP γ S-Experimentes bestimmt werden. Hierbei wurde eine steigende Konzentration der Hybridsubstanz gegen eine fixe Konzentration des agonistischen Bausteines Iperoxo vermessen. Außerdem wurde im selben Versuchsdurchlauf eine Kontrollkurve des Referenzagonisten Iperoxo aufgenommen und die erhaltenen Kurven simultan mit der Methode nach Waud (Waud 1975; Lazareno und Birdsall 1993; Tränkle et al. 2005) ausgewertet. Diese Methode liefert bei fehlender Spontanaktivität der Rezeptoren einen Schätzwert für die Affinität des Antagonisten. Es handelt sich hierbei um einen modifizierten Schild-Plot (Arunlakshana und Schild 1997) um die Steigung der Schild-Geraden s und die Gleichgewichts-Affinitätskonstante K_B zu bestimmen. Ist s nicht unterschiedlich von 1, so handelt es sich um einen kompetitiven Antagonismus. Da der Wendepunkt der Antagonist-Kurve (bzw. Hybridsubstanz-Kurve) nicht von der Agonist-Kurve isoliert betrachtet werden kann (Lazareno und Birdsall 1993) müssen beide Datensätze per simultaner Analyse ausgewertet werden. Der erste Datensatz besteht aus der

Kontrollkurve mit steigenden Konzentrationen an Referenzagonist Iperoxo. Der zweite Datensatz beinhaltet die Datenpunkte der steigenden Konzentrationen an Hybridsubstanz in Gegenwart einer fixen Konzentration an Iperoxo. Die fixe Konzentration an Iperoxo entspricht der Konzentration, die 80-90% des Maximaleffektes auslöst ($10^{-9,5}$ M). Die erhaltenen funktionellen Daten wurden mit folgender Gleichung nach Tränkle et al. 2005 ausgewertet:

$$Effekt = \frac{(E_{max} - basal)}{(1 + \{\frac{EC_{50, Kontrolle}}{[A]} \times (1 + [B]^s \times K_B)\}^n)} + basal \quad \text{Gleichung 11}$$

- [A]: Konzentration des Agonisten
- E_{max} : Oberes Plateau der Agonist-Kurve
- basal: Unteres Plateau der Agonist-Kurve
- n: Steigung der Agonist-Kurve
- $EC_{50, Kontrolle}$: Agonist-Konzentration, welche den halbmaximalen Effekt auslöst
- [B]: Konzentration des Antagonisten
- K_B : Gleichgewichts-Affinitätskonstante
- s: Steigung der Schild-Geraden

Wenn davon ausgegangen werden kann, dass es sich um eine Parallelverschiebung der Kurvenschar handelt, so reichen für diese Methode wenige Punkte der Kurven in Anwesenheit des Antagonisten. Damit ist diese Methode effizienter als die klassische Analyse nach Schild (Arunlakshana und Schild 1997).

Die Durchführung der Experimente erfolgte, wie in Kapitel 3.4.1.2 beschrieben. Unter Verwendung von Gleichung 11 wurde eine Kurvenschar generiert. Mit dem F-Test ($P < 0,05$) wurde überprüft, ob die Steigung der Antagonist-Kurve (n) bzw. der Schild-Geraden (s) signifikant unterschiedlich von 1 waren. Traf dies nicht zu, so wurden diese Werte auf 1 festgesetzt. Der erhaltene K_B -Wert ist ein Schätzwert für die Affinität des untersuchten Antagonisten zum Rezeptor.

3.4.2 Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (cAMP-Experiment)

3.4.2.1 Theoretische Grundlagen des cAMP-Experimentes

Bei dieser Art des funktionellen Experimentes wird die Rezeptoraktivierung nicht direkt am G-Protein selbst gemessen, sondern innerhalb des Signalweges, den das rezeptorgebundene G-Protein zu aktivieren vermag. Die intrazelluläre Konzentration des sekundären Botenstoffs cAMP wird sowohl durch G_s -Proteine als auch durch $G_{i/o}$ -Proteine beeinflusst, welche auch beide von dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten M_2 -Rezeptor gebunden werden können (Kenakin 2014). Es wurde sich jedoch auf den Einfluss der G_s -Proteine fokussiert indem der $G_{i/o}$ -Inhibitor Pertussis Toxin (PTX) zum Einsatz kam, um die $G_{i/o}$ -Proteine funktionsunfähig zu machen. Die rezeptorgebundenen G_s -Proteine haben einen stimulatorischen Einfluss auf die Adenylylcyclase, welche Adenosindiphosphat (ADP) in cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umwandelt. Die intrazelluläre Konzentration von cAMP steigt unter dem Einfluss aktivierter G_s -Proteine folglich an. Der metabolische Abbau des cAMP wurde durch den Einsatz des unspezifischen Phosphodiesterase-Hemmstoffes IBMX (Isobutyl-methylxanthin, R17) unterbunden (Ferrari-Dileo et al. 1992). Der Nachweis des entstandenen cAMP gelang mit dem HTRF® cAMP Kit, welches an Akzeptormoleküle gebundenes cAMP (d2-cAMP) sowie an Donormoleküle gebundenen cAMP-Antikörper (anti-cAMP) enthält. Bindet nun ein Antikörper an ein d2-cAMP-Molekül, so liegen Donor und Akzeptor nah beieinander, sodass ein Förster-Resonanz-Energietransfer (FRET) stattfinden kann. Hierbei wird Energie in Form von Licht mit der Wellenlänge 665 nm frei. Dieses kann per Mikroplattenleser (G26) quantitativ bestimmt werden. Entsteht nun, durch Aktivierung der M_2 -Rezeptoren im Versuchsansatz und damit der Bindung von G_s -Proteinen, endogenes cAMP so bindet anti-cAMP auch vermehrt an dieses unmarkierte cAMP und es findet kein FRET statt. Je mehr endogenes cAMP also entsteht umso weniger FRET-Signal kann detektiert werden und das Messsignal nimmt ab. Erhalten wird idealerweise eine Konzentrations-Effekt-Kurve mit der Steigung $n_H = -1$, welche in der anschließenden Auswertung in eine ansteigende Kurve ($n_H = 1$) transformiert wird.

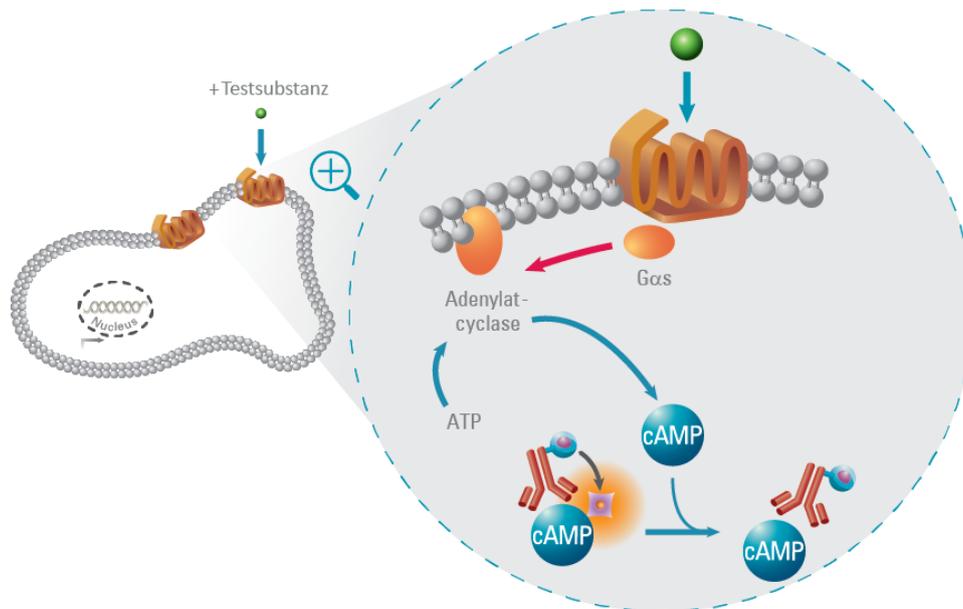


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Prinzips des Cisbio HTRF® cAMP Kit; modifiziert nach Cisbio HTRF® cAMP Kit Anleitung (<https://www.cisbio.com/drug-discovery/camp-gs-assay-kits>) Die Abbildung zeigt die Konkurrenz des durch Rezeptor-Aktivierung generierten endogenen cAMP und des artifiziellen d2-cAMP um die Bindung an den Antikörper anti-cAMP. Das resultierende Messsignal ist antiproportional zur Menge des gebildeten endogenen cAMP.

3.4.2.2 Durchführung einer Messung des intrazellulären cAMP-Gehaltes (cAMP-Experiment)

Da es sich im Falle des cAMP-Experimentes um einen sogenannten ganz-Zell-Versuch handelt, mussten Zellen hierfür auf genügend vielen Zellkulturschalen (V3) so ausgesät werden, dass am Vortag zum eigentlichen Versuch, eine Konfluenz von 80-90% erreicht war. 16-20 Stunden vor dem Experiment wurde das normale Nährmedium (L10) dann durch PTX-haltiges Nährmedium (100 ng/ml, R28) ersetzt. Am Versuchstag selbst wurden die Verdünnungsreihen der Testverbindungen in IBMX-haltigem Puffer (1 mM, L8) frisch hergestellt. Die Zellen wurden anschließend mit 10 ml D-PBS-Puffer (R4) gewaschen und mit 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (R31) von der Zellkulturschale (V3) gelöst. Die Protease-Aktivität des Trypsins wurde mit 7 ml Nährmedium (L10) gestoppt und die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen (V5) überführt. Das durch die Zentrifugation (G3, Rotor JS 4.3; 900 rpm, 4 Minuten) erhaltene Zellpellet wurde in HBSS+20 mM HEPES-Puffer (L4) resuspendiert und mit der Neubauer Zählkammer (G28) wurde die Zellzahl ermittelt und das benötigte Volumen für die Verdünnung errechnet. In jedem Well der Mikrotiterplatte (V20) mussten sich für das Experiment 40.000 Zellen befinden. Das benötigte Volumen aus

der Zellsuspension wurde dann in ein neues Zentrifugenröhrchen (V5) überführt und erneut, auf schon beschriebene Weise, zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im IBMX-haltigen Versuchspuffer (L8) in einem für die benötigte Zellzahl pro Well errechneten Volumen resuspendiert und jeweils 5 μ l davon in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte (V20) pipettiert. Anschließend wurde die Platte (V20) für 30 Minuten im Inkubator (G7) aufbewahrt. Darauffolgend wurden je 5 μ l der Verdünnungsreihe der Testsubstanz bzw. 5 μ l Versuchspuffer für Negativkontrolle und Basalwertbestimmung dispensiert, um die Platte danach wiederum für 30 Minuten im Inkubator zu inkubieren. Es folgte die Zugabe von C+L-Puffer („conjugate and lysis buffer“, L15) in die Vertiefung des Negativkontrollwertes und von d2-cAMP, gelöst in C+L-Puffer (L15), in alle weiteren Vertiefungen. Abschließend wurde anti-cAMP, gelöst in C+L-Puffer (L15), in alle Vertiefungen pipettiert. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur sowie unter Lichtausschluss und die Vermessung des Experimentes mit dem Mikroplattenleser Mithras² LB 943 (G26). Als Positivkontrolle wurde bei jeder Versuchsplatte der endogene Ligand Acetylcholin, der Superagonist Iperoxo und der direkte Stimulator der Adenylatcyclase Forskolin (FSK, R8) mitgeführt. Iperoxo diente bei der Auswertung der Ergebnisse als Referenzagonist, auf welchen die Messwerte der Testverbindungen bezogen wurden. Das untere Plateau der Iperoxo-Kurve wurde als 0%, das obere Plateau als 100% definiert.

3.5 „Bias“-Berechnung

Bei der Berechnung des „Ligand-Bias“ handelt es sich um eine Methode, die es ermöglicht, eine quantitative Aussage über eine mögliche Ligand-spezifische Bevorzugung eines Signalweges gegenüber einem anderen zu treffen. Grundlage bildet die Analyse von funktionell ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven mit dem „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983). Dieses beschreibt, wie effizient die Rezeptorbindung eines Agonisten in eine Signalantwort übertragen wird. Ein Maß für diese sogenannte „Kopplungseffizienz“ ist nach Black und Leff die Kopplungskonstante τ (tau). Dieser Parameter beschreibt das Verhältnis der Gesamtkonzentration an Rezeptoren R_T zu den Rezeptoren, die durch Interaktion mit einem Agonisten für eine halbmaximale Systemantwort notwendig sind (K_E):

$$\tau = \frac{[RT]}{K_E}$$

Gleichung 12

K_E : Konzentration der Agonist-Rezeptor-Komplexe, welche eine halbmaximale Systemantwort hervorruft

$[RT]$: Gesamt-rezeptorzahl

Mit Hilfe dieser Methode wurde außerdem der Parameter K_A ermittelt, der ein Maß für die funktionelle Affinität darstellt.

$$E = \frac{E_{max} \times \tau^n [A]^n}{(K_A + [A])^n + \tau^n [A]^n}$$

Gleichung 13

E_{max} : maximal mögliche Antwort des Systems

τ : Kopplungskonstante

K_A : funktionelle Affinität des Partialagonisten

n : Maß für die Steilheit der Kopplungsbeziehung („transducer slope“)

Durch die Verwendung und Weiterführung des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983) konnten signifikante analytische Vorteile im Bereich der „Bias“-Berechnung beschrieben werden (Ehlert 2008; Kenakin 2012; Kenakin und Christopoulos 2013). Der gemessene Agonismus wird als systemunabhängiger Parameter quantifiziert. Dieser enthält die funktionelle Affinität des Agonisten und auch seine intrinsische Aktivität „efficacy“. Ausgedrückt wird dies in der Form des „Transduktionskoeffizienten“ τ/K_A . Der Parameter τ bringt die „efficacy“ des Agonisten, die Rezeptorzahl und die Systemkopplung ein, die Dissoziationskonstante K_A bringt den Kehrwert der „conditional affinity“ des Agonisten in einem funktionellen System ein (Kenakin 2013). Dieser Parameter (τ/K_A) beschreibt die Effizienz, mit der eine Verbindung einen möglichen Effekt auslöst. Testverbindungen können dann in verschiedenen Experimentalmodellen vermessen werden und durch Bestimmung und

Vergleich des beschriebenen Parameters kann ein möglicher „Ligand-Bias“ aufgedeckt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine modifizierte Gleichung nach Shonberg et al. 2014 verwendet, welche den Vorteil bietet, dass der Bruch τ/K_A als einziger Parameter definiert werden kann.

$$E = \frac{E_{max} \left(\frac{\tau}{K_A}\right)^n [A]^n}{\left(\frac{\tau}{K_A}\right)^n [A]^n + \left(\frac{[A]}{K_A} + 1\right)^n} \quad \text{Gleichung 14}$$

Durch Subtraktion des Referenzagonist-Transduktionskoeffizienten von dem der Testsubstanz werden die normalisierten $\Delta\log(\tau/K_A)$ -Werte erhalten:

$$\Delta\log\left(\frac{\tau}{K_A}\right) = \log\left(\frac{\tau}{K_A}\right)_{\text{Testsubstanz}} - \log\left(\frac{\tau}{K_A}\right)_{\text{Referenzagonist}} \quad \text{Gleichung 15}$$

Die Ligand-induzierte Signaleffizienz unterschiedlicher Signalwege kann anhand dieses Parameters verglichen werden. Um einen Vergleich zwischen verschiedenen Liganden zu ermöglichen, kann, als letzter Schritt, der Parameter $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ bestimmt werden. Dieser besagt wie viel mehr oder weniger ein bestimmter Signalweg durch eine Testsubstanz im Vergleich zu einer anderen Testsubstanz aktiviert wird. Berechnet wird dieser als „Bias“ bezeichnete Wert durch Subtraktion der normalisierten Transduktionskoeffizienten aus Gleichung 15 jedes zu vergleichenden Signalweges voneinander (Gregory et al. 2012; Charfi et al. 2015).

$$\Delta\Delta\log\left(\frac{\tau}{K_A}\right) = \Delta\log\left(\frac{\tau}{K_A}\right)_{\text{Signalweg 1}} - \Delta\log\left(\frac{\tau}{K_A}\right)_{\text{Signalweg 2}} \quad \text{Gleichung 16}$$

Der „Bias“ ist ein Ergebnis eines Vergleichs von Transduktionskoeffizienten, die auf einen Referenzagonisten normalisiert wurden. Der erhaltene Wert für den „Bias“ ist somit immer in Relation zum verwendeten Referenzagonisten zu betrachten.

Der Standardfehler für $\Delta\log(\tau/K_A)$ und $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ berechnet sich wie folgt:

$$SE_{\left(\Delta\log\left(\frac{\tau}{K_A}\right)\right)} = \sqrt{(SE_{\text{Testsubstanz}})^2 + (SE_{\text{Referenzagonist}})^2} \quad \text{Gleichung 17}$$

$$SE_{\left(\Delta\Delta\log\left(\frac{\tau}{K_A}\right)\right)} = \sqrt{\left(SE_{\left(\Delta\log\left(\frac{\tau}{K_A}\right)\right)_{\text{Signalweg 1}}}\right)^2 + \left(SE_{\left(\Delta\log\left(\frac{\tau}{K_A}\right)\right)_{\text{Signalweg 2}}}\right)^2} \quad \text{Gleichung 18}$$

3.6 Statistische Methoden

Alle durchgeführten statistischen Berechnungen wurden mit dem Computerprogramm GraphPad Prism® (P4) erstellt. Die statistischen Prüfverfahren sowie die Bestimmungen der Lage- und Streuungsparameter basierten auf der Annahme normalverteilter Datensätze. Die Datenpunkte der Gesamtkurve sind als arithmetisches Mittel \pm SEM der Einzelversuche angegeben. Die mit der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ (Gleichung 7) ermittelten Kenngrößen wurden für jede Kurve eines individuellen Versuchstages einzeln bestimmt und nachfolgend arithmetisch gemittelt.

3.6.1 Deskriptive Statistik

3.6.1.1 Berechnung des arithmetischen Mittels

Hierbei handelt es sich um ein Lagemaß, welches den mittleren Bereich einer Messreihe darstellt. Es wird auch als Mittelwert oder Durchschnitt bezeichnet und berechnet sich wie folgt:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad \text{Gleichung 19}$$

x_i : Messwert des Einzelversuches i

n : Anzahl der voneinander unabhängigen Einzelversuche

3.6.1.2 Berechnung der Streuung

Die Streuungsmaße lassen eine Aussage über die Einheitlichkeit und damit über die Verlässlichkeit der Messwerte zu. Die Verteilung der Einzelwerte um den Mittelwert beschreibt die Standardabweichung (engl.: standard deviation):

$$SD = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Gleichung 20}$$

Die Abweichung des arithmetischen Mittels vom tatsächlichen Wert gibt der Standardfehler an (engl.: standard error of the mean, SEM):

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad \text{Gleichung 21}$$

3.6.2 Statistische Prüfverfahren

3.6.2.1 T-Test und ANOVA-Analyse

Der ungepaarte zweiseitige T-Test ermöglicht den Vergleich zweier voneinander unabhängiger Mittelwerte. Es wird berechnet, ob sich diese signifikant voneinander unterscheiden. Voraussetzung ist eine Normalverteilung der Messwerte und eine näherungsweise Übereinstimmung der Standardabweichungen beider Gesamtheiten. Mit Hilfe des Einstichproben T-Test wird auf einen signifikanten Unterschied eines ermittelten Mittelwerts zu einem vorgegebenen Wert hin geprüft.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \cdot \frac{(n_1 - 1) \cdot SD_1^2 + (n_2 - 1) \cdot SD_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}} \quad \text{Gleichung 22}$$

\bar{x}_1 :	Mittelwert der Grundgesamtheit 1
\bar{x}_2 :	Mittelwert der Grundgesamtheit 2
SD_1 :	Standardabweichung der Grundgesamtheit 1
SD_2 :	Standardabweichung der Grundgesamtheit 2
n_1 :	Anzahl der Einzelversuche in Grundgesamtheit 1
n_2 :	Anzahl der Einzelversuche in Grundgesamtheit 2

Anhand des für t erhaltenen Wertes lässt sich in Nachschlagewerken aus Tabellen oder computergestützt, unter Vorgabe einer bestimmten Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert), auf Unterschiede prüfen. Nimmt der mit Hilfe des t-Wertes errechnete p-Wert kleinere Werte als 0,05 an, so wird der gefundene Unterschied mit 95%iger Wahrscheinlichkeit statistisch signifikant sein. Für p-Werte größer als 0,05 wird der gefundene Unterschied als zufällige Beobachtung angenommen.

Die sogenannte one-way analysis of variance (one-way ANOVA-Analyse, Varianzanalyse) ist eine Erweiterung des T-Tests, die dazu dient, mehrere Mittelwerte untereinander vergleichen zu können. Die ANOVA-Analyse gibt an ob ein signifikanter Unterschied besteht ($P < 0,05$), aber nicht, welche Mittelwerte sich voneinander

unterscheiden. Hierzu wurde an die ANOVA-Analyse ein Post-hoc Test nach Tukey angeschlossen. Beide Analysen wurden mit Hilfe des Computerprogrammes Prism (P4) computerunterstützt durchgeführt.

$$F_{ANOVA} = \frac{\frac{SSB}{DFB}}{\frac{SSW}{DFW}} \quad \text{Gleichung 23}$$

- F_{ANOVA} : F-Wert der ANOVA-Analyse
 SSB: Quadratsumme zwischen den Gruppen
 DFB: Anzahl der Freiheitsgrade zwischen den Gruppen
 SSW: Quadratsumme innerhalb der Gruppen
 DFW: Anzahl der Freiheitsgrade innerhalb der Gruppen

3.6.2.2 F-Test

Zum Vergleich unterschiedlicher Kurvenanpassungen (z.B. hinsichtlich des Hill-Koeffizienten, von EC_{50} oder von E_{max}) untereinander wurde der F-Test verwendet. Je genauer das gewählte Modell die Datenpunkte beschreibt, das heißt, je näher die gemessenen Datenpunkte an der Kurvenanpassung durch den Computer liegen, desto kleiner wird die Summe der Abstandsquadrate. Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde auf 5% festgesetzt.

$$F = \frac{\frac{SS_1 - SS_2}{DF_1 - DF_2}}{\frac{SS_2}{DF_2}} \quad \text{Gleichung 24}$$

- SS_1 : Summer der Abstandsquadrate mit Auswertemodell 1
 SS_2 : Summer der Abstandsquadrate mit Auswertemodell 2
 df_1 : Anzahl der Freiheitsgrade mit Auswertemodell 1
 df_2 : Anzahl der Freiheitsgrade mit Auswertemodell 2

Der ermittelte F-Wert kann mit dem entsprechenden Wert für die vorhandenen Freiheitsgrade in Tabellen der F-Verteilung für die festgelegte Irrtumswahrscheinlichkeit $P < 0,05$ verglichen werden. Liegt der mit Gleichung 24 berechnete F-Wert oberhalb oder ist er mit dem tabellierten Wert identisch, so ergibt das komplexere Modell eine signifikant bessere Kurvenanpassung. Der Parameter bleibt demnach freiliegend. Liegt der Wert jedoch unterhalb, so wird das simple Modell bevorzugt und damit der geprüfte Parameter festgesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Bindungsverhalten der Hybridsubstanzen gegenüber orthosterischen Radioliganden des M₂-Rezeptors

4.1.1 Beeinflussung des Bindungsverhaltens der Testverbindungen zum M₂-Rezeptor durch den verwendeten Radioliganden

Durch Verwendung von Radioliganden mit (aus funktioneller Perspektive) unterschiedlicher intrinsischer Aktivität, konnte die Bindungsaffinität der mit dem Radioliganden konkurrierenden Testsubstanz zum Rezeptor verändert werden. Der Unterschied zwischen den beiden verwendeten Radioliganden besteht neben unterschiedlicher chemischer Struktur darin, dass es sich bei [³H]NMS um einen Antagonisten handelt, bei [³H]Iperoxo um einen Agonisten. Als agonistisch wirkender Ligand markiert [³H]Iperoxo den hochaffinen Bindungszustand, also den G-Protein gekoppelten Rezeptor, mit höherer Affinität als den niedrigaffinen Bindungszustand (Schrage et al. 2014). Mit der Testsubstanz Iperoxo als Kompetitor gegenüber [³H]Iperoxo, wurde eine monophasische Bindungskurve erhalten ($pK_A = 9,99 \pm 0,12$, M.W. \pm S.E.M., n=3 vgl. Abb. 7 B), weil [³H]Iperoxo es nicht erlaubt, den niedrig affinen Rezeptorzustand zu erfassen. Bei Verwendung von [³H]NMS als Radioligand markierte dieses sowohl G-Protein gekoppelte als auch G-Protein entkoppelte Rezeptorproteine, also den hochaffinen und niedrigaffinen Rezeptorzustand (Hulme et al. 1990b). In der vorliegenden Arbeit band Iperoxo mit hoher Affinität an den hochaffinen Bindungszustand ($pK_i = 9,49 \pm 0,60$, M.W. \pm S.E.M., n=8) und mit einer um zwei Dekaden geringeren Affinität an den niedrigaffinen Rezeptorzustand ($pK_i = 7,44 \pm 0,15$, M.W. \pm S.E.M., n=8). Es resultierte eine biphasische Bindungskurve (vgl. Abb. 7 A). Werden die pK_i -Werte von Iperoxo gegenüber [³H]Iperoxo mit dem pK_i -Wert des hochaffinen Bindungszustands von Iperoxo gegen [³H]NMS verglichen, so lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen ($pK_i = 9,99 \pm 0,12$ vs. $9,49 \pm 0,60$, M.W. \pm S.E.M., n=3 bzw. 8, T-Test, $P < 0,05$). Folglich wird im Gleichgewichtsbindungsexperiment mit [³H]Iperoxo, wie oben erwähnt, nur der hochaffine Bindungszustand markiert und demnach auch detektiert.

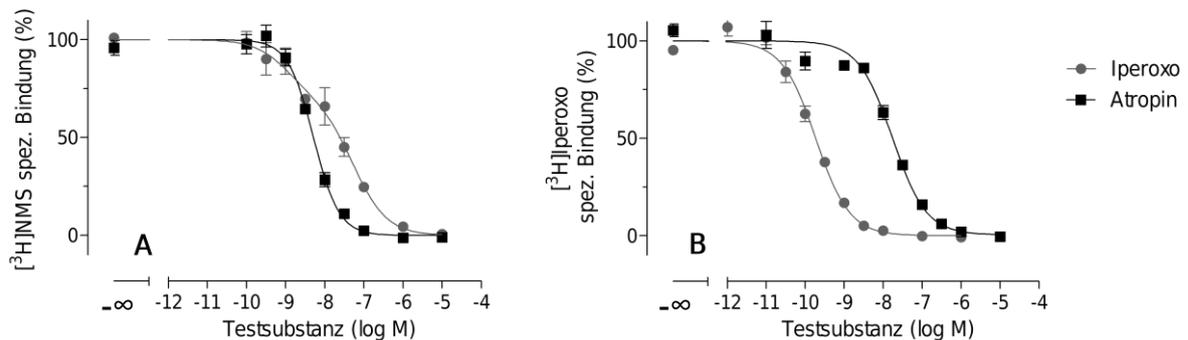


Abbildung 7: Einfluss des Radioliganden auf die Bindungsneigung von Iperoxo und Atropin. Ordinate: Spezifische $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung (A) bzw. $[^3\text{H}]$ Iperoxo-Bindung (B) in Prozent des Wertes in Abwesenheit der Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen Bindung in Gegenwart von $10\ \mu\text{M}$ Atropin. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Iperoxo (Kreise) bzw. Atropin (Quadrate). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Gleichung 7 (vgl. Kapitel 3.3.2). Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehler aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Mittelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung erhoben.

Im Gegensatz zu Iperoxo als Vollagonisten zeigte Atropin als Antagonist bzw. inverser Agonist sowohl im Bindungsexperiment gegenüber $[^3\text{H}]$ NMS als auch gegen $[^3\text{H}]$ Iperoxo eine monophasische Bindungskurve (vgl. Abb. 7 A und B). Dies ist so zu erklären, dass die Affinität von Antagonisten zu G-protein freien und G-Protein gebundenen Rezeptoren sehr ähnlich ist (Tota und Schimerlik 1990). Beobachtet wurde jedoch eine signifikant höhere Affinität des Atropin für den M_2 -Rezeptor in $[^3\text{H}]$ NMS-Experimenten ($pK_A = 8,49 \pm 0,15$, M.W. \pm S.E.M., $n=6$) als in $[^3\text{H}]$ Iperoxo-Experimenten ($pK_i = 8,00 \pm 0,08$, M.W. \pm S.E.M., $n=3$, T-Test, $P<0.05$).

Zusammenfassend sei festgestellt, dass mit diesen Voruntersuchungen die Befunde von Schrage et al. (2014) bestätigt werden konnten und in der vorliegenden Arbeit nachfolgend der Vergleich von pK_i -Werten aus $[^3\text{H}]$ NMS-Bindungsexperimenten mit denen aus $[^3\text{H}]$ Iperoxo-Bindungsexperimenten herangezogen wird, um ein Indiz für den Bindungsmodus von Agonist-Antagonist-Hybriden zu erhalten.

4.1.2 Iperoxo-Atropin und Iperoxo-Scopolamin Hybride zeigen Radioligand-abhängiges Bindungsverhalten

Die Testsubstanz Iperoxo-4-Atropin, also Iperoxo, das mit Atropin durch eine aliphatische Kette mit vier Kohlenwasserstoffen verbunden ist, zeigte eine signifikant geringere Bindungsneigung zum M₂-Rezeptor in [³H]NMS-Bindungsexperimenten verglichen mit jener in [³H]Iperoxo-Bindungsexperimenten (vgl. Abb. 8 A; pK_i = 7,30 ± 0,06, M.W. ± S.E.M., n=3 vs. 8,43 ± 0,08, M.W. ± S.E.M., n=3, T-Test, P<0.05). Auch für Iperoxo-8-Atropin konnte ein signifikanter Unterschied gezeigt werden (vgl. Abb. 8 C; pK_{i(NMS)} = 7,95 ± 0,06, M.W. ± S.E.M., n=3; pK_{i(Ipx)} = 7,62 ± 0,11, M.W. ± S.E.M., n=3, T-Test, P<0.05). Hier war es jedoch umgekehrt: die Bindungsaffinität, gemessen gegenüber [³H]Iperoxo, war signifikant geringer als jene gegenüber [³H]NMS. Für die Testverbindungen Iperoxo-6-Atropin und Iperoxo-10-Atropin konnte kein signifikanter Unterschied in den Bindungskonstanten K_i zwischen den Bestimmungen mit beiden Radioliganden festgestellt werden (vgl. Abb. 8 B und 8 D). Die Kettenlänge hat demnach großen Einfluss auf das Bindungsverhalten der Verbindungen. Iperoxo-4-Atropin bevorzugt bei der Bindung den G-Protein-gekoppelten Rezeptor, wie er durch [³H]Iperoxo markiert wird. Iperoxo-8-Atropin hingegen bevorzugt den G-Protein-entkoppelten Rezeptor, was sich in einer signifikant stärkeren Bindungsaffinität in [³H]NMS-Gleichgewichtsbindungsexperimenten niederschlägt (pK_{i(NMS)} = 7,95 ± 0,06, M.W. ± S.E.M.; pK_{i(Ipx)} = 7,62 ± 0,11, M.W. ± S.E.M.). Iperoxo-6-Atropin und Iperoxo-10-Atropin binden an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit gleicher Affinität wie an den G-Protein-entkoppelten Rezeptor. Die pK_i-Werte aus den verschiedenen Bindungsexperimenten zeigen keinen signifikanten Unterschied (vgl. Abb. 8 B und D und Tab. 7 in Kapitel 4.1.5). Da alle Bindungskurven der Testverbindungen monophasisch waren (F-Test, P<0.05, vgl. Abb. 8) ist außerdem davon auszugehen, dass es sich um Partialagonisten handelt. Im Gegensatz zu Vollagonisten zeigen Partialagonisten nämlich sowohl im Bindungsexperiment gegen einen Radioantagonisten als auch gegen einen Radioagonisten monophasische Kurven. Dies ist so zu erklären, dass die Affinität von Partialagonisten wie auch von Antagonisten zu G-protein freien und G-Protein gebundenen Rezeptoren sehr ähnlich ist (Tota und Schimerlik 1990).

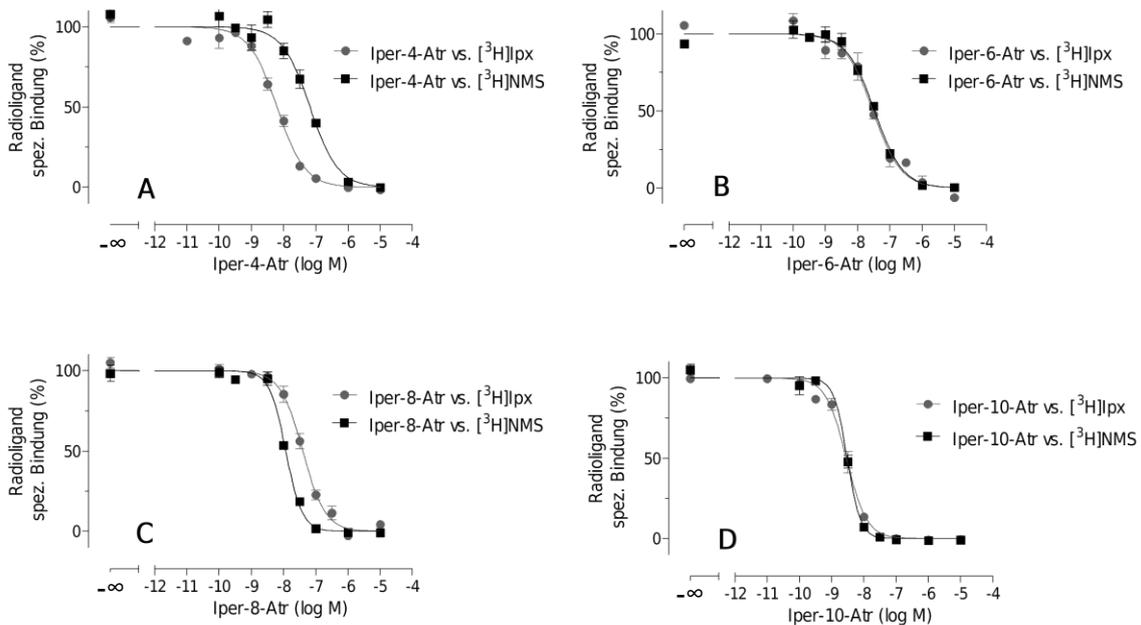


Abbildung 8: Einfluss des Radioliganden auf die Bindungsaffinität der Hybridliganden aus Iperoxo und Atropin. Ordinate: Spezifische Radioligand-Bindung in Prozent des Wertes in Abwesenheit der Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen Bindung in Gegenwart von 10 μM Atropin. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Hybridsubstanzen aus Iperoxo und Atropin aufgetragen gegen $[^3\text{H}]$ Iperoxo (Kreise) bzw. $[^3\text{H}]$ NMS (Quadrat). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Gleichung 7 (vgl. Kapitel 3.3.2). Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Mittelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmungen erhoben.

Die Testverbindungen bestehend aus Iperoxo und Scopolamin verbunden mit einer aliphatischen Kette aus 4, 6, 8 oder 10 Kohlenwasserstoffen zeigten im gleichen Versuchsansatz ebenfalls signifikante Unterschiede in ihren Bindungsaffinitäten. Interessanterweise konnte für jede einzelne Verbindung eine höhere Bindungsaffinität für den G-Protein-gekoppelten M_2 -Rezeptor ($[^3\text{H}]$ Iperoxo-Bindungsexperiment) als für den G-Protein-entkoppelten Rezeptor ($[^3\text{H}]$ NMS-Bindungsexperiment) nachgewiesen werden (vgl. Abb. 9 A-D und Tab. 7 in Kapitel 4.1.5). Die Länge der aliphatischen Verbindungskette bewirkt im Falle der Iperoxo-Scopolamin Hybridsubstanzen, im Gegensatz zu den Hybriden aus Iperoxo und Atropin, stets einen geringeren Unterschied in ihrem Bindungsverhalten. Nichtsdestotrotz handelt es sich auch in diesem Set bei allen Bindungskurven um monophasische Kurven, weshalb für alle Testverbindungen eine partialagonistische Wirkung postuliert werden kann.

