

**NEUARTIGE SILICIUM-HALTIGE ALLOSTERISCHE MODULATOREN
ALS HOCHPOTENTE, ATYPISCHE FÖRDERER DER GLEICHGEWICHTSBINDUNG
EINES ORTHOSTERISCHEN LIGANDEN
AN MUSKARINISCHEN M₂-ACETYLCHOLIN-REZEPTOREN**

Dissertation

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

vorgelegt von
Seraina Duda-Johner
aus
Winterthur (Schweiz)

Bonn 2002

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

1. Referent: Prof. Dr. med. Klaus Mohr
2. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Bönisch

Tag der Promotion:

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1998 bis zum November 2002 in der Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Instituts der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. K. Mohr angefertigt.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. med. K. Mohr für die gute Betreuung dieser Arbeit. Für die angebotene Möglichkeit im Demonstrationskurs der Pharmakologie und Physiologie mitzuwirken bin ich sehr dankbar. Seine didaktischen Fähigkeiten und seine kritische Haltung in wissenschaftlichen Fragen sind mir ein besonderes Vorbild.

Herrn Professor Dr. rer. nat. H. Bönisch danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Stefan Buller, Regula Johner, Alexandra Raasch und Uta Voigtländer haben durch ihr Korrekturlesen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt Frau I. Knöbel für ihre Fähigkeit, ein äusserst angenehmes Arbeitsklima zu schaffen und Iris Jusen für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft in sämtlichen Laborangelegenheiten und für ihre Einführung in die Rheinische Lebensweise.

Für die gute Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft danke ich ganz herzlich meinen Freunden und Arbeitskollegen Edith Balatková, Dr. Stefan Buller, Dr. Michael Decker, Andreas Dittmann, Niels Eckstein, Gerald Tabeteh Frunjang, Ralf Gilsbach, Maren Großmüller, Andrea Liekweg, Alexandra Raasch, PD Dr. Christian Tränkle, Uta Voigtländer und Dr. Oliver Weyand.

Auch allen weiteren ehemaligen und derzeitigen Arbeitskollegen der Abteilung Pharmakologie & Toxikologie danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre.

Chantal Liggerstorfer und Susanne Rosenkranz haben mich mit ihrer Freundschaft während den letzten Jahren begleitet.

Mein ganz besonderer Dank gilt Thomas für seine unerschöpfliche Geduld, sein in mich gestecktes Vertrauen und sein Verständnis, das er mir während der ganzen Zeit meines Studiums und der Promotionszeit entgegengebracht hat, und meinen Eltern und Schwestern Regula und Ursina deren Unterstützung aus der fernen Heimat stets präsent war.

Mueti, Vati
und Thomas

1	Einleitung	1
1.1	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren.....	1
1.2	Allosterische Modulation muskarinischer Rezeptoren	2
1.3	Allosterische Effekte auf die Orthoster-Bindung	3
1.4	Allosterische Modulatoren an der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle muskarinischer M ₂ -Rezeptoren	5
1.5	Perspektiven für den Einsatz allosterischer Modulatoren muskarinischer Rezeptoren	7
1.6	Fragestellung	9
2	Methoden und Material	11
2.1	Herstellung von Membransuspensionen.....	11
2.1.1	Membransuspension aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins.....	11
2.1.2	Membransuspension aus Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters.....	12
2.1.2.1	Zellkultur	13
2.1.2.2	Membranpräparation aus CHO-Zellen	13
2.2	Protein-Gehaltsbestimmung der Membransuspensionen	14
2.3	Radioligandbindungsstudien.....	15
2.3.1	Allgemeine theoretische Grundlagen zu Radioligandbindungsstudien	15
2.3.2	Homologe Konkurrenz zur Charakterisierung der Bindungseigen- schaften der eingesetzten Homogenate	16
2.3.2.1	Theoretische Grundlagen	16
2.3.2.2	Versuchsdurchführung.....	19
2.3.2.2.1	Charakterisierung der Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein.....	19
2.3.2.2.2	Charakterisierung der aus CHO-Zellen gewonnenen Homogenate.....	21
2.3.3	Heterologe Interaktionsexperimente	23
2.3.3.1	Theoretische Grundlagen	23
2.3.3.2	Versuchsdurchführung.....	25
2.3.3.2.1	Versuchsdurchführung mit Homogenaten aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein.....	25
2.3.3.2.2	Versuchsdurchführung mit Homogenaten aus CHO-Zellen.....	27
2.3.3.3	Überprüfung des bindungsfördernden Effektes von allosterischen Modulatoren.....	28

2.3.4	Kinetische Experimente	30
2.3.4.1	Theoretische Grundlagen	30
2.3.4.2	Dissoziationsexperimente unter Einsatz von Homogenaten aus Schweineherzventrikelgewebe.....	32
2.3.4.3	Dissoziationsexperimente mit Homogenaten aus CHO-Zellen, die bestimmte Muskarinrezeptorsubtypen exprimieren.....	33
2.4	Materialien	35
2.4.1	Muskarinrezeptor- Antagonisten	35
2.4.2	Allosterische Modulatoren.....	36
2.4.3	Reagenzien.....	38
2.4.4	Pufferlösungen.....	39
2.4.4.1	Mg, Tris, Cl, P _i -Puffer	39
2.4.4.2	Na, K, P _i -Puffer	39
2.4.4.3	Phosphatpuffer (PBS , Phosphate buffered saline).....	39
2.4.4.4	HEPES-Puffer (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure)	40
2.4.5	Nährmedium	40
2.5	Eingesetzte Computerprogramme	41
2.6	Statistik	41
3	Ergebnisse	44
3.1	Homologe Competition mit dem Radioliganden [³ H]NMS zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der eingesetzten Membransuspensionen.....	44
3.2	Charakterisierung der Interaktionen von W84-artigen allosterischen Modulatoren mit muskarinischen Rezeptoren mittels dem orthosteri- schen Antagonisten [³ H]NMS.....	48
3.2.1	W84 und das bis-tertiäre Derivat W84t	49
3.2.1.1	Vergleich der Dissoziationsuntersuchungen von W84 und W84t mit [³ H]NMS	49
3.2.1.2	Heterologe Interaktion: Übergang von negativer zu neutraler Kooperativität.....	51
3.2.2	Neuartige organometallische allosterische Modulatoren.....	53
3.2.2.1	Dissoziationsexperimente zur Bestimmung der Affinität von W84-Si ₁ /6 und W84-Si ₂ /6 zum [³ H]NMS-besetzten M ₂ -Rezeptor.....	54