Die oben ausgeführte Hypothese über die intrinsischen Aktivitäten aller Testverbindungen am M_2 -Rezeptor wurde in funktionellen Experimenten (vgl. Kapitel 4.3 und 4.5) überprüft.

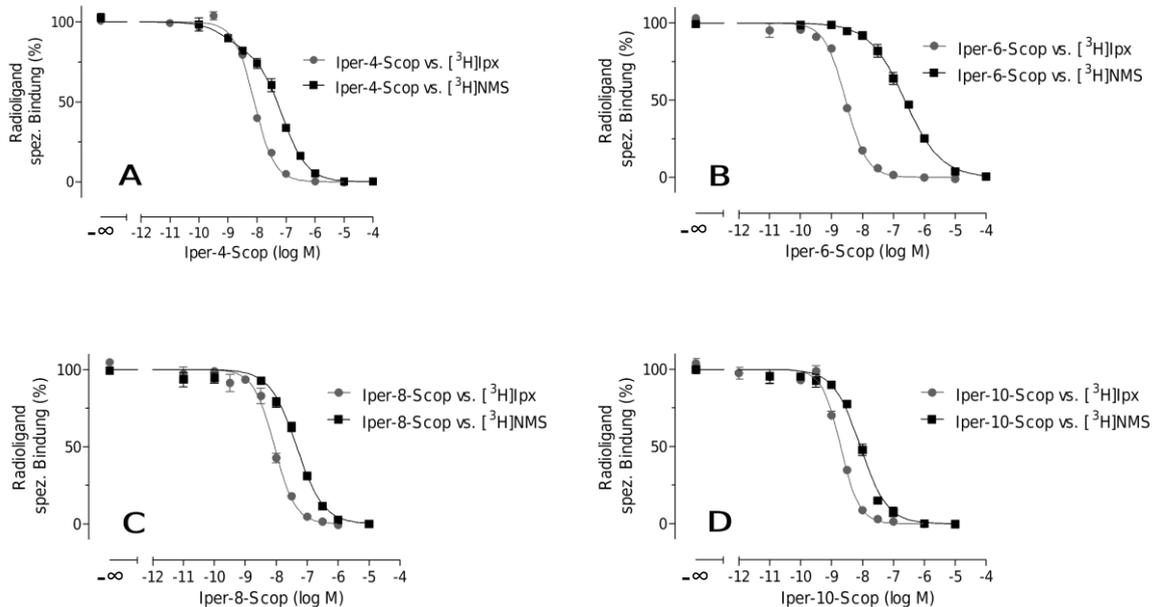


Abbildung 9: Einfluss des orthosterischen Radioliganden auf die Bindungsaffinität der Hybridliganden aus Iperoxo und Scopolamin. Ordinate: Spezifische Bindung der Radioliganden [3 H]Iperoxo (Kreise) bzw. [3 H]NMS (Quadrate) in Prozent des Wertes in Abwesenheit von Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen Bindung in Gegenwart von 10 μ M Atropin. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Hybridsubstanzen aus Iperoxo und Scopolamin. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Gleichung 7 (vgl. Kapitel 3.3.2). Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Mittelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung erhoben.

4.1.3 Der antagonistische Baustein bewirkt Unterschiede der Affinitätsparameter der Hybridsubstanzen im Bindungsgleichgewicht

Dieses Kapitel verdeutlicht den Einfluss des antagonistischen Hybridbausteines auf die Bindungsaffinität. Verglichen wurden Hybridsubstanzen gleicher Verbindungskettenlänge aber mit unterschiedlichem antagonistischem Baustein.

Iperoxo-4-Atropin und Iperoxo-4-Scopolamin zeigten im [3 H]NMS-Bindungsexperiment keinen signifikanten Unterschied ihrer pK_i -Werte (vgl. Abb. 10 A und Tab. 7 in Kapitel 4.1.5, T-Test, $P < 0.05$). Bei dieser sehr kurzen Länge der Verbindungskette hatte der antagonistische Baustein keinen signifikanten Einfluss auf

den Parameter für die Bindungsaffinität. Anders hingegen sah es aus, wenn die Verbindungskette länger war. Bei allen weiteren Testverbindungen (C = 6, 8, 10) zeigte sich, dass Verbindungen mit Atropin als antagonistischem Baustein eine höhere Affinität im $[^3\text{H}]$ NMS-Bindungsexperiment aufwiesen, als solche mit Scopolamin als antagonistischem Baustein jedoch gleicher Kettenlänge (vgl. Abb. 10 B-D und Tab. 7 in Kapitel 4.1.5, T-Test, $P < 0.05$).

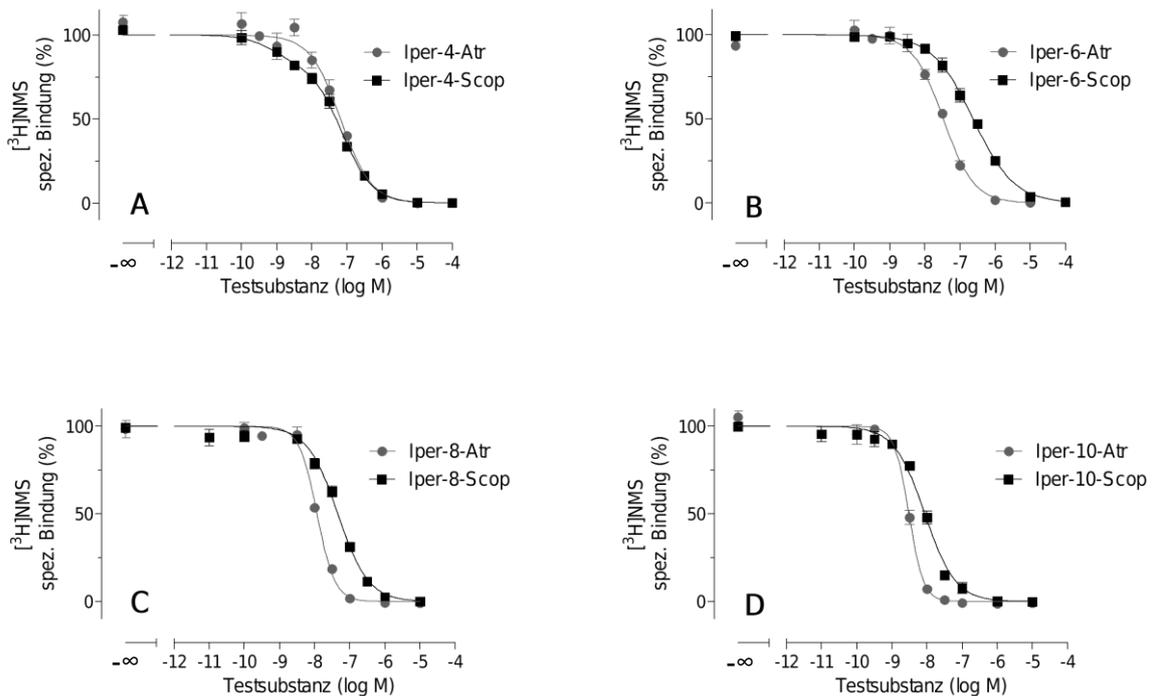


Abbildung 10: Einfluss des antagonistischen Bausteins der Hybridsubstanzen auf die Bindungsaffinität im $[^3\text{H}]$ NMS-Gleichgewichtsbindungsexperiment.

Ordinate: Spezifische $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung in Prozent des Wertes in Abwesenheit der Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen Bindung in Gegenwart von 10 μM Atropin. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Hybridsubstanzen aus Iperoxo und Atropin (Kreise) bzw. aus Iperoxo und Scopolamin (Quadrate). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Gleichung 7 (vgl. Kapitel 3.3.2). Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Mittelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung erhoben.

Auch im $[^3\text{H}]$ Iperoxo-Bindungsexperiment zeigten die Hybridsubstanzen der Kettenlänge mit vier Kohlenwasserstoffen und unterschiedlichen antagonistischen Bausteinen keinen signifikanten Unterschied in ihrer Bindungsaffinität (vgl. Abb. 11 A und Tab. 7 in Kapitel 4.1.5, T-Test, $P < 0.05$). Wie auch im $[^3\text{H}]$ NMS-Bindungsexperiment war auch im $[^3\text{H}]$ Iperoxo-Bindungsexperiment bei den

Verbindungen mit längerer Kette (C = 6, 8) sehr wohl ein Affinitätsunterschied feststellbar. Interessanterweise besaßen im [³H]Iperoxo-Bindungsexperiment jedoch die Verbindungen mit Scopolamin als antagonistischem Baustein und gleicher Kettenlänge die signifikant höhere Affinität als jene mit Atropin (vgl. Abb. 11 B-C, T-Test, P<0.05). Beim Vergleich von Iperoxo-10-Atropin und Iperoxo-10-Scopolamin konnte ein solcher signifikanter Unterschied jedoch nicht festgestellt werden (vgl. Abb. 11 D und Tab. 7 in Kapitel 4.1.5, T-Test, P<0.05).

Diese Ergebnisse stehen in klarem Kontrast zueinander und legen nahe, dass der antagonistische Baustein einen großen Einfluss auf das Bindungsverhalten der Hybridsubstanzen hat. Iperoxo-Atropin-Hybride zeigten relativ zu Iperoxo-Scopolamin-Hybriden eine höhere Affinität im [³H]NMS-Bindungsexperiment und damit zum G-protein-entkoppelten Rezeptorzustand (Abb. 10). Iperoxo-Scopolamin-Hybride hingegen zeigten relativ zu Iperoxo-Atropin-Hybriden eine höhere Affinität im [³H]Iperoxo-Bindungsexperiment und damit zum G-protein-gekoppelten M₂-Rezeptor (Abb. 11).

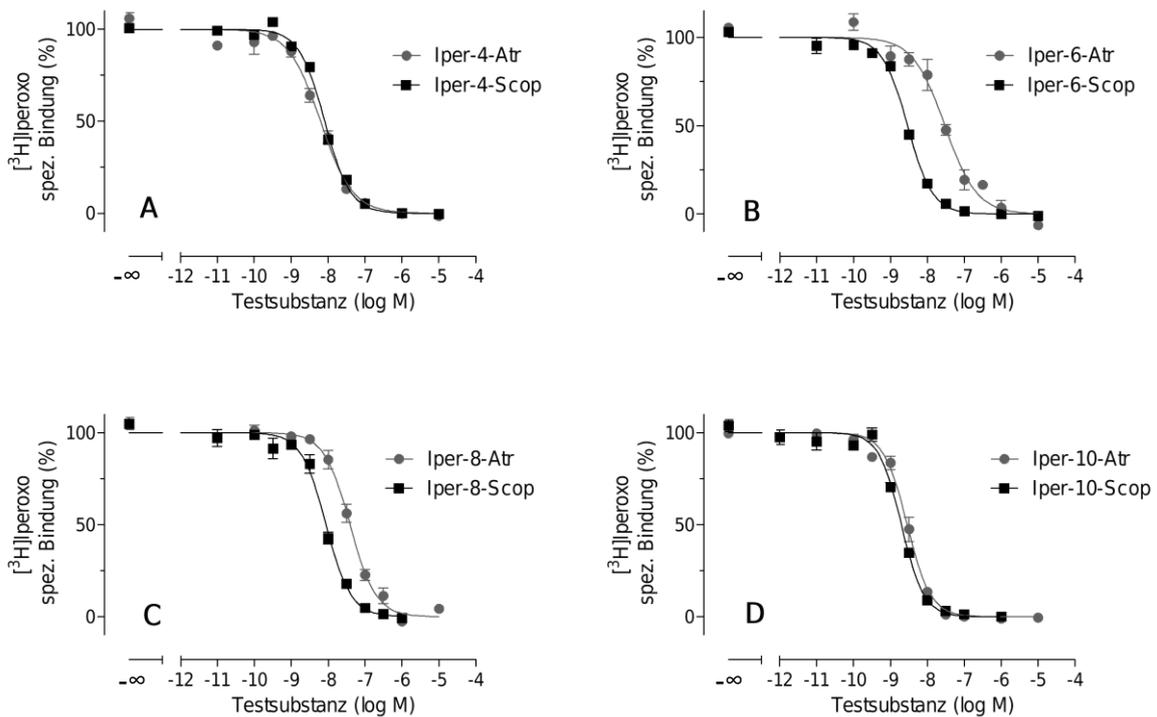


Abbildung 11: Einfluss des antagonistischen Bausteins der Hybridsubstanzen auf die Bindungsaffinität im $[^3\text{H}]$ Iperoxo-Bindungsexperiment. Ordinate: Spezifische $[^3\text{H}]$ Iperoxo-Bindung in Prozent des Wertes in Abwesenheit der Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen Bindung in Gegenwart von $10\ \mu\text{M}$ Atropin. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Hybridsubstanzen aus Iperoxo und Atropin (Kreise) bzw. Iperoxo und Scopolamin (Quadrate). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Gleichung 7 (vgl. Kapitel 3.3.2). Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Mittelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung erhoben.

4.1.4 Die Agonist-Fragmente Iper-4 und Iper-8 zeigen Biphasizität ihres Bindungsverhaltens

Um den Einfluss des antagonistischen Bausteines weiter zu beleuchten, wurden Fragmente der Hybridsubstanzen mit einer Verbindungskette von vier bzw. acht Kohlenwasserstoffen im Gleichgewichtsbindungsexperiment untersucht. Die Fragmente bestanden aus dem agonistischen Baustein Iperoxo und der aliphatischen Verbindungskette (Strukturformeln vgl. Kapitel 2.1.6). Der antagonistische Baustein Atropin oder Scopolamin war in diesen Verbindungen nicht vorhanden. Damit war es möglich zu differenzieren, welche Beeinflussung der Bindung von der Verbindungskette ausgeht und welcher Einfluss auf den antagonistischen Baustein zurückzuführen ist. Sowohl für das Fragment Iperoxo-4 als auch für Iperoxo-8, war eine signifikant biphasische Regressionskurve (F-Test, $P < 0.05$) Resultat der

Gleichgewichtsbindungsexperimente (vgl. Abb. 12 A und B). Die Fragmente verhielten sich also im Bindungsexperiment ähnlich dem reinen Superagonisten Iperoxo, der ebenfalls eine biphasische Bindungskurve zeigte (vgl. Abb. 7 A in Kapitel 4.1.1.). Dies lässt einen vollagonistischen Charakter der beiden Fragmente hypothetisieren (Tota und Schimerlik 1990). Die pK_i -Werte für die hochaffine und die niedrigaffine Bindung lagen bei Iperoxo im Vergleich zu den Fragmenten jedoch bei signifikant geringeren Konzentrationen (vgl. Tab. 7 in Kapitel 4.1.5). Die Fragmente binden also an den G-Protein gekoppelten Rezeptor mit höherer Affinität als an den nicht G-Protein gekoppelten Rezeptor, dies jedoch erst in signifikant höheren Konzentrationsbereichen als der reine Superagonist Iperoxo (Iperoxo $pK_i(1) = 9,49 \pm 0,60$, $pK_i(2) = 7,44 \pm 0,15$; Iperoxo-4 $pK_i(1) = 7,50 \pm 0,31$, $pK_i(2) = 5,21 \pm 0,02$; Iperoxo-8 $pK_i(1) = 7,25 \pm 0,63$, $pK_i(2) = 5,48 \pm 0,50$, immer M.W. \pm S.E.M). Zwischen den Affinitätsparametern der hochaffinen und der niedrigaffinen Bindung beider Fragmente (Iperoxo-4 und Iperoxo-8) gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied (Iperoxo-4 $pK_i(1) = 7,50 \pm 0,31$, $pK_i(2) = 5,21 \pm 0,02$; Iperoxo-8 $pK_i(1) = 7,25 \pm 0,63$, $pK_i(2) = 5,48 \pm 0,50$, immer M.W. \pm S.E.M). Ob die Verbindungskette vorhanden ist oder nicht hat demnach einen Einfluss auf die Bindungsaffinität der Testverbindungen. Ob die Kette jedoch vier (Iperoxo-4) oder acht (Iperoxo-8) Kohlenwasserstoffe enthält, wirkt sich auf die Bindungsaffinität nicht signifikant aus (T-Test, $P < 0.05$).

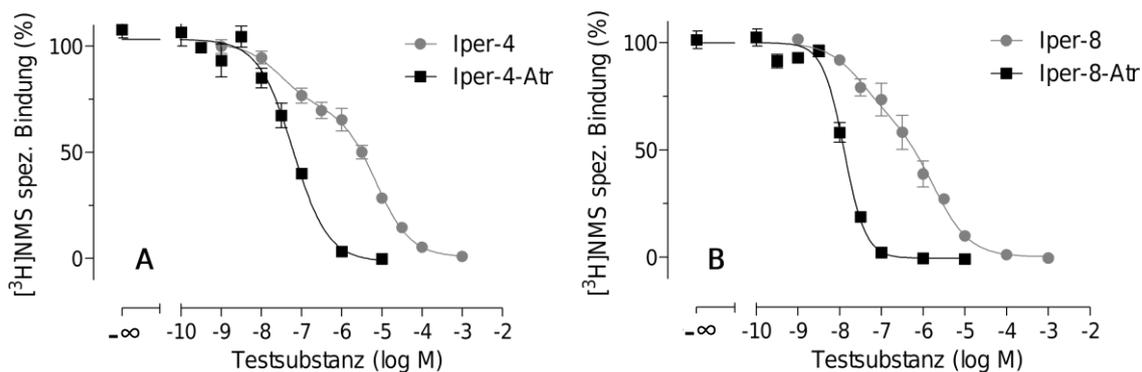


Abbildung 12: Einfluss des antagonistischen Bausteins zweier Hybridsubstanzen und ihrer Fragmente im $[^3\text{H}]$ NMS-Gleichgewichtsbindungsexperiment. Ordinate: Spezifische $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung in Prozent des Wertes in Abwesenheit der Testsubstanzen. 0% entspricht der unspezifischen Bindung in Gegenwart von 10 μM Atropin. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Fragmente aus Iperoxo und der aliphatischen Kohlenwasserstoff-Kette (Kreise) bzw. der Hybridsubstanzen aus Iperoxo und Atropin (Quadrate). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Gleichung 7 (vgl. Kapitel 3.3.2). Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus vier voneinander unabhängigen Versuchen. Die Mittelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung ermittelt.

Die Hybridsubstanzen wiesen, im Gegensatz zu ihren Fragmenten, eine monophasische Bindungskurve auf (vgl. Abb. 12 A und B, vgl. auch Kapitel 4.1.2 und 4.1.3). Beide Rezeptorzustände (hochaffiner und niedrigaffiner Rezeptorzustand) wurden also mit gleicher Affinität gebunden, was bedeuten könnte, dass es sich bei den Hybridsubstanzen wahrscheinlich um Partialagonisten am M_2 -Rezeptor handelt (Tota und Schimerlik 1990). Die Einführung des antagonistischen Bausteins führte demnach zu einer Veränderung des Bindungsverhaltens, das bei den Fragmenten noch nicht zu beobachten war. Die Verbindungskette allein bewirkt diese Veränderung im Bindungsverhalten also noch nicht, es ist ein Resultat des antagonistischen Bausteins.

4.1.5 Einfluss der Verbindungskettenlänge auf die Bindungsaffinität der Hybridsubstanzen

Nachdem der Einfluss der Bausteine und des verwendeten Radioliganden auf die Bindungsaffinität der Hybridsubstanzen untersucht wurde, wird sich dieses Kapitel nun dem Einfluss der Länge der Verbindungskette widmen. Hierzu wurden die pK_i -Werte von Hybridsubstanzen mit gleichen Bausteinen jedoch unterschiedlicher Kettenlänge

gegenüber demselben Radioliganden bestimmt und in Form eines Balkendiagrammes gegenübergestellt (vgl. Abb. 13).

Die Testverbindungen aus Iperoxo und Atropin zeigten mit steigender Kettenlänge im Gleichgewichtsbindungsexperiment gegenüber [³H]NMS eine Erhöhung des pK_i-Wertes als Masszahl für ihre Bindungsaffinität (vgl. Abb. 13 A). Alle pK_i-Werte unterschieden sich hier signifikant voneinander (vgl. Tab. 7). Je mehr Kohlenwasserstoffe die Verbindungskette enthielt, desto höher war die Bindungsneigung der jeweiligen Testsubstanz für den M₂-Rezeptor.

Testverbindungen bestehend aus Iperoxo und Scopolamin zeigten eine ähnliche Rangordnung der Bindungskonstanten an M₂-Rezeptoren im Gleichgewichtsbindungsexperiment gegenüber [³H]NMS. Auch hier nahm die Affinität für den untersuchten Rezeptor, beginnend mit Iperoxo-6-Scopolamin mit steigender Länge der Verbindungskette zu (vgl. Abb. 13 C). Nur Iperoxo-4-Scopolamin passte nicht in diese Reihe und lag mit seiner Affinität (pK_i = 7,48 ± 0,14, M.W. ± S.E.M., n=3) auf gleichem Niveau wie Iperoxo-8-Scopolamin (pK_i = 7,41 ± 0,09, M.W. ± S.E.M., n=3).

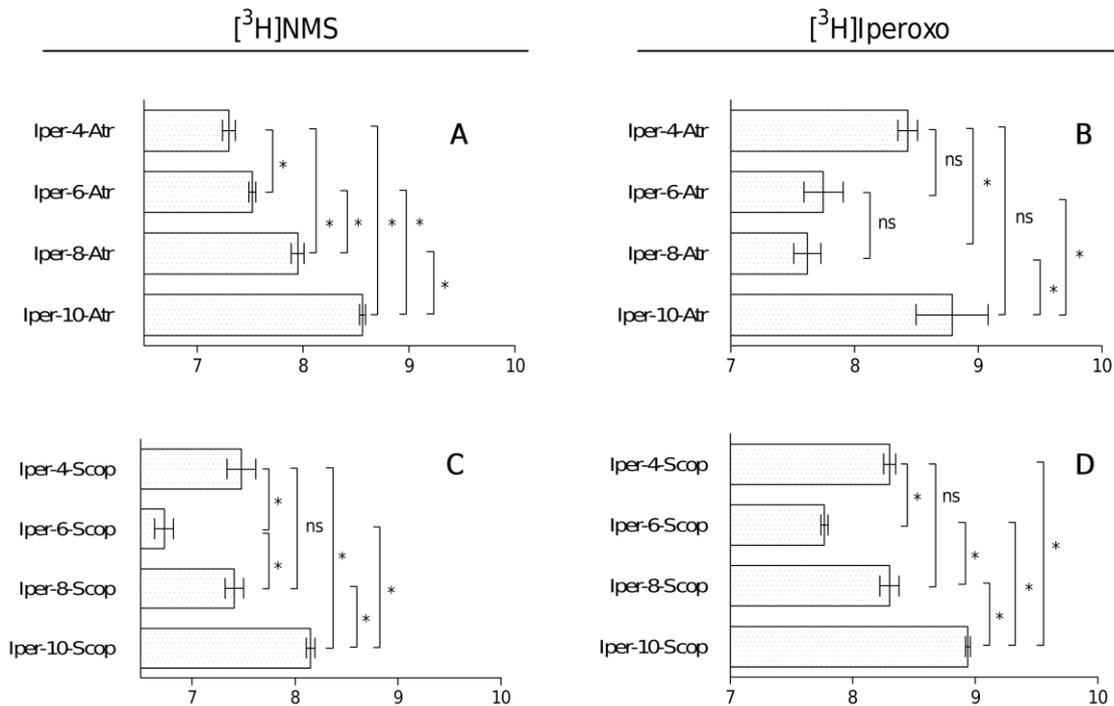


Abbildung 13: Einfluss der Länge der aliphatischen Kohlenwasserstoff-Kette zwischen agonistischem und invers agonistischem Baustein der Hybridsubstanzen auf ihre Bindungskonstante. Ordinate: Bezeichnung der Testsubstanz. Abszisse: pK_i -Werte: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_i berechnet nach Gleichung 8 (vgl. Kapitel 3.3.2). Die pK_i -Werte beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n = -1$ (konstant). Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehler aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmungen erhoben. *: Werte unterscheiden sich signifikant voneinander. ns: kein signifikanter Unterschied. Eckige Klammern zeigen einen Vergleich unter zwei Verbindungen. Berechnung der Signifikanz mit One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison post-hoc Test $P < 0,05$.

Im Gleichgewichtsbindungsexperiment zeigte sich im Falle der Hybridsubstanzen aus Iperoxo und Atropin gegenüber $[^3\text{H}]$ Iperoxo ein gänzlich anderes Bild als gegenüber $[^3\text{H}]$ NMS. Iperoxo-4-Atropin nahm stark an Affinität zu und unterscheidet sich mit seinem $pK_i = 8,43 \pm 0,08$ (M.W. \pm S.E.M., $n=3$) nicht mehr signifikant von dem von Iperoxo-10-Atropin ($pK_i = 8,79 \pm 0,29$, M.W. \pm S.E.M., $n=3$; vgl. Abb. 13 B). Iperoxo-6-Atropin und Iperoxo-8-Atropin unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant voneinander. Iperoxo-8-Atropin weist aber eine signifikant geringere Affinität als Iperoxo-4-Atropin und Iperoxo-10-Atropin auf (vgl. Abb. 13 B).

Iperoxo-Scopolamin Hybridsubstanzen zeigten im Bindungsexperiment gegenüber $[^3\text{H}]$ Iperoxo im Profil den gleichen Einfluss der Kettenlänge auf die Bindungskonstante pK_i wie im Gleichgewichtsbindungsexperiment gegenüber $[^3\text{H}]$ NMS. Die

Bindungskonstanten wurden im Durchschnitt um eine Dekade größer (vgl. Kapitel 4.1.2 und Abb. 9), die Rangfolge blieb dabei die gleiche. Der pK_i Wert für den untersuchten M_2 -Rezeptor nahm ab Iperoxo-6-Scopolamin mit steigender Länge der Verbindungskette zu (vgl. Abb. 13 D). Nur Iperoxo-4-Scopolamin passte abermals nicht in die Reihe und lag mit seiner Affinität ($pK_i = 8,30 \pm 0,05$, M.W. \pm S.E.M., $n=4$) auf gleichem Niveau wie Iperoxo-8-Scopolamin ($pK_i = 8,30 \pm 0,08$, M.W. \pm S.E.M., $n=3$).

Testsubstanz	$[^3H]NMS$			$[^3H]Iperoxo$		
	pK_i	SEM	N	pK_i	SEM	N
Iperoxo	7,85 9,49/7,44	0,18 0,60/0,15	8	9,99	0,12	3
Atropin	8,49	0,15	6	8,00	0,08	3
Iperoxo-4-Atropin	7,30	0,06	3	8,43	0,08	3
Iperoxo-6-Atropin	7,52	0,03	3	7,75	0,16	3
Iperoxo-8-Atropin	7,95	0,06	3	7,62	0,11	3
Iperoxo-10-Atropin	8,56	0,03	3	8,79	0,29	3
Iperoxo-4-Scopolamin	7,48	0,14	3	8,30	0,05	4
Iperoxo-6-Scopolamin	6,73	0,09	3	8,77	0,03	3
Iperoxo-8-Scopolamin	7,41	0,09	3	8,30	0,08	3
Iperoxo-10-Scopolamin	8,15	0,04	3	8,94	0,02	3
Iperoxo-4	5,65 7,50/5,21	0,17 0,31/0,02	4	k.A.	k.A.	k.A.
Iperoxo-8	6,39 7,25/5,48	0,26 0,63/0,50	4	k.A.	k.A.	k.A.

Tabelle 7: Pharmakologische Parameter der Interaktion der angegebenen Testverbindungen mit $[^3H]NMS$ bzw. $[^3H]Iperoxo$ an M_2 -Rezeptoren. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus n unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung erhoben. Die Auswertung der Daten erfolgte nach Gleichung 7 (vgl. Kapitel 3.3.2). pK_i : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_i berechnet nach Gleichung 8. Die pK_i -Werte beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n = -1$ (konstant).

4.2 Bindungsverhalten der Hybridsubstanzen an der allosterischen Bindungsstelle des M₂-Rezeptors

In früheren Arbeiten des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. Mohr wurden bereits allosterisch-orthosterische Hybridliganden untersucht (z.B. Antony et al. 2009, Bock et al. 2012, Bock et al. 2014b Chirinda 2015; Krebs 2017). Die in diesen Arbeiten geprüften Testverbindungen bestanden unter anderem aus einem orthosterischen Agonisten, wie, dem auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten, Iperoxo und einem allosterischen Modulator in Form eines Phthalimid- oder Naphthalimidrestes. Verbunden waren die Bausteine mit einer aliphatischen Verbindungskette aus z.B. sechs Kohlenwasserstoffen (namentlich dann Iper-6-Phthal und Iper-6-Naph). Bei diesen Verbindungen war es wichtig, neben ihrer Interaktion mit der orthosterischen Bindungsstelle (durch den orthosterischen Baustein) auch jene mit der allosterischen Bindungsstelle (durch den allosterischen Baustein), also die allosterische Affinität, zu untersuchen. Hierzu wurde die Methode der „2-Punkt-Kinetik“ nach Kostenis und Mohr 1996 genutzt (vgl. Kapitel 3.3.4.2). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hybridsubstanzen beinhalten keinen allosterischen Modulator, sondern bestehen aus zwei orthosterisch bindenden Bausteinen. Nichtsdestotrotz wurden auch hier „2-Punkt-Kinetik-Experimente“ mit Hilfe des Radioliganden [³H]NMS durchgeführt, um eine mögliche allosterische Affinität an orthosterisch besetzten M₂-Rezeptoren zu quantifizieren. Auf der Basis vorhandener Literatur (z.B. Tränkle et al. 1996) wurden niedrige Affinitätswerte für die untersuchten Verbindungen hypothetisiert. Es erschien jedoch interessant zu prüfen, ob die Hybridsubstanzen eine signifikant höhere Bindungsneigung für die allosterische Bindungsstelle aufweisen als ihre Bausteine allein.

4.2.1 Bindungsneigung von Iperoxo und Atropin zur allosterischen Bindungsstelle

Im ersten Schritt dieser Versuchsreihe der „2-Punkt-Kinetischen-Experimente“ wurde die allosterische Bindungsneigung von Iperoxo und Atropin zum M₂-Rezeptor untersucht. Iperoxo ist der funktionell superagonistische Baustein an M₂-Rezeptoren der in dieser Arbeit untersuchten Hybridliganden und Atropin ein invers agonistischer

Baustein. Atropin steht hierbei auch stellvertretend für Scopolamin, welches in dieser Arbeit nicht auf seine allosterische Affinität hin untersucht wurde. Da beide Bausteine klassische orthosterische Liganden sind, war keine hohe Bindungsneigung zur allosterischen Bindungsstelle zu erwarten (Tränkle et al. 1996). Dies bestätigte sich in Experimenten, in denen Iperoxo einen $pEC_{0,5 \text{ diss}}$ Wert von $2,46 \pm 2,24$, $n=3$ und Atropin einen $pEC_{0,5 \text{ diss}}$ Wert von $3,27 \pm 0,07$, $n=3$ aufwies (immer M.W. \pm S.E.M., vgl. Abb. 14 und Tab. 8 in Kapitel 4.2.2). In Gegenwart dieser Konzentration ist die Halbwertszeit der Dissoziation des Radioliganden unter Kontrollbedingungen jedoch *nicht* verdoppelt, da von beiden Testverbindungen eine Maximalkonzentration von 1 mM eingesetzt wurde, um in physiologisch relevanten Konzentrationen zu bleiben, womit weder die Kurve von Iperoxo noch die von Atropin ein unteres Plateau erreichte (vgl. Kapitel 3.3.4). Um trotzdem einen Eindruck des Kurvenverlaufes bis hin zu einer Substanzkonzentration von 10 mM zu erreichen, wurden das obere Plateau und das Steilheitsmaß nH der Konzentrations-Effekt-Kurven (vgl. Abb. 14) auf 100% bzw. -1 konstant gesetzt. Dadurch war es möglich, von beiden Kurven $pEC_{0,5 \text{ diss}}$ -Werte zu ermitteln. Der $pEC_{0,5 \text{ diss}}$ der Iperoxo-Kurve wies jedoch einen Fehler von 91% ($2,46 \pm 2,24$, M.W. \pm S.E.M.) auf, wodurch statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen den $pEC_{0,5 \text{ diss}}$ -Werten von Iperoxo und Atropin festgestellt werden konnte (vgl. Tab. 7). Weiterhin wurde das untere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven von Iperoxo ($51,83 \pm 196,20$, M.W. \pm S.E.M.) und von Atropin ($18,71 \pm 6,40$, M.W. \pm S.E.M.) bestimmt. Das untere Plateau von Iperoxo ist durch den großen Fehler nicht signifikant unterschiedlich von Null. Das untere Plateau von Atropin weist jedoch einen signifikanten Unterschied von Null auf und lässt damit die Aussage zu, dass Atropin nicht in der Lage ist, die Dissoziation von $[^3H]NMS$ vollständig zu verzögern. Diese Aussage kann für Iperoxo auf statistischer Basis nicht getroffen werden.

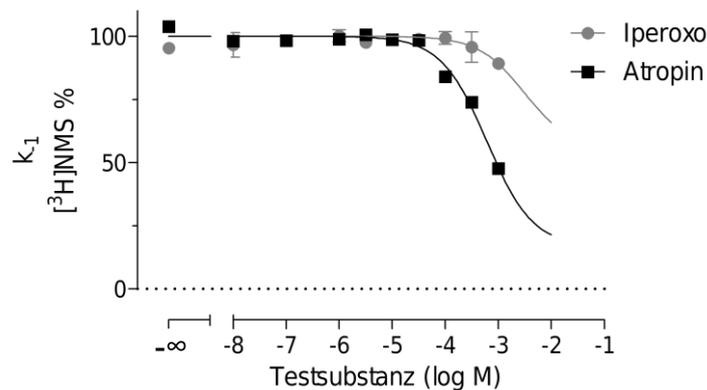


Abbildung 14: Affinität der Hybrid-Bausteine Iperoxo und Atropin für die allosterische Bindungsstelle des M₂-Rezeptors. Dargestellt sind Konzentrations-Effekt-Kurven für die allosterische Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation durch die orthosterischen Hybridligand-Bausteine Iperoxo (Kreise, grau) und Atropin (Quadrate, schwarz). Ordinate: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} , normiert auf das obere Plateau (=100%). 0% entspricht einer unendlichen Verzögerung der Radioligand-Dissoziation. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Gleichung 7. Die k_{-1} -Werte stammen aus „2-Punkt-Kinetik-Experimenten“ und wurden durch monophasische Analyse (Gleichung 14) erhalten. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testverbindungen. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Einzelwerte wurden in Doppelbestimmung erhoben. Die Konzentrations-Effekt-Kurven wurden bis zu den Effekten zehnfach höherer Konzentrationen, als experimentell untersucht werden konnten, extrapoliert (Kurvenverlängerung ohne Datenpunkte).

4.2.2 Bindungsneigung von Iperoxo-Atropin- und Iperoxo-Scopolamin- Hybriden für die allosterischen Bindungsstelle

Nachdem beleuchtet wurde, dass die Einzelbausteine Iperoxo und Atropin nur eine äußerst geringe Bindungsneigung zur allosterischen Bindungsstelle aufweisen (vgl. Kapitel 4.2.1), war es nun interessant zu prüfen, ob sich dies bei den Hybridsubstanzen anders verhielt. Insbesondere sollte der Einfluss des antagonistischen Bausteins und der Länge der Verkettung auf die allosterische Bindungsneigung herausgestellt werden. Mittels One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test ($P < 0,05$) wurden die $-\log$ Wendepunkte ($pEC_{0,5 \text{ diss}}$) der Einzelkurven untereinander verglichen. Außerdem wurde mit Hilfe des T-Tests ($P < 0,05$) das untere Plateau einer jeden Kurve mit $k_{-1} = 0\%$ verglichen, um zu ergründen, ob die jeweilige Testsubstanz eine vollständige Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation erreicht.