3.2.2.2	Umkehrung von negativer zu positiver Kooperativität durch einen N ⁺ /Si-Austausch.....	55
3.2.3	Modifikation in der Länge der Zwischenkette ausgehend von W84-Si ₁ /6.....	56
3.2.3.1	Dissoziationsexperimente mit Si-haltigen W84-Analoga mit unterschiedlichen Längen der Si/N ⁺ -Zwischenkette.....	57
3.2.3.2	Heterologe Interaktionsversuche mit Si-haltigen W84-Derivaten mit unterschiedlicher Länge der Si-N ⁺ -Zwischenkette	58
3.2.4	Einfluss des allosterischen Modulators W84-Si ₁ /5 auf die Affinität von [³ H]NMS zum muskarinischen M ₂ -Rezeptor	60
3.2.5	Einführung von Naphthalimid-Substituenten in Silicium-haltige W84-artige allosterische Modulatoren	62
3.2.5.1	[³ H]NMS-Dissoziationsverzögerung der Naphthalimid-substituierten organometallischen W84-Derivate.....	62
3.2.5.2	Heterologe Interaktionsversuche mit Naphthalimid-haltigen organometallischen Verbindungen	64
3.2.5.3	Simultane Analysen von heterologen Interaktionsexperimenten mit verschiedenen Radioligandkonzentrationen	69
3.2.5.4	Vergleichende Untersuchungen mit Alcuronium.....	72
3.2.6	Orientierende Bindungsstudien mit dem allosterischen Modulator W84-NPSi ₅ N ⁺ NP an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen.....	73
4	Diskussion	78
4.1	Wirkung von W84t im Vergleich mit Literaturdaten.....	78
4.2	Zur Notwendigkeit zweier positiver Ladungen als Elemente des Pharmakophors allosterischer Modulatoren vom Alkan-bis-ammonium-Typ.....	81
4.3	Bedeutung heterologer Interaktionsexperimente für die Entwicklung allosterischer Modulatoren.....	82
4.4	Atypisches Verhalten der organometallischen Verbindungen in Radioligandbindungsstudien.....	82
4.4.1	Starke Förderung der Gleichgewichtsbindung von [³ H]NMS durch die organometallischen Modulatoren.....	83
4.4.2	Teilweise Abhängigkeit der Parameter p α und pK _A von der	

	eingesetzten Radioligandkonzentration	84
4.4.3	Fehlende Pufferabhängigkeit der allosterischen Wirkung des neuartigen allosterischen Modulators W84-Si ₁ /6	86
4.4.4	Hohe Steilheit von Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Dissoziationsuntersuchungen	87
4.4.5	Der Austausch von Phthalimid-Substituenten durch Naphthalimid-substituenten bewirkt bei den organometallischen Modulatoren keine Veränderung der Affinität zu [³ H]NMS-besetzten M ₂ -Rezeptoren	90
4.4.6	Mögliche Erklärungen für die beobachteten atypischen Phänomene	91
4.5	Affinität von [³ H]NMS zu muskarinischen Rezeptoren unterschiedlicher Spezies und zu verschiedenen Subtypen; Vergleich mit Literatur-Befunden	92
4.6	Subtypselektivität von W84-NPSi5N ⁺ NP und Bedeutung der organometallischen Modulatoren für die weitere Entwicklung allosterischer Modulatoren muskarinischer Rezeptoren.....	94
5	Zusammenfassung	95
6	Literaturverzeichnis.....	97
7	Anhang	103
7.1	Radioligandbindungsstudien	103
7.1.1	Homologe Wettbewerbsversuche	104
7.1.2	Kinetische Untersuchungen	104
7.1.3	Heterologe Interaktions-Experimente.....	105
7.2	Funktionelle Experimente	107
7.2.1	Theoretische Grundlagen	107
7.2.2	Versuchsdurchführung.....	109
7.2.2.1	Präparation der Meerschweinchen-Herzvorhöfe.....	109
7.2.2.2	Aufbau der Versuche	109
7.2.2.3	Einfluss von W84t und W84 auf die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Oxotremorin M	110
7.2.2.4	Berechnung der Kontraktionskraft nach Oxo M-Zugabe	111
7.2.3	Ergebnisse der funktionellen Experimente.....	111
7.2.3.1	Eigenwirkung der allosterischen Modulatoren	112

7.2.3.2	Antimuskarinischer Effekt der allosterischen Modulatoren W84t und W84	113
7.3	Zusammenfassung sämtlicher Radioligandbindungsstudien	116
8	Publikationsliste	120
8.1	Wissenschaftliche Originalarbeiten	120
8.2	Abstracta/ Kongressmitteilungen	120

1 Einleitung

1.1 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren gehören zu der Superfamilie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren [1, 2]. Sie weisen eine grosse Ähnlichkeit mit dem Photorezeptor Rhodopsin auf. Die dreidimensionale Struktur des bovinen Rhodopsin ist vor kurzem durch röntgenkristallographische Untersuchungen aufgeklärt worden [3]. Im Gegensatz dazu ist die genaue dreidimensionale Struktur muskarinischer Rezeptoren noch nicht bekannt.

In den achtziger und frühen neunziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts konnten insgesamt fünf verschiedene Muskarinrezeptor-Subtypen (M_1 bis M_5) kloniert und teilweise charakterisiert werden [4, 5, 6]. Alle fünf Säugetier-Muskarinrezeptoren weisen unterschiedliche pharmakologische und funktionelle Eigenschaften sowie charakteristische Expressionsmuster auf. So sind beispielsweise Muskarinrezeptoren im zentralen Nervensystem in eine Vielzahl vegetativer, sensorischer und motorischer Prozesse involviert [7]. Mittels subtypspezifischen Antikörpern [8] und geeigneten Radioligand-Bindungsstrategien [9, 10] sowie durch Bestimmung von mRNA [11] konnte das Verteilungsmuster der einzelnen Rezeptorsubtypen im Gehirn und in peripheren Geweben genauer bestimmt werden. Meistens liegen verschiedene Rezeptorsubtypen in demselben Gewebe vor, so dass die Charakterisierung der einzelnen Rezeptoren äusserst komplex ist. In der glatten Muskulatur werden beispielsweise die Subtypen M_2 , M_3 und M_4 und in der Muskulatur des Herzens jedoch insbesondere M_2 -Rezeptoren exprimiert [12, 13]. Der Einsatz von Zellen, die mit Genen der einzelnen Subtypen transformiert sind, ermöglicht es nun, die Bindungseigenschaften der jeweiligen Rezeptor-Subtypen zu charakterisieren. Diese Zelllinien werden ebenfalls für funktionelle in vitro Untersuchungen eingesetzt [14].

Eine mögliche Erklärung dafür, dass es bis jetzt nicht gelungen ist, absolut subtypselektive kompetitive Agonisten oder Antagonisten von Acetylcholin für therapeutische Zwecke zu synthetisieren, wird in der Sequenzhomologie im Bereich der Bindungsstelle des physiologischen Liganden Acetylcholin vermutet [15]. Die Muskarinrezeptor-Subtypen sind innerhalb der Spezies der Säugetiere hochkonserviert und weisen eine sehr hohe Aminosäure-Sequenzhomologie von 89-98% auf [16]. Es besteht ein grosses Interesse, absolut subtypselektive Wirkprinzipien zur Therapie einer Vielzahl von Erkrankungen

mit Beteiligung muskarinischer Signalwege zu entwickeln. Dazu gehören beispielsweise Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Asthma bronchiale, peptische Ulcera sowie Störungen der Darmmotilität und der Herz- oder Harnblasenfunktion. Auch in der Schmerztherapie könnten den Parasympathikus subtypselektiv modulierende Arzneistoffe ihren Einsatz finden [17]. Bis jetzt wird jedoch einzig der relativ M_1 -selektive Rezeptor-Antagonist Pirenzepin zur Therapie peptischer Ulcera in der Klinik eingesetzt. Auch der neu auf dem deutschen Markt eingeführte Arzneistoff Tiotropium (Spiriva[®]) mit der Indikation chronisch obstruktive Bronchitis weist keine absolute Subtypselektivität auf. Er soll sich vor allem dadurch auszeichnen, dass die Halbwertszeit der Dissoziation von M_3 -Rezeptoren wesentlich höher ist, als von den anderen muskarinischen Rezeptoren [18].

1.2 Allosterische Modulation muskarinischer Rezeptoren

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren sind allosterisch modulierbar [19, 20, 21]. Das Bindungsverhalten des endogenen Agonisten Acetylcholin an seiner Bindungsstelle (orthosterische Bindungsstelle), sowie die Affinität anderer Liganden der orthosterischen Bindungsstelle ist durch eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Modulatoren beeinflussbar. Diese Modulation erfolgt kooperativ, das heisst, das Bindungsverhalten des orthosterischen Liganden wird durch den allosterischen Modulator in gleichem Ausmass modifiziert, wie das Bindungsverhalten des Modulators durch den orthosterischen Liganden. Die allosterischen Modulatoren besetzen dabei eine von der orthosterischen Bindungsstelle getrennte Bindungsstelle auf dem gleichen Rezeptorprotein (allosterische Bindungsstelle). Viele Daten weisen darauf hin [22, 23, 24], dass es sich bei dieser zweiten, allosterischen Bindungsstelle - in Analogie zu der orthosterischen Bindungsstelle - um eine klar topologisch abgrenzbare Bindungsstelle handelt. Diese liegt im Vergleich zur orthosterischen Bindungsstelle weiter extrazellulär [25, 26]. Für die allosterische Bindungsstelle auf M_2 -Rezeptoren wurde der Begriff der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ geprägt [22], da eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher allosterischer Modulatoren wie beispielsweise Gallamin, W84 und Alcuronium ihre allosterische Wirkung über diese Bindungsstelle zu entfalten scheinen [27]. In den letzten Jahren wiesen verschiedene Studien darauf hin, dass einige an M_2 -Rezeptoren allosterisch wirksame Substanzen ihre Wirkung nicht über die gemeinsame allosterische Bindungsstelle, sondern über eine weitere Bindungsstelle entfalten [27, 28]. Weitere Unter-

suchungen werden notwendig sein, um abzuklären, ob diese Substanzen (Tacrin, Duo3, Staurosporin, KT5720) ihre allosterische Wirkung ebenfalls über eine einzige, von der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle abgrenzbare „zweite allosterische Bindungsstelle“ entfalten, und somit eine zweite topologisch definierbare allosterische Bindungsstelle auf M₂-Rezeptoren vorliegt. Es ist auch denkbar, dass jede dieser Substanzen ihren Effekt über andere Epitope entfaltet. Somit wäre zumindest für den M₂-Rezeptor eine Vielzahl allosterischer Haftpunkte vorhanden.

1.3 Allosterische Effekte auf die Orthoster-Bindung

Zur Quantifizierung allosterischer Modulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren hat sich das "ternäre Modell allosterischer Interaktion" [29] als gut geeignet erwiesen. Zur Analyse von Bindungsuntersuchungen wird es routinemässig eingesetzt und hat sich bis heute bewährt [30] (s. 2.3.3.1, S. 23). Unter Einsatz dieses Modells ist es möglich, allosterische Effekte zu quantifizieren.