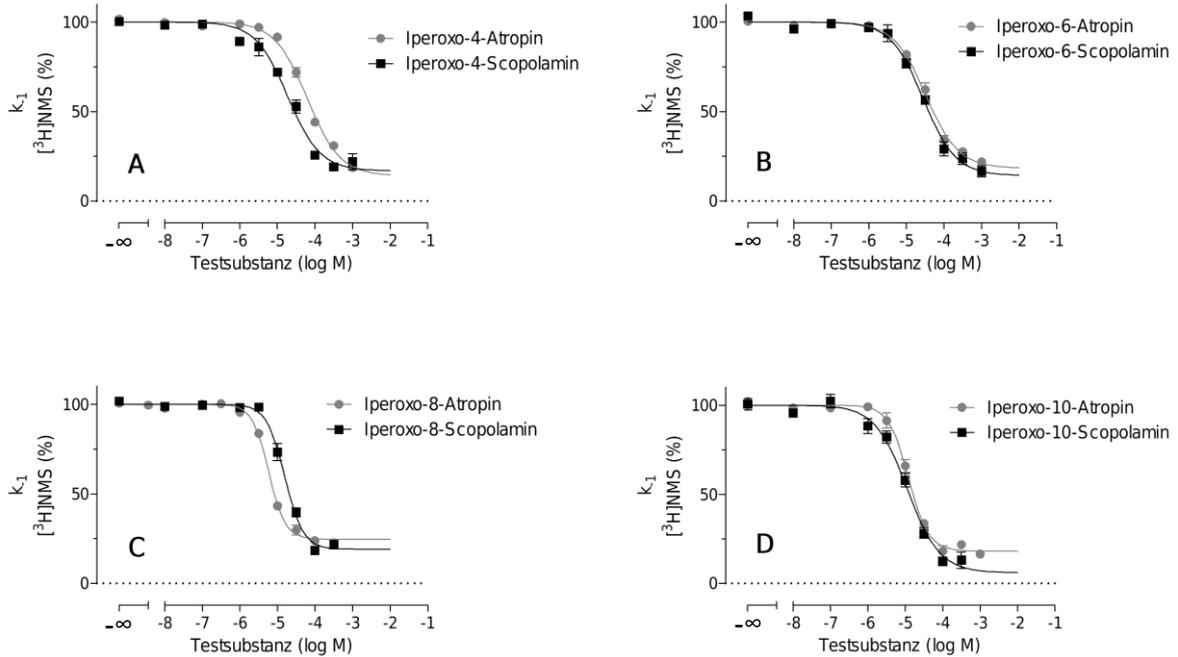


Abbildung 15: Affinität der Hybridsubstanzen aus Iperoxo und Atropin sowie aus Iperoxo und Scopolamin für die allosterische Bindungsstelle des M_2 -Rezeptors.

Dargestellt sind Konzentrations-Effekt-Kurven für die allosterische Verzögerung der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation durch die orthosterisch-orthosterischen Iperoxo-Atropin-Hybridliganden (Kreise, grau) und Iperoxo-Scopolamin-Hybridliganden (Quadrate, schwarz). Ordinate: Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der Dissoziation des Radioliganden, normiert auf das obere Plateau (= keine Verzögerung = 100%). 0% entspricht einer unendlichen Verzögerung der Radioligand-Dissoziation. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Gleichung 7. Die k_{-1} -Werte stammen aus „2-Punkt-Kinetik-Experimenten“ und wurden durch monophasische Analyse (Gleichung 14) erhalten. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testverbindungen. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Versuchen. Die Einzelwerte wurden in Form von Doppelbestimmungen erhoben. Die Konzentrations-Effekt-Kurven wurden bis zu den Effekten zehnfach höherer Konzentrationen, als experimentell untersucht werden konnten, extrapoliert (Kurvenverlängerung ohne Datenpunkte).

Keine der untersuchten Testverbindungen, seien es Iperoxo-Atropin oder Iperoxo-Scopolamin Hybride, waren in der Lage die $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation bis auf $k_{-1} = 0$ zu reduzieren (vgl. Abb. 15 und 16). Die ausgeprägteste maximale Verzögerung um den Faktor 17 erreichte Iperoxo-10-Scopolamin mit einem unteren Plateau von $6,03\% \pm 2,98$ (M.W. \pm S.E.M.). Die geringste maximale Verzögerung um den Faktor 4 erreichte Iperoxo-8-Atropin mit einem unteren Plateau von $24,61\% \pm 1,17$ (M.W. \pm S.E.M.). Die anderen Hybridliganden erreichten ein unteres Plateau zwischen 14,05% und 18,99%. Es lässt sich zusammenfassen, dass, außer im Falle der Hybridsubstanzen mit einer Verbindungskettenlänge von vier Kohlenwasserstoffen, immer die Iperoxo-

Scopolamin-Hybride ein signifikant geringeres unteres Plateau erreichten als ihre Verwandten aus Iperoxo und Atropin (vgl. Abb. 16).

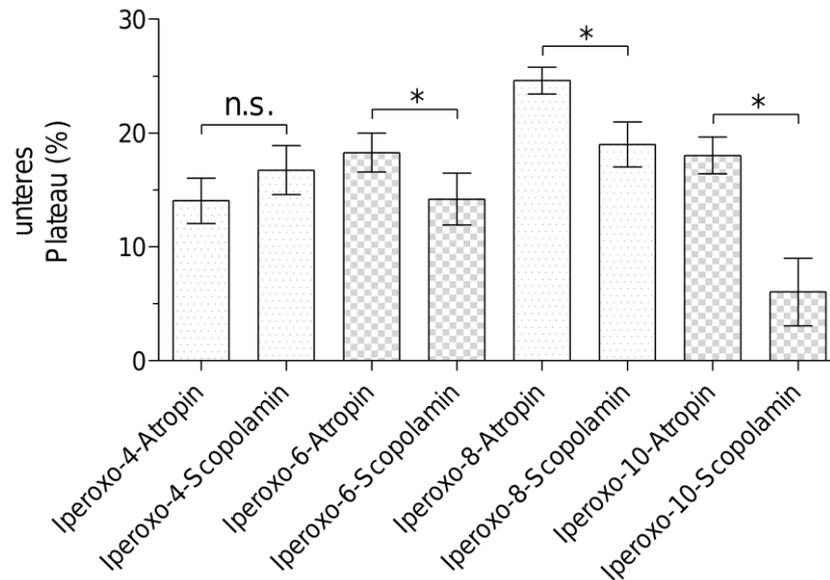


Abbildung 16: Maximale Verzögerung der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation der Iperoxo-Atropin-Hybride verglichen mit den Iperoxo-Scopolamin-Hybriden. Dargestellt sind die unteren Plateaus in % der Konzentrations-Effekt-Kurven für die allosterische Verzögerung der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation durch die orthosterisch-orthosterischen Iperoxo-Atropin-Hybridliganden und Iperoxo-Scopolamin-Hybridliganden. Ordinate: unteres Plateau (%). Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanz. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler aus mindestens zwei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung erhoben. *: Werte unterscheiden sich signifikant voneinander. ns: Kein signifikanter Unterschied. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels T-Test, $P < 0,05$. Alle Werte für das untere Plateau sind signifikant unterschiedlich von $k_{-1} = 0\%$.

Der statistische Vergleich aller $p\text{EC}_{0,5\text{diss}}$ -Werte untereinander mittels One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test ($P < 0,05$) konnte keine signifikanten Unterschiede belegen. Weder die Hybridverbindungen mit gleicher Verbindungskettenlänge noch die Hybride mit gleichem antagonistischem Baustein, jedoch verschiedenen Kettenlängen, erzielten signifikant unterschiedliche Wendepunkte. Damit ist die allosterische Affinität für alle Hybridsubstanzen im millimolaren Bereich gleich ausgeprägt (vgl. Tab. 8). Die allosterische Bindung, und in der Folge die $[^3\text{H}]$ NMS-dissoziationsverzögernde Wirkung, tritt demnach erst in unphysiologisch hohen Konzentrationen ein. Es ist folglich davon auszugehen, dass in allen, in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten, in denen die Konzentrationen der Testsubstanzen durchweg unterhalb des millimolaren Bereichs

liegen, hauptsächlich die orthosterische Bindung der Verbindungen Einfluss auf das Messergebnis hat. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der anfänglichen Hypothese, dass es sich bei den untersuchten Hybriden um orthosterisch-orthosterische Hybridsubstanzen handelt, die keine relevante allosterische Wirkung entfalten. Diese Untersuchung stützt außerdem die Vermutung, dass der Bindungsmodus der Hybridsubstanzen hauptsächlich orthosterischer Natur sein dürfte.

Besonders bemerkenswert ist der signifikante Unterschied der Effekte der Hybridsubstanzen verglichen mit denen ihrer Einzelbausteine (Iperoxo und Atropin). Die Hybridsubstanzen wiesen eine ca. 100-fach höhere Bindungsneigung zur allosterischen Bindungsstelle auf (vgl. Tab. 8).

Testsubstanz	pEC _{0,5 diss}	SEM	unteres Plateau (%)	SEM	N
Iperoxo	2,46	2,24	51,83	196,20	3
Atropin	3,27	0,07	18,71	6,40	3
Iperoxo-4-Atropin	4,20	0,04	14,05	1,98	3
Iperoxo-6-Atropin	4,48	0,04	18,28	1,72	3
Iperoxo-8-Atropin	5,23	0,02	24,61	1,17	2
Iperoxo-10-Atropin	4,91	0,03	18,03	1,62	2
Iperoxo-4-Scopolamin	4,72	0,05	16,74	2,16	3
Iperoxo-6-Scopolamin	4,55	0,05	14,20	2,29	3
Iperoxo-8-Scopolamin	4,80	0,03	18,99	1,98	3
Iperoxo-10-Scopolamin	4,95	0,06	6,03	2,98	3

Tabelle 8: Pharmakologische Parameter der Interaktion der angegebenen Testverbindungen mit [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus N unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Doppelbestimmung erhoben. Die Auswertung der Daten erfolgte nach Gleichung 7. Die k₋₁-Werte stammen aus „2-Punkt-Kinetik-Experimenten“ und wurden durch monophasische Analyse (Gleichung 14) erhalten. pEC_{0,5 diss}: negativer dekadischer Logarithmus des Wendepunktes der Konzentrations-Effekt-Kurve.

4.3 Aktivierung des G_i-Signalweges des M₂-Rezeptors

Nachdem die Experimente zum Bindungsverhalten der Hybridsubstanzen und ihrer Bausteine in den vorangegangenen Kapiteln behandelt wurden, soll im Folgenden die Art und das Ausmaß der Aktivierung des M₂-Rezeptors durch die Testverbindungen betrachtet werden. Der M₂-Rezeptor ist in der Lage neben dem präferentiellen G_i-Signalweg auch den G_s-Signalweg zu aktivieren (Kenakin 2003). Dies geschieht vor allem durch höhere Konzentrationen eines Agonisten, wodurch dieser Vorgang nicht nur von experimenteller, sondern durchaus auch von physiologischer Bedeutung ist (Antony et al. 2009). Zur Begutachtung des G_i-Signalweges wurden [³⁵S]GTPγS-Experimente an Membransuspensionen aus Flp-In-CHO-M₂-Zellen durchgeführt (vgl. Kapitel 3.4.1). Um das Ausmaß der Aktivierung des G_s-Signalweges zu quantifizieren wurden cAMP-Experimente an ganzen Flp-InTM-CHO-M₂-Zellen durchgeführt (vgl. Kapitel 3.4.2). Für beide Signalwege wurde herausgefunden, dass das Ausmaß der Rezeptoraktivierung durch die Hybridsubstanzen sowohl von der Länge der Verbindungskette, als auch vom verwendeten antagonistischen Baustein (Atropin oder Scopolamin) abhängig ist. Alle Hybridsubstanzen zeigten Partialagonismus auf beiden Signalwegen. Die Fragmente Iperoxo-8 und Iperoxo-4, also der agonistische Teil der Hybridsubstanzen zusammen mit der Verbindungskette, zeigten auf beiden Signalwegen vollagonistische Wirkung.

4.3.1 Iperoxo-Atropin Hybride zeigen Verbindungsketten-abhängigen Partialagonismus auf dem G_i-Signalweg

Die Hybridsubstanzen aus Iperoxo und Atropin wiesen im funktionellen Experiment der [³⁵S]GTPγS-Bindung einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Länge der aliphatischen Verbindungskette und dem Maximaleffekt (E_{max}) auf, den sie in der Lage waren auszulösen. Hybridsubstanzen mit kürzerer Verbindungskette besaßen einen größeren Maximaleffekt als Hybride mit längerer Verbindungskette. Je weniger Kohlenwasserstoffe die Verbindungskette demnach enthält, desto größer ist die maximale Wirksamkeit der Hybridsubstanz (vgl. Abb. 17 und 18 B). Alle Hybridsubstanzen zeigten jedoch eine signifikant geringere Wirksamkeit als Iperoxo, welcher in der vorliegenden Arbeit als Referenzagonist genutzt wurde (vgl. Abb. 18 B).

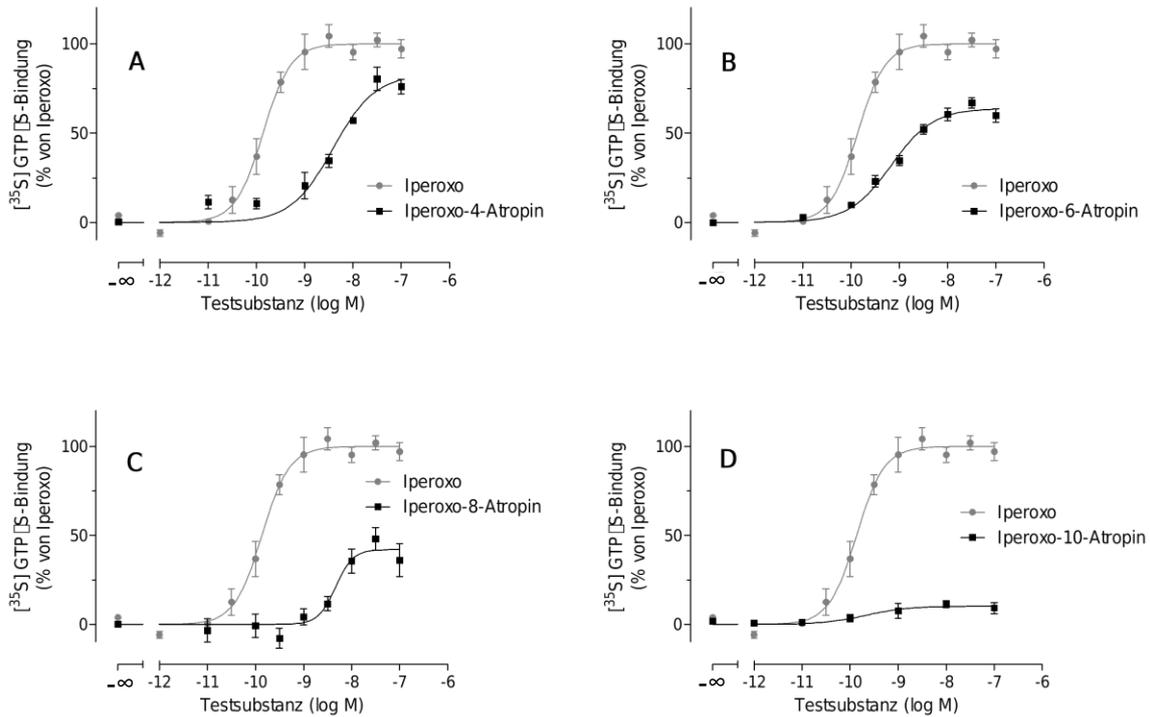


Abbildung 17: Durch Iperoxo-Atropin Hybride induzierte Förderung der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. Dargestellt sind Konzentrations-Effekt-Kurven für die Förderung der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung am M_2 -Rezeptor in Abhängigkeit von der Konzentration des Referenzagonisten Iperoxo (grau, Kreise) und der Hybridsubstanzen (schwarz, Quadrate). Ordinate: Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0% entspricht der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem oberen Plateau (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration. Die Kurvenanpassung erfolgte mit Gleichung 7. Die dargestellten Datenpunkte sind Mittelwerte mit Standardfehler aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmungen erhoben.

Iperoxo-4-Atropin zeigt mit einem oberen Plateau (E_{max}) von $83\% \pm 4$ (Angaben in „% von Iperoxo“, M.W. \pm S.E.M.) die höchste partialagonistische Wirkung aller untersuchten Hybridsubstanzen (vgl. Abb. 18 B und Tab. 9). Der E_{max} Wert ist signifikant kleiner als der für Iperoxo gemessene Wert und ist größer als diejenigen aller anderen Iperoxo-Atropin Hybride (vgl. Tab. 9). Der Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve (pEC_{50}) für Iperoxo-4-Atropin beträgt $\text{pEC}_{50} = 8,41 \pm 0,10$ (M.W. \pm S.E.M.) und ist damit mehr als eine Dekade weiter rechts, also bei höheren Substanzkonzentrationen platziert, als derjenige für Iperoxo (vgl. Tab. 9 und Abb. 18 A). Iperoxo-4-Atropin weist also eine signifikant geringere Wirkstärke als Iperoxo auf. Es hat außerdem eine geringere Wirkstärke als Iperoxo-6-Atropin ($\text{pEC}_{50} = 9,16 \pm 0,06$, M.W. \pm S.E.M.) und Iperoxo-10-Atropin ($\text{pEC}_{50} = 9,66 \pm 0,37$, M.W. \pm S.E.M.). Von

dem Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo-8-Atropin unterscheidet sich der pEC_{50} für Iperoxo-4-Atropin jedoch nicht (vgl. Tab. 9). Sie besitzen die gleiche Wirkstärke. Der $E_{max} = 64\% \pm 2$ (M.W. \pm S.E.M.) für Iperoxo-6-Atropin liegt signifikant unter dem Wert für Iperoxo-4-Atropin und mit seiner mehr als 20% höheren Wirksamkeit signifikant über Iperoxo-8-Atropin (vgl. Abb. 18 B und Tab. 9). Sein $pEC_{50} = 9,16 \pm 0,06$ (M.W. \pm S.E.M.) liegt bei signifikant höheren Konzentrationen als der Referenzagonist Iperoxo (vgl. Abb. 18 A und Tab. 9). Seine Wirkstärke verglichen mit der von Iperoxo-4-Atropin ist jedoch interessanterweise signifikant höher, obwohl es in seiner Wirksamkeit (E_{max}) geringer ist (vgl. Tab. 9 und Abb. 18 A).

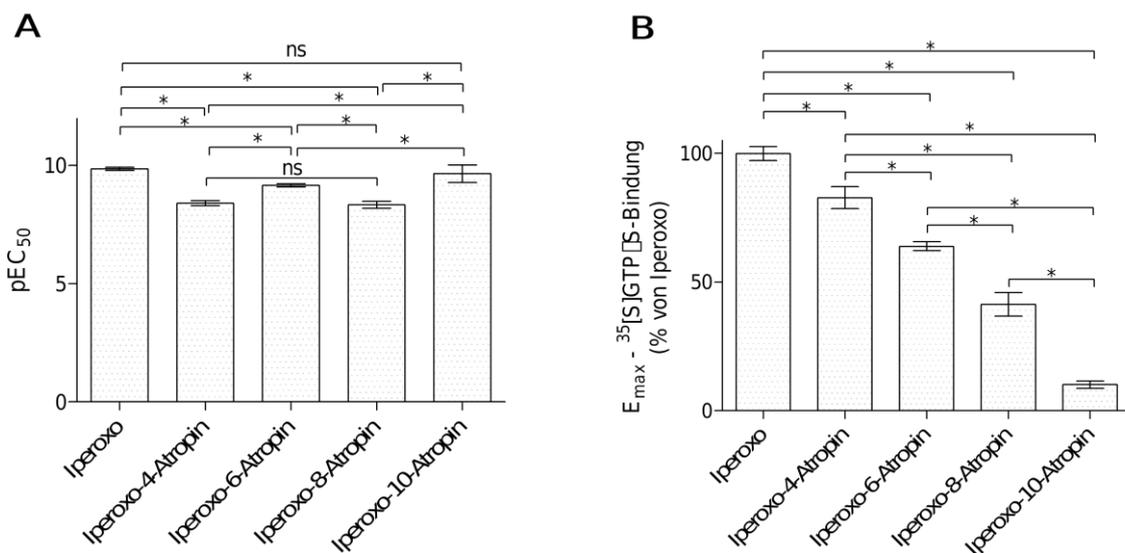


Abbildung 18: Einfluss der Länge der Verbindungskette in Iperoxo-Atropin Hybriden auf den pEC_{50} und in Bezug zur maximalen Förderung der $[^{35}S]$ GTP γ S-Bindung durch Iperoxo. (A) Dargestellt sind die pEC_{50} der Konzentrations-Effekt-Kurven des Referenzagonisten und der Hybride. Ordinate: pEC_{50} . Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanz. (B) Dargestellt sind die oberen Plateaus (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurven des Referenzagonisten und der Hybride. Ordinate: Prozentuale $[^{35}S]$ GTP γ S-Bindung. 0% entspricht der $[^{35}S]$ GTP γ S-Bindung in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem oberen Plateau (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanz. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung erhoben. *: Werte unterscheiden sich signifikant voneinander. ns: Kein signifikanter Unterschied. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test, $P < 0,05$.

Iperoxo-8-Atropin hat eine maximale Wirksamkeit von $41\% \pm 5$ (M.W. \pm S.E.M.) bezogen auf den Maximaleffekt von Iperoxo. Diese ist signifikant kleiner als diejenige von Iperoxo-6-Atropin ($E_{\max} = 64\% \pm 2$, M.W. \pm S.E.M.) und signifikant größer als die von Iperoxo-10-Atropin ($E_{\max} = 9\% \pm 1$, M.W. \pm S.E.M.). Iperoxo-8-Atropin besitzt einen pEC_{50} von $8,34 \pm 0,14$ (M.W. \pm S.E.M.). Damit hat es eine signifikant geringere Wirkstärke als Iperoxo sowie Iperoxo-6-Atropin; sie liegt auf gleichem Niveau wie diejenige für Iperoxo-4-Atropin (vgl. Abb. 17 C, 18 A und Tab. 9). Unter den Testverbindungen ist Iperoxo-10-Atropin die Hybridspezies mit der geringsten partialagonistischen Wirkung mit $E_{\max} = 10\% \pm 2$ (M.W. \pm S.E.M.), jedoch mit der größten Wirkstärke ($pEC_{50} = 9,66 \pm 0,37$, M.W. \pm S.E.M.). Die Wirkstärke ist nicht signifikant unterschiedlich von der des Referenzagonisten Iperoxo und befindet sich damit auf einem sehr hohen Niveau (vgl. Abb. 17 D, 18 A und Tab. 8). Alle Iperoxo-Atropin Hybride weisen demnach unterschiedliche maximale Wirksamkeiten (E_{\max}) auf, welche sich direkt mit der Länge der Verbindungskette in Zusammenhang bringen lassen (vgl. Abb. 18 B). Die Wirkstärken (pEC_{50}) der Testverbindungen korrelieren hingegen nicht mit der Verbindungskettenlänge (vgl. Abb. 18 A).

Testsubstanz	pEC_{50}	SEM	E_{\max} (%)	SEM	N
Iperoxo	9,86	0,06	100	3	6
Iperoxo-4-Atropin	8,41	0,10	83	4	4
Iperoxo-6-Atropin	9,16	0,06	64	2	4
Iperoxo-8-Atropin	8,34	0,14	41	5	5
Iperoxo-10-Atropin	9,66	0,37	10	2	3

Tabelle 9: Pharmakologische Parameter der [³⁵S]GTPγS-Bindung an M₂-Rezeptor durch die Iperoxo-Atropin Hybride in Membransuspensionen. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehler aus N unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmungen erhoben. Die Auswertung der Daten erfolgte nach Gleichung 7. pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus des Wendepunktes der Konzentrations-Effekt-Kurve. E_{\max} : oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve (E_{\max}) in % des E_{\max} Wertes des Referenzagonisten Iperoxo (=100%).

4.3.2 Iperoxo-Scopolamin Hybride zeigen keinen Verbindungsketten-abhängigen Partialagonismus auf dem G_i- Signalweg

Die starke Korrelation zwischen der Länge der Verbindungskette und der maximalen Wirksamkeit E_{max} , welche die Hybridsubstanzen aus Iperoxo und Atropin aufwiesen (vgl. Kapitel 4.3.1), konnte für die Iperoxo-Scopolamin Hybriden nicht beobachtet werden. Alle Hybridsubstanzen in diesem Kapitel besaßen eine partialagonistische maximale Wirksamkeit von ca. 60% und unterschieden sich damit nicht signifikant voneinander (vgl. Abb. 19, 20). Durch den Austausch von Atropin gegen Scopolamin geht die Kettenlängenabhängigkeit des Partialagonismus verloren. Aber auch die Wirkstärke, also die pEC_{50} -Werte unterschieden sich nicht signifikant zwischen den verschiedenen Iperoxo-Scopolamin-Hybridsubstanzen. Deren pEC_{50} Werte waren alle signifikant kleiner als der für Iperoxo gefundene Wert, waren jedoch nicht signifikant verschieden voneinander (vgl. Tab. 9). In dieser Serie von Verbindungen ist demnach nicht nur die partialagonistische Wirkung Kettenlängen-unabhängig, auch die Wirkstärke wird von der Kettenlänge nicht beeinflusst.

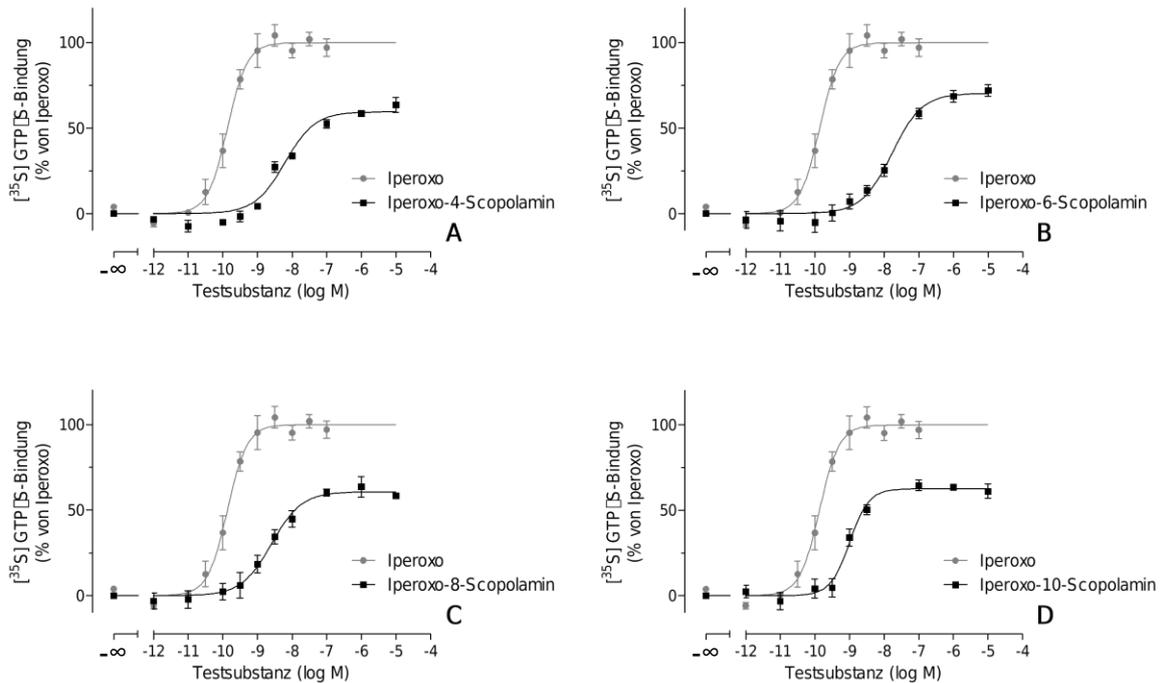


Abbildung 19: Förderung der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung durch Iperoxo-Scopolamin Hybride. Dargestellt sind Konzentrations-Effekt-Kurven für die Förderung der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in M_2 -Rezeptor haltigen Membransuspensionen in Abhängigkeit von der Konzentration des Referenzagonisten Iperoxo (grau, Kreise) und der Hybridsubstanzen (schwarz, Quadrate). Ordinate: Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0% entspricht der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration in mol/l. Die Kurvenanpassung erfolgte mit Gleichung 7. Die dargestellten Datenpunkte sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmungen erhoben.

Die Konzentrations-Effekt-Kurve für Iperoxo-4-Scopolamin (vgl. Abb. 19 A) zeigte ein oberes Plateau von $60\% \pm 2$ (M.W. \pm S.E.M.) der maximalen Wirksamkeit von Iperoxo. Damit liegt dieses signifikant unterhalb der Iperoxo-Wirksamkeit (vgl. Abb. 20 B und Tab. 10). Der $p\text{EC}_{50}$ beträgt $8,22 \pm 0,08$ (M.W. \pm S.E.M.) und ist damit ebenfalls signifikant verschieden vom Wendepunkt der Iperoxo-Kurve (vgl. Abb. 20 A und Tab. 10). Auch die Wirkstärke von Iperoxo-4-Scopolamin ist somit geringer als jene von Iperoxo. Iperoxo-6-Scopolamin zeigt eine partialagonistische Wirkung von $70\% \pm 2$ (M.W. \pm S.E.M., vgl. Abb. 20 B). Diese liegt damit um 10% über der maximalen Wirksamkeit der anderen Hybridsubstanzen mit Scopolamin als antagonistischem Baustein. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant (One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test $P > 0,05$) (vgl. Abb. 20 B). Andererseits liegt sie signifikant unter der Wirkstärke des Referenzagonisten Iperoxo (vgl. Abb. 20 B). Die Wirkstärke

von Iperoxo-6-Scopolamin ist $7,78 \pm 0,09$ (M.W. \pm S.E.M.) und damit signifikant geringer als jene von Iperoxo jedoch nicht verschieden zu denen der anderen Hybridsubstanzen mit Scopolamin als antagonistischem Baustein (vgl. Abb. 20 A und Tab. 10).

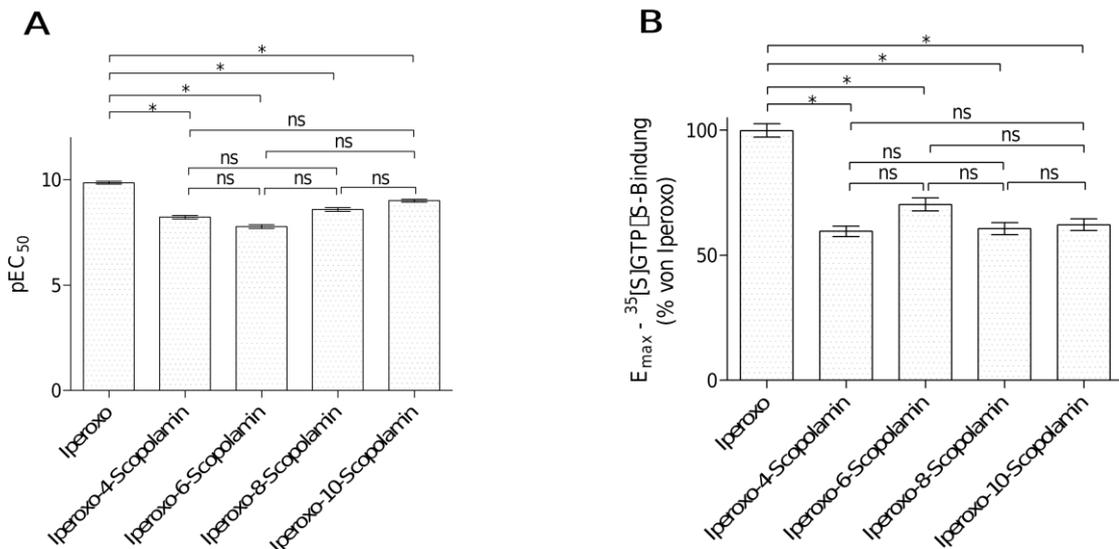


Abbildung 20: Einfluss der Länge der Verbindungskette in Iperoxo-Scopolamin-Hybriden auf den pEC₅₀ und die maximale Ligand geförderte [³⁵S]GTPγS-Bindung. (A) Dargestellt sind die pEC₅₀ der Konzentrations-Effekt-Kurven des Referenzagonisten und der Hybride. Ordinate: pEC₅₀. Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanz. (B) Dargestellt sind die oberen Plateaus (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurven des Referenzagonisten und der Testverbindungen. Ordinate: Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0% entspricht der [³⁵S]GTPγS-Bindung in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem oberen Plateau (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanz. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung erhoben. *: Werte signifikant verschieden voneinander. ns: Werte nicht signifikant unterschiedlich voneinander. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test sowie mit dem T-Test jeweils mit P < 0,05.

Die Iperoxo-8-Scopolamin Kurve im [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment (vgl. Abb. 19 C) zeigte ein oberes Plateau von $60\% \pm 2$ (M.W. \pm S.E.M.) der maximalen Wirksamkeit von Iperoxo. Damit liegt dieses signifikant unterhalb der Wirksamkeit von Iperoxo (vgl. Abb. 20 B und Tab. 10). Der pEC₅₀ beträgt $8,59 \pm 0,09$ (M.W. \pm S.E.M.) und ist signifikant unterschiedlich vom Wendepunkt der Iperoxo-Kurve (vgl. Abb. 20 A und Tab. 10). Die Wirkstärke von Iperoxo-8-Scopolamin ist geringer als jene von Iperoxo. Iperoxo-10-Scopolamin, als Vertretersubstanz mit der längsten Verbindungskette in

dieser Serie, zeigte einen Maximaleffekt von $62\% \pm 2$ (M.W. \pm S.E.M., vgl. Abb. 19 D und 20 B). Damit ist es nicht signifikant mehr oder weniger partialagonistisch wirksam als seine Hybrid-Verwandten, jedoch zeigt sich ebenfalls eine signifikant geringere maximale Wirksamkeit als Iperoxo (vgl. Abb. 20 B und Tab. 10). Der Wert für die Wirkstärke von Iperoxo-10-Scopolamin beträgt $pEC_{50} = 9,00 \pm 0,06$ (M.W. \pm S.E.M.) und ist damit nicht signifikant höher als derjenige der anderen Hybride mit Scopolamin als antagonistischem Baustein aber signifikant niedriger als der für Iperoxo gefundene Wert (One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test $P < 0,05$, vgl. Abb. 20 A und Tab. 10).

Testsubstanz	pEC_{50}	SEM	E_{max} (%)	SEM	N
Iperoxo	9,86	0,06	100	3	6
Iperoxo-4-Scopolamin	8,22	0,08	60	2	3
Iperoxo-6-Scopolamin	7,78	0,09	70	3	3
Iperoxo-8-Scopolamin	8,59	0,09	61	2	3
Iperoxo-10-Scopolamin	9,00	0,06	62	2	3

Tabelle 10: Pharmakologische Parameter der [35 S]GTP γ S-Bindung für Iperoxo-Scopolamin-Hybride in M_2 -Rezeptor haltigen Membransuspensionen. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehler aus N unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung erhoben. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Gleichung 7. pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus des Wendepunktes der Konzentrations-Effekt-Kurve. E_{max} : oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve (E_{max}) in % des E_{max} Wertes für den Referenzagonisten Iperoxo (100%). Die Parameter beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = \text{konstant} = 1$.