Allosterische Modulatoren an Muskarinrezeptoren beeinflussen beide Prozesse, die die Gleichgewichtsbindung eines orthosterischen Liganden an seine spezifische Bindungsstelle bestimmen, die Ligand-Assoziation und -Dissoziation [20]. Dementsprechend kann durch die Gegenwart eines allosterischen Modulators die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden - in Abhängigkeit von der Beeinflussung der Assoziations- und Dissoziationsprozesse - durch den Modulator verändert werden.

In der folgenden Abbildung (Abb. 1) wird der Einfluss dreier verschiedener allosterischer Modulatoren auf die Gleichgewichtsbindung (A) eines orthosterischen Liganden dargestellt. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden basierend auf dem ternären Modell allosterischer Modulation (s. 2.3.3.1, S. 23, Gleichung 13) simuliert. Die Einflüsse der allosterischen Modulatoren auf die kinetischen Effekte werden dabei im Teil B der Abbildung getrennt nach Wirkung auf die Verzögerung der Dissoziation von Orthoster-Rezeptor-Komplexen sowie auf die Hemmung der Assoziation des orthosterischen Liganden an seine Bindungsstelle abgebildet.

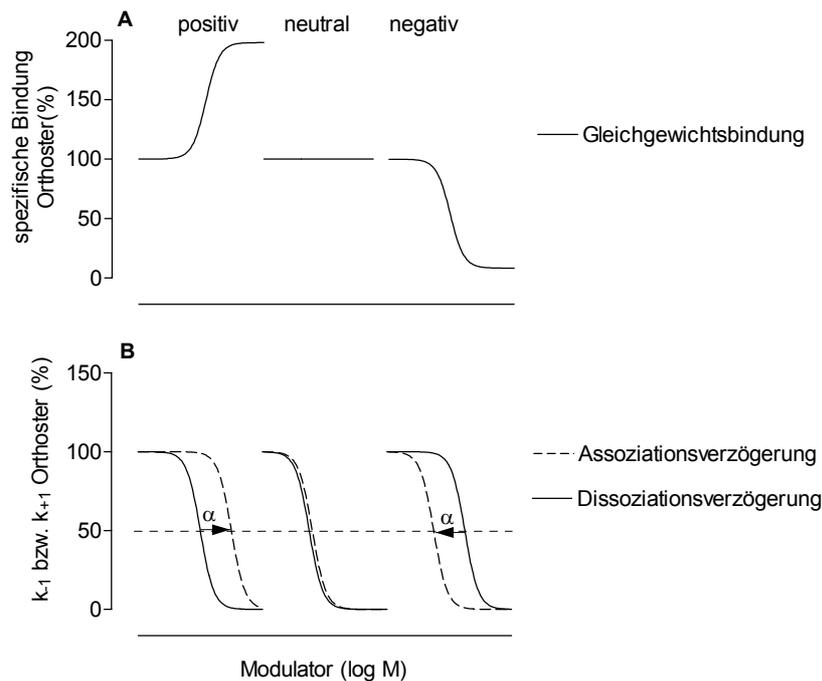


Abb. 1: Darstellung der drei beobachtbaren Formen der Interaktion zwischen drei verschiedenen allosterischen Modulatoren und einem orthosterischen Liganden. Ordinate: (A) spezifische Bindung des orthosterischen Liganden in Prozent bezogen auf die Gleichgewichtsbindung in Abwesenheit eines allosterischen Modulators. (B) apparente Dissoziations- (k_{-1}) bzw. Assoziationsgeschwindigkeitskonstante (k_{+1}) des orthosterischen Liganden in Prozent bezogen auf den Kontrollwert in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Konzentration der allosterischen Modulatoren (log M). Abgebildet werden einerseits die simulierten Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Gleichgewichtsbindungsexperimente (A) und andererseits die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der kinetischen Ereignisse, die diesen zugrunde liegen und in Einzelexperimenten beobachtet werden können (B). Die horizontale gebrochene Linie (in B) kennzeichnet die Lage der Wendepunkte (EC_{50}) der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Dissoziations- bzw. Assoziationsexperimente. α : Kooperativitätsfaktor (s. Text).

Das Bindungsverhalten und die Wirkung eines allosterischen Modulators ist definiert über (1) seine Affinität zum Rezeptor, die von der Struktur des Modulators und dem Rezeptor abhängt, und (2) den Kooperativitätsfaktor α , der vom Rezeptor, dem Modulator und dem orthosterischen Liganden abhängt [31].

Im Falle der positiven Kooperativität überwiegt die Hemmung der Dissoziation von Rezeptor-Ligand-Komplexen die Assoziationshemmung ($\alpha < 1$). Bei neutraler Kooperativität heben sich die Effekte auf Dissoziation und Assoziation auf ($\alpha = 1$). Die negative Kooperativität ist dadurch gekennzeichnet, dass die Assoziation des Orthosters stärker gehemmt wird als dessen Dissoziation ($\alpha > 1$).

Gemäss dem ternären Modell allosterischer Interaktion errechnet sich der Kooperativitätsfaktor α als Quotient der Wendepunkte (EC_{50}) der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Dissoziation und der Assoziation. In Dissoziationsexperimenten kann die Affinität eines allosterischen Modulators zum Orthoster-besetzten Rezeptor bestimmt werden; diese wird durch den $EC_{50,diss}$ -Wert beschrieben (s. 2.3.4, S. 30). Assoziationsuntersuchungen ermöglichen die Bestimmung der Affinität des allosterischen Modulators zum Orthoster-freien Rezeptor ($EC_{50,ass}$). In heterologen Interaktionsexperimenten können sowohl der Kooperativitätsfaktor α als auch die Affinität des allosterischen Modulators zum Orthoster-freien Rezeptor bestimmt werden.

1.4 Allosterische Modulatoren an der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle muskarinischer M_2 -Rezeptoren

Wie bereits beschrieben (1.1) existiert bis heute kein Arzneistoff, der seine Wirkung an muskarinischen Rezeptoren absolut subtypeselektiv entfaltet. Ausgehend von der hohen Sequenzhomologie der muskarinischen Rezeptor-Subtypen im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle erweist sich die Suche nach subtypeselektiven Agonisten oder Antagonisten an dieser Bindungsstelle als äusserst schwierig. Die allosterischen Bindungsstellen muskarinischer Rezeptoren stellen daher für therapeutische Ziele eine besser zugängliche und stärker variierende Region dar. Die Sequenzhomologie im weiter extrazellulären Bereich der Ligandbindungstasche, wo die Bindungsstellen allosterischer Modulatoren liegen, ist deutlich geringer [21]. Ziel ist es aus diesem Grund, allosterische Modulatoren muskarinischer Rezeptoren zu entwickeln, die als mögliche Therapeutika - auf Grund subtypspezifischer Wirkung - ein im Vergleich zu unselektiven Arzneistoffen reduziertes Nebenwirkungspotential aufweisen. Eine absolute Subtypeselektivität bezüglich der Wirkung eines allosterischen Modulators kann auf zwei unterschiedliche Weisen zustande kommen. Einerseits kann der Modulator nur zu der allosterischen Bindungsstelle eines einzigen Muskarinrezeptor-Subtyps eine Affinität aufweisen und nicht mit den anderen Rezeptorsubtypen interagieren. Die andere Möglichkeit besteht darin, dass sich der Modulator nur an einem Subtyp positiv bzw. negativ kooperativ mit dem endogenen Orthoster Acetylcholin oder einem exogenen Liganden verhält, und an allen anderen vier Subtypen wird neutrale Kooperativität beobachtet. Basierend auf quantitativen Struktur-Wirkungs-Analysen (QSAR) einer Reihe von Modulatoren der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle an M_2 -Rezeptoren wurden in

früheren Untersuchungen übereinstimmende strukturelle Elemente aufgedeckt und als Pharmakophor postuliert [32, 33, 20, 34, 35]. Unter einem Pharmakophor versteht man die räumliche Anordnung funktioneller Gruppen eines niedermolekularen Liganden einer Bindungstasche [36].

Diese QSAR-Analysen fussten zumeist auf Bindungsuntersuchungen mit dem Radioliganden [^3H]N-Methylscopolamin ([^3H]NMS). Es wurde die Affinität der einzelnen allosterischen Modulatoren zum Orthoster-besetzten Rezeptor bestimmt und in die QSAR-Analysen miteinbezogen. Im folgenden werden die strukturellen Merkmale des zur Zeit postulierten Pharmakophors allosterischer Modulatoren der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle von M_2 -Rezeptoren beschrieben:

- zwei positive Ladungen, in den zitierten Arbeiten in Form von quartären Stickstoffen;
- der Abstand zwischen diesen Ladungen sollte idealerweise 6 oder 7 Methylen-Gruppen betragen, um eine maximale dissoziationsverzögernde Potenz zu erlangen [37];
- zwei aromatische Imide; diese Elemente sind "sandwichartig" angeordnet (s. Abb. 2);

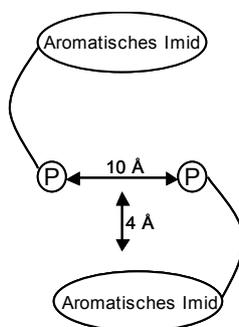


Abb. 2: Pharmakophor-Modell nach Lit. [34, 35]. P: positive Ladungen, im Abstand von ca. 10 Å. Der Pharmakophor nimmt gemäss den Modell-Vorstellungen eine "sandwichartige" Konformation ein ("S-shape").

Ausgehend von der in frühere QSAR-Studien einbezogenen Substanz W84 wurden systematisch weitere Strukturveränderungen vorgenommen. Mit den hieraus resultierenden Substanzen wurden weitere quantitative Struktur-Wirkungs-Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde von einer Kettenlänge zwischen den zwei quartären Stickstoffen von 7 Methylen-Gruppen ausgegangen [38]. Die aromatischen Substituenten

wurden schrittweise gesättigt und anschliessend stufenweise verkleinert. Hierbei stellte sich heraus, dass eine hohe allosterische Potenz bezüglich einer [^3H]NMS-Dissoziationsverzögerung erwartet werden kann, wenn an beiden Enden der Methylenbisammonium-Kette aromatische Systeme aus flachen, lipophilen Imid-Skeletten vorliegen. Dies deutete auf sterische Einschränkungen im Bereich der lipophilen Bindungstasche hin, was die Frage nach der Grösse einer solchen postulierten Bindungstasche nach sich zog. Folglich wurden weitere Strukturmodifikationen vorgenommen, welche die Grösse [39] bzw. mögliche asymmetrische Modifikationen [40] dieser aromatischen Substituenten betrafen. Auch diese Substanzen wurden in Radioligandbindungsuntersuchungen bezüglich ihrer Potenz zur Dissoziationsverzögerung von [^3H]NMS- M_2 -Rezeptorkomplexen untersucht. Letztere Arbeiten gingen von einer Zwischenkettenlänge von 6 Methylen-Gruppen aus. Das Pharmakophor-Modell wurde dadurch konkretisiert, dass die gemeinsame allosterische Bindungstasche bevorzugt mit rigiden und grossen aromatischen Substituenten interagiert. Zwischen der Lipophilie einzelner Substituenten und deren allosterischer Potenz konnte keine gute Korrelation bestimmt werden.

Diese erwähnten QSAR-Analysen werden mit dem Ziel der Entwicklung subtypeselektiver allosterischer Modulatoren durchgeführt. Zusätzlich verspricht man sich, auf diese Weise genauere Kenntnisse über die Topologie des muskarinischen M_2 -Rezeptors im Bereich der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle zu gewinnen.