4.3.3 Die Fragmente Iperoxo-4 und Iperoxo-8 sind Vollagonisten auf dem G_i -Signalweg

Um dem Einfluss des antagonistischen Bausteines der Hybridliganden weiter auf den Grund zu gehen, wurden außerdem die Fragmente der Hybridsubstanzen funktionell untersucht. Diese Fragmente bestehen aus dem jeweiligen Hybridliganden ohne seinen antagonistischen Baustein (Strukturformeln vgl. Kapitel 2.1.6). Auf diese Weise war es möglich zu erkennen, welche Auswirkungen die Verbindungskette auf die [35 S]GTP γ S-Bindung der M_2 -Rezeptoren im Membranhomogenat, verglichen mit der

des reinen Agonisten Iperoxo, besitzt. Der Vergleich dieser verlängerten Iperoxoverbindungen mit den kompletten Hybriden erlaubte es, den Effekt des Wegfalls der antagonistischen Bausteine (Atropin bzw. Scopolamin) zu analysieren. Für die Untersuchungen standen die Fragment-Verbindungen Iperoxo-4 und Iperoxo-8 zur Verfügung.

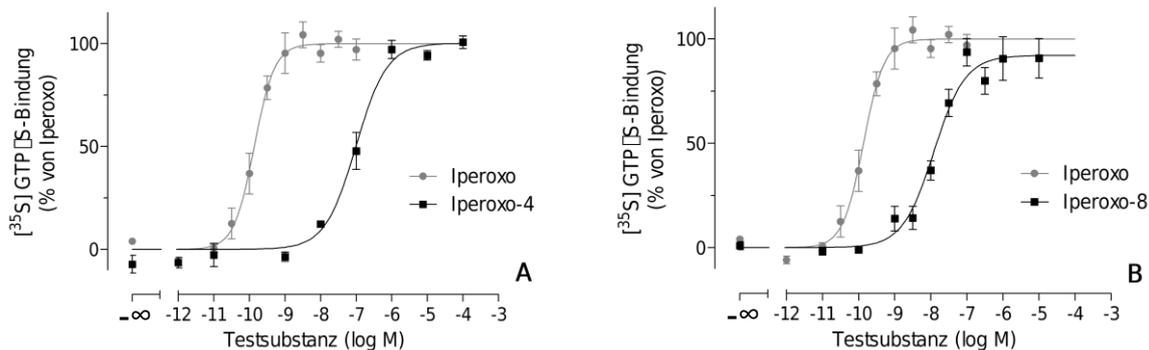


Abbildung 21: Förderung der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung durch die Hybrid-Fragmente Iperoxo-4 und Iperoxo-8. Dargestellt sind Konzentrations-Effekt-Kurven für die $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in M_2 -Rezeptor haltigen Membranen in Abhängigkeit von der Konzentration des Referenzagonisten Iperoxo (grau, Kreise) und der Hybridsubstanzen (schwarz, Quadrate). Ordinate: $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Prozent. 0% entspricht der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration. Die Kurvenanpassung erfolgte mittels Gleichung 7. Die dargestellten Datenpunkte sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung erhoben.

Beide Fragmente zeigen im $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperiment, also auf dem G_i -Signalweg, vollagonistisches Verhalten (vgl. Abb. 21 und 22 B). Das obere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven der Fragmente unterscheidet sich nicht signifikant vom E_{max} Wert von Iperoxo (vgl. Abb. 22 B). Beide Fragmente erreichen demnach einen Maximaleffekt, der nicht verschieden von 100%, also der maximalen Iperoxo Wirksamkeit ist. Iperoxo-4 erreicht einen Wert für $E_{\text{max}} = 100\% \pm 3$ und $\text{pEC}_{50} = 7,01 \pm 0,08$ (immer M.W. \pm S.E.M.). Der pEC_{50} von Iperoxo-4 ist also um fast drei Dekaden und damit signifikant geringer als derjenige von Iperoxo ($\text{pEC}_{50} = 9,86 \pm 0,06$, M.W. \pm S.E.M., vgl. Abb. 22 A und Tab. 11). Die Wirkstärke von Iperoxo wird also nur durch das Vorhandensein der kurzen aliphatischen Kette mit vier Kohlenwasserstoffen drastisch herabgesetzt.

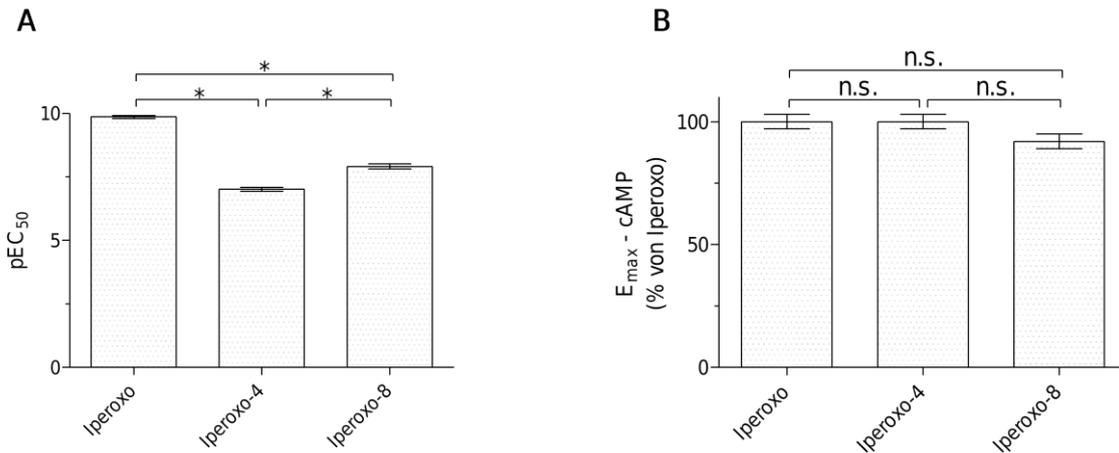


Abbildung 22: Der pEC₅₀ und die maximale Förderung der [³⁵S]GTPγS-Bindung E_{max} durch die Hybridfragmente Iperoxo-4 und Iperoxo-8 in Bezug zu Iperoxo. (A) Dargestellt sind die pEC₅₀ der Konzentrations-Effekt-Kurven des Referenzagonisten und der Hybridfragmente. Ordinate: pEC₅₀. Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanz. (B) Dargestellt sind die oberen Plateaus (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurven des Referenzagonisten und der Hybridfragmente Iperoxo-4 und Iperoxo-8. Ordinate: Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0% entspricht der [³⁵S]GTPγS-Bindung in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem oberen Plateau (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanz. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung erhoben. *: Werte unterscheiden sich signifikant voneinander. ns: Kein signifikanter Unterschied. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mittels One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Tests, P < 0,05.

Der Maximaleffekt von Iperoxo-8 erreicht einen Wert von E_{max} = 92% ± 3 (M.W. ± S.E.M.), aber auch hier zeigt die statistische Analyse keinen Unterschied zum oberen Kurvenplateau von Iperoxo (vgl. Abb. 22 B und Tab. 11). Es handelt sich demnach ebenfalls um einen Vollagonisten. Der Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve pEC₅₀ = 7,91 ± 0,10 (M.W. ± S.E.M.) ist bei signifikant höherer Wirkstärke angesiedelt als für Iperoxo-4 gemessen (vgl. Abb. 22 A und Tab. 11), jedoch bei signifikant niedrigerer Wirkstärke im Vergleich mit Iperoxo. Iperoxo-8 mit der langen aliphatischen Kette aus acht Kohlenwasserstoffen erreicht also interessanterweise eine signifikant höhere Wirkstärke am M₂-Rezeptor als Iperoxo-4 mit der kürzeren Kette (vgl. Abb. 22 A).

Testsubstanz	pEC ₅₀	SEM	E _{max} (%)	SEM	N
Iperoxo	9,86	0,06	100	3	6
Iperoxo-4	7,01	0,08	100	3	3
Iperoxo-8	7,91	0,10	92	3	3

Tabelle 11: Pharmakologische Parameter der [³⁵S]GTPγS-Bindung an M₂-Rezeptor-haltigen Membransuspensionen aus CHO Zellen durch die Hybridfragmente Iperoxo-4 und Iperoxo-8. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus N unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung erhoben. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Gleichung 7. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus des Wendepunktes der Konzentrations-Effekt-Kurve. E_{max}: oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve in % des E_{max} Wertes des Referenzagonisten Iperoxo (=100%). *: Werte signifikant verschieden voneinander. ns: Werte nicht signifikant verschieden voneinander. Berechnung der Signifikanzen mittels One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test P < 0,05.

4.4 Einfluss des antagonistischen Bausteins auf die Rezeptoraktivierung im G_i-Signalweg

Der Einfluss des antagonistischen Bausteins Atropin bzw. Scopolamin auf die Rezeptoraktivierung wurde durch ein modifiziertes Verfahren des [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimentes (Waud 1975; Lazareno und Birdsall 1993; Tränkle et al. 2005) ermittelt und hinsichtlich eines kompetitiven Antagonismus analysiert. Hierbei wurden steigende Konzentrationen der Hybridsubstanz gegen eine fixe Konzentration des agonistischen Bausteines Iperoxo vermessen. Gleichzeitig wurde eine Referenzkurve mit dem Agonisten Iperoxo aufgenommen, um anschließend beide erhaltenen Kurven simultan mit Gleichung 11 auszuwerten. Die Steigung der Referenzkurve (*n*) und der Schild-Faktor (*s*) wurden während der Datenanalyse nacheinander einmal als Konstante behandelt und auf 1 festgesetzt und zum anderen als Variable behandelt. Per F-Test (P < 0,05) wurde anschließend jeweils bestimmt, welche Kurvenanpassung die Datenpunkte besser global beschreibt und einem Modell zugeordnet. Mit dieser Vorgehensweise wurden aus beiden Hybridfamilien zwei Vertreter untersucht. Von den Iperoxo-Atropin Hybriden kamen Iperoxo-8-Atropin und Iperoxo-10-Atropin zum Einsatz. Aus der Familie der Iperoxo-Scopolamin Hybride wurden Iperoxo-8-Scopolamin und Iperoxo-10-Scopolamin als Vertreter ausgewählt. Es wurden jeweils die beiden Hybridsubstanzen mit den längsten Verbindungsketten ausgesucht, da

diese im klassischen [³⁵S]GTPγS-Experiment (vgl. Kapitel 4.3) den geringsten Partialagonismus zeigten. Daher wurde geschlossen, dass ihre antagonistische Potenz wahrscheinlich größer ist als jene der Hybridsubstanzen mit kürzerer Verbindungskette.

4.4.1 Iperoxo-Atropin Hybride zeigen antagonistisches Verhalten im modifizierten [³⁵S]GTPγS-Experiment

Bislang wurde in dieser Arbeit nur die agonistische Wirkung der Iperoxo-Atropin Hybridsubstanzen untersucht, welche vom Iperoxo ausgehen dürfte. In diesem Versuchsansatz ist es nun möglich den antagonistischen Einfluss des Hybrides zu untersuchen, indem ein modifiziertes [³⁵S]GTPγS-Experiment („single inhibition curve design“ vgl. Kapitel 3.4.1.3) zum Einsatz kommt. Anschließend wurden die Ergebnisse mit der globalen Analyse nach Waud (vgl. Gleichung 11) ausgewertet und die Parameter K_B und s bestimmt. K_B ist ein Maß für die antagonistische Bindung der Testsubstanz und der Wert für s gibt an, ob es sich um einen kompetitiven Antagonismus handeln kann.

In Abbildung 23 sind die nativen Kurven der [³⁵S]GTPγS-Experimente im Inhibitionskurven-Design zu sehen, wie sie nach Aufzeichnung der Datenpunkte und getrennter nichtlinearer Regression mit Gleichung 7 erhalten wurden. Die graue Kurve zeigt den Konzentrations-Effekt-Zusammenhang des Referenzagonisten Iperoxo. Die schwarze Kurve zeigt den Einfluss einer steigenden Konzentration von Iperoxo-8-Atropin (vgl. Abb. 23 A) bzw. Iperoxo-10-Atropin (vgl. Abb. 23 B) auf den Effekt einer fixen Konzentration von Iperoxo (0,3 nM). Die Konzentration von 0,3 nM Iperoxo entspricht der Konzentration, die 80 – 90 %igen Maximaleffekt verursacht. Es ist daher in den Abbildungen 23 A und B zu erkennen, dass das obere Plateau der schwarzen Kurven bei 80 – 90 % des oberen Plateaus der Iperoxo-Kurve (grau) lokalisiert ist. Mit steigenden Konzentrationen der Hybridsubstanz (Iperoxo-8-Atropin bzw. Iperoxo-10-Atropin) wird weniger [³⁵S]GTPγS gebunden. Die Hybridsubstanz antagonisiert den agonistischen Effekt von 0,3 nM Iperoxo konzentrationsabhängig und die Kurve fällt ab.

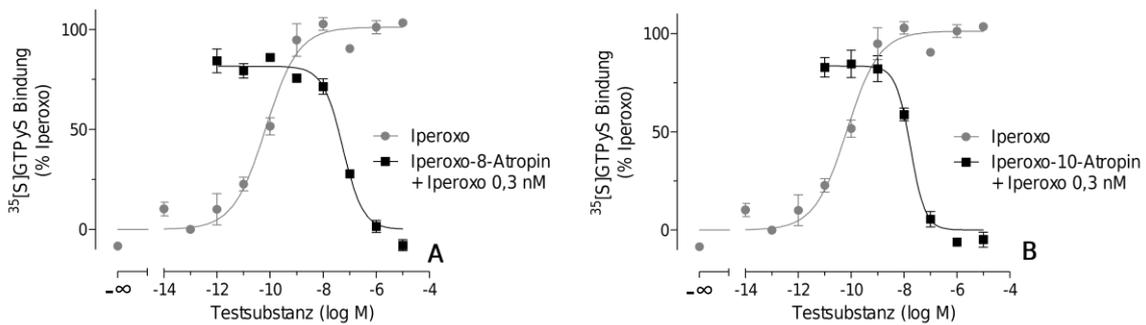


Abbildung 23: $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung der Iperoxo-Atropin Hybride in Gegenwart einer fixen Konzentration von Iperoxo. Dargestellt sind Konzentrations-Effekt-Kurven für die Förderung der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung am M_2 -Rezeptor in Abhängigkeit von der Konzentration des Referenzagonisten Iperoxo (grau, Kreise) und der Hybridsubstanzen in Gegenwart einer genannten konstanten Konzentration von Iperoxo (schwarz, Quadrate). Ordinate: $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Prozent. 0% entspricht der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration. Die Kurvenanpassung erfolgte mittels Gleichung 7. Die dargestellten Datenpunkte sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmungen erhoben.

Die zwei Kurven in Abbildung 23 A beziehungsweise 23 B wurden anschließend jeweils simultan mit Gleichung 11 analysiert, da eine globale Analyse nach Waud (vgl. Kapitel 3.4.1.3) versuchsunabhängig interpretierbare Schätzwerte der Parameter K_B und s liefert. Es ist nicht möglich, diese Parameter aus den mittels logistischer Einzelkurvenanalyse (mit Hilfe von Gleichung 7, siehe oben) aus Abbildung 23 abzulesen, da zur Bestimmung von K_B und s immer die Referenzkurve zusammen mit der Kurve in Gegenwart der Testsubstanz betrachtet werden muss (Waud 1975).

Gleichung 11 erkennt lediglich ein Datengerüst, die graphische Auftragung ist davon unabhängig. Wird auf der Abszisse statt des Hybrids der Agonist Iperoxo aufgetragen, repräsentiert jede eingesetzte Konzentration der Hybridsubstanz, die aus den Datenpunkten der schwarzen Kurven in Abbildung 23 ersichtlich sind, eine parallel verschobene Agonist-Kurve (mit $E_{\max} = \text{konstant} = 100\%$ und einem Basalwert = konstant = 0% , vgl. Abb. 24). Das Lot von den Datenpunkten auf die Abszisse für die errechneten Kurven liegt stets bei einer Iperoxo-Konzentration von $0,3\text{ nM}$, da dies die eingesetzte Fixkonzentration war (vgl. Abb. 24). Anhand der parallel verschobenen Kurven werden nun durch *nichtlineare* Anwendung von Gleichung 11, analog zu einer

klassischen *linearen* Schild-Analyse (Arunlakshana und Schild 1997), die Parameter K_B und s bestimmt.

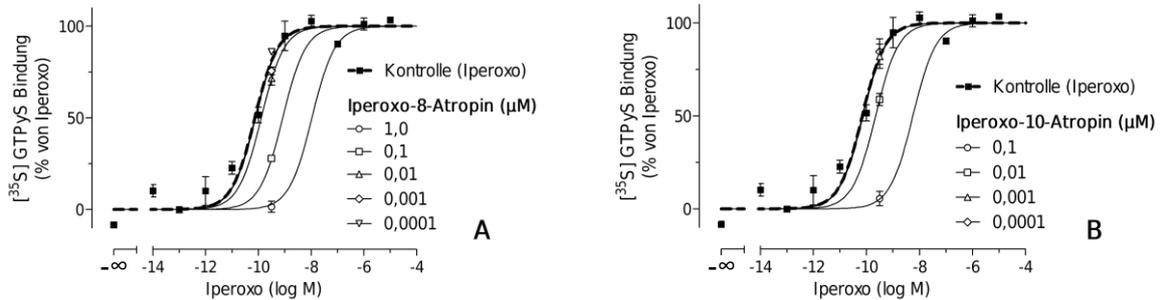


Abbildung 24: Einfluss von Iperoxo-8-Atropin und Iperoxo-10-Atropin auf die Iperoxo-vermittelte Aktivierung des M₂-Rezeptors. Einfluss der Hybridsubstanzen auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo. Dargestellt sind aufsteigende molare Konzentrationen von Iperoxo-8-Atropin und Iperoxo-10-Atropin. Ordinate: Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0% entspricht der [³⁵S]GTPγS-Bindung in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration. Die Datensätze wurden mittels Gleichung 15 (globale Analyse nach Waud, 1975) ausgewertet. Die dargestellten Datenpunkte sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmungen erhoben.

Ob die Schild-Steigung s verschieden von $s = 1$ war, wurde per F-Test geprüft. Für beide Hybridsubstanzen wurde nach der Prüfung die jeweilige Steigung auf $s = \text{konstant} = 1$ festgesetzt, da dies das bevorzugte Modell war. Demnach handelt es sich sowohl bei Iperoxo-8-Atropin (vgl. Abb. 24 A) als auch bei Iperoxo-10-Atropin (vgl. Abb. 24 B) um formal kompetitive Antagonisten gegenüber Iperoxo. Der errechnete K_B wird zur besseren Vergleichbarkeit als pK_B angegeben und beträgt für Iperoxo-8-Atropin $7,98 \pm 0,25$ und für Iperoxo-10-Atropin $8,47 \pm 0,15$ (immer M.W. \pm S.E.M., vgl. Tab. 12). Der Vergleich dieser Werte mittels T-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($P > 0,05$). Beide Hybridsubstanzen besitzen demnach die gleiche antagonistische Potenz.

Testsubstanz	pK _B	SEM	s	N
Iperoxo-8-Atropin	7,98	0,25	=1	3
Iperoxo-10-Atropin	8,47	0,15	=1	3

Tabelle 12: Pharmakologische Schätzwerte ausgewählter Hybridparameter aus der globalen Analyse nach Waud. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus N unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte stammen aus Einzelexperimenten, die in Form von Dreifachbestimmung erhoben wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Gleichung 11. pK_B: negativer dekadischer (-)Logarithmus des Schätzwertes für die antagonistische Potenz. s: Schild-Steigung, welche nach Bestätigung per F-Test (P < 0,05) auf s = 1 festgesetzt wurde. Ein Wert von 1 ist formal kompatibel mit der Vorstellung eines kompetitiven Antagonismus.

4.4.2 Iperoxo-Scopolamin Hybride zeigen kein antagonistisches Verhalten im modifizierten [³⁵S]GTPγS-Experiment

Auch mit den Vertretern der Hybridfamilie in welcher Scopolamin als antagonistischer Baustein enthalten ist, wurden modifizierte [³⁵S]GTPγS-Experimente durchgeführt. In Abbildung 25 sind die nativen Kurven der [³⁵S]GTPγS-Experimente zu sehen, wie sie nach Aufzeichnung der Datenpunkte und nichtlinearer Regression mittels Gleichung 7 erhalten wurden. Die graue Kurve zeigt den Konzentrations-Effekt-Zusammenhang des Referenzagonisten Iperoxo. Die Bindungsmesswerte in Gegenwart steigender Konzentration von Iperoxo-8-Scopolamin (vgl. Abb. 25 A) bzw. Iperoxo-10-Scopolamin (vgl. Abb. 25 B) bei gleichzeitiger Anwesenheit einer fixen Konzentration von Iperoxo (0,3 nM) konnten nicht durch eine Kurve mit negativer Steigung beschrieben werden. Stattdessen blieben die Messergebnisse über den gesamten Konzentrationsbereich der Hybridsubstanzen bei 80-100% des Maximaleffektes von Iperoxo. Es ist daher aus den Abbildungen 25 A und B abzuleiten, dass weder Iperoxo-8-Scopolamin noch Iperoxo-10-Scopolamin in der Lage ist den agonistischen Effekt der fixen Konzentration von Iperoxo (0,3 nM) zu antagonisieren. Damit war es im Nachgang an die modifizierten [³⁵S]GTPγS-Experimente nicht möglich die Parameter K_B und s mit Hilfe von Gleichung 11 zu bestimmen. Schlussfolgernd ist die antagonistische Potenz der untersuchten Iperoxo-Scopolamin Hybride nicht hoch genug, um zu Tage zu treten und mit der Analyse nach Waud quantifiziert zu werden. Auch über die Art der Interaktion, also ob diese gegebenenfalls kooperativ ist oder nicht, kann keine Aussage getroffen werden.

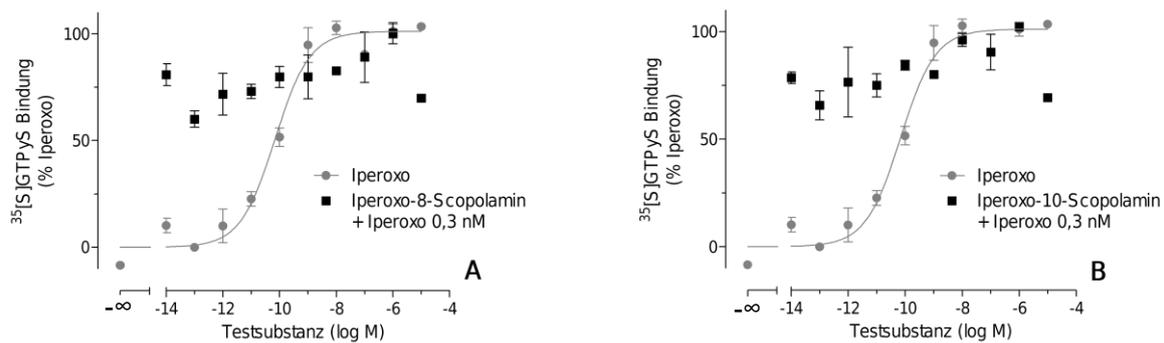


Abbildung 25: $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung der Iperoxo-Scopolamin Hybride in Gegenwart einer fixen Konzentration von Iperoxo. Dargestellt sind Konzentrations-Effekt-Kurven für die Förderung der M_2 -Rezeptor vermittelten $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Abhängigkeit von der Konzentration des Referenzagonisten Iperoxo (grau, Kreise) und der Hybridsubstanzen in einer fixen Konzentration von Iperoxo (schwarz, Quadrate). Ordinate: Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0% entspricht der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration. Die Kurvenanpassung erfolgte mittels Gleichung 7. Die dargestellten Datenpunkte sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Mittelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmungen erhoben.

4.5 Aktivierung des G_s -Signalweges des M_2 -Rezeptors

Weiterhin war es Ziel dieser Arbeit herauszufinden, wie sich die untersuchten Hybridverbindungen bei der Aktivierung eines für M_2 -Rezeptoren nicht-präferentiellen Signalweges verhalten. Ausgewählt wurde hierfür neben dem präferentiellen G_i -Signalweg, welcher in Kapitel 4.3 durch die Verwendung von $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimente näher beleuchtet wurde, die Erforschung des G_s -Signalweges durch cAMP-Experimente. In dieser Art des funktionellen Experimentes, wird die Rezeptoraktivierung nicht direkt am G-Protein selbst gemessen, sondern in dem Signalweg, welchen das rezeptorgebundene G-Protein aktivierten. Die intrazelluläre Konzentration des sekundären Botenstoffs cAMP wird sowohl durch G_s -Proteine als auch durch $\text{G}_{i/o}$ -Proteine beeinflusst (Kenakin 2014). Es konnte sich jedoch auf den Einfluss der G_s -Proteine dadurch fokussiert werden, dass der $\text{G}_{i/o}$ -Inhibitor Pertussis Toxin (PTX) zum Einsatz kam, um die genannten Proteine funktionsunfähig zu machen. Die erhaltenen Ergebnisse, die in diesem Kapitel vorgestellt werden, spiegeln also den Einfluss der Testverbindungen auf die Aktivierung des M_2 -Rezeptors mit anschließender Rekrutierung von G_s -Proteinen wider.

Als Referenzsubstanzen wird in den folgenden Untersuchungsergebnissen neben dem Superagonisten Iperoxo auch der inverse Agonist Atropin dargestellt. Grund hierfür ist, dass in den durchgeführten cAMP-Experimenten spontane Aktivität der Rezeptoren in Erscheinung trat, welche die invers agonistische Wirkung von Atropin darzustellen erlaubte. Das Resultat ist ein unteres Plateau der Atropin-Kurve von $-18,98\% \pm 2,74$ (M.W. \pm S.E.M.) bezogen auf Iperoxo. Der Wendepunkt der Kurve für Atropin liegt bei $pEC_{50} = 6,79 \pm 0,32$ (M.W. \pm S.E.M., vgl. Abb. 26, sowie Abb. 28 und Tab. 13, beides in Kapitel 4.5.1). Das obere Plateau von Iperoxo wurde auf 100% = konstant festgesetzt und die Werte der Referenzsubstanz Atropin und der Hybridsubstanzen damit prozentualisiert. Der pEC_{50} von Iperoxo beträgt $8,16 \pm 0,05$ (M.W. \pm S.E.M., vgl. Tab. 13 in Kapitel 4.5.1).

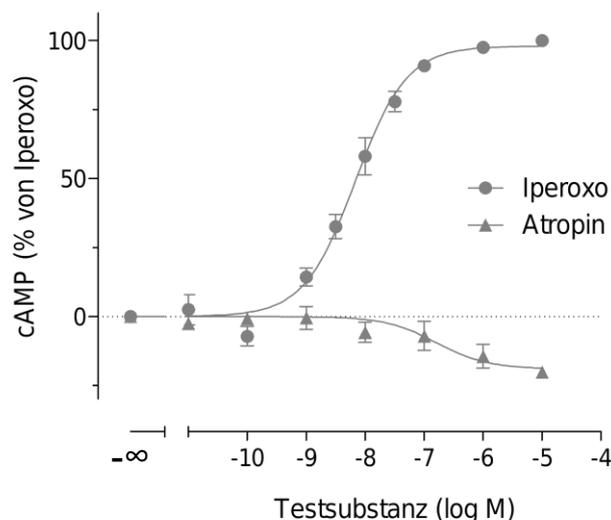


Abbildung 26: cAMP-Akkumulation in Flp-In-CHO-M₂-Zellen induziert durch die Referenzsubstanzen Iperoxo und Atropin. Dargestellt sind Konzentrations-Effekt-Kurven für die cAMP-Akkumulation in Flp-In-CHO-M₂-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration des Referenzagonisten Iperoxo (grau, Kreise) und des Referenzantagonisten Atropin (grau, Dreiecke). Ordinate: Prozentuale cAMP-Akkumulation. 0% entspricht der cAMP-Akkumulation in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem oberen Plateau (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Testsubstance-Konzentration. Die Kurvenanpassung erfolgte mittels Gleichung 7. Die dargestellten Datenpunkte sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmungen erhoben.

Es war also im nativen funktionellen Experiment möglich, ohne Veränderungen am Versuchsaufbau vornehmen zu müssen, sowohl die agonistische Wirkung von Iperoxo

als auch die invers agonistische Wirkung des Atropins zu ermitteln. Spannend war es zu sehen, welche Eigenschaft der Bausteine der Iperoxo-Atropin Hybride im cAMP-Experiment überwiegen würde. Wäre also ein partialagonistisches Verhalten eines Hybrides zu beobachten, so müsste dieses vom Baustein Iperoxo ausgehen. Hat das Hybrid hingegen invers agonistischen Charakter, so überwiegt die Wirkung des Bausteins Atropin. Im Hinblick auf die Hybridsubstanzen mit Scopolamin als antagonistischem Baustein ist nicht von einem invers agonistischen Verhalten der Testverbindungen auszugehen, da ein solches für Scopolamin in früheren Arbeiten nicht nachgewiesen werden konnte (Kaufel 2010).

4.5.1 Iperoxo-Atropin Hybride zeigen Verbindungsketten-abhängigen Partialagonismus oder inversen Agonismus auf dem G_s-Signalweg

Bei der Untersuchung der Hybridsubstanzen mit Iperoxo als agonistischem Baustein und Atropin als antagonistischem Baustein zeigte sich, dass die Länge der Verbindungskette (4, 6, 8 oder 10 Kohlenwasserstoffe) großen Einfluss auf das Verhalten der Verbindungen am M₂-Rezeptor hat. Alle E_{max}-Werte in Abbildung 28 B sind in Prozent des oberen Plateaus des Referenzagonisten Iperoxo als % von *Iperoxo* angegeben. Iperoxo-4-Atropin weist einen Wert E_{max} = 28% ± 3 (M.W. ± S.E.M.) auf, der damit signifikant kleiner ist als der E_{max} von Iperoxo (vgl. Abb. 27 A und 28 B). Es besitzt daher einen partialagonistischen Charakter. Seine Wirkstärke beträgt pEC₅₀ = 7,19 ± 0,21 (M.W. ± S.E.M., vgl. Abb. 27 A und Tab. 13). Damit ist die Wirkstärke um fast eine Dekade geringer als jene von Iperoxo (pEC₅₀ = 8,16 ± 0,05, M.W. ± S.E.M.) jedoch nicht signifikant verschieden davon (One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test P > 0,05, vgl. Abb. 28 B).

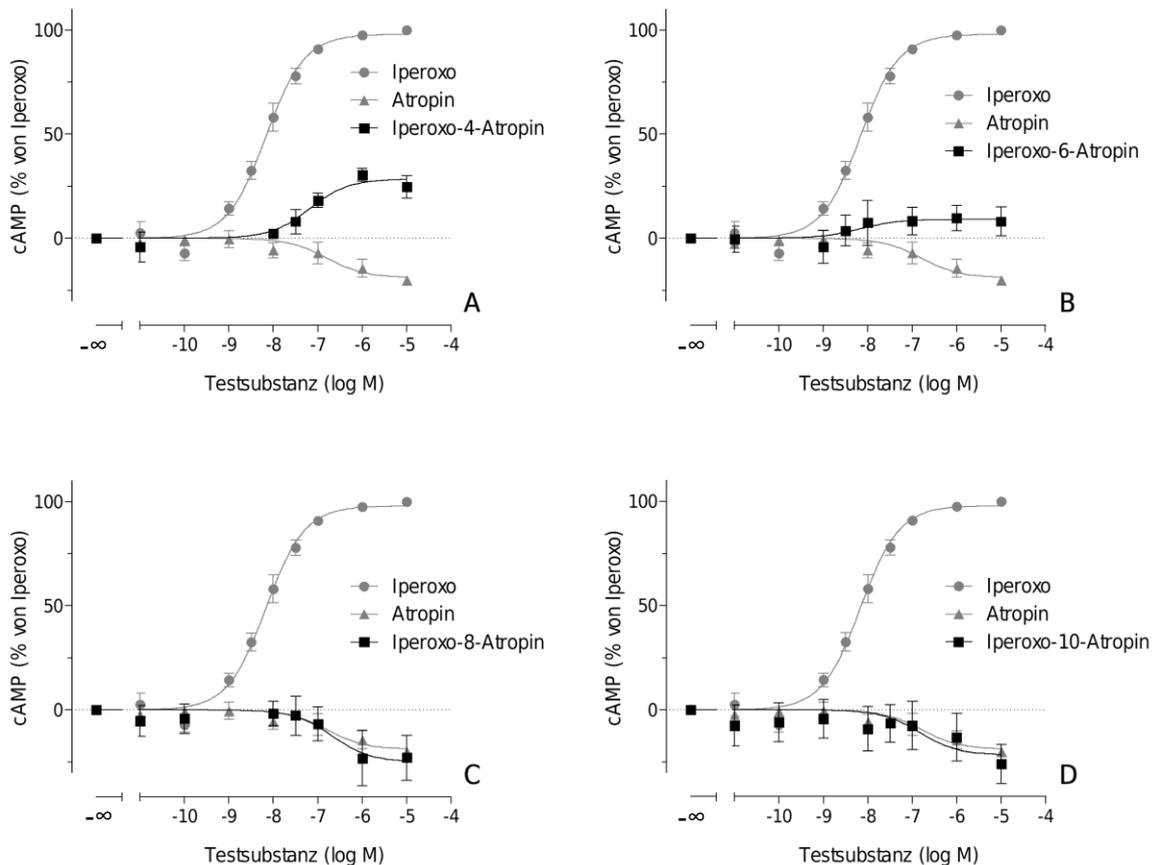


Abbildung 27: cAMP-Akkumulation in Flp-In-CHO-M₂-Zellen induziert durch Iperoxo-Atropin Hybride mit unterschiedlicher Zwischenkettenlänge. Dargestellt sind Konzentrations-Effekt-Kurven für die cAMP-Akkumulation in Flp-In-CHO-M₂-Zellen des Referenzantagonisten Atropin (grau, Dreiecke) und der aufgeführten Hybridsverbindungen (schwarz, Quadrate) in Abhängigkeit von der Konzentration des Referenzagonisten Iperoxo (grau, Kreise). Ordinate: Prozentuale cAMP-Akkumulation. 0% entspricht der cAMP-Akkumulation in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem oberen Plateau (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration. Die Kurvenanpassung erfolgte mittels Gleichung 7. Die dargestellten Datenpunkte sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung erhoben.

Iperoxo-6-Atropin weist ein oberes Plateau seiner Konzentrations-Effekt-Kurve im cAMP-Experiment von $E_{max} = 9\% \pm 4$ (M.W. \pm S.E.M.) auf. Damit liegt es signifikant unterhalb des E_{max} seines Strukturverwandten mit vier Kohlenwasserstoffen (vgl. Abb. 28 B). Jedoch weist auch Iperoxo-6-Atropin noch eine partialagonistische Wirkung auf. Wird die Wirkstärke der Verbindung betrachtet, so ist diese mit $pEC_{50} = 8,18 \pm 0,94$ (M.W. \pm S.E.M.) ebenfalls nicht signifikant verschieden von der für Iperoxo, $pEC_{50} = 8,16 \pm 0,05$ (M.W. \pm S.E.M.), gemessenen (vgl. Abb. 28 A und Tab. 13).

Es zeichnet sich nach der Betrachtung der Hybridsubstanzen Iperoxo-4-Atropin und Iperoxo-6-Atropin schon ab, dass die Länge der Verbindungskette im cAMP-Experiment, wie zuvor bereits im [³⁵S]GTPγS-Experiment (vgl. Kapitel 4.3) einen erheblichen Einfluss auf die maximale Wirksamkeit E_{\max} der Hybridsubstanz hat.

Nun sollen die Effekte der beiden Hybridsubstanzen mit den längeren Verbindungsketten aus 6 und 8 Kohlenwasserstoffen besprochen werden. Diese werden im Folgenden mit dem Referenzantagonisten Atropin verglichen, da sie beide, genau wie auch Atropin selbst, eine invers agonistische Wirkung aufweisen (vgl. Abb. 27 C und D). Demnach liegt das *untere Plateau* ihrer Konzentrations-Effekt-Kurven im negativen Bereich (vgl. Abb. 28 B). Dies resultiert aus der Normierung der Messwerte auf den Referenzagonisten Iperoxo, auf welchen auch alle anderen Testverbindungen normiert wurden. Für die Vergleichbarkeit aller vier Hybridverbindungen untereinander wurde von diesem Vorgehen auch in diesem Fall nicht abgewichen. Jedoch stellt sich für Iperoxo-8-Atropin und Iperoxo-10-Atropin nicht die Frage, ob die ermittelten E_{\max} Werte signifikant verschieden von dem für Iperoxo bestimmten Wert war. Die Signifikanz ist auf den ersten Blick zu erkennen, da der E_{\max} von Iperoxo definitionsgemäß bei 100% liegt und der E_{\max} der im Folgenden besprochenen Hybridsubstanzen im negativen Bereich (vgl. Abb. 28 B) angesiedelt war. Ein näherer Vergleich mit den Parametern des Referenzantagonisten Atropin erschien demnach für diese Betrachtung sinnvoller zu sein.

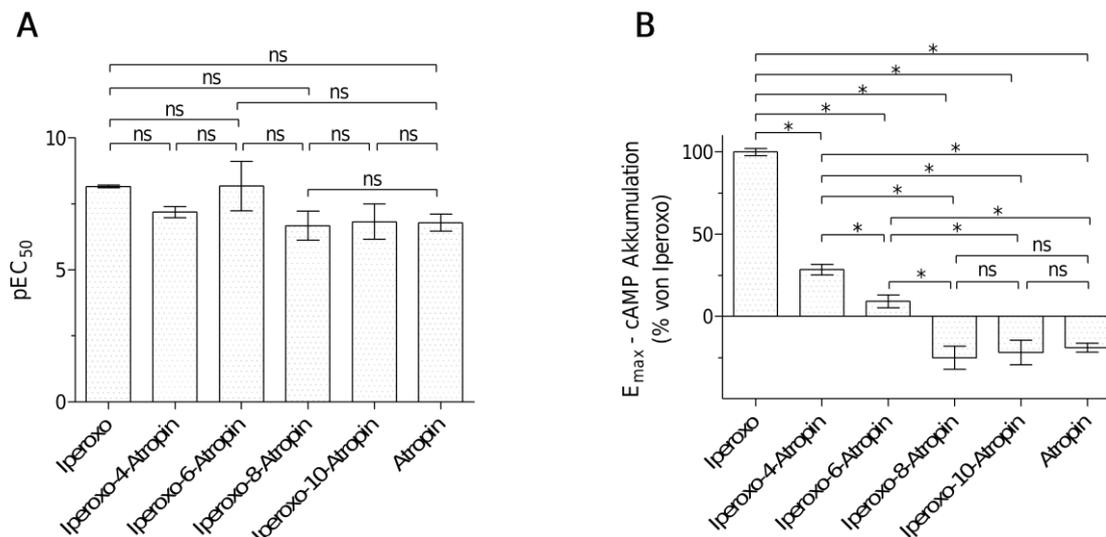


Abbildung 28: Einfluss der Länge der Verbindungskette in Iperoxo-Atropin Hybriden auf den pEC_{50} und die maximale cAMP-Akkumulation E_{max} in Flp-In-CHO-M₂-Zellen. (A) Dargestellt sind die pEC_{50} der Konzentrations-Effekt-Kurven des Referenzagonisten und der Hybride. Ordinate: pEC_{50} . Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanz. (B) Dargestellt sind die maximalen Plateaus (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurven der Referenzsubstanzen Iperoxo und Atropin sowie der Hybridsubstanzen. Ein negatives maximales unteres Plateau deutet auf inversen Agonismus hin. Ordinate: Prozentuale cAMP-Akkumulation. 0% entspricht der cAMP-Akkumulation in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem maximalen oberen Plateau (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanz. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung erhoben. *: Werte unterscheiden sich signifikant voneinander. ns: kein signifikanter Unterschied. Berechnung der Signifikanzen mit Hilfe von One-way ANOVA in Kombination mit Tukey's Multiple Comparison Test $P < 0,05$ sowie mit dem T-Test $P < 0,05$.

Iperoxo-8-Atropin zeigte einen E_{max} von $-25\% \pm 7$ (M.W. \pm S.E.M., vgl. Abb. 27 C, Abb. 28 B und Tab. 13). Dieser lag um 6% niedriger als der für Atropin ermittelte, ist aber auf Grund des großen Fehlers nicht signifikant verschieden von Atropin (vgl. Abb. 28 B). Iperoxo-8-Atropin und Atropin zeigen demnach die gleiche invers agonistische Wirksamkeit E_{max} . Die Wirkstärke von Iperoxo-8-Atropin betrug $pEC_{50} = 6,67 \pm 0,55$ und war weder von $pEC_{50} = 8,16 \pm 0,05$ für Iperoxo noch von $pEC_{50} = 6,79 \pm 0,32$ für Atropin signifikant verschieden (immer M.W. \pm S.E.M., vgl. Abb. 28 A und Tab. 13). Die Signifikanzberechnungen wurden mittels One-way ANOVA Analyse und Tukey's Multiple Comparison Test, $P > 0,05$ durchgeführt. Bei Iperoxo-10-Atropin ließen sich viele Parallelen zu seinem Verwandten mit acht Kohlenwasserstoffen in der Verbindungskette ziehen. Iperoxo-10-Atropin hat einen $E_{max} = -22\% \pm 7$ (M.W. \pm S.E.M.), der weder zu dem E_{max} Wert von Atropin noch zu demjenigen Wert von

Iperoxo-8-Atropin einen signifikanten Unterschied aufwies (vgl. Abb. 27 D und 28 B). Auch seine Wirkstärke liegt auf dem Niveau von Iperoxo, Atropin und Iperoxo-8-Atropin und unterschied sich nicht signifikant von diesen. Sie beträgt $pEC_{50} = 6,83 \pm 0,67$ (M.W. \pm S.E.M., vgl. Abb. 28 A und Tab. 13). Die Iperoxo-Atropin Hybride mit den Verbindungskettenlängen von 8 und 10 Kohlenwasserstoffen sind zusammenfassend, sowohl was ihre invers agonistische maximale Wirksamkeit als auch ihre Wirkstärke anbelangt, auf gleichem Niveau wie der reine Antagonist bzw. inverse Agonist Atropin.

Abschließend sei betont, dass bei allen Iperoxo-Atropin Hybriden im cAMP-Experiment die Länge der Verbindungskette in Hinsicht auf die maximale Wirksamkeit E_{max} der Verbindungen erheblichen Einfluss hat. Die Wirkstärke pEC_{50} der Hybridsubstanzen wird jedoch durch die unterschiedlichen Kettenlängen nicht signifikant beeinflusst (vgl. Tab. 13).

Testsubstanz	pEC_{50}	SEM	E_{max} (%)	SEM	N
Iperoxo	8,16	0,05	100	2	3
Atropin	6,79	0,32	-19	3	3
Iperoxo-4-Atropin	7,19	0,21	28	3	3
Iperoxo-6-Atropin	8,18	0,94	9	4	3
Iperoxo-8-Atropin	6,67	0,55	-25	7	3
Iperoxo-10-Atropin	6,83	0,67	-22	7	3

Tabelle 13: Pharmakologische Parameter der cAMP-Akkumulation in Flp-In-CHO-M₂-Zellen durch die aufgeführten Iperoxo-Atropin Hybride mit unterschiedlicher Zwischenkettenlänge. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehler aus N unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmung erhoben. Die Auswertung der Daten erfolgte nach Gleichung 7. pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus des Wendepunktes der Konzentrations-Effekt-Kurve. E_{max} : maximales (oberes oder negatives unteres) Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve (E_{max}) in % des E_{max} Wertes für den Referenzagonisten Iperoxo (=100%).

4.5.2 Iperoxo-Scopolamin Hybride zeigen Verbindungsketten-abhängigen Partialagonismus auf dem G_s-Signalweg

Die Hybridsubstanzen mit dem antagonistischen Baustein Scopolamin an Stelle von Atropin (vgl. Kapitel 4.5.1), verhielten sich im cAMP-Experiment als partielle Agonisten (vgl. Abb. 29). Einen invers agonistischen Einfluss des Scopolamin-Bausteins konnte für die Iperoxo-Scopolamin Hybride nicht beobachtet werden, was die Hinweise auf eine fehlende invers agonistische Wirkweise von reinem Scopolamin in der Dissertation von Kaufel (2010) bestätigte. Nichtsdestotrotz hat die Länge der Verbindungskette auch in dieser Art von Hybridsubstanzen Einfluss auf die partialagonistische maximale Wirksamkeit (E_{max}) und außerdem, im Unterschied zu den Iperoxo-Atropin Hybriden, auch auf die Wirkstärke (pEC_{50}) der Verbindungen. Auch in diesem Kapitel wurden alle E_{max} -Werte auf das obere Plateau des Referenzagonisten Iperoxo normiert und sind daher als % von *Iperoxo* angegeben.

Iperoxo-4-Scopolamin besitzt mit $E_{max} = 52\% \pm 4$ (M.W. \pm S.E.M.), zusammen mit Iperoxo-6-Scopolamin die höchste partialagonistische maximale Wirksamkeit dieser Substanzfamilie (vgl. Abb. 29 A und 30 B). Ihre maximalen oberen Plateaus liegen damit signifikant unter dem des Referenzagonisten Iperoxo (vgl. Abb. 29 A, 30 B und Tab. 14) unterscheiden sich jedoch nicht untereinander (Abb. 30 B). Die Wirkstärke von Iperoxo-4-Scopolamin $pEC_{50} = 6,60 \pm 0,16$ (M.W. \pm S.E.M.) ist signifikant niedriger als die von Iperoxo ($pEC_{50} = 8,16 \pm 0,05$, M.W. \pm S.E.M.) und die von Iperoxo-10-Scopolamin ($pEC_{50} = 8,10 \pm 0,61$, M.W. \pm S.E.M.). Iperoxo-4-Scopolamin weist damit eine der niedrigsten Wirkstärken unter den Iperoxo-Scopolamin Hybriden auf.

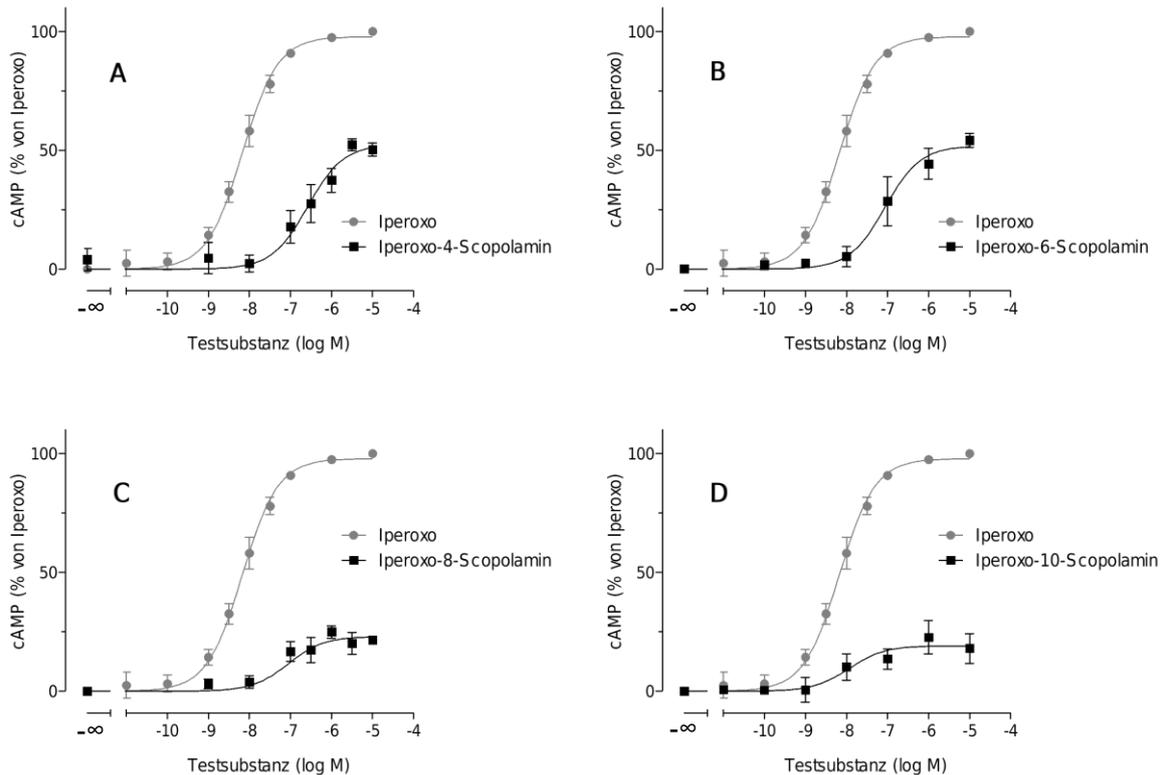


Abbildung 29: cAMP-Akkumulation in Flp-In-CHO-M₂-Zellen induziert durch Iperoxo-Scopolamin Hybride. Dargestellt sind Konzentrations-Effekt-Kurven für die cAMP-Akkumulation in Flp-In-CHO-M₂-Zellen für den Referenzagonisten Iperoxo (grau, Kreise) und die jeweilige Hybrids substanz (schwarz, Quadrate). Ordinate: Prozentuale cAMP-Akkumulation. 0% entspricht der cAMP-Akkumulation in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem oberen Plateau (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Tests substanz-Konzentration. Die Kurvenanpassung erfolgte mit Gleichung 7. Die dargestellten Datenpunkte sind Mittelwerte mit Standardfehler aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmungen erhoben.

Der Unterschied der Länge der Verbindungskette von zwei Kohlenwasserstoffen (von 4 zu 6) bewirkt keine signifikante Änderung der maximalen Wirksamkeit der Verbindungen (vgl. Abb. 30 B). Auch die Wirkstärke von Iperoxo-6-Scopolamin ist mit $pEC_{50} = 6,88 \pm 0,19$ (M.W. \pm S.E.M.) nicht signifikant verschieden von der von Iperoxo-4-Scopolamin ($pEC_{50} = 6,60 \pm 0,16$, M.W. \pm S.E.M., vgl. Abb. 30 A und Tab. 14).

Diese Ergebnisse harmonisieren mit denen aus den [³⁵S]GTP γ S-Experimenten (vgl. Kapitel 4.3). Auf beiden untersuchten Signalwegen (G_i und G_s) hat die Länge der Verbindungskette im Falle der Verbindungen Iperoxo-4-Scopolamin und Iperoxo-6-Scopolamin keinen Einfluss auf deren maximale Wirksamkeit (E_{max}). Ein Unterschied jedoch tut sich auf, wenn im Folgenden die Verbindungen Iperoxo-8-Scopolamin und Iperoxo-10-Scopolamin besprochen werden. Im [³⁵S]GTP γ S-Experimenten (vgl.

Kapitel 4.3) zeigten auch diese beiden Hybridsubstanzen mit den längeren Verbindungsketten keinen signifikanten Unterschied in ihrer maximalen Wirksamkeit (E_{max}). Alle Iperoxo-Scopolamin Hybride hatten auf dem G_i -Signalweg (vgl. Kapitel 4.3) eine partialagonistische maximale Wirksamkeit zwischen $60\% \pm 2$ (M.W. \pm S.E.M., Iperoxo-4-Scopolamin) und $70 \pm 2\%$ (M.W. \pm S.E.M., Iperoxo-6-Scopolamin).

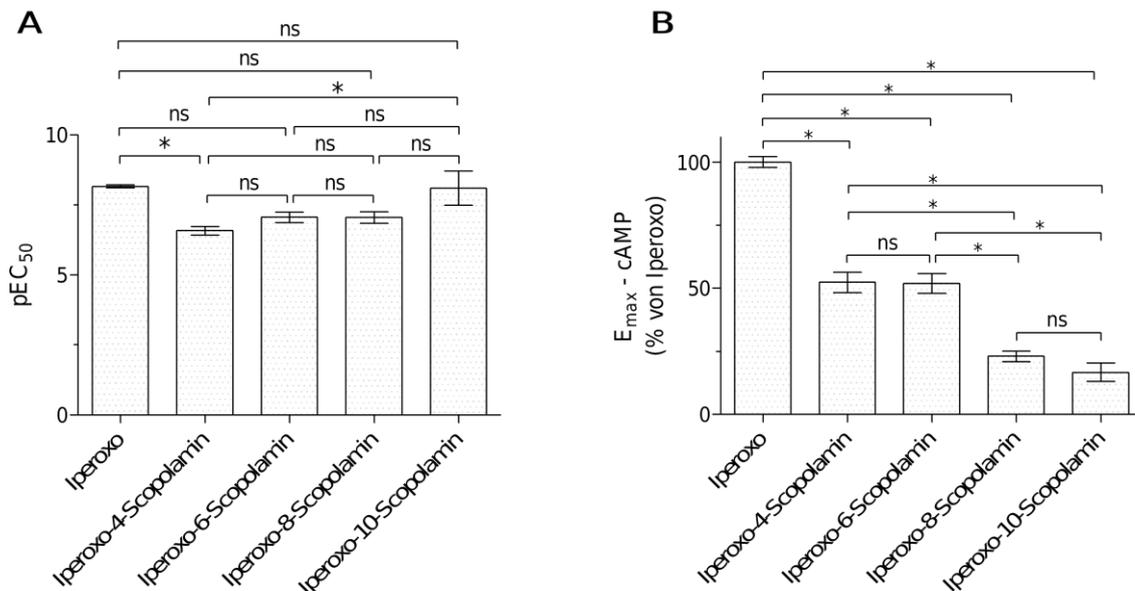


Abbildung 30: Einfluss der Länge der Verbindungskette in Iperoxo-Scopolamin Hybriden auf den pEC₅₀ und die maximale cAMP-Akkumulation E_{max} in Flp-In-CHO-M₂-Zellen. (A) Dargestellt sind die pEC₅₀ der Konzentrations-Effekt-Kurven des Referenzagonisten und der Hybride. Ordinate: pEC₅₀. Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanz. (B) Dargestellt sind die oberen Plateaus (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurven des Referenzagonisten Iperoxo und der Hybridsubstanzen. Ordinate: Prozentuale cAMP-Akkumulation. 0% entspricht der cAMP-Akkumulation in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem oberen Plateau (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanz. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. ns: Werte nicht signifikant verschieden voneinander. Alle nicht markierten Vergleiche weisen einen signifikanten Unterschied auf. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmungen erhoben. *: Werte signifikant verschieden voneinander. ns: kein signifikanter Unterschied. Berechnung der Signifikanzen mit Hilfe von One-way ANOVA und nachfolgendem Tukey's Multiple Comparison Test mit $P < 0,05$.

Iperoxo-8-Scopolamin und auch Iperoxo-10-Scopolamin weisen jedoch im cAMP-Experiment, also auf dem G_s -Signalweg, eine signifikant geringere maximale Wirksamkeit auf als ihre Strukturverwandten mit 4 und 6 Kohlenwasserstoffen in der Verbindungskette (vgl. Abb. 30 B und Tab. 14). Die Konzentrations-Effekt-Kurve von

Iperoxo-8-Scopolamin besitzt ein oberes Plateau von $23\% \pm 2$ (M.W. \pm S.E.M.), welches nicht signifikant verschieden ist von dem von Iperoxo-10-Scopolamin ($17\% \pm 4$, M.W. \pm S.E.M.). Beide E_{\max} Werte sind, wie schon erwähnt, signifikant kleiner als jene von Iperoxo, Iperoxo-4-Scopolamin und Iperoxo-6-Scopolamin (vgl. Abb. 30 B). Auch hier ist zu bemerken, dass der Unterschied der Verbindungskettenlänge von zwei Kohlenwasserstoffen (8 zu 10) keine Veränderung in der maximalen Wirksamkeit (E_{\max}) zur Folge hat. Werden die Wirkstärken pEC_{50} der Verbindungen betrachtet, lässt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied feststellen (vgl. Abb. 30 A und Tab. 14): beide pEC_{50} liegen mit $7,11 \pm 0,21$ (M.W. \pm S.E.M.) für Iperoxo-8-Scopolamin und mit $8,10 \pm 0,61$ (M.W. \pm S.E.M.) für Iperoxo-10-Scopolamin auf dem gleichen Niveau wie der des Referenzagonisten Iperoxo ($8,16 \pm 0,05$, M.W. \pm S.E.M.). Der einzige signifikante Unterschied, welcher sich im Hinblick auf die Wirkstärke per One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Test auf einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$ ermitteln lässt, ist jener zwischen Iperoxo-10-Scopolamin und Iperoxo-4-Scopolamin. Ersteres weist einen mit $8,10 \pm 0,61$ (im Gegensatz zu $6,58 \pm 0,16$, immer M.W. \pm S.E.M.) signifikant höheren pEC_{50} -Wert auf und besitzt damit die höhere Wirkstärke (vgl. Abb. 30 A).

Testsubstanz	pEC_{50}	SEM	E_{\max} (%)	SEM	N
Iperoxo	8,16	0,05	100	2,15	3
Iperoxo-4-Scopolamin	6,58	0,16	52	4,08	4
Iperoxo-6-Scopolamin	7,06	0,19	52	3,90	3
Iperoxo-8-Scopolamin	7,05	0,21	23	2,09	3
Iperoxo-10-Scopolamin	8,10	0,61	17	3,60	3

Tabelle 14: Pharmakologische Parameter der cAMP-Akkumulation in Flp-In-CHO-M₂-Zellen durch die Iperoxo-Scopolamin Hybride. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehler aus N unabhängigen Experimenten. Die Einzelexperimente wurden als Dreifachbestimmungen erhoben. Die Auswertung der Daten erfolgte nach Gleichung 7. pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus des Wendepunktes der Konzentrations-Effekt-Kurve. E_{\max} : oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve in % des E_{\max} Wertes des Referenzagonisten Iperoxo (100%).

4.5.3 Die Hybridfragmente Iperoxo-4 und Iperoxo-8 sind starke Partialagonisten auf dem G_s-Signalweg

Nachdem schon der G_i-Signalweg mit der Durchführung von [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten beleuchtet wurde (vgl. Kapitel 4.3), sollte nachfolgend auch der G_s-Signalweg, bei Aktivierung der Rezeptoren durch die Hybridfragmente, untersucht werden. Auch hier wurden die zwei zur Verfügung stehenden Fragmente Iperoxo-4 und Iperoxo-8 mit unterschiedlich langen aliphatischen Ketten verwendet. Die dazugehörigen Strukturformeln finden sich in Kapitel 2.1.6. Im Gegensatz zum G_i-Signalweg, auf dem sich sowohl Iperoxo-4 als auch Iperoxo-8 als Vollagonisten entpuppten, zeigten beide Verbindungen auf dem G_s-Signalweg lediglich partialagonistischen Charakter (vgl. Abb. 31 und 32 B).

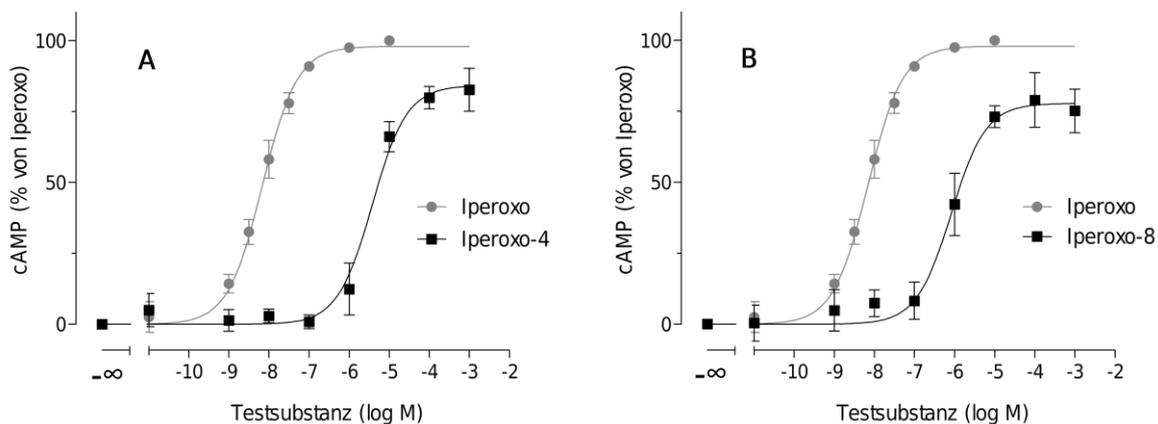


Abbildung 31: cAMP-Akkumulation in Flp-In-CHO-M₂-Zellen induziert durch die Hybridfragmente Iperoxo-4 und Iperoxo-8. Dargestellt sind Konzentrations-Effekt-Kurven für die cAMP-Akkumulation in Flp-In-CHO-M₂-Zellen der Fragmente (schwarz, Quadrate) in Abhängigkeit von dem Referenzagonisten Iperoxo (grau, Kreise). Ordinate: Prozentuale cAMP-Akkumulation. 0% entspricht der cAMP-Akkumulation in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem oberen Plateau (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Tests substanz-Konzentration. Die Kurvenanpassung erfolgte mit Gleichung 7. Die dargestellten Datenpunkte sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Doppelbestimmungen erhoben.

Der partialagonistische Charakter ist jedoch mit E_{max} Werten von 78 bzw. 84 %, bezogen auf den Superagonisten Iperoxo, stark ausgeprägt (vgl. Tab. 15). Iperoxo-4 hat eine maximale Wirkstärke von E_{max} = 84% ± 4 (M.W. ± S.E.M.) und liegt damit signifikant unterhalb des oberen Plateaus des Referenzagonisten Iperoxo (vgl. Abb.

32 B). Hinsichtlich seiner Wirkstärke ist Iperoxo-4 ebenfalls signifikant verschieden von Iperoxo. Es hat einen pEC_{50} von $5,43 \pm 0,11$ (M.W. \pm S.E.M.) und ist damit signifikant unter dem für Iperoxo gefundenen $pEC_{50} = 8,16 \pm 0,05$ (M.W. \pm S.E.M.) positioniert (vgl. Abb. 32 A und Tab. 15). Es zeigt damit eine über 100-fach schwächere Wirkstärke als der Referenzagonist.

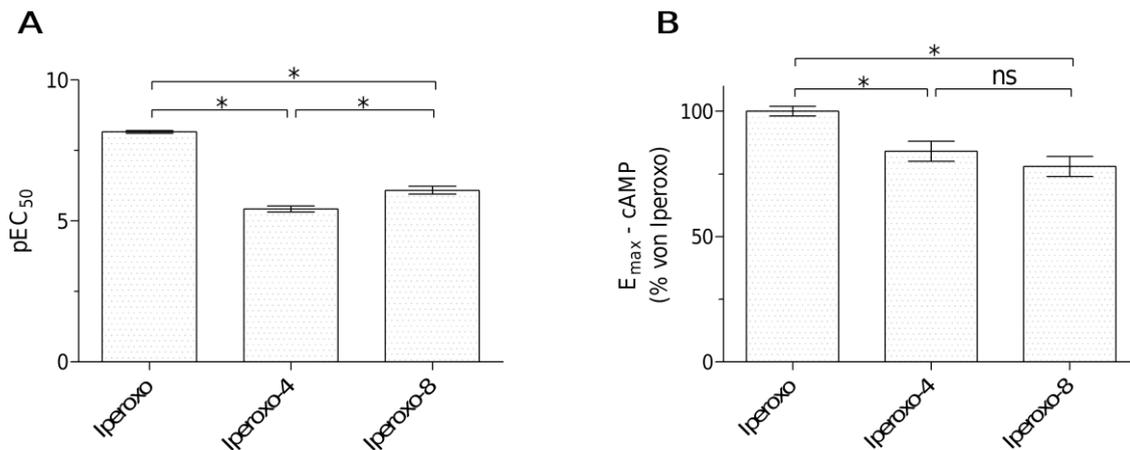


Abbildung 32: Der pEC_{50} und die maximale cAMP-Akkumulation E_{max} der Hybridfragmente Iperoxo-4 und Iperoxo-8 in Flp-In-CHO-M2-Zellen. (A) Dargestellt sind die pEC_{50} der Konzentrations-Effekt-Kurven des Referenzagonisten Iperoxo und der Hybridfragmente. Ordinate: pEC_{50} . Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanz. (B) Dargestellt sind die oberen Plateaus (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurven des Referenzagonisten Iperoxo und der Hybridfragmente. Ordinate: Prozentuale cAMP-Akkumulation. 0% entspricht der cAMP-Akkumulation in Abwesenheit eines Liganden und 100% entspricht dem oberen Plateau (E_{max}) der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Iperoxo. Abszisse: Bezeichnung der Testsubstanz. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. ns: Werte nicht signifikant verschieden voneinander. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmungen erhoben. *: Werte weisen einen signifikanten Unterschied auf. ns: kein signifikanter Unterschied. Berechnung der Signifikanzen mit Hilfe von One-way ANOVA und nachfolgendem Tukey's Multiple Comparison Test mit $P < 0,05$.

Iperoxo-8 verhält sich hinsichtlich der maximalen Wirksamkeit ähnlich wie sein Verwandter Iperoxo-4. Das obere Plateau der Kurve von Iperoxo-8 liegt bei $78\% \pm 4$ (M.W. \pm S.E.M.), was gemäß statistischer Analyse mittels One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Post Test ($P > 0,05$) nicht signifikant verschieden zu dem E_{max} von Iperoxo-4 ist (vgl. Abb. 32 B und Tab. 15). Ein Partialagonist ist Iperoxo-8 damit genauso wie Iperoxo-4, da auch sein E_{max} signifikant unterhalb von dem des Referenzagonisten Iperoxo liegt. Die Wirkstärke von Iperoxo-8 ist signifikant größer als die von Iperoxo-4. Es handelt sich um eine Affinitätszunahme von einer halben Dekade

(vgl. Abb. 32 A) durch die um vier Kohlenwasserstoffe längere Kette im Iperoxo-8. Dieses Phänomen war zuvor auch auf dem G_i-Signalweg beobachtet worden (vgl. Kapitel 4.3.3).

Testsubstanz	pEC ₅₀	SEM	E _{max} (%)	SEM	N
Iperoxo	8,16	0,05	100	2	3
Iperoxo-4	5,43	0,11	84	4	3
Iperoxo-8	6,09	0,14	78	4	3

Tabelle 15: Pharmakologische Parameter der cAMP-Akkumulation in Flp-In-CHO-M₂-Zellen durch die Fragmente Iperoxo-4 und Iperoxo-8. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehler aus N unabhängigen Experimenten. Die Einzelwerte wurden in Form von Dreifachbestimmungen erhoben. Die Auswertung der Daten erfolgte nach Gleichung 7. pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus des Wendepunktes der Konzentrations-Effekt-Kurve. E_{max}: oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve in % des E_{max} Wertes des Referenzagonisten Iperoxo (100%). *: Werte signifikant verschieden voneinander. ns: Werte nicht signifikant verschieden voneinander. Berechnung der Signifikanzen mittels One-way ANOVA und Tukey's Multiple Comparison Post Test (P < 0,05).

4.6 Bestimmung des „Ligand-Bias“

Bei der Bestimmung des „Ligand-Bias“ handelt es sich um eine Methode, die es erlaubt, eine quantitative Aussage über eine mögliche Ligand-spezifische Bevorzugung eines Signalweges gegenüber einem anderen zu treffen. Dieses Phänomen tritt erst dann in Erscheinung, wenn Rezeptor-vermittelte Effekte durch die Aktivierung von mindestens zwei unterschiedlichen Signalkaskaden hervorgerufen werden. Für den in der vorliegenden Arbeit untersuchten M₂-Rezeptor wurde bereits beschrieben, dass unterschiedliche G-Proteine aktiviert werden können und somit auch unterschiedliche Effekte in den Intrazellulärraum vermittelt werden (Kenakin 2003; Bock et al. 2012; Kenakin 2014). Im Falle des M₂-Acetylcholinrezeptors kommen hierfür das vom Rezeptor bevorzugte G_i-Protein und das vor allem durch hohe Agonist-Konzentrationen gebundene G_s-Protein in Frage (Antony et al. 2009). Inwiefern ein untersuchter Agonist nun in der Lage ist, die intrazelluläre Rezeptorbindung des einen möglichen G-Proteins mehr als die des anderen G-Proteins hervorzurufen – immer in Relation zu einem Referenzagonisten – lässt sich mit Hilfe einer „Ligand-Bias“-Berechnung quantifizieren. Wird ein Signalweg durch die Testsubstanz, verglichen mit

der Referenzsubstanz, effektiver eingeschaltet als ein anderer, so weist die Testsubstanz einen „Ligand-Bias“ in Richtung dieses Signalweges auf. Man spricht in dieser Hinsicht auch von *funktionaler Selektivität*.

Grundlage zur Berechnung des „Ligand-Bias“ bildet die Analyse von Konzentrations-Effekt-Kurven aus den Kapiteln 4.3 und 4.5 mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983). Dieses beschreibt, wie effizient die Rezeptorbindung eines Agonisten in eine Signalantwort, d.h. einen Effekt, übertragen wird (vgl. Kapitel 3.5). Die Ligand-induzierte Signaleffizienz unterschiedlicher Signalwege wurde anhand des Parameters $\Delta\log(\tau/K_A)$ verglichen (vgl. Gleichung 15). Um einen Vergleich zwischen verschiedenen Liganden untereinander zu erhalten, wurde der Parameter $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ bestimmt (vgl. Gleichung 16). Dieser besagt wie viel mehr oder weniger ein bestimmter Signalweg durch eine Testsubstanz im Vergleich zu einer anderen Testsubstanz aktiviert wird (Gregory et al. 2012; Charfi et al. 2015). Als Referenzagonist wurde auch zur Bestimmung des „Ligand-Bias“ Iperoxo gewählt, da alle Verbindungen Iperoxo als agonistischen Molekülteil tragen. Für den Referenzagonisten Iperoxo wurde signalwegunabhängig jeweils ein $\Delta\log(\tau/K_A) = 0$ ermittelt, woraus $\Delta\Delta\log(\tau/K_A) = 0$ resultierte. Alle abgebildeten Werte für die Testverbindungen verstehen sich im Vergleich zu Iperoxo.

Bei Betrachtung der G_i-Signalwegaktivierung in Abbildung 33 (vgl. auch Tab. 16) lässt sich erkennen, dass alle Testverbindungen bis auf das Iperoxo-10-Atropin den Signalweg signifikant ineffizienter aktivieren als der Referenzagonist Iperoxo. Die $\Delta\log(\tau/K_A)$ -Werte rangieren zwischen $-0,72 \pm 0,16$ (M.W. \pm S.E.M.) für Iperoxo-6-Atropin und $-2,86 \pm 0,12$ (M.W. \pm S.E.M.) für das Fragment Iperoxo-8. Iperoxo-10-Atropin unterscheidet sich mit $-0,23 \pm 1,50$ (M.W. \pm S.E.M.) nicht signifikant von Iperoxo, weist jedoch auch den größten Standardfehler aller Testverbindungen auf, weshalb hier die fehlende statistische Signifikanz und große Streuung auch vereinbar ist mit einer den anderen Verbindungen vergleichbaren Ineffizienz. Warum die Einzelversuche so inhomogene Ergebnisse lieferten, woraus die große Streuung resultierte, konnte nicht eruiert und bei der Versuchsdurchführung auch mit höchster Vorsicht und Sorgfalt leider nicht abgestellt werden. Eine gewisse Tendenz in der Effizienz der Signalwegsaktivierung ist in Korrelation mit der Länge der Verbindungskette zu erkennen. Sowohl das Iperoxo-10-Atropin ($\Delta\log(\tau/K_A) = -0,23 \pm 1,50$, M.W. \pm S.E.M.) als auch das Iperoxo-10-Scopolamin ($\Delta\log(\tau/K_A) = -0,87 \pm 0,12$,

M.W. \pm S.E.M.), also jeweils die Familienvertreter mit der längsten Zwischenkette, zeigen die höchste Effizienz der Signaltransduktion auf dem G_i -Signalweg. Die beiden Testverbindungen mit der geringsten Effizienz sind die Fragmente Iperoxo-4 und Iperoxo-8. Diese liegen mit Werten von $-2,85 \pm 0,13$ (M.W. \pm S.E.M.) respektive $-2,86 \pm 0,12$ (M.W. \pm S.E.M.) signifikant unterhalb der anderen Testverbindungen (T-Test $P < 0,05$).