1.5 Perspektiven für den Einsatz allosterischer Modulatoren muskarinischer Rezeptoren

Das Konzept der allosterischen Modulation von Proteinen ist seit langer Zeit bekannt [41]. Der ursprünglich für biochemische Prozesse im Kontext mit Enzymen eingeführte Begriff der "Allosterie" beschreibt, dass ein Modulator an eine regulierende, von dem aktiven Zentrum eines Proteins (Enzym, Rezeptor) unterschiedliche Stelle bindet, und dadurch die Proteinfunktion bzw. die Kenndaten der Bindung des Liganden im aktiven Zentrum beeinflusst [42].

Bis heute sind neben den Benzodiazepinen, die ihre Wirkung über eine allosterische Förderung der γ -Aminobuttersäure (GABA)-Bindung an die ligandgesteuerten Ionenkanal-Rezeptoren GABA_A ausüben, sowie Galantamin [43] und den Barbituraten jedoch keine weiteren Arzneimittel im klinischen Einsatz, die ihren Effekt bekanntermassen

über eine allosterische Modulation von Rezeptoren ausüben. Für Narkotika wird ein allosterischer Wirkmechanismus diskutiert [44].

Der seltene Einsatz dieses Wirkprinzips ist erstaunlich, da allosterische Modulatoren im Gegensatz zu konventionellen, direkt wirksamen Agonisten und Antagonisten eine Vielzahl von Vorteilen aufweisen. So verstärken positiv kooperative allosterische Modulatoren - wie beispielsweise die Benzodiazepine - die Amplitude der Wirkung eines endogenen Botenstoffes, in diesem Fall GABA, ohne selber GABAerg zu wirken. Übertragen auf das muskarinisch cholinerge System würde ein allosterischer Modulator, der die Bindung von Acetylcholin absolut subtypselektiv fördert, nur an den Synapsen Wirkung zeigen, wo Acetylcholin freigesetzt wird und der entsprechende Muskarinrezeptor-Subtyp vorliegt. Folglich wäre zusätzlich zu einer Subtypselektivität auch eine Organselektivität vorhanden. Ebenfalls wäre es möglich, mittels eines subtypselektiven Modulators die Bindung eines exogenen Liganden der orthosterischen Bindungsstelle muskarinischer Rezeptoren zu modulieren. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen, wie sie beim Einsatz direkt cholinerg oder anticholinerg wirksamer Substanzen, die bis heute keine absolute Subtypselektivität aufweisen, auftreten, wären gar nicht vorhanden oder wesentlich geringer ausgeprägt.

Ein weiterer Vorteil allosterischer Modulatoren in der Klinik liegt darin, dass ihr Effekt sättigbar ist („ceiling effect“). Dies bedeutet, dass ein allosterischer Modulator eine maximale Wirkung entfalten kann, die abhängig ist von der Kooperativität zwischen Modulator und orthosterischem Ligand [21, 45]. Dadurch ist das Risiko einer Intoxikation nach Überdosierung nicht vorhanden.

Die geschilderten Vorteile allosterischer Modulatoren werden, wie schon beschrieben, in der Praxis erst durch die Benzodiazepine ausgenutzt. Die Entwicklung subtypselektiver allosterischer Modulatoren muskarinischer Rezeptoren wie auch anderer G-Proteingekoppelter Rezeptoren und Ligand-gesteuerter Ionenkanäle erscheint vor dem Hintergrund der erwähnten Vorteile sehr vielversprechend.

Zusätzlich zu den Vorteilen, die der Einsatz subtypselektiver allosterischer Modulatoren muskarinischer Rezeptoren für die Klinik zu bieten hat, ist ein weiterer Punkt zu beachten: Durch weiterführende Untersuchungen auf diesem Gebiet - seien es Bindungsstudien oder funktionelle Experimente - können Erkenntnisse über submolekulare Grundlagen der Funktion muskarinischer Rezeptoren gewonnen werden [42].

1.6 Fragestellung

Um die geschilderten Vorteile allosterischer Modulatoren muskarinischer Rezeptoren ausnutzen zu können, sollen Substanzen entwickelt werden, die ihre allosterische Wirkung absolut subtypeselektiv entfalten. Zusätzlich sollte ein subtypeselektiver Modulator eine hohe Affinität zur entsprechenden allosterischen Bindungsstelle aufweisen. Dadurch könnten im Falle des Einsatzes einer solchen Substanz in der Klinik sehr geringe Mengen appliziert und das Risiko des Auftretens unspezifischer unerwünschter Arzneimittelwirkungen klein gehalten werden.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, genauere Kenntnisse über den Pharmakophor von Liganden der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle von muskarinischen M₂-Rezeptoren zu gewinnen (s. 1.4). Dazu sollten sowohl Untersuchungen an Orthosterbesetzten, als auch an freien muskarinischen M₂-Rezeptoren durchgeführt werden.

Erste Studien mit einem bis-tertiären Derivat des Prototypmodulators W84 hatten darauf hingedeutet, dass der Pharmakophor von Liganden der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle auf M₂-Rezeptoren (s. 1.4) nicht unbedingt zwei permanente positive Ladungen beispielsweise in Form von quartären Stickstoffen aufweisen muss, um dissoziationsverzögernde Effekte zu entfalten [46]. Zur Ermittlung der Bedeutung der beiden positiven Zentren allosterischer Modulatoren vom Alkan-bis-ammonium-Typ sollte in Radioligandbindungsuntersuchungen die Affinität der Substanzen zu mit [³H]NMS besetzten M₂-Rezeptoren mittels Dissoziationsexperimenten bestimmt werden. In heterologen Interaktionsexperimenten sollte die Affinität zu Orthoster-freien Rezeptoren, sowie die Kooperativität der Testsubstanzen mit [³H]NMS ermittelt werden.

Ausgehend von Radioligandbindungsstudien mit dem bis-tertiären Derivat von W84 sollte eine Reihe von W84-Derivaten untersucht werden, die Variationen hinsichtlich der zwei quartären Stickstoffe und der Länge der Zwischenkette aufweisen, um die Bedeutung der beiden räumlich getrennten kationischen Zentren zu erfassen. Dazu wurden mit W84 isostere Moleküle ausgewählt, bei welchen ein oder beide kationische Zentren durch Silicium-Atome ersetzt worden waren.