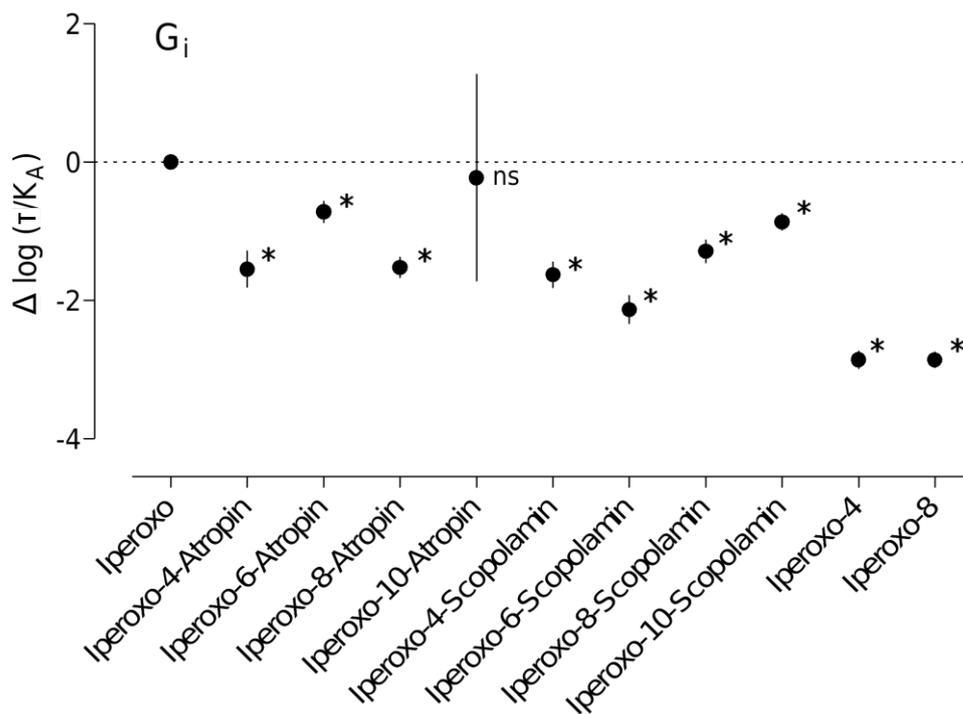


Abbildung 33: Effizienz der G_i -Signalwegsaktivierung der Hybridsubstanzen und ihrer Fragmente im Vergleich zu Iperoxo. Der Parameter $\Delta \log(\tau/K_A)$ besagt, wie effizient ein Ligand den G_i -Signalweg im Vergleich zum Referenzagonisten Iperoxo zu aktivieren vermag. Werte im positiven Bereich stellen eine effizientere Aktivierung der G_i -Signalkaskade dar. Werte im negativen Bereich stellen eine ineffizientere Aktivierung der G_i -Signalkaskade dar. Die $\Delta \log(\tau/K_A)$ -Werte wurden auf Basis von Gleichung 15 ermittelt. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. *: Wert signifikant verschieden vom Referenzagonisten Iperoxo. ns: Wert nicht signifikant verschieden vom Referenzagonisten Iperoxo. Berechnung der Signifikanzen mit dem T-Test $P < 0,05$. Die Fehlerfortpflanzung wurde mit Gleichung 17 berechnet.

Mit Blick auf die G_s -Signalwegsaktivierung, also den nicht präferentiellen Signalweg des M_2 -Rezeptors, zeigt sich ein ähnliches Bild wie auf dem G_i -Signalweg (vgl. Abb. 34 und Tab. 16). Innerhalb der Substanzfamilien hat die Testsubstanz mit der geringsten Verbindungskettenlänge auch die geringste Effizienz in der Signaltransduktion. Namentlich handelt es sich hier um das Iperoxo-4-Atropin mit

einem $\Delta\log(\tau/K_A)$ von $-0,95 \pm 0,20$ (M.W. \pm S.E.M.), um das Iperoxo-4-Scopolamin mit einem $\Delta\log(\tau/K_A)$ von $-1,54 \pm 0,14$ (M.W. \pm S.E.M.) und um das Fragment Iperoxo-4 mit einem $\Delta\log(\tau/K_A)$ von $-2,71 \pm 0,11$ (M.W. \pm S.E.M.). Die Verbindung mit der längsten Verbindungskette innerhalb einer Substanzfamilie löst das Rezeptor-vermittelte Signal am effizientesten aus. Hier handelt es sich analog um Iperoxo-6-Atropin mit einem $\Delta\log(\tau/K_A)$ von $0,04 \pm 0,75$ (M.W. \pm S.E.M.), um Iperoxo-10-Scopolamin mit einem $\Delta\log(\tau/K_A)$ von $-0,03 \pm 0,47$ (M.W. \pm S.E.M.) und um das Fragment Iperoxo-8 mit einem $\Delta\log(\tau/K_A)$ Wert von $-2,05 \pm 0,12$ (M.W. \pm S.E.M.). Iperoxo-6-Atropin und Iperoxo-10-Scopolamin zeigen auf dem G_s -Signalweg damit sogar eine gleich effiziente Signalwegsaktivierung wie der Referenzagonist Iperoxo. Iperoxo-8-Atropin und Iperoxo-10-Atropin konnten in die Auswertung nicht mit aufgenommen werden, da diese im cAMP-Experiment einen inversen Agonismus zeigten (vgl. Kapitel 4.5.1), welcher mit dem Operational Model nicht auszuwerten ist. Besonders hervorzuheben sind auch auf diesem Signalweg die Fragmente Iperoxo-4 und Iperoxo-8. Sie haben abermals die geringste Effizienz in der Signaltransduktion (Iperoxo-4 = $-2,71 \pm 0,11$; Iperoxo-8 = $-2,05 \pm 0,12$, immer M.W. \pm S.E.M.). Iperoxo-8 löst das Rezeptor-vermittelte Signal aber, wie oben erwähnt, signifikant effizienter aus als Iperoxo-4 (T-Test, $P < 0,05$).

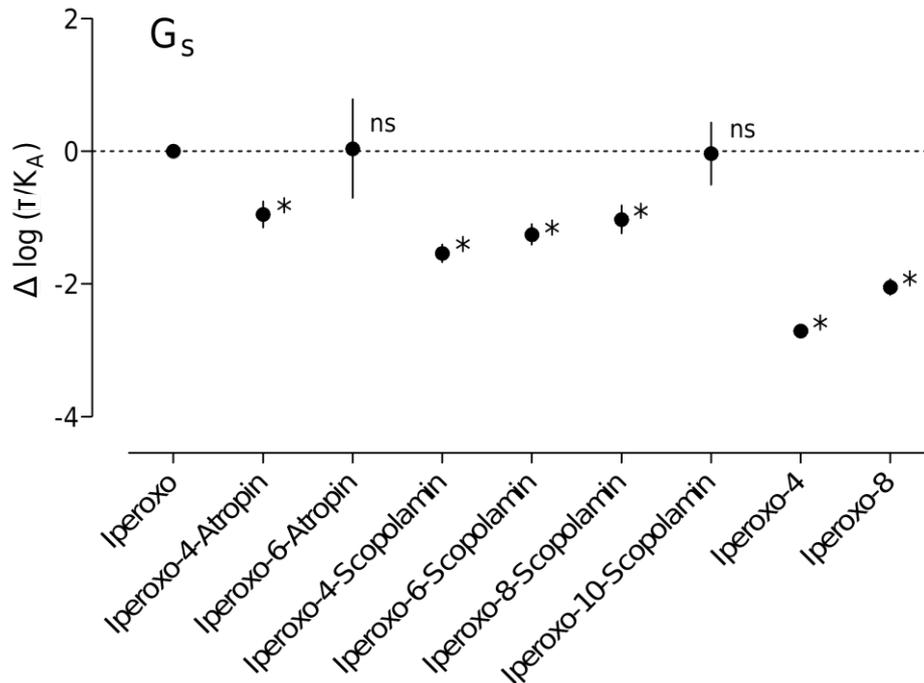


Abbildung 34: Effizienz der G_s -Signalwegsaktivierung der Hybridsubstanzen und ihrer Fragmente im Vergleich zu Iperoxo. Der Parameter $\Delta \log(\tau/K_A)$ besagt, wie effizient ein Ligand den G_s -Signalweg im Vergleich zum Referenzagonisten Iperoxo zu aktivieren vermag. Werte im positiven Bereich stellen eine effizientere Aktivierung der G_s -Signalkaskade dar. Werte im negativen Bereich stellen eine ineffizientere Aktivierung der G_s -Signalkaskade dar. Die $\Delta \log(\tau/K_A)$ -Werte wurden auf Basis von Gleichung 15 ermittelt. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. *: Wert signifikant verschieden vom Referenzagonisten Iperoxo. ns: Wert nicht signifikant verschieden vom Referenzagonisten Iperoxo. Berechnung der Signifikanzen mit dem T-Test, $P < 0,05$. Die Fehlerfortpflanzung wurde mit Gleichung 17 berechnet.

Wird nun der „Ligand-Bias“ mit Hilfe der Berechnung von $\Delta \Delta \log(\tau/K_A)$ -Werten wie in Abbildung 35 aufgetragen betrachtet, so ist zu beachten, dass es sich hierbei nun um eine Darstellung der Aktivierung eines Signalweges im Vergleich zu einem anderen in Abhängigkeit vom Referenzagonisten Iperoxo handelt. Liegen die Werte im positiven Bereich, so wird der G_i -Signalweg gegenüber Iperoxo bevorzugt aktiviert. Liegen die Werte hingegen im negativen Bereich, so wird der G_s -Signalweg gegenüber Iperoxo bevorzugt.

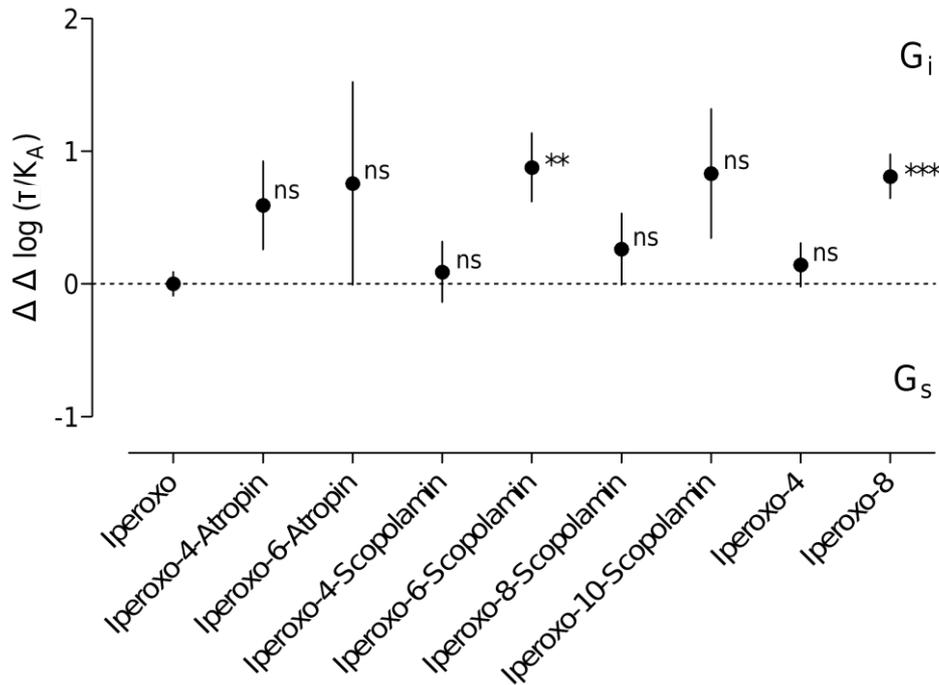


Abbildung 35: Graphische Darstellung des „Ligand-Bias“ der Hybridsubstanzen sowie ihrer Fragmente im Vergleich zum Referenzagonisten Iperoxo. Der Parameter $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ besagt, ob ein bestimmter Signalweg durch eine Testsubstanz, im Vergleich zum Referenzagonisten Iperoxo, bevorzugt aktiviert wird. Werte im positiven Bereich stellen einen „Ligand-Bias“ in Richtung der G_i -Signalkaskade dar. Werte im negativen Bereich stellen einen „Ligand-Bias“ in Richtung der G_s -Signalkaskade dar. Die $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ -Werte wurden auf Basis von Gleichung 16 ermittelt. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardfehler aus mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten. **/***: Werte signifikant verschieden vom Referenzagonisten Iperoxo (**: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$). Die Berechnung der Signifikanz erfolgte mittels T-Test $P < 0,05$. Die Fehlerfortpflanzung wurde mit Gleichung 18 berechnet.

Es fällt auf, dass alle Testverbindungen im positiven Bereich der Grafik in Abbildung 35 angesiedelt sind und damit auf der Seite eines „Ligand-Bias“ hin zum G_i -Signalweg. Die einzigen beiden Verbindungen, die sich jedoch signifikant von Iperoxo unterscheiden und damit *G_i-ge-biased* sind, sind das Iperoxo-6-Scopolamin ($\Delta\Delta\log(\tau/K_A) = 0,88 \pm 0,26$, M.W. ± S.E.M.) und das Fragment Iperoxo-8 ($\Delta\Delta\log(\tau/K_A) = 0,81 \pm 0,17$, M.W. ± S.E.M.). Alle anderen Testverbindungen konnten einem T-Test ($P < 0,05$) bezüglich eines signifikanten Unterschiedes zu Iperoxo nicht standhalten, obwohl die Mittelwerte doch teilweise weit im positiven Bereich positioniert waren. Erwähnt werden sollten hier das Iperoxo-4-Atropin mit einem $\Delta\Delta\log(\tau/K_A) = 0,59 \pm 0,33$ (M.W. ± S.E.M.), das Iperoxo-6-Atropin mit einem $\Delta\Delta\log(\tau/K_A) = 0,76 \pm 0,77$ (M.W. ± S.E.M.) und das Iperoxo-10-Scopolamin mit einem $\Delta\Delta\log(\tau/K_A) = 0,83 \pm 0,49$ (M.W. ± S.E.M.)

S.E.M.). Bei diesen Verbindungen könnte eine pharmakologische Relevanz durch die verpasste statistische Signifikanz verschleiert sein.

Zusammenfassend sind die meisten Testverbindungen mit Blick auf die Aktivierung des G_i -Signalweges gegenüber dem G_s -Signalweg ausgeglichen. Sie aktivieren die genannten Signalwege im gleichen Verhältnis, wie es der Referenzagonist Iperoxo vermag. Ausnahmen bilden hier die Verbindungen Iperoxo-6-Scopolamin und das Fragment Iperoxo-8, die einen „Ligand-Bias“ für den G_i -Signalweg aufweisen.

Testsubstanz	GTP γ S-Bindung $\Delta\log(\tau/K_A)$	N	cAMP-Akkumulation $\Delta\log(\tau/K_A)$	N	Ligand-Bias $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$	N
Iperoxo	0,00 $\pm 0,07$	6	0,00 $\pm 0,06$	3	0,00 $\pm 0,09$	9
Iperoxo-4-Atropin	-1,55 $\pm 0,26$	4	-0,95 $\pm 0,20$	3	0,59 $\pm 0,33$	7
Iperoxo-6-Atropin	-0,72 $\pm 0,16$	4	0,04 $\pm 0,75$	3	0,76 $\pm 0,77$	7
Iperoxo-8-Atropin	-1,52 $\pm 0,15$	5	k.A.		k.A.	
Iperoxo-10-Atropin	-0,23 $\pm 1,50$	3	k.A.		k.A.	
Iperoxo-4-Scopolamin	-1,63 $\pm 0,19$	3	-1,54 $\pm 0,14$	4	0,09 $\pm 0,23$	7
Iperoxo-6-Scopolamin	-2,13 $\pm 0,20$	3	-1,25 $\pm 0,16$	3	0,88 ** $\pm 0,26$	6
Iperoxo-8-Scopolamin	-1,29 $\pm 0,17$	3	-1,03 $\pm 0,21$	3	0,26 $\pm 0,27$	6
Iperoxo-10-Scopolamin	-0,87 $\pm 0,12$	3	-0,03 $\pm 0,47$	3	0,83 $\pm 0,49$	6
Iperoxo-4	-2,85 $\pm 0,13$	3	-2,71 $\pm 0,11$	3	0,14 $\pm 0,17$	6
Iperoxo-8	-2,86 $\pm 0,12$	3	-2,05 $\pm 0,12$	3	0,81 *** $\pm 0,17$	6

Tabelle 16: Zusammenfassung der Bias-Parameter $\Delta\log(\tau/K_A)$ und $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ -Werte der Hybridsubstanzen und ihrer Fragmente. $\Delta\log(\tau/K_A)$ ist der normalisierte Transduktionskoeffizient nach Kenakin (2012). Die Werte wurden mit Gleichung 15 ermittelt. $\Delta\Delta\log(\tau/K_A)$ ist die Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die G_i und G_s -Signalwegaktivierung. Die Werte wurden mit Gleichung 16 ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus N unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde mit Gleichung 17 bzw. 18 berechnet.

5 Diskussion

5.1 Die Bindungsaffinität der Hybridliganden zeigt sowohl Abhängigkeit von der Länge der Verbindungskette als auch vom antagonistischen Baustein

Als Voruntersuchung zu den Bindungsexperimenten mit den Hybridsubstanzen wurde die Rezeptorbindungsaffinität der Bausteine Iperoxo und Atropin mit Hilfe der Radioliganden [³H]NMS und [³H]Iperoxo bestimmt. Das Ziel war es, den Unterschied in der Bindungsaffinität der Testverbindungen zu erkennen, welchen nur die Verwendung eines Radioagonisten anstatt eines Radioantagonisten bedingt. Als agonistisch wirkender Ligand markierte [³H]Iperoxo den hochaffinen Rezeptorbindungszustand, also den G-Protein gekoppelten Rezeptor, mit höherer Affinität als den niedrigaffinen Bindungszustand (Schrage et al. 2014). Mit der Testsubstanz Iperoxo als Kompetitor gegenüber [³H]Iperoxo, wurde dadurch eine monophasische Bindungskurve erhalten. Bei Verwendung von [³H]NMS als Radioligand markierte dieses sowohl G-Protein gekoppelte als auch G-Protein entkoppelte Rezeptorproteine, also den hochaffinen und niedrigaffinen Rezeptorzustand (Hulme et al. 1990b). Iperoxo band sich mit um zwei Dekaden geringerer Affinität an den niedrigaffinen Rezeptorzustand im Vergleich mit dem hochaffinen Rezeptorzustand. Es resultierte eine biphasische Bindungskurve. Ein Vergleich des pK_i-Wertes von Iperoxo gegenüber [³H]Iperoxo in homologen Kompetitionen mit dem pK_i-Wert des hochaffinen Bindungszustands von Iperoxo gegenüber [³H]NMS in heterologen Inhibitionen, lässt keinen signifikanten Unterschied feststellen. Folglich scheint es so, dass in heterologen Bindungsexperimenten mit dem Radioliganden [³H]Iperoxo nur der hochaffine Bindungszustand markiert wird und demnach auch detektiert wird. Zusammenfassend bindet Iperoxo also mit einer höheren Affinität im [³H]Iperoxo-Bindungsexperiment, da es sich hier um G-Protein gekoppelte M₂-Rezeptoren im Versuch handelt, im Vergleich zu den heterologen [³H]NMS-Bindungsexperimenten, in denen auch nicht G-Protein gekoppelte Rezeptoren vorhanden sind.

Theoretisch ist es denkbar, dass ein Partialagonist sowohl aktive, signalkompetente Rezeptorkonformationen, als auch inaktive Konformationen stabilisieren kann (Page et al. 1995; Zhu 1996). Geht man nun weiterführend von der Hypothese aus, deren Grundstein Bock et al. (2014b) legten, indem sie für orthosterisch-orthosterische Hybridsubstanzen dynamisches Bindungsverhalten und damit Partialagonismus postulierten, dass die untersuchten Hybridsubstanzen abhängig von Kettenlänge und Affinität des verwendeten antagonistischen Bausteins mal vermehrt agonistisch, mal vermehrt antagonistisch binden, so sollte dieses Phänomen in Bindungsexperimenten mit [³H]NMS bzw. [³H]Iperoxo Unterschiede in der Bindungsaffinität der Hybridsubstanzen aufzeigen.

Die Inhibitionsbindungsexperimente der Iperoxo-Atropin Hybride und der Iperoxo-Scopolamin Hybride lieferten keine biphasischen Kurven. Es kann demnach davon ausgegangen werden, dass keine der Testverbindungen ausschließlich agonistisch bindet und damit das gleiche Bindungsverhalten wie der rein agonistische Baustein Iperoxo besitzt. Jedoch ließen sich, wie aufgrund der unterschiedlichen Struktur und Länge erwartet, Unterschiede in der Bindungsaffinität auch bei den Hybridsubstanzen feststellen, welche zudem eine Abhängigkeit vom verwendeten Radioliganden aufwiesen. Demnach binden auch die verschiedenen Hybridsubstanzen mit unterschiedlichen Affinitäten an G-Protein gekoppelte und nicht G-Protein gekoppelte M₂-Rezeptoren. Dies deutete darauf hin, dass die Hybridsubstanzen, abhängig von der Länge der Verbindungskette und vom verbauten antagonistischen Baustein, entweder einen vermehrt agonistischen Bindungsmodus oder einen vermehrt antagonistischen Bindungsmodus eingehen. Für Atropin konnte 1996 gezeigt werden, dass es auch über eine allosterische Bindung an M₂-Rezeptoren seine antagonistische Wirkung entfalten kann (Tränkle et al. 1996). Dies geschah jedoch erst in signifikant höheren Konzentrationen als in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden. Im Einklang damit konnte in Kapitel 4.2.1 keine relevante allosterische Bindung für Atropin innerhalb der eingesetzten Konzentrationen gezeigt werden, weshalb dieser Erklärungsansatz im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiterverfolgt wird.

Konkret gibt es unter den Testverbindungen damit Vertreter, welche einen antagonistischen Bindungsmodus bevorzugen, d.h. mit ihrem antagonistischen Baustein in der orthosterischen Bindungstasche des M₂-Rezeptors binden. Andere wiederum bevorzugen einen agonistischen Bindungsmodus, d.h. sie binden mit ihrem

agonistischen Baustein innerhalb der orthosterischen Bindungstasche des untersuchten Rezeptors. In der folgenden Abbildung ist dargestellt, dass bei Verwendung des Radioantagonisten [³H]NMS, die Testsubstanz abhängig von ihrem bevorzugten Bindungsmodus antagonistisch an nicht G-protein gekoppelte und agonistisch an G-Protein gekoppelte Rezeptoren bindet, bzw. die G-Protein Kopplung auslöst. Wird die gleiche Testsubstanz nun im Bindungsexperiment gegen [³H]Iperoxo untersucht, so stehen mehr G-Protein gekoppelte Rezeptoren zur Verfügung, an welche eine vornehmlich agonistisch bindende Testsubstanz mit höherer Affinität binden wird und damit eine nach links verschobene Bindungskurve resultiert (vgl. Abb. 36). Dadurch wird es möglich Testverbindungen, die einen agonistischen Bindungsmodus bevorzugen, von solchen zu unterscheiden, die bevorzugt antagonistisch binden.

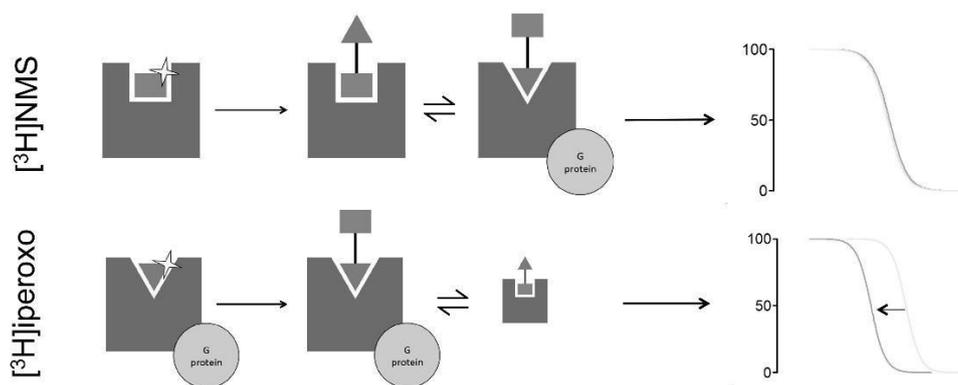


Abbildung 36: Einfluss der Verwendung verschiedener Radioliganden auf die Bindungsaffinität einer Hybridverbindung. Oben: bei Verwendung des Radioantagonisten [³H]NMS bindet die Testsubstanz abhängig von ihrem bevorzugten Bindungsmodus antagonistisch (Rechteck) an nicht G-protein gekoppelte und agonistisch (Dreieck) an G-Protein gekoppelte Rezeptoren bzw. sie löst die G-Protein Kopplung aus. Unten: Die gleiche Testsubstanz nun im Bindungsexperiment gegen [³H]Iperoxo. Es stehen mehr G-Protein gekoppelte Rezeptoren zur Verfügung, an die eine vornehmlich agonistisch bindende Testsubstanz (Dreieck) mit höherer Affinität binden wird und damit resultiert eine nach links verschobene Bindungskurve.

Die Testsubstanz Iperoxo-4-Atropin zeigte (ohne Anwendung eines kompetitiven Modells für zwei Bindungsstellen) eine signifikant geringere mittlere Bindungsaffinität zum M₂-Rezeptor in [³H]NMS-Bindungsexperimenten verglichen mit jener in [³H]Iperoxo-Bindungsexperimenten ($pK_i = 7,30 \pm 0,06$ vs. $8,43 \pm 0,08$, MW \pm SEM). Iperoxo-4-Atropin bevorzugt demnach bei seiner Bindung den G-Protein-gekoppelten Rezeptor, wie er durch [³H]Iperoxo markiert wird. Damit scheint Iperoxo-4-Atropin in

erster Linie mit seinem Iperoxo-Baustein orthosterisch zu binden, was in einer hohen partialagonistischen Wirkpotenz resultiert, wie in funktionellen Experimenten bestätigt werden konnte (vgl. Kapitel 4.3.1). Auch für Iperoxo-8-Atropin wurde in der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Rezeptorbindungsneigung gezeigt ($pK_{I(NMS)} = 7,95 \pm 0,06$; $pK_{I(IPX)} = 7,62 \pm 0,11$, MW \pm SEM). Hier war es jedoch umgekehrt: die Bindungsaffinität gemessen gegenüber $[^3H]$ Iperoxo war signifikant geringer als jene gegenüber $[^3H]$ NMS. Dies lässt nun die Interpretation zu, dass Iperoxo-8-Atropin, im Vergleich zu Iperoxo-4-Atropin, vermehrt mit seinem antagonistischen Atropin-Baustein orthosterisch bindet. Resultieren würde daraus ein geringerer Partialagonismus als im Falle von Iperoxo-4-Atropin. Auch dies konnte im funktionellen Experiment bestätigt werden (vgl. Kapitel 4.3.1). In Gegenwart der Testverbindungen Iperoxo-6-Atropin und Iperoxo-10-Atropin wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den mit beiden Radioliganden gemessenen Bindungsneigungen festgestellt. Alle Gleichgewichtsinhibitionskurven der Testverbindungen waren mit der gewählten Anzahl gemessener Datenpunkte monophasisch, womit vereinbar ist, dass es sich bei allen Hybriden um Partialagonisten handelt. Im Gegensatz zu Vollagonisten zeigen Partialagonisten nämlich sowohl im Bindungsexperiment gegen einen Radioantagonisten als auch gegen einen Radioagonisten monophasische Kurven. Dies wird damit erklärt, dass die Affinität von Partialagonisten wie auch diejenige von Antagonisten zu G-Protein freien und G-Protein gebundenen Rezeptoren sehr ähnlich ist (Tota und Schimerlik 1990). Limitiert werden könnte die Aussagekraft über die Phasizität der erhaltenen Gleichgewichtsinhibitionskurven durch die Anzahl der gemessenen Datenpunkte, da sich manchmal erst bei sehr feiner Abstufung eine leichte Biphasizität erkennen und statistisch sichern lässt.

Die Kettenlänge hat demnach im Fall der Iperoxo-Atropin Hybride großen Einfluss auf das Bindungsverhalten der Verbindungen. Iperoxo-4-Atropin bevorzugt bei der Bindung den G-Protein-gekoppelten Rezeptor, wie er durch $[^3H]$ Iperoxo markiert wird. Iperoxo-8-Atropin hingegen, bevorzugt mehr den G-Protein-entkoppelten Rezeptor, was sich in einer signifikant stärkeren Bindungsaffinität in $[^3H]$ NMS-Bindungsexperimenten niederschlägt. Dies lässt den Schluss zu, dass mit länger werdender Verbindungskette die Wahrscheinlichkeit zunimmt, dass die Verbindung antagonistisch bindet und demnach in Summe einen geringeren Partialagonismus aufweist. In Abbildung 37 wurde dieser Zusammenhang grafisch dargestellt.

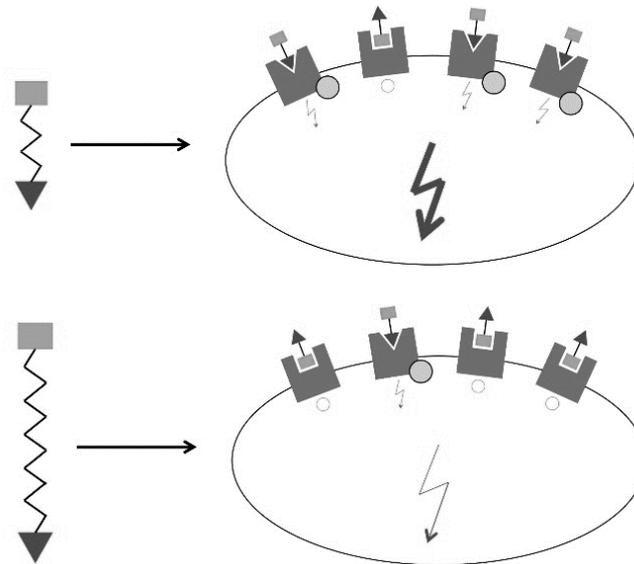


Abbildung 37: Einfluss der Länge der Verbindungskette auf die Bindungsorientierung der Testsubstanz. Oben: Eine Testsubstanz mit kurzer Verbindungskette bindet vermehrt agonistisch (Dreieck) an G-Protein gekoppelte Rezeptoren bzw. löst eine G-Protein Kopplung aus (Kreise). Es resultiert ein hohes intrazelluläres Signal und damit eine hohe partialagonistische Wirkstärke (Blitzsymbol). Unten: Eine Testsubstanz mit langer Verbindungskette bindet vermehrt antagonistisch (Rechteck) an nicht G-Protein gekoppelte Rezeptoren bzw. löst keine G-Protein Kopplung aus. Es resultiert ein geringes intrazelluläres Signal und damit eine geringe partialagonistische Wirkstärke (Blitzsymbol).

Die Ergebnisse der Verbindungen Iperoxo-6-Atropin und Iperoxo-10-Atropin passen jedoch nicht zu dieser Hypothese. Die pK_i -Werte aus den Inhibitionsbindungsexperimenten mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ und $[^3\text{H}]\text{Iperoxo}$ zeigen keinen signifikanten Unterschied. Damit scheinen beide Hybride mit gleicher Affinität an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor und an den G-Protein-entkoppelten Rezeptor zu binden. Die in Abbildung 37 dargestellte Abhängigkeit gilt damit nur für die Verbindungen Iperoxo-4-Atropin und Iperoxo-8-Atropin, nicht jedoch für Iperoxo-6-Atropin und Iperoxo-10-Atropin. Die Kettenlängen mit vier und acht Kohlenwasserstoffen könnten einen „sweet spot“ darstellen, an dem das beobachtete Phänomen erkannt werden konnte. Iperoxo-6-Atropin ist ggf. zu lang, um eine bevorzugte agonistische Bindung erkennen zu lassen. Iperoxo-10-Atropin hingegen zeigt vielleicht aufgrund seiner schieren Größe ein anderes Verhalten als erwartet.

Bei den Hybridverbindungen bestehend aus Iperoxo und Scopolamin wurde der von der Zwischenkettenlänge abhängige Unterschied in der Bindungsaffinität durch die Verwendung von Scopolamin statt Atropin komplett eliminiert. Alle Testverbindungen, egal ob mit einer Verbindungskette aus 4, 6, 8 oder 10 Kohlenwasserstoffen, zeigten

untereinander vergleichbares Bindungsverhalten. Es wurde für jede einzelne Verbindung eine signifikant höhere Bindungsaffinität für den G-Protein-gekoppelten M₂-Rezeptor (³H]Iperoxo-Bindungsexperiment) als für den G-Protein-entkoppelten Rezeptor (³H]NMS-Bindungsexperiment) nachgewiesen. Die Länge der aliphatischen Verbindungskette scheint demnach bei den Iperoxo-Scopolamin Hybridsstoffen, im Gegensatz zu den Hybriden aus Iperoxo und Atropin, keinen oder nur einen geringeren Unterschied in ihrem Bindungsverhalten zu bewirken. Nichtsdestotrotz handelte es sich auch in diesen Experimenten bei allen Bindungskurven um monophasische Kurven, weshalb für alle Testverbindungen eine partialagonistische Wirkung postuliert werden kann, welche sich innerhalb der Substanzfamilie nicht signifikant unterscheiden sollte. Diese Vermutung wurde im funktionellen Experiment bestätigt. Alle Hybridverbindungen mit Scopolamin als antagonistischer Baustein erreichten in [³⁵S]GTPγS-Experimenten maximale Wirksamkeiten (E_{max}) von 60-70%, welche sich nicht signifikant voneinander unterschieden (vgl. Abb. 20 B in Kapitel 4.3.2).

Die Antwort auf die Frage, warum die Verwendung von Atropin als antagonistischer Baustein bewirkt, dass die Länge der Verbindungskette einen Einfluss auf die Bindungsorientierung der Hybride hat, die Verwendung von Scopolamin jedoch nicht, liesse sich wie folgt geben. Iperoxo besitzt eine Affinität für den untersuchten M₂-Rezeptor von pK_i = 9,8 (Schrage et al. 2013), Atropin von pK_i = 9,0-9,1 (Kashihara et al. 1992; Kovacs et al. 1998; Hsieh und Liao 2002; Nelson et al. 2006) und Scopolamin von pK_i = 8,7 (Huang et al. 2001). Ein möglicher Erklärungsansatz ist, dass der Agonist- und Antagonistmolekülteil abhängig von der Kettenlänge um die orthosterische Bindungsstelle am M₂-Rezeptor konkurrieren könnten. Das ΔpK_i zwischen Iperoxo und Scopolamin ist mit einem Wert von 1,1 jedoch offenbar so groß, dass die Affinität von Scopolamin für die orthosterische Bindungsstelle nicht ausreicht, um sich hinsichtlich seiner Bindungsneigung gegen Iperoxo durchzusetzen. Dementsprechend könnte in dieser Konstellation immer Iperoxo orthosterisch binden und der voluminöse Scopolamin-Teil bewirkt lediglich eine sterische Hinderung der Rezeptorkonformationsänderung, wodurch kein vollagonistischer Effekt mit diesen Hybriden erreicht wird, wie dies bereits für andere dualsterische, orthosterisch-allosterische Iperoxo-Hybride vermutet wurde (Bock et al. 2012). Die partialagonistische maximale Wirksamkeit E_{max} in funktionellen Experimenten, die für

alle Iperoxo-Scopolamin Hybride auf dem gleichen Niveau liegt, untermauert diese Einschätzung und wird in Kapitel 5.3 weitergehend diskutiert.