Als Alternative zu Silicium-Atomen wären auch Kohlenstoffatome in Frage gekommen, doch die Synthese von W84-C-Analoga wäre präparativ ungleich komplizierter ausgefallen als die Synthese der W84-Si-Analoga [47]. Zu einem späteren Zeitpunkt könnte in ausgewählten Si-haltigen W84-Derivaten eine Substitution von Silicium durch Kohlenstoff vorgenommen werden, ohne dass grosse Veränderungen in der Potenz und

stoff vorgenommen werden, ohne dass grosse Veränderungen in der Potenz und Kooperativität zu erwarten wären. Frühere Arbeiten zur Silicium-Substitution von Kohlenstoffatomen organischer Arzneimittel hatten aufgezeigt, dass die resultierenden organometallischen Substanzen die gleiche pharmakologische Wirkung entfalten wie die Ausgangssubstanzen [48].

Die aus den Untersuchungen zur Lage und Bedeutung der zwei quartären Stickstoffe in W84 resultierende Substanz mit optimalem Wirkprofil sollte als Ausgangssubstanz für Untersuchungen mit weiteren ausgewählten Substanzen dienen, wobei das optimale Wirkprofil durch hohe positive Kooperativität definiert wurde. Die ausgewählten Substanzen sollten Strukturmodifikationen im Bereich der aromatischen Substituenten aufweisen, denn frühere Untersuchungen hatten ergeben, dass der Austausch der Phthalimid-Substituenten in W84 durch Naphthalimid-Substituenten eine deutliche Affinitätssteigerung zu [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren zur Folge hat [35].

Sämtliche Untersuchungen sollten an Homogenaten aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein durchgeführt werden, da dieses Gewebe reich an M₂-Rezeptoren ist und kaum Muskarinrezeptoren der anderen vier Subtypen aufweist [11].

Einen weiteren Abschnitt dieser Arbeit sollte die Untersuchung ausgewählter allosterischer Modulatoren an sämtlichen fünf muskarinischen Rezeptor-Subtypen hinsichtlich ihres Verhaltens in Gleichgewichtsbindungs- und Dissoziationsexperimenten darstellen. Dazu sollten die für die Experimente mit Homogenaten aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein angewandten Methoden übertragen werden auf die Untersuchungen mit Homogenaten aus fünf Zelllinien der Ovarien chinesischer Hamster (CHO), die zuvor stabil mit humanen Rezeptorgen sämtlicher muskarinischer Rezeptor-Subtypen transformiert worden waren.

2 Methoden und Material

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Radioligandbindungsstudien an muskarinischen Rezeptoren untersucht, welche Konsequenzen aus dem Austausch der quartären Stickstoffe des allosterischen Prototyp-Modulators W84, einer Alkan-bis-ammonium-Verbindung, durch tertiäre, nicht permanent positiv geladene Stickstoffe (W84t(ertiär)) bezüglich der allosterischen Wirksamkeit erfolgen. In weiteren Untersuchungen wurde der Effekt einer Substitution eines oder beider quartären Stickstoffe von W84 durch Silicium auf die allosterische Potenz dieser Substanzen untersucht. Die eine so entwickelte, vielversprechende organometallische Verbindung W84-Si_{1/6} diente als neue Leitstruktur für weitere Modifikationen. Diese betrafen sowohl die Länge der Zwischenkette, als auch die seitlichen Substituenten.

Alle Bindungsuntersuchungen - jene unter Gleichgewichtsbedingungen (heterologe Interaktion) sowie die kinetischen Studien (Dissoziation) - wurden mit dem muskarinischen Antagonisten [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS) an Homogenaten aus Hausschweinherzventrikelgewebe durchgeführt. Zusätzlich wurden einige Substanzen an humanen muskarinischen Rezeptoren (M₁ bis M₅) untersucht, welche von Chinesischer-Hamster-Ovarien (CHO) exprimiert worden waren, die zuvor mit den jeweiligen Genen stabil transfiziert worden waren.

Im folgenden werden die Methoden zur Gewinnung und Charakterisierung von Membransuspensionen sowie die experimentellen Ansätze zur Bestimmung der allosterischen Potenz der einzelnen Testsubstanzen in Dissoziations- und Gleichgewichtsbindungsexperimenten aufgeführt.

2.1 Herstellung von Membransuspensionen

2.1.1 Membransuspension aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins

Für die Membranpräparation wurden Schweineherzen verwendet, die direkt nach der Schlachtung eisgekühlt in eine Präparationskammer überführt worden waren. Nachdem die Herzen mit NaCl-Lösung (0,9%) gespült worden waren, erfolgte die Abtrennung der Ventrikelwände vom übrigen Herzgewebe und deren Portionierung (ca. 40 g). Die Ventrikelportionen wurden bei -80°C in Gefrierbeuteln gelagert. Sämtliche in diesem Abschnitt beschriebenen Arbeitsschritte wurden in der Präparationskammer bei 4°C

durchgeführt, ebenso wiesen alle im Verlauf der Präparation eingesetzten Lösungen eine Temperatur von 4°C auf.