Nachdem die Affinitätsunterschiede der verschiedenen Testverbindungen im [³H]NMS- bzw. [³H]Iperoxo-Bindungsexperiment besprochen und mit den Affinitäten der Einzelbausteine in Verbindung gebracht wurden, wird im Folgenden nochmal die Affinität der Hybridverbindungen in Abhängigkeit von der Länge der Verbindungskette aufgegriffen. Die Iperoxo-Atropin Hybride zeigen eine klare Korrelation zwischen der Länge der Verbindungskette und ihrer Affinität für den M₂-Rezeptor im [³H]NMS-Bindungsexperiment (Iper-4-Atr < Iper-6-Atr < Iper-8-Atr < Iper-10-Atr, vgl. Abb. 13 A in Kapitel 4.1.5). Mit der Länge der Verbindungskette erhöht sich auch die Affinität der Testverbindungen, was daran liegen könnte, dass eine lange Verbindungskette die freie Drehbarkeit und Ausrichtung der Bausteine Iperoxo und Atropin weniger behindert als eine kurze Kette. Damit könnten sich die Bausteine leichter in eine für ihre Bindung am Rezeptor optimale Position bewegen und die Affinität wäre entsprechend höher als bei Hybridverbindungen, deren Beweglichkeit durch eine verkürzte Kette eingeschränkt ist. Werden dieselben Verbindungen im [³H]Iperoxo-Bindungsexperiment betrachtet, zeigen sie eine geänderte Reihenfolge der Affinität (Tendenz: Iper-8-Atr < Iper-6-Atr < Iper-4-Atr < Iper-10-Atr, vgl. Abb. 13 B in Kapitel 4.1.5), was auf eine bevorzugte Bindungstopographie in Abhängigkeit von den Affinitäten der Einzelbausteine hindeutet, und im vorangegangenen Absatz erläutert wurde.

Iperoxo-Scopolamin Hybride weisen diese strenge Korrelation zwischen der Länge der Verbindungskette und der im [³H]NMS-Bindungsexperiment gemessenen Affinität für den M₂-Rezeptor nicht auf. Die Affinität von Iperoxo-4-Scopolamin, also dem Hybrid mit der kürzesten Kette, unterscheidet sich nicht signifikant von Iperoxo-8-Scopolamin. Es fügt sich damit aufgrund seiner relativ hohen Affinität, trotz eingeschränkter intramolekularer Beweglichkeit, nicht in die Reihe der Korrelation zwischen Verbindungskettenlänge und Bindungsneigung ein. Erst ab der Länge der Hybridverbindung Iperoxo-6-Scopolamin ist diese Korrelation wieder zu erkennen. Warum das Iperoxo-4-Scopolamin trotz eingeschränkter Beweglichkeit eine hohe Affinität zeigt, kann an dieser Stelle nicht geklärt werden. Es ist aber auszuschließen, dass es sich um eine zufällige oder versuchsansatzbedingte Beobachtung handelt, da das gleiche Phänomen auch im [³H]Iperoxo-Bindungsexperiment zu beobachten war.

Die gleichmäßige Zunahme der Affinität aller Iperoxo-Scopolamin Hybride im [³H]Iperoxo-Bindungsexperiment gegenüber dem [³H]NMS-Bindungsexperiment lässt sich, wie bereits diskutiert, mit einer gleichbleibenden Bindungstopographie der Testverbindungen erklären, welche nicht abhängig sein sollte vom verwendeten Radioliganden und auf dem hohen Affinitätsunterschied (ΔpK_i) zwischen agonistischem und antagonistischem Baustein beruhen könnte.

Zusammenfassend können die ersten Überlegungen durch Bock et al. (2014b), welche dynamisches Bindungsverhalten und damit Partialagonismus für orthosterisch-orthosterische Hybridliganden postulierten, durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gestützt werden, wenn der Unterschied in der intrinsischen Aktivität der beiden Bausteine groß genug ist. Außerdem ist zu ergänzen, dass sowohl die Affinität der Bausteine für die orthosterische Bindungsstelle des Zielrezeptors als auch die Länge der Verbindungskette einen elementaren Einfluss auf das Bindungsverhalten der Hybrids substanz ausübt.

5.2 Hybrids substanz besitzen eine geringe Affinität für die allosterische Bindungsstelle des M₂-Rezeptors

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hybrids substanz weisen keinen Molekülteil auf, der als allosterischer Modulator fungiert, wie er in Verbindungen vorkommt, die in früheren Arbeiten im Arbeitskreis von Herrn Prof. Mohr untersucht wurden (z.B. Chirinda 2015; Krebs 2017), sondern bestehen aus zwei orthosterisch bindenden Bausteinen. Für orthosterisch-orthosterische und allosterisch-allosterische bipharmakophore Liganden postulierten Bock et al. (2014b) möglichen Partialagonismus auf Basis von dynamischem Bindungsverhalten, wenn die intrinsische Aktivität der verwendeten Bausteine einen ausreichend großen Unterschied aufweisen würde. Die Methode der „2-Punkt-Kinetik-Experimente“ nach Kostenis und Mohr 1996 wurde durchgeführt um eine mögliche allosterische Affinität der Hybride, trotz Abwesenheit eines allosterischen Modulators, zu quantifizieren.

Erwartet wurden, aufgrund der rein orthosterischen Bausteine, keine hohen Affinitätswerte der untersuchten Verbindungen für die allosterische Bindungsstelle des M₂-Rezeptors (Tränkle et al. 1996). Die Voruntersuchungen mit den Bausteinen

Iperoxo und Atropin zeigten eine [³H]NMS-dissoziationsverzögernde Wirkung erst bei unphysiologisch hohen Konzentrationen im millimolaren Bereich. Außerdem erreichten die Konzentrations-Effekt-Kurven für die allosterische Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation ein unteres Plateau oberhalb von k_{-1} (in % der Kontrolle) = 0, was bedeutet, dass keine komplette Dissoziationsverzögerung erreicht werden konnte (Tränkle et al. 1996; Schrage et al. 2014). Die Affinität der einzelnen Bausteine Iperoxo und Atropin für die allosterische Bindungsstelle des M₂-Rezeptors ist demnach außerordentlich gering.

Interessant jedoch war es zu sehen, dass die Hybridverbindungen, also die Iperoxo-Atropin-Hybride als auch die Iperoxo-Scopolamin-Hybride, eine signifikant höhere Affinität für die allosterische Bindungsstelle aufweisen als ihre Einzelbausteine. Abbildung 15 in Kapitel 4.2.2 zeigt, dass die Wendepunkte der Kurven und damit die Affinität aller untersuchten Hybridsubstanzen im mikromolaren Bereich liegen. Die unteren Plateaus der Messkurven konnten allesamt den Wert von 0 nicht erreichen, womit keine der untersuchten Verbindungen in der Lage war eine komplette [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung zu bewirken (vgl. Abb. 16 in Kapitel 4.2.2). Außerdem war kein signifikanter Unterschied zwischen der allosterischen Affinität der Iperoxo-Atropin- und der Iperoxo-Scopolamin Hybride bei gleicher Kettenlänge feststellbar. Die schiere Größe der Hybridsubstanzen gegenüber den Einzelbausteinen scheint eine Erhöhung der allosterischen Affinität zur Folge zu haben, diese ist aber wohl nicht in Abhängigkeit einer bestimmten Kettenlänge oder eines bestimmten Bausteins. Dementsprechend wird die allosterische Affinität der Hybridsubstanzen als nicht spezifisch angesehen. Es wird davon ausgegangen, dass alle Testverbindungen in den für die Bindungsversuche und für die funktionellen Experimente verwendeten Konzentrationen im nanomolaren Bereich nur vernachlässigbar gering allosterisch binden. Alle gefundenen rezeptorvermittelten funktionellen Effekte der Testverbindungen können daher auf eine orthosterische Bindung in Zusammenhang mit einer sterischen Hinderung durch den nicht gebundenen Molekülteil zurückgeführt werden (Bock et al. 2014a). Eine allosterische Bindung wird daher nicht als mögliche Ursache für gefundene Effekte in Betracht gezogen.

5.3 Iperoxo-Atropin Hybride zeigen eine kettenlängenabhängige G_i-Signalwegaktivierung

Nachdem die Ergebnisse der Experimente zum Bindungsverhalten der Hybridsubstanzen und ihrer Bausteine in den vorangegangenen Kapiteln diskutiert wurden, wird nun die Art und das Ausmaß der Aktivierung des M₂-Rezeptors durch die Testverbindungen besprochen. Der präferentielle Signalweg des M₂-Rezeptors ist der G_i-Signalweg (Kenakin 2003; Kenakin 2014). Zur Begutachtung des G_i-Signalweges wurden [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente an Membransuspensionen aus Flp-CHO-M₂-Zellen durchgeführt. Es wurde beobachtet, dass das Ausmaß der Rezeptoraktivierung auf dem G_i-Signalweg durch die Hybridsubstanzen ist sowohl von der Länge der Verbindungskette, als auch vom verwendeten antagonistischen Baustein (Atropin oder Scopolamin) abhängig ist. Alle Hybridsubstanzen zeigten Partialagonismus auf dem untersuchten Signalweg, wobei es einen deutlichen Unterschied im Ausmaß der Rezeptoraktivierung zwischen den Iperoxo-Atropin Hybriden und denen, die aus Iperoxo und Scopolamin bestehen, gab. Die Fragmente Iperoxo-8 und Iperoxo-4, also der agonistische Teil der Hybridsubstanzen zusammen mit der Verbindungskette, wiesen vollagonistischen Charakter auf. Dies ist im Einklang mit früheren Untersuchungen des Fragments Iperoxo-6 (Bock et al. 2012). Nur die Verbindungskette von 4 bzw. 8 Kohlenwasserstoffen ohne antagonistischem Molekülteil war demnach, vermutlich aufgrund ihrer begrenzten Größe, nicht in der Lage den Charakter des Superagonisten Iperoxo (Schrage et al. 2013) hinsichtlich seiner maximalen Wirksamkeit E_{max} unter diejenige eines Vollagonisten zu vermindern.

Die Fähigkeit der maximalen Rezeptoraktivierung der Iperoxo-Atropin Hybride ist streng abhängig von der jeweiligen Kettenlänge. Alle Hybridsubstanzen unterscheiden sich signifikant in ihrer Fähigkeit den G_i-Signalweg zu aktivieren (maximale Wirksamkeit E_{max}). Sie weisen alle einen partialagonistischen Charakter auf und das Ausmaß des Partialagonismus sinkt mit der Länge der Verbindungskette.

Dies ist ein weiterer Schritt hin zur Verfestigung der in Kapitel 5.1 aufgestellten Hypothese, dass bei dieser Art der Hybridsubstanzen das Ausmaß der in Gesamtheit betrachteten Aktivierung der M₂-Rezeptoren und damit der Bindungsmodus der Verbindungen kettenlängenabhängig ist. Abbildung 38 verdeutlicht diesen

Zusammenhang grafisch. Eine Testsubstanz mit kurzer Verbindungskette wie z.B. Iperoxo-4-Atropin bindet eher mit seinem agonistischen Baustein, also mit Iperoxo, als mit seinem antagonistischen Baustein (Atropin). Daraus resultiert in der Gesamtheit aller M₂-Rezeptoren einer Zelle, dass mehr Hybridmoleküle agonistisch gebunden sind als in antagonistischer Orientierung. Demnach werden viele G-Proteine rekrutiert, was sich in einem hohen Signal im [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment widerspiegelt. Dies wiederum bewirkt eine Konzentrations-Effekt-Kurve mit einem hohen oberen Effektplateau und damit eine hohe partialagonistische maximale Wirksamkeit (vgl. Abb. 38, oben). Im Gegensatz dazu bindet eine Testsubstanz mit längerer Kettenlänge, z.B. Iperoxo-10-Atropin, vermehrt auch mit seinem antagonistischen Baustein Atropin orthosterisch an den untersuchten M₂-Rezeptor. Damit sind, wird die Gesamtheit der Rezeptoren einer Zelle betrachtet, mehr Rezeptoren antagonistisch gebunden, als dies im Falle des Iperoxo-4-Atropin der Fall wäre. Daraus folgt, dass weniger Rezeptoren G-Proteine rekrutierten und damit weniger Rezeptoren zur intrazellulären Signalwegaktivierung beitragen.

Es resultiert schlussendlich eine Konzentrations-Effekt-Kurve mit einem niedrigeren oberen Plateau und damit eine geringere partialagonistische maximale Wirksamkeit E_{max} (vgl. Abb. 38, unten).

Jedoch handelt es sich bei jedem der untersuchten Hybride um Partialagonisten, da, je nach Hybrid, eine bestimmte Anzahl an Rezeptoren im System antagonistisch gebunden werden und damit nicht zur Signalstärke beitragen. Dieses Prinzip des Partialagonismus konnte schon für orthosterisch-allosterische Hybridsubstanzen am M₂-Rezeptor gezeigt werden (Bock et al. 2014a). Bei einem Vollagonisten wären, im Gegensatz dazu, in der Theorie 100% der Rezeptoren agonistisch gebunden und würden eine Signalantwort auslösen. Das obere Plateau der resultierenden Konzentration-Effekt-Kurve liegt demnach bei einem Vollagonisten bei 100%. Die Affinitäten von Iperoxo und Atropin für die orthosterische Bindungsstelle des M₂-Rezeptors liegen, wie in Kapitel 5.1 beschrieben, so nah beieinander, dass eine Konkurrenzsituation auftreten kann, welche in Abhängigkeit von der Länge der Verbindungskette hin zum agonistischen Baustein oder hin zum antagonistischen Baustein verschoben ist. Es resultieren Konzentrations-Effekt-Kurven mit oberen Plateaus <100%.

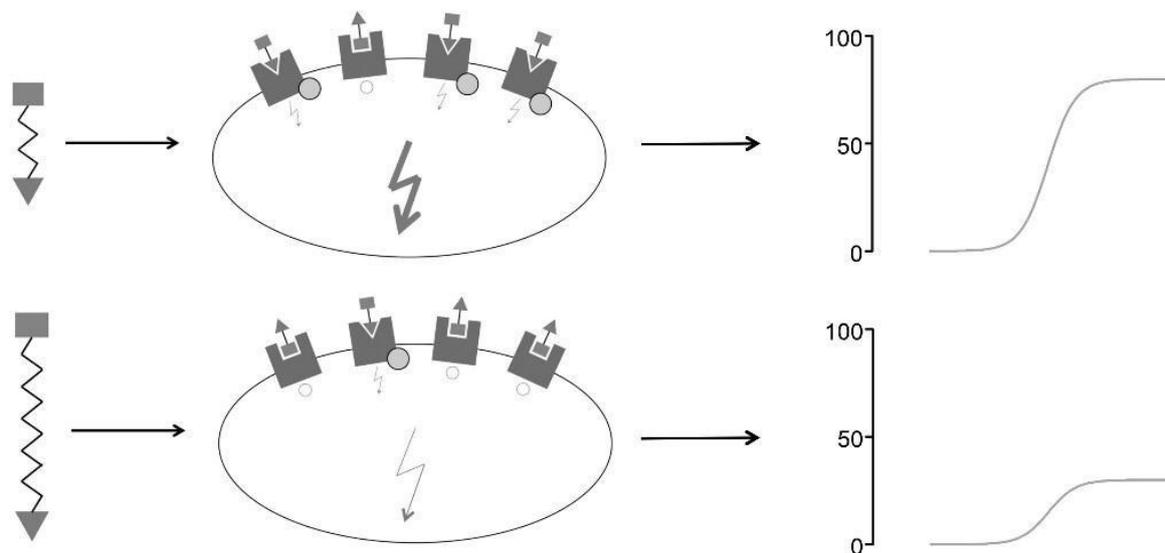


Abbildung 38: Einfluss der Länge der Verbindungskette auf die Bindungsorientierung der Testsubstanz und damit auf die Rezeptoraktivierung.

Oben: Eine Testsubstanz mit kurzer Verbindungskette bindet vermehrt agonistisch (Dreieck) an G-Protein gekoppelte Rezeptoren bzw. sie löst die G-Protein Kopplung aus (Kreise). Es resultiert ein hohes intrazelluläres Signal und damit eine hohe partialagonistische maximale Wirkstärke (Blitz und hohe Kurve). Unten: Eine Testsubstanz mit langer Verbindungskette bindet vermehrt antagonistisch (Rechteck) an nicht G-Protein gekoppelte Rezeptoren bzw. sie löst keine G-Protein Kopplung aus (Kreise). Es resultiert ein geringes intrazelluläres Signal (Blitz) und damit eine geringe partialagonistische maximale Wirkstärke (Blitz und flache Kurve).

Das für die Iperoxo-Atropin Hybride geltende Prinzip der zwischenkettenlängenabhängigen Signalwegsaktivierung kann für die Hybridsubstanzen bestehend aus Iperoxo und Scopolamin keine Anwendung finden. Hier erreichen im $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperiment die Konzentrations-Effekt-Kurven aller Testverbindungen obere Plateaus, die nicht signifikant verschieden voneinander sind. Egal welche Länge die Verbindungskette aufweist, die den Baustein Iperoxo mit dem Baustein Scopolamin verbindet, das Ausmaß der Rezeptoraktivierung ist nicht signifikant verschieden zwischen den unterschiedlichen Hybridverbindungen. Dies lässt sich, wie in Kapitel 5.1 erläutert, auf den hohen Affinitätsunterschied zwischen Iperoxo und Scopolamin für die orthosterische Bindungsstelle des M_2 -Rezeptors zurückführen. Die Konkurrenzsituation zwischen dem agonistischen Baustein und dem antagonistischen Baustein, wie sie bei den Iperoxo-Atropin Hybriden stattfindet, wird hier durch die relevant höhere Affinität von Iperoxo für die orthosterische Bindungsstelle des M_2 -Rezeptors unterbunden. Bock et al. (2012) zeigten, dass durch die Verwendung großer allosterischer Bausteine die freie Beweglichkeit des Rezeptors beeinträchtigt und damit das Ausmaß der Rezeptoraktivierung verringert werden kann.

Es wurde daher auch bei den vorliegenden Ergebnissen davon ausgegangen, dass fast ausschließlich Iperoxo orthosterisch an den Rezeptor bindet und der Scopolamin-Teil der Hybridsubstanz lediglich zu einer sterischen Hinderung der Rezeptorkonformationsänderung bei Aktivierung führt. Dies resultiert in einem Partialagonismus, der allerdings keine Abhängigkeit von der Kettenlänge zeigt.

Um die Theorie der sterischen Hinderung zu untermauern, wurden Fragmente der Hybridsubstanzen im [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment untersucht. Diese Fragmente bestanden lediglich aus dem Iperoxo-Teil der Hybride und einer aliphatischen Kette aus 4 bzw. 8 Kohlenwasserstoffen. Damit konnte herausgefunden werden, ob die partialagonistische Wirkung der Hybride aus Iperoxo und Scopolamin abhängig vom Baustein Scopolamin ist oder allein schon durch sterische Hinderung der aliphatischen Kette ausgelöst wird. Beide Fragmente zeigten im [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment jedoch eine vollagonistische Wirksamkeit (E_{max}), was auch schon zuvor für das Fragment Iperoxo-6 ermittelt wurde (Bock et al. 2012). Die oberen Plateaus ihrer Konzentrations-Effekt-Kurven unterschieden sich daher nicht signifikant von dem von Iperoxo. Daher liegt es nahe, dass die Struktur des Scopolamin selbst notwendig ist, um die maximale Wirkstärke der bipharmakophoren Verbindungen auf ein partialagonistisches Niveau von rund 60% des Niveaus von Iperoxo zu drücken.

5.4 Darstellung des antagonistischen Effektes von Atropin

Da die in den vorigen Kapiteln diskutierten Ergebnisse darauf hindeuteten, dass die Hybridsubstanzen aus Iperoxo und Atropin in der Lage sind mit ihrem antagonistischen Teil (Atropin) orthosterisch zu binden, die Iperoxo-Scopolamin Hybride dies aber den Ergebnissen nach wahrscheinlich nicht tun, werden an dieser Stelle weitere Untersuchungen diskutiert, die diese Theorie untermauern. Einen Beweis für die mögliche allosterische Bindung könnten zukünftige Studien liefern, in denen die für die allosterische Bindung der Hybridverbindungen notwendigen Aminosäuren des Zielrezeptors mutiert werden und damit für die Bindung nicht mehr zur Verfügung stehen (Voigtländer et al. 2003). Solche Mutationsstudien wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht durchgeführt, sondern der Einfluss des antagonistischen Bausteins Atropin bzw. Scopolamin auf die Rezeptoraktivierung wurde zur weiteren Aufklärung

des Sachverhaltes durch ein modifiziertes Verfahren des [³⁵S]GTPγS-Experimentes (Waud 1975; Lazareno und Birdsall 1993; Tränkle et al. 2005) bestimmt. Hierbei wurden steigende Konzentrationen der Hybridsubstanz gegen eine fixe Konzentration des agonistischen Bausteines Iperoxo vermessen. Mit dieser Art der Analyse wurden aus beiden Hybridfamilien zwei Vertreter analysiert. Von den Iperoxo-Atropin Hybriden kamen Iperoxo-8-Atropin und Iperoxo-10-Atropin zum Einsatz. Aus der Familie der Iperoxo-Scopolamin Hybride wurden Iperoxo-8-Scopolamin und Iperoxo-10-Scopolamin als Vertreter ausgewählt. Es wurden jeweils die beiden Hybridsubstanzen mit den längsten Verbindungsketten ausgesucht, da diese im klassischen [³⁵S]GTPγS-Experiment den geringsten Partialagonismus, d.h. die geringste maximale Wirksamkeit zeigen, woraus geschlussfolgert wird, dass ihre antagonistische Potenz wahrscheinlich größer ist, als jene der Hybridsubstanzen mit kürzerer Verbindungskette.

Die beiden Hybridfamilien unterscheiden sich deutlich in ihrer antagonistischen Potenz. Ein Vertreter der Iperoxo-Atropin Hybride, das Iperoxo-8-Atropin, war in der Lage die fixe Konzentration an Iperoxo zu antagonisieren. Es wurde eine absteigende Konzentrations-Effekt-Kurve erhalten. Die Datenpunkte der Kurve von Iperoxo-8-Scopolamin blieben auf einem gleichbleibenden Niveau von ungefähr 90% des oberen Plateaus der Iperoxo-Kurve. Dies rührt daher, dass die Fixkonzentration von Iperoxo, die im Versuchsansatz eingesetzt wurde, genau die Konzentration von Iperoxo ist, welche 90% seines oberen Effektplateaus entspricht. Damit war die Testsubstanz Iperoxo-8-Scopolamin nicht in der Lage den Effekt der Fixkonzentration an Iperoxo zu antagonisieren. Hiermit konnte ein weiterer Beleg für die Hypothese erbracht werden, dass die Hybridsubstanzen aus Iperoxo und Atropin in der Lage sind mit ihrem antagonistischen Teil orthosterisch zu binden und damit in diesem experimentellen Ansatz die fixe Konzentration von Iperoxo zu antagonisieren. Der Vertreter der Iperoxo-Scopolamin Hybride vermochte dies nicht zu erreichen. Dies zeigt, dass diese Familie von Hybridsubstanzen mit Scopolamin als antagonistischem Baustein nicht mit diesem Teil ihrer Struktur eine orthosterische Bindung eingeht. Damit sind sie also nicht in der Lage antagonistisch zu binden und einen vorhandenen Effekt zu antagonisieren. Dies könnte einen Hinweis auf neutrale Kooperativität darstellen, für dessen Nachweis ein funktionelles allosterisches Modell angewendet werden müsste, um den Kooperativitätsfaktor α zu bestimmen (Bdioui et al. 2019). Dies wurde in Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt, weshalb eine Aussage über die

Kooperativität der getesteten Iperoxo-Scopolamin-Hybridsubstanzen nicht getroffen werden kann.

Mit der simultanen Analyse nach Waud konnte die Art des Antagonismus gegenüber Iperoxo bestimmt und die antagonistische Potenz der Testverbindungen berechnet werden. Demnach handelt es sich sowohl bei Iperoxo-8-Atropin als auch bei Iperoxo-10-Atropin um formal kompetitive Antagonisten, ein Befund, der aufgrund der erwarteten orthosterischen Bindung durch Atropin die Hypothese eines orthosterischen Wettbewerbes zwischen Hybrid und Iperoxo bestätigt. Der errechnete pK_B beträgt für Iperoxo-8-Atropin $7,98 \pm 0,25$ und für Iperoxo-10-Atropin $8,47 \pm 0,15$ (immer M.W. \pm S.E.M., vgl. Tab. 12 in Kapitel 4.4.1). Ein Vergleich der Werte mit dem T-Test ($P < 0,05$) ergab keinen signifikanten Unterschied; jedoch ist eine Tendenz hin zu einer höheren antagonistischen Potenz bei längerer Kettenlänge zu erahnen. Auch dies ist ein weiteres Indiz für die Hypothese, dass die Iperoxo-Atropin Hybride mit längerer Kette vermehrt antagonistisch binden.

5.5 Kettenlängen-gesteuerter Partialagonismus der Hybridsubstanzen auf dem G_s -Signalweg

Eine weitere Fragestellung, die in dieser Arbeit behandelt wurde ist, ob die untersuchten Hybridsubstanzen einen Signalweg gegenüber einem anderen Signalweg, verglichen mit einem Referenzagonisten, präferieren. Ausgewählt wurde hierfür neben dem präferentiellen G_i -Signalweg, welcher durch [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimente analysiert wurde, die Erforschung des G_s -Signalweges durch cAMP-Experimente. Da in Anwesenheit hoher Konzentrationen eines Agonisten auch G_s -Proteine durch den M_2 -Rezeptor rekrutiert werden können, ist die Aktivierung dieses Signalweges nicht nur von experimenteller, sondern auch von physiologischer Bedeutung (Antony et al. 2009). Die intrazelluläre Konzentration des sekundären Botenstoffes cAMP wird zwar sowohl durch G_s -Proteine als auch durch $G_{i/o}$ -Proteine beeinflusst (Kenakin 2014), es konnte sich jedoch auf den Einfluss der G_s -Proteine dadurch fokussiert werden, dass der $G_{i/o}$ -Inhibitor Pertussis Toxin (PTX) zum Einsatz kam, um die $G_{i/o}$ -Proteine funktionsunfähig zu machen. Die erhaltenen Ergebnisse spiegeln also den Einfluss der Testverbindungen auf die Aktivierung des M_2 -Rezeptors mit anschließender Rekrutierung von G_s -Proteinen wider. Im Anschluss an die cAMP-

und [³⁵S]GTPγS-Experimente konnte mit den aus ihnen gewonnenen Ergebnissen auf die Anwesenheit eines „Ligand-Bias“ geprüft werden, welcher im folgenden Kapitel diskutiert wird.

Als Referenzsubstanzen wurden neben dem Superagonisten Iperoxo auch der inverse Agonist Atropin untersucht. Grund hierfür ist, dass in den durchgeführten cAMP-Experimenten nicht willentlich herbeigeführte spontane Aktivität der Rezeptoren in Erscheinung trat, welche die invers agonistische Wirkung von Atropin sichtbar machte, die auch schon zuvor in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten gezeigt werden konnte (Hilf und Jakobs 1992). Das Resultat war, im Sinne eines invers agonistischen Effektes, ein negatives oberes Plateau der Atropin-Kurve. Es war damit im nativen funktionellen Experiment möglich, sowohl die agonistische Wirkung von Iperoxo als auch die invers agonistische Wirkung des Atropins zu ermitteln. Somit war zu beobachten, ob die agonistische Eigenschaft des Iperoxo-Bausteins oder die invers antagonistische Eigenschaft des Atropin-Bausteins eines bestimmten Iperoxo-Atropin Hybrides im cAMP-Experiment überwiegen würde. Wäre also ein partialagonistisches Verhalten eines Hybrids zu beobachten, so müsste dieses vom Baustein Iperoxo ausgehen. Zeigte das Hybrid hingegen invers agonistischen Charakter, so überwöge die Wirkung des Bausteins Atropin. Im Hinblick auf die Hybridsubstanzen mit Scopolamin als antagonistischem Baustein ist nicht von einem invers agonistischen Verhalten der Testverbindungen auszugehen, da ein solches für Scopolamin in früheren Arbeiten nicht nachgewiesen werden konnte (Kaufel 2010). Somit entpuppte sich das cAMP-Experiment, neben der Ermittlung des „Ligand-Bias“ aus den erhaltenen Ergebnissen als weitere Möglichkeit das Bindungsverhalten der Hybridsubstanzen aufzuklären. Zu erwarten war ein partialagonistischer Effekt der kurzkettigen Iperoxo-Atropine und aller Iperoxo-Scopolamine sowie ein invers agonistischer Effekt der langkettigen Iperoxo-AtropinHybride. Diese Vermutungen konnten experimentell bestätigt werden. Iperoxo-4-Atropin und Iperoxo-6-Atropin sind relativ starke Partialagonisten. Sie binden bevorzugt mit ihrem agonistischen Baustein orthosterisch an den M₂-Rezeptor, was diesen aktiviert und in einem hohen partialagonistischen Effekt (E_{max}) resultiert. Jedoch sind beide Verbindungen auf dem G_s-Signalweg sehr viel schwächere Partialagonisten als auf dem G_i-Signalweg, welcher durch die Durchführung von [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten untersucht wurde. Iperoxo-8-Atropin und Iperoxo-10-Atropin zeigen im cAMP-Experiment im Gegensatz dazu eine invers agonistische Wirkung, welche sich nicht signifikant von

der der Referenzsubstanz Atropin unterscheidet. Somit war auch auf dem G_s -Signalweg wie auf dem G_i -Signalweg eine strenge Korrelation zwischen der Länge der Verbindungskette und der Aktivierung des M_2 -Rezeptors zu beobachten.

Bei den Iperoxo-Scopolamin Hybriden sollten die Ergebnisse des cAMP-Experimentes, ausgehend von den Überlegungen der vorangegangenen Kapitel, anders ausfallen, als die der Iperoxo-Atropin Hybride. Und auch hier passen die gewonnenen Erkenntnisse mit den theoretischen Überlegungen zusammen. Alle Hybridsubstanzen aus Iperoxo und Scopolamin zeigten im cAMP-Experiment auf dem G_s -Signalweg eine partialagonistische Wirkung. Diese war auf dem G_i -Signalweg nicht abhängig von der Kettenlänge. Auf dem G_s -Signalweg konnte jedoch eine gewisse Abhängigkeit von der Länge der Verbindungskette zwischen Iperoxo und Scopolamin festgestellt werden. Die Hybridsubstanzen mit einer Kettenlänge von 4 bzw. 6 Kohlenwasserstoffen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Iperoxo-8-Scopolamin und Iperoxo-10-Scopolamin unterschieden sich ebenfalls nicht voneinander, zeigten aber einen signifikant schwächeren Partialagonismus als ihre Familienmitglieder mit den kürzeren Verbindungsketten. Damit war interessanterweise auf dem G_s -Signalweg, anders als auf dem G_i -Signalweg ein Kettenlängenabhängiges partialagonistisches Verhalten für die Iperoxo-Scopolamin Hybride feststellbar. Dies könnte der Tatsache geschuldet sein, dass unterschiedliche Liganden in der Lage sind, unterschiedliche Konformationsänderungen des Rezeptors zu induzieren und damit die Rekrutierung eines bestimmten G-Proteins gegenüber einem anderen zu bevorzugen (Vaidehi und Kenakin 2010). Dieses als „Ligand-Bias“ bekannte Phänomen wird im folgenden Kapitel für alle Testverbindungen diskutiert.

5.6 G_i -Bias von Iperoxo-6-Scopolamin und dem Fragment Iperoxo-8

Im letzten Schritt der Analyse der Effekte der Hybridsubstanzen und ihrer Fragmente wurde mit Hilfe der erhaltenen funktionellen Daten aus [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperimenten sowie cAMP-Experimenten der „Ligand-Bias“ für jede Testsubstanz bestimmt. Bei der Bestimmung des „Ligand-Bias“ handelt es sich um eine Methode, die es ermöglicht, eine quantitative Aussage über eine eventuelle Ligand-spezifische Bevorzugung eines Signalweges gegenüber einem anderen zu

treffen. Dieses Phänomen tritt erst dann in Erscheinung, wenn verschiedene Rezeptorvermittelte Effekte durch die Aktivierung von mindestens zwei unterschiedlichen Signalkaskaden hervorgerufen werden. Im Falle des M₂-Rezeptors kommt hierfür das vom Rezeptor bevorzugte G_i-Protein und das vor allem durch hohe Agonistkonzentrationen gebundene G_s-Protein in Frage (Antony et al. 2009). Inwiefern ein untersuchter Agonist nun in der Lage ist, die Bindung des einen möglichen G-Proteins mehr als die des anderen G-Proteins hervorzurufen – immer in Relation zu einem Referenzagonisten – lässt sich mit Hilfe des „Ligand-Bias“ quantifizieren.

Es ist auffällig, dass alle Testverbindungen eine Tendenz hin zu einem „Ligand-Bias“ zum G_i-Signalweg aufweisen. Die einzigen beiden Verbindungen, die sich jedoch signifikant von Iperoxo unterscheiden und damit einen G_i-Bias besitzen, sind Iperoxo-6-Scopolamin sowie das Fragment Iperoxo-8. Erwähnt werden sollten hier Iperoxo-4-Atropin, Iperoxo-6-Atropin und Iperoxo-10-Scopolamin, die alle weit auf der Seite eines G_i-Bias liegen, der jedoch nicht signifikant verschieden von demjenigen für Iperoxo war (T-Test, P < 0,05). Bei diesen Verbindungen könnte eine pharmakologische Relevanz durch die verpasste statistische Signifikanz verschleiert sein.

Zusammenfassend sind die meisten in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen mit Blick auf die Aktivierung des G_i-Signalweges gegenüber dem G_s-Signalweg ausgeglichen aktiv. Sie aktivieren die genannten Signalwege im gleichen Verhältnis wie der Referenzagonist Iperoxo. Ausnahmen bilden hier die Verbindungen Iperoxo-6-Scopolamin und das Fragment Iperoxo-8, die einen „Ligand-Bias“ in Richtung des G_i-Signalweges aufweisen. Dies ist insofern höchst interessant, da bisher angenommen wurde, dass eine Signalwegeselektivität von Hybridliganden durch einen allosterischen Baustein ausgelöst würde (Antony et al. 2009). Der allosterische Baustein interferiere mit dem extrazellulären allosterischen Bereich, woraus eine eingeschränkte Außenbewegung der intrazellulären Domänen resultiert und damit die Signalwegaktivierung eingeschränkt sei (Bock et al. 2012). Nun konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass mit den Testverbindungen Iperoxo-6-Scopolamin und dem Fragment Iperoxo-8 zwei Verbindungen einen G_i-Bias aufweisen, die nicht relevant allosterisch binden. Allein durch die sterische Hinderung der Konformationsänderung des M₂-Rezeptors nach Aktivierung mit dem entsprechenden Iperoxo-Baustein konnte eine Signalwegeselektivität erreicht werden, was die in dieser Richtung bereits 2014 aufgestellte Hypothese stützt (Bock et al.

2014b). Das Erreichen eines „Ligand-Bias“ ist damit nicht zwingend auf einen allosterischen Baustein innerhalb des Hybridliganden angewiesen.

6 Zusammenfassung

Der in dieser Arbeit untersuchte M₂-Rezeptor dient seit langem als maßgebliches Modellsystem auf dem Gebiet der pharmakologischen Forschung an G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCR), weil er über jeweils eine gut charakterisierte orthosterische und allosterische Bindungsstelle verfügt. Die klassischen dualsterischen Liganden umfassen einen orthosterischen Baustein und einen allosterischen Molekülteil, welche über eine Zwischenkette aus Kohlenwasserstoffen kovalent miteinander verbunden sind. Für diese Art von bipharmakophoren Liganden sind zwei verschiedene Bindungsmodi denkbar. Einer, in welchem sowohl der orthosterisch als auch der allosterisch bindende Molekülteil eine Interaktion mit dem Rezeptormolekül eingeht (Steinfeld et al. 2007; Bock und Mohr 2013). Hierbei handelt es sich dann um eine dualsterische bzw. bitopische Bindungspose. Der zweite denkbare Bindungsmodus umfasst lediglich die rein allosterische Bindung der Hybrids substanz an das allosterische Haftareal des Rezeptors. Welche dieser Bindungsposen vom Hybridliganden eingenommen wird, hängt von der Affinität der jeweiligen Bausteine für ihre Bindungsstelle im Rezeptormolekül ab (Bock et al. 2014a). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hybridliganden unterscheiden sich maßgeblich von den klassischen Hybridliganden vergangener Untersuchungen. Die mit dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Mohr kooperierende Arbeitsgruppe von Frau Prof. Holzgrabe, Würzburg, synthetisierte dualsterische Liganden, welche aus zwei orthosterisch bindenden Molekülteilen bestehen. Als agonistischer Baustein fungierte der Superagonist Iperoxo, der antagonistische Baustein war entweder der Antagonist Atropin oder Scopolamin. Die Zwischenkette hatte eine Länge von 4, 6, 8 bzw. 10 Kohlenwasserstoffen. Ziel der Untersuchungen war es, die Art der Rezeptorbindung und -funktion dieser neuartigen Hybride aufzuklären und ihren Bindungsmodus zu eruieren. Anknüpfend an die Überlegungen zu klassischen dualsterischen Hybriden mit einem allosterischen Molekülteil von Bock et al. (2014a) wurde die Hypothese aufgestellt, dass die neuartigen Hybride abhängig von der Affinität der unterschiedlichen Bausteine und abhängig von der Länge der Verbindungskette entweder agonistisch oder antagonistisch binden. Den Grundstein für diese Überlegungen legten Bock et al. (2014b), indem sie dynamisches Bindungsverhalten und Partialagonismus für orthosterisch-orthosterische Hybridliganden postulierten, wenn der Unterschied in der intrinsischen Aktivität der beiden Bausteine groß genug

wäre. Die Gesamtheit der gebundenen Hybridverbindungen, welche in einem bestimmten Verhältnis agonistisch gegenüber antagonistisch gebunden sind, sollte die Stärke des partialagonistischen Effektes bestimmen (Bock et al. 2014b).

Nachdem die allosterische Affinität der Testverbindungen in Dissoziationsexperimenten überprüft wurde, mussten, um Belege hierfür zu finden, Bindungsexperimente und funktionelle Experimente durchgeführt werden. Für die Bindungsexperimente wurden zwei verschiedene Radioliganden mit unterschiedlicher intrinsischer Aktivität genutzt und die Experimente wurden im Anschluss nach Waud (1975) so modifiziert, dass explizit der Einfluss des antagonistischen Bausteines Atropin bzw. Iperoxo bestimmt werden konnte. Außerdem sollte die Hypothese überprüft werden, ob eine Signalwegselektivität unabhängig von der Bindung eines allosterischen Molekülteils vorhanden wäre. Dies wurde durch die Untersuchung unterschiedlicher Signalwege und die anschließende Berechnung des „Ligand-Bias“ erreicht.

Die Gleichgewichtsbindungsversuche der Testverbindungen wurden gegen den Radioagonisten [³H]Iperoxo sowie gegen den Radioantagonisten [³H]NMS durchgeführt. Auf diese Weise konnte der Bindungsmodus der Hybride bestimmt werden und es resultierte die Erkenntnis, dass die untersuchten Iperoxo-Atropin Hybride, abhängig von ihrer Kettenlänge, entweder hauptsächlich agonistisch oder antagonistisch binden. Die Hybridsubstanzen aus Iperoxo und Scopolamin bevorzugten alle den agonistischen Bindungsmodus. Anschließend wurde mittels 2-Punkt-Kinetik die allosterische Affinität der Verbindungen in [³H]NMS Dissoziationsexperimenten untersucht. Alle Hybride zeigten in den Konzentrationen, die in den weiteren Experimenten eingesetzt wurden, nur eine vernachlässigbar geringe allosterische Affinität. Eine allosterische Bindung der Verbindungen wurde daher für die weitere Interpretation der Daten nicht in Betracht gezogen. Auf dem G_i- und auf dem G_s-Signalweg wiesen die Iperoxo-Atropin Hybride einen Kettenlängen-abhängigen Partialagonismus (bezogen auf die maximale Wirksamkeit E_{max}) auf. Die Iperoxo-Scopolamin Hybride zeigten dies nur auf dem G_s-Signalweg und auch nicht in dem ausgeprägten Maße wie ihre Verwandten mit Atropin. Per WAUD-Analyse (Waud 1975) wurde die antagonistische Potenz ausgewählter Testverbindungen bestimmt. Der Atropin-Baustein war in der Lage orthosterisch zu binden und einen fixen durch Iperoxo ausgelösten agonistischen Effekt zu antagonisieren. Scopolamin als

antagonistischer Baustein vermochte dies nicht zu erreichen. Daher ist davon auszugehen, dass Scopolamin nicht in dem Maße orthosterisch bindet, wie es der Baustein Atropin vermag. Die Berechnung des „Ligand-Bias“ deckte einen G_i -Bias von Iperoxo-6-Scopolamin und dem Fragment Iperoxo-8 auf. Eine Signalwegselektivität ist demnach nicht zwingend nur durch die Bindung eines allosterischen Bausteins an das allosterische Haftareal des M_2 -Rezeptors realisierbar, wie es Bock et al. bereits 2014 vermuteten (Bock et al. 2014b).

Wahrscheinlich aufgrund der ähnlichen Affinitäten von Iperoxo und Atropin für die allosterische Bindungsstelle des M_2 -Rezeptors sind zwei unterschiedliche Bindungsmodi der Iperoxo-Atropin Hybride möglich. Abhängig von der Länge der Zwischenkette bindet entweder vermehrt Iperoxo oder Atropin orthosterisch. Eine kurze Verbindungskette dirigiert den Bindungsmodus hin zu einem orthosterisch gebundenen Iperoxo-Baustein. Dies resultiert in einem starken Partialagonismus des Hybrides. Eine längere Zwischenkette lässt vermehrt auch Atropin orthosterisch binden, was sich in einem schwächeren Partialagonismus dieser Hybridsubstanzen niederschlägt. Da in den Hybridverbindungen aus Iperoxo und Scopolamin die Affinitäten der beiden Bausteine für die orthosterische Bindungsstelle des M_2 -Rezeptors weiter auseinander liegen, schafft es Scopolamin nicht, sich gegen die hohe Affinität des Iperoxo „durchzusetzen“ und eine orthosterische Bindung einzugehen. Der gleichbleibend hohe Partialagonismus aller Hybride dieser Familie lässt sich gegenwärtig allein durch die sterische Hinderung der Konformationsänderung des Rezeptormoleküls durch den voluminösen Scopolamin-Teil erklären.

Somit trägt die vorliegende Arbeit dazu bei, den Bindungsmodus der untersuchten neuartigen Hybridliganden aus einem Agonisten und zwei unterschiedlichen kompetitiven Antagonisten besser zu verstehen, um damit das Ausmaß der Aktivierung unterschiedlicher Signalwege zu erklären. Außerdem werden die Vorüberlegungen von Bock et al. (2014b), dass Partialagonismus aufgrund von dynamischem Bindungsverhalten auch durch orthosterisch-orthosterische Agonist-Antagonist-Hybridliganden ausgelöst werden kann, sowie dass eine Signalwegselektivität nicht zwingend einen allosterisch bindenden Molekülteil benötigt, durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gestützt. Dies öffnet die Türen für das Design weiterer neuartiger rein orthosterischer Hybridsubstanzen aus Agonisten und Antagonisten, welches durch Variation ihrer Bausteine und damit der Affinitäten und

durch Veränderung der Länge der Zwischenkette zu Agonisten mit potentiell kalkulierbarer partialagonistischer Wirkung und Signalwegelektivität am M₂-Rezeptor führen kann.

7 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.; Holtje, H. D.; Barocelli, E.; Amici, M. de; Holzgrabe, U.; Mohr, K. (2009): Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (2), S. 442–450. DOI: 10.1096/fj.08-114751.

Arunlakshana, O.; Schild, H. O. (1997): Some quantitative uses of drug antagonists. 1958. In: *British journal of pharmacology* 120 (4 Suppl), 151-61; discussion 148-50.

Barlow, R.; Blake, J. F. (1989): Hill coefficients and the logistic equation. In: *Trends in pharmacological sciences* 10 (11), S. 440–441. DOI: 10.1016/S0165-6147(89)80006-9.

Bdioui, S.; Verdi, J.; Pierre, N.; Trinquet, E.; Roux, T.; Kenakin, T. (2019): The pharmacologic characterization of allosteric molecules: Gq protein activation. In: *Journal of receptor and signal transduction research* 39 (2), S. 106–113. DOI: 10.1080/10799893.2019.1634101.

Black, J. W.; Leff, P. (1983): Operational models of pharmacological agonism. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 220 (1219), S. 141–162.

Bock, A.; Chirinda, B.; Krebs, F.; Messerer, R.; Batz, J.; Muth, M.; Dallanoce, C.; Klingenthal, D.; Tränkle, C.; Hoffmann, C.; Amici, M. de; Holzgrabe, U.; Kostenis, E.; Mohr, K. (2014a): Dynamic ligand binding dictates partial agonism at a G protein-coupled receptor. In: *Nature chemical biology* 10 (1), S. 18–20. DOI: 10.1038/nchembio.1384.

Bock, A.; Kostenis, E.; Tränkle, C.; Lohse, M. J.; Mohr, K. (2014b): Pilot the pulse: controlling the multiplicity of receptor dynamics. In: *Trends in pharmacological sciences* 35 (12), S. 630–638. DOI: 10.1016/j.tips.2014.10.002.

Bock, A.; Merten, N.; Schrage, R.; Dallanoce, C.; Batz, J.; Klockner, J.; Schmitz, J.; Matera, C.; Simon, K.; Kebig, A.; Peters, L.; Muller, A.; Schrobang-Ley, J.; Tränkle, C.; Hoffmann, C.; Amici, M. de; Holzgrabe, U.; Kostenis, E.; Mohr, K. (2012): The

allosteric vestibule of a seven transmembrane helical receptor controls G-protein coupling. In: *Nature communications* 3, S. 1044. DOI: 10.1038/ncomms2028.

Bock, A.; Mohr, K. (2013): Dualsteric GPCR targeting and functional selectivity: the paradigmatic M(2) muscarinic acetylcholine receptor. In: *Drug discovery today. Technologies* 10 (2), e245-52. DOI: 10.1016/j.ddtec.2012.12.003.

Bonner, T. I.; Buckley, N. J.; Young, A. C.; Brann, M. R. (1987): Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. In: *Science (New York, N.Y.)* 237 (4814), S. 527–532. DOI: 10.1126/science.3037705.

Caulfield, M. P.; Birdsall, N. J. (1998): International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Pharmacological reviews* 50 (2), S. 279–290.

Charfi, I.; Audet, N.; Bagheri Tudashki, H.; Pineyro, G. (2015): Identifying ligand-specific signalling within biased responses: focus on delta opioid receptor ligands. In: *British journal of pharmacology* 172 (2), S. 435–448. DOI: 10.1111/bph.12705.

Chen, X.; Klockner, J.; Holze, J.; Zimmermann, C.; Seemann, W. K.; Schrage, R.; Bock, A.; Mohr, K.; Tränkle, C.; Holzgrabe, U.; Decker, M. (2015): Rational design of partial agonists for the muscarinic m1 acetylcholine receptor. In: *Journal of medicinal chemistry* 58 (2), S. 560–576. DOI: 10.1021/jm500860w.

Cheng, Y.; Prusoff, W. H. (1973): Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. In: *Biochemical pharmacology* 22 (23), S. 3099–3108.

Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G.F.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H-J; Kuhn, P.; Weis, Wl.; Kobilka, B. K.; Stevens, R. C. (2007): High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. In: *Science (New York, N.Y.)* 318 (5854), S. 1258–1265. DOI: 10.1126/science.1150577.

Chirinda, B. (2015): The allosteric core region of the M2 muscarinic acetylcholine receptor: role for ligand selectivity and action. Dissertation. Universität Bonn, Bonn. Pharmazie. Online verfügbar unter <https://bonndoc.ulb.uni-bonn.de/xmlui/handle/20.500.11811/6532>, zuletzt geprüft am 04.12.2020.

- Christopoulos, A.; El-Fakahany, E. E. (1999): Qualitative and quantitative assessment of relative agonist efficacy. In: *Biochemical pharmacology* 58 (5), S. 735–748.
- Christopoulos, A.; Grant, M. K.; Ayoubzadeh, N.; Kim, O. N.; Sauerberg, P.; Jeppesen, L.; El-Fakahany, E. E. (2001): Synthesis and pharmacological evaluation of dimeric muscarinic acetylcholine receptor agonists. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 298 (3), S. 1260–1268.
- Christopoulos, A.; Kenakin, T. (2002): G protein-coupled receptor allosterism and complexing. In: *Pharmacological reviews* 54 (2), S. 323–374.
- Clark, A. L.; Mitchelson, F. (1976): The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. In: *British journal of pharmacology* 58 (3), S. 323–331. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1976.tb07708.x.
- DeBlasi, A.; O'Reilly, K.; Motulsky, H. J. (1989): Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. In: *Trends in pharmacological sciences* 10 (6), S. 227–229.
- DeWire, SM.; Ahn, S.; Lefkowitz, R. J.; Shenoy, S. K. (2007): Beta-arrestins and cell signaling. In: *Annual review of physiology* 69, S. 483–510. DOI: 10.1146/annurev.physiol.69.022405.154749.
- Disingrini, T.; Muth, M.; Dallanoce, C.; Barocelli, E.; Bertoni, S.; Kellershohn, K.; Mohr, K.; Amici, M. de; Holzgrabe, U. (2006): Design, synthesis, and action of oxotremorine-related hybrid-type allosteric modulators of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Journal of medicinal chemistry* 49 (1), S. 366–372. DOI: 10.1021/jm050769s.
- Drake, M. T.; Violin, J. D.; Whalen, E. J.; Wisler, J. W.; Shenoy, S. K.; Lefkowitz, R. J. (2008): beta-arrestin-biased agonism at the beta2-adrenergic receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (9), S. 5669–5676. DOI: 10.1074/jbc.M708118200.
- Eglen, R. M. (2006): Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. In: *Autonomic & autacoid pharmacology* 26 (3), S. 219–233. DOI: 10.1111/j.1474-8673.2006.00368.x.

- Ehlert, F. J. (2008): On the analysis of ligand-directed signaling at G protein-coupled receptors. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 377 (4-6), S. 549–577. DOI: 10.1007/s00210-008-0260-4.
- Ferrari-Dileo, G.; Davis, E. B.; Anderson, D. R. (1992): Effects of cholinergic and adrenergic agonists on adenylate cyclase activity of retinal microvascular pericytes in culture. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 33 (1), S. 42–47.
- Fredriksson, R.; Lagerstrom, M. C.; Lundin, L-G; Schioth, H. B. (2003): The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. In: *Molecular pharmacology* 63 (6), S. 1256–1272. DOI: 10.1124/mol.63.6.1256.
- Gao, Z. G.; Ijzerman, A. P. (2000): Allosteric modulation of A(2A) adenosine receptors by amiloride analogues and sodium ions. In: *Biochemical pharmacology* 60 (5), S. 669–676. DOI: 10.1016/s0006-2952(00)00360-9.
- Gregory, K. J.; Sexton, P. M.; Tobin, A. B.; Christopoulos, A. (2012): Stimulus bias provides evidence for conformational constraints in the structure of a G protein-coupled receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (44), S. 37066–37077. DOI: 10.1074/jbc.M112.408534.
- Griffin, M. T.; Figueroa, K. W.; Liller, S.; Ehlert, F. J. (2007): Estimation of agonist activity at G protein-coupled receptors: analysis of M2 muscarinic receptor signaling through Gi/o, Gs, and G15. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 321 (3), S. 1193–1207. DOI: 10.1124/jpet.107.120857.
- Hilf, G.; Jakobs, K. H. (1992): Agonist-independent inhibition of G protein activation by muscarinic acetylcholine receptor antagonists in cardiac membranes. In: *European journal of pharmacology* 225 (3), S. 245–252. DOI: 10.1016/0922-4106(92)90026-r.
- Hoare, S. R.; Strange, P. G. (1996): Regulation of D2 dopamine receptors by amiloride and amiloride analogs. In: *Molecular pharmacology* 50 (5), S. 1295–1308.
- Hsieh, DJ-Y; Liao, C-F (2002): Zebrafish M2 muscarinic acetylcholine receptor: cloning, pharmacological characterization, expression patterns and roles in embryonic bradycardia. In: *British journal of pharmacology* 137 (6), S. 782–792. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704930.

- Huang, F.; Buchwald, P.; Browne, C. E.; Farag, H. H.; Wu, W. M.; Ji, F.; Hochhaus, G.; Bodor, N. (2001): Receptor binding studies of soft anticholinergic agents. In: *AAPS pharmSci* 3 (4), E30. DOI: 10.1208/ps030430.
- Hulme, E. C.; Birdsall, N. J.; Buckley, N. J. (1990a): Muscarinic receptor subtypes. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 30, S. 633–673. DOI: 10.1146/annurev.pa.30.040190.003221.
- Hulme, E. C.; Spalding, T. A.; Curtis, C. A.; Birdsall, N. J.; Corrie, J. E. (1990b): Blockade of muscarinic receptors by alkylating agonist analogues. In: *Biochemical Society transactions* 18 (3), S. 440–441.
- Jensen, A. A.; Spalding, T. A. (2004): Allosteric modulation of G-protein coupled receptors. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 21 (4), S. 407–420. DOI: 10.1016/j.ejps.2003.11.007.
- Kashihara, K.; Varga, E. V.; Waite, S. L.; Roeske, W. R.; Yamamura, H. I. (1992): Cloning of the rat M3, M4 and M5 muscarinic acetylcholine receptor genes by the polymerase chain reaction (PCR) and the pharmacological characterization of the expressed genes. In: *Life sciences* 51 (12), S. 955–971. DOI: 10.1016/0024-3205(92)90403-c.
- Kaufel, D. (2010): Interaktion orthosterisch/allosterischer Antagonist-Hybride mit muskarinischen M2-Acetylcholinrezeptoren. Dissertation. Universität Bonn, Bonn. Pharmazeutisches Institut. Online verfügbar unter <https://bonndoc.ulb.uni-bonn.de/xmlui/handle/20.500.11811/4978>, zuletzt geprüft am 01.06.2021.
- Kebig, A.; Kostenis, E.; Mohr, K.; Mohr-Andrä, M. (2009): An optical dynamic mass redistribution assay reveals biased signaling of dualsteric GPCR activators. In: *Journal of receptor and signal transduction research* 29 (3-4), S. 140–145. DOI: 10.1080/10799890903047437.
- Kenakin, T. (2012): The potential for selective pharmacological therapies through biased receptor signaling. In: *BMC pharmacology & toxicology* 13, S. 3. DOI: 10.1186/2050-6511-13-3.
- Kenakin, T. (2013): New concepts in pharmacological efficacy at 7TM receptors: IUPHAR review 2. In: *British journal of pharmacology* 168 (3), S. 554–575. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02223.x.

Kenakin, T. (2014): What is pharmacological 'affinity'? Relevance to biased agonism and antagonism. In: *Trends in pharmacological sciences* 35 (9), S. 434–441. DOI: 10.1016/j.tips.2014.06.003.

Kenakin, T.; Christopoulos, A. (2013): Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. In: *Nature reviews. Drug discovery* 12 (3), S. 205–216. DOI: 10.1038/nrd3954.

Kenakin, T. P. (2003): The secret lives of GPCRs. In: *Drug discovery today* 8 (15), S. 674.

Kent, R. S.; Lean, A. de; Lefkowitz, R. J. (1980): A quantitative analysis of beta-adrenergic receptor interactions: resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modeling of ligand binding data. In: *Molecular pharmacology* 17 (1), S. 14–23.

Kollias-Baker, C. A.; Ruble, J.; Jacobson, M.; Harrison, J. K.; Ozeck, M.; Shryock, J. C.; Belardinelli, L. (1997): Agonist-independent effect of an allosteric enhancer of the A1 adenosine receptor in CHO cells stably expressing the recombinant human A1 receptor. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 281 (2), S. 761–768.

Kords, H.; Lullmann, H.; Ohnesorge, F. K.; Wassermann, O. (1968): Action of atropine and some hexane-1.6-bis-ammonium derivatives upon the toxicity of DFP in mice. In: *European journal of pharmacology* 3 (4), S. 341–346. DOI: 10.1016/0014-2999(68)90118-0.

Kostenis, E.; Mohr, K. (1996): Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation. In: *Trends in pharmacological sciences* 17 (8), S. 280–283.

Kovacs, I.; Yamamura, H. I.; Waite, S. L.; Varga, E. V.; Roeske, W. R. (1998): Pharmacological comparison of the cloned human and rat M2 muscarinic receptor genes expressed in the murine fibroblast (B82) cell line. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 284 (2), S. 500–507.

Krebs, F. (2017): Untersuchung des Einflusses schrittweise rigidifizierter Zwischenketten allosterisch/orthosterischer Hybrid-Agonisten auf den muskarinischen M2-Acetylcholinrezeptor. Dissertation. Universität Bonn, Bonn. Pharmazie.

- Kruh, J. (1982): Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. In: *Molecular and cellular biochemistry* 42 (2), S. 65–82.
- Kubo, T.; Maeda, A.; Sugimoto, K.; Akiba, I.; Mikami, A.; Takahashi, H.; Haga, T.; Haga, K.; Ichiyama, A.; Kangawa, K. (1986): Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. In: *FEBS letters* 209 (2), S. 367–372. DOI: 10.1016/0014-5793(86)81144-9.
- Lagerstrom, M. C.; Schioth, H. B. (2008): Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. In: *Nature reviews. Drug discovery* 7 (4), S. 339–357. DOI: 10.1038/nrd2518.
- Lazareno, S.; Birdsall, N. J. (1993): Estimation of antagonist K_b from inhibition curves in functional experiments: alternatives to the Cheng-Prusoff equation. In: *Trends in pharmacological sciences* 14 (6), S. 237–239.
- Lazareno, S.; Birdsall, N. J. (1995): Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors: interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. In: *Molecular pharmacology* 48 (2), S. 362–378.
- Lean, A. de; Stadel, J. M.; Lefkowitz, R. J. (1980): A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 255 (15), S. 7108–7117.
- Lefkowitz, R.J.; Shenoy, S. K. (2005): Transduction of receptor signals by beta-arrestins. In: *Science (New York, N.Y.)* 308 (5721), S. 512–517. DOI: 10.1126/science.1109237.
- Leppik, R. A.; Birdsall, N. J. (2000): Agonist binding and function at the human alpha(2A)-adrenoceptor: allosteric modulation by amilorides. In: *Molecular pharmacology* 58 (5), S. 1091–1099. DOI: 10.1124/mol.58.5.1091.
- Leppik, R. A.; Mynett, A.; Lazareno, S.; Birdsall, N. J. (2000): Allosteric interactions between the antagonist prazosin and amiloride analogs at the human alpha(1A)-adrenergic receptor. In: *Molecular pharmacology* 57 (3), S. 436–445. DOI: 10.1124/mol.57.3.436.

- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *The Journal of biological chemistry* 193 (1), S. 265–275.
- Matucci, R.; Nesi, M.; Martino, M. V.; Bellucci, C.; Manetti, D.; Ciuti, E.; Mazzolari, A.; Dei, S.; Guandalini, L.; Teodori, E.; Vistoli, G.; Romanelli, M. N. (2016): Carbachol dimers as homobivalent modulators of muscarinic receptors. In: *Biochemical pharmacology* 108, S. 90–101. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.03.012.
- Melchiorre, C.; Cassinelli, A.; Quaglia, W. (1987): Differential blockade of muscarinic receptor subtypes by polymethylene tetraamines. Novel class of selective antagonists of cardiac M-2 muscarinic receptors. In: *Journal of medicinal chemistry* 30 (1), S. 201–204. DOI: 10.1021/jm00384a034.
- Melchiorre, C.; Minarini, A.; Angeli, P.; Giardina, D.; Gulini, U.; Quaglia, W. (1989): Polymethylene tetraamines as muscarinic receptor probes. In: *Trends in pharmacological sciences Suppl*, S. 55–59.
- Michal, P.; El-Fakahany, E. E.; Dolezal, V. (2007): Muscarinic M2 receptors directly activate Gq/11 and Gs G-proteins. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 320 (2), S. 607–614. DOI: 10.1124/jpet.106.114314.
- Miedlich, S. U.; Gama, L.; Seuwen, K.; Wolf, R. M.; Breitwieser, G. E. (2004): Homology modeling of the transmembrane domain of the human calcium sensing receptor and localization of an allosteric binding site. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (8), S. 7254–7263. DOI: 10.1074/jbc.M307191200.
- Milligan, G. (2003): Principles: extending the utility of 35SGTP gamma S binding assays. In: *Trends in pharmacological sciences* 24 (2), S. 87–90.
- Mos, I.; Jacobsen, S. E.; Foster, SR; Bräuner-Osborne, H. (2019): Calcium-Sensing Receptor Internalization Is β -Arrestin-Dependent and Modulated by Allosteric Ligands. In: *Molecular pharmacology* 96 (4), S. 463–474. DOI: 10.1124/mol.119.116772.
- Moser, U.; Gubitza, C.; Galvan, M.; Immel-Sehr, A.; Lambrecht, G.; Mutschler, E. (1995): Aliphatic and heterocyclic analogues of arecaidine propargyl ester. Structure-activity relationships of mono- and bivalent ligands at muscarinic M1 (M4), M2 and M3 receptor subtypes. In: *Arzneimittel-Forschung* 45 (4), S. 449–455.

- Nagano, N.; Nemeth, E. F. (2005): Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca(2+) for drug development: the extracellular calcium receptor and an innovative medical approach to control secondary hyperparathyroidism by calcimimetics. In: *Journal of pharmacological sciences* 97 (3), S. 355–360. DOI: 10.1254/jphs.fmj04007x6.
- Nelson, C. P.; Nahorski, SR; Challiss, R. A.J. (2006): Constitutive activity and inverse agonism at the M2 muscarinic acetylcholine receptor. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 316 (1), S. 279–288. DOI: 10.1124/jpet.105.094383.
- Neubig, R. R.; Spedding, M.; Kenakin, T.; Christopoulos, A. (2003): International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. In: *Pharmacological reviews* 55 (4), S. 597–606. DOI: 10.1124/pr.55.4.4.
- Oldham, W. M.; Hamm, H. E. (2008): Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (1), S. 60–71. DOI: 10.1038/nrm2299.
- Page, K. M.; Curtis, C. A.; Jones, P. G.; Hulme, E. C. (1995): The functional role of the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors, probed by site-directed mutagenesis. In: *European journal of pharmacology* 289 (3), S. 429–437. DOI: 10.1016/0922-4106(95)90151-5.
- Peralta, E. G.; Winslow, J. W.; Ashkenazi, A.; Smith, D. H.; Ramachandran, J.; Capon, D. J. (1988): Structural basis of muscarinic acetylcholine receptor subtype diversity. In: *Trends in pharmacological sciences* Suppl, S. 6–11.
- Petrel, C.; Kessler, A.; Dauban, P.; Dodd, RH.; Rognan, D.; Ruat, M. (2004): Positive and negative allosteric modulators of the Ca2+-sensing receptor interact within overlapping but not identical binding sites in the transmembrane domain. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (18), S. 18990–18997. DOI: 10.1074/jbc.M400724200.
- Rajeswaran, W. G.; Cao, Y.; Huang, X. P.; Wroblewski, M. E.; Colclough, T.; Lee, S.; Liu, F.; Nagy, P. I.; Ellis, J.; Levine, B. A.; Nocka, K. H.; Messer, W. S., JR (2001): Design, synthesis, and biological characterization of bivalent 1-methyl-1,2,5,6-

tetrahydropyridyl-1,2,5-thiadiazole derivatives as selective muscarinic agonists. In: *Journal of medicinal chemistry* 44 (26), S. 4563–4576. DOI: 10.1021/jm0102405.

Sabroe, I.; Peck, M. J.; van Keulen, B. J.; Jorritsma, A.; Simmons, G.; Clapham, P. R.; Williams, T. J.; Pease, J. E. (2000): A small molecule antagonist of chemokine receptors CCR1 and CCR3. Potent inhibition of eosinophil function and CCR3-mediated HIV-1 entry. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (34), S. 25985–25992. DOI: 10.1074/jbc.M908864199.

Schmitz, J.; van der Mey, D.; Bermudez, M.; Klockner, J.; Schrage, R.; Kostenis, E.; Tränkle, C.; Wolber, G.; Mohr, K.; Holzgrabe, U. (2014): Dualsteric muscarinic antagonists--orthosteric binding pose controls allosteric subtype selectivity. In: *Journal of medicinal chemistry* 57 (15), S. 6739–6750. DOI: 10.1021/jm500790x.

Schrage, R.; Holze, J.; Klockner, J.; Balkow, A.; Klause, A. S.; Schmitz, A-L; Amici, M. de; Kostenis, E.; Tränkle, C.; Holzgrabe, U.; Mohr, K. (2014): New insight into active muscarinic receptors with the novel radioagonist (3)Hiperoxo. In: *Biochemical pharmacology* 90 (3), S. 307–319. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.05.012.

Schrage, R.; Seemann, W. K.; Klöckner, J.; Dallanoce, C.; Racké, K.; Kostenis, E.; Amici, M. de; Holzgrabe, U.; Mohr, K. (2013): Agonists with supraphysiological efficacy at the muscarinic M2 ACh receptor. In: *British journal of pharmacology* 169 (2), S. 357–370. DOI: 10.1111/bph.12003.

Schramm, S.; Agnetta, L.; Bermudez, M.; Gerwe, H.; Irmen, M.; Holze, J.; Littmann, T.; Wolber, G.; Tränkle, C.; Decker, M. (2019): Novel BQCA- and TBPB-Derived M1 Receptor Hybrid Ligands: Orthosteric Carbachol Differentially Regulates Partial Agonism. In: *ChemMedChem* 14 (14), S. 1349–1358. DOI: 10.1002/cmdc.201900283.

Shonberg, J.; Lopez, L.; Scammells, P. J.; Christopoulos, A.; Capuano, B.; Lane, JR (2014): Biased agonism at G protein-coupled receptors: the promise and the challenges--a medicinal chemistry perspective. In: *Medicinal research reviews* 34 (6), S. 1286–1330. DOI: 10.1002/med.21318.

Simon, M. I.; Strathmann, M. P.; Gautam, N. (1991): Diversity of G proteins in signal transduction. In: *Science (New York, N.Y.)* 252 (5007), S. 802–808.

Stanek, M.; Picard, L-P; Schmidt, M. F.; Kaindl, J. M.; Hubner, H.; Bouvier, M.; Weikert, D.; Gmeiner, P. (2019): Hybridization of beta-Adrenergic Agonists and

Antagonists Confers G Protein Bias. In: *Journal of medicinal chemistry* 62 (10), S. 5111–5131. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00349.

Steinfeld, T.; Mammen, M.; Smith, J. A.M.; Wilson, R. D.; Jasper, JR (2007): A novel multivalent ligand that bridges the allosteric and orthosteric binding sites of the M2 muscarinic receptor. In: *Molecular pharmacology* 72 (2), S. 291–302. DOI: 10.1124/mol.106.033746.

Stockton, J. M.; Birdsall, N. J.; Burgen, A. S.; Hulme, E. C. (1983): Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. In: *Molecular pharmacology* 23 (3), S. 551–557.

Tota, M. R.; Schimerlik, M. I. (1990): Partial agonist effects on the interaction between the atrial muscarinic receptor and the inhibitory guanine nucleotide-binding protein in a reconstituted system. In: *Molecular pharmacology* 37 (6), S. 996–1004.

Tränkle, C.; Dittmann, A.; Schulz, U.; Weyand, O.; Buller, S.; Jöhren, K.; Heller, E.; Birdsall, N. J.M.; Holzgrabe, U.; Ellis, J.; Holtje, H. D.; Mohr, K. (2005): Atypical muscarinic allosteric modulation: cooperativity between modulators and their atypical binding topology in muscarinic M2 and M2/M5 chimeric receptors. In: *Molecular pharmacology* 68 (6), S. 1597–1610. DOI: 10.1124/mol.105.017707.

Tränkle, C.; Kostenis, E.; Burgmer, U.; Mohr, K. (1996): Search for lead structures to develop new allosteric modulators of muscarinic receptors. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 279 (2), S. 926–933.

Vaidehi, N.; Kenakin, T. (2010): The role of conformational ensembles of seven transmembrane receptors in functional selectivity. In: *Current opinion in pharmacology* 10 (6), S. 775–781. DOI: 10.1016/j.coph.2010.09.004.

Violin, J. D.; Lefkowitz, R. J. (2007): Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. In: *Trends in pharmacological sciences* 28 (8), S. 416–422. DOI: 10.1016/j.tips.2007.06.006.

Voigtländer, U.; Jöhren, K.; Mohr, M.; Raasch, A.; Tränkle, C.; Buller, S.; Ellis, J.; Hölte, H-D; Mohr, K. (2003): Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: identification of two amino acids in the muscarinic M2 receptor that account entirely for the M2/M5 subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in N-methylscopolamine-occupied receptors. In: *Molecular pharmacology* 64 (1), S. 21–31. DOI: 10.1124/mol.64.1.21.

Waud, D. R. (1975): Analysis of Dose—Response Curves. In: *E. E. Daniel und D. M. Paton (Hg.): Smooth Muscle. Boston, MA: Springer US*, S. 471–506. Online verfügbar unter https://doi.org/10.1007/978-1-4684-2751-6_27, zuletzt geprüft am 01.06.2021.

Wess, J. (1997): G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 11 (5), S. 346–354.

Zhu, B. T. (1996): Rational design of receptor partial agonists and possible mechanisms of receptor partial activation: a theory. In: *Journal of theoretical biology* 181 (3), S. 273–291. DOI: 10.1006/jtbi.1996.0130.

8 Veröffentlichungen

Bannenberg P, Messerer R, Holzgrabe U, Mohr K. Binding modes of agonist/inverse agonist-hybrids define intensity of partial agonism at the M2 muscarinic acetylcholine receptor. Poster beim German Pharm-Tox Summit (DGPT, VKliPha), Heidelberg, Deutschland, 2017.

Zamarbide M, Gil-Bea FJ, **Bannenberg P**, Martínez-Pinilla E, Sandoval J, Franco R, Pérez-Mediavilla A. Maternal imprinting on cognition markers of wild type and transgenic Alzheimer's disease model mice. *Sci Rep.* 2018 Apr 24; 8(1):6434. doi: 10.1038/s41598-018-24710-7

Hackenberg B, Horváth ON, Petächti M, Schult R, Yenigün N, **Bannenberg P**. Skabiestherapie in Deutschland: Ergebnisse einer bundesweiten Umfrage mit besonderem Fokus auf die Wirksamkeit der Erstlinientherapie mit Permethrin [Scabies therapy in Germany: Results of a nationwide survey with a special focus on the efficacy of first-line therapy with permethrin]. *Hautarzt.* 2020;71(5):374-379. German. doi: 10.1007/s00105-020-04561-y.

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr möchte ich meinen ganz besonderen Dank dafür aussprechen, mir die Gelegenheit gegeben zu haben, diese Dissertation in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen.

Ich danke besonders Herrn PD Dr. Christian Tränkle für die vertrauensvolle Zusammenarbeit, die vielen hilfreichen Ratschläge der letzten Jahre und insbesondere bei der Erstellung dieser Arbeit. Für die Übernahme der Aufgaben des Erstgutachters und Betreuers nach der Pensionierung von Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr und für die damit verbundene kompromisslose Unterstützung bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet.

Auch Herrn Prof. Dr. Günther Weindl möchte ich herzlich für die kurzentschlossene Übernahme der Aufgaben des Zweitgutachters danken, nachdem Herr PD Dr. Christian Tränkle sich aufgrund der Pensionierung von Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr für die Übernahme der Betreuung bereiterklärt hat.

Mein aufrichtiger Dank gilt außerdem Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe und ihren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die Synthese und freundliche Bereitstellung der von mir untersuchten Verbindungen.

Außerdem danke ich meinen früheren Kolleginnen und Kollegen sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, besonders Herrn Matthias Irmen, Frau Dr. Janine Holze, Frau Iris Jusen und Herrn Dieter Baumert für die schöne Arbeitsatmosphäre, die vielen Dialoge und die hervorragende gegenseitige Unterstützung in allen Bereichen der Zusammenarbeit.

Meiner Familie und vor allem meiner Frau Helen danke ich für das liebevolle Verständnis, die endlose Geduld und die bedingungslose Unterstützung, die mir den notwendigen Rückhalt gegeben haben, diese Arbeit zu vervollständigen.