Für die Präparation wurde jeweils eine Ventrikelportion leicht angetaut, mittels Wiegemesser fein zerkleinert und zweimal mit ca. 20 ml Saccharoselösung (0,32 M) blutfrei gewaschen. Anschliessend wurden die Gewebestücke in Saccharoselösung aufgenommen (ca. 10 ml/g Feuchtgewicht des Gewebes). Die Gewebesuspension wurde mittels eines Waring-Blendor-Homogenisators (New Hartford, USA) zerkleinert (fünfmal im Abstand von 30 s jeweils 10 s auf Stufe „high“). Darauf wurde das Volumen mit Saccharoselösung auf die zwanzigfache Einwaage ergänzt, resuspendiert und in einem Potter Elvehjem-Glashomogenisator (5 Hübe bei 1750 U/min; Janke & Kunkel, IKA[®] Labortechnik, Staufen, D) weiterverarbeitet. Durch die im Potter-Homogenisator auftretenden Scherkräfte werden die Zellen aufgebrochen. Zur Abtrennung von Zellorganellen höherer Dichte sowie Bindegewebsfasern, Zelltrümmern usw. wurde die Suspension in einer Ultrazentrifuge (Beckman L7-35, Beckman Rotor Typ 35, Palo Alto, USA) bei 2000 U/min während 11 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut bei 32000 U/min während 41 min zentrifugiert. Die Pellets wurden in Wasser aufgenommen (4 ml/g) und mittels des Elvehjem-Homogenisators bei 1500 U/min resuspendiert. Von der Suspension wurden Aliquota à 1 ml in Eppendorf-Reaktionsgefässe verteilt. Die Aliquota wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.2 Membransuspension aus Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters

Das Bindungsverhalten des in dieser Arbeit beschriebenen Derivates des allosterischen Prototyp-Modulators W84 W84-NPSi5N⁺NP (Strukturformeln s. 2.4.2, S. 36) wurde zusätzlich zu den Untersuchungen an Homogenaten aus Hausschweinherzventrikeln auch an Membransuspensionen von fünf verschiedenen CHO-Zelllinien untersucht. Diese CHO-Zellen waren zuvor mit jeweils einem der humanen M₁- bis M₅-Rezeptorgene stabil transfiziert und freundlicherweise von Dr. Neil J. Buckley (Wellcome Laboratory for Pharmacology, University College London, U.K.) zur Verfügung gestellt worden. Im folgenden werden die Methoden beschrieben, die bei der Heranzüchtung von Zellen zur Membranpräparation eingesetzt wurden.

2.1.2.1 Zellkultur

Sämtliche Arbeiten mit lebenden Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt (Bio-Flow Technik, Meckenheim, D). Die CHO-Zellen wurden bei 37°C, in einer Atmosphäre von ca. 96% relativer Luftfeuchtigkeit und ca. 5% CO₂ im unter 2.4.5 (S. 40) beschriebenen Nährmedium in Kulturflaschen mit 182 cm² Bodenfläche (Cat. No. 660175, Greiner Labortechnik, Frickenhausen, D) (CHO-M₂) bzw. Cellstar Gewebekulturschalen 145/20 mm (Cat. No. 639160, Greiner Labortechnik) (CHO M₁, CHO M₃- bis M₅) kultiviert (CO₂ Water Jacketed Incubator, Forma Scientific, Marjetta, USA.). Alle 2-3 Tage wurde das Nährmedium ausgetauscht. Bei Konfluenz wurden die Zellen vereinzelt. Dazu wurde der konfluente Zellrasen einmal mit sterilem Phosphatpuffer (s. 2.4.4.3, S. 39) gespült. Nach Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung und kurzer Inkubation (ca. 5 min) wurden die Zellen von den Kulturflaschen bzw. -schalen abgelöst und nach Abzentrifugieren des Trypsin-EDTA-haltigen Überstandes sowie Resuspension in frischem Nährmedium gleichmässig auf mehrere Kulturflaschen oder -schalen verteilt.

2.1.2.2 Membranpräparation aus CHO-Zellen

Die bei der Herstellung und Lagerung von Homogenaten aus Hausschweinherzventrikeln eingesetzten Puffer- und Zentrifugationsbedingungen konnten nicht auf die Gewinnung von CHO-Homogenaten übertragen werden, da sich entweder bei gleicher Zentrifugen-Beschleunigung nicht resuspendierbare Pellets bildeten oder die Membransuspension nach Wiederauftauen weisse Schlieren aufwies, die auf ausgefallene DNA hindeuten (Validierungsdaten in dieser Arbeit nicht gezeigt).

Die Zellen wurden für Membranpräparationen vorbereitet, wenn 16 Kulturflaschen bzw. 20 Kulturschalen zu ca. 80-90% bewachsen waren. Dazu wurde ein frisch hergestelltes Natriumbutyrat-haltiges (ca. 5 mM) Nährmedium auf den Zellrasen gegeben, um den Expressionsgrad der jeweiligen muskarinischen Rezeptoren zu erhöhen [49]. Ca. 16 Stunden nach Zugabe des butyrathaltigen Nährmediums wurde dieses durch 3 ml Homogenisationspuffer je Kulturflasche bzw. 2,4 ml je Kulturschale ersetzt (20 mM HEPES (s. 2.4.4.4), 10 mM Na₂EDTA, pH 7,4, 4°C). Mittels eines Zellschabers (PS steril, L=30 cm, beweglicher Kopf, TPP[®], Cat. No.9903, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, D) wurden die Zellen von der Oberfläche abgeschabt, unter Zugabe von 1,5 ml Homo-

genisationspuffer in Polypropylen-Röhrchen (PP-test tube, sterile, Cellstar[®], Cat. No. 227261, Greiner bio-one, Frickenhausen, D) überführt und sofort auf Eis gekühlt gelagert. Dabei wurden jeweils 4 oder 5 Kulturflaschen bzw. -schalen gleichzeitig bearbeitet und die Zellsuspensionen in einem PP-Röhrchen gesammelt. Anschliessend wurden die Zellsuspensionen mit einem Polytron-Zerkleinerer (PT 10-35, Kinematica AG, Littau, CH) aufgeschlossen (zweimal im Abstand von ca. 2 min während ca. 6 s auf Stufe 6, wobei langsam auf Stufe 6 beschleunigt wurde (Drehzahlregler, Kinematica AG, Littau, CH)). Diese Suspension wurde dann in einer Ultrazentrifuge (Avanti J.25, Rotor Typ JA 25.50, Beckman, Palo Alto, U.S.A) bei 40000 g während 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Pellets wurden in ca. 30 ml Lagerungspuffer (20 mM HEPES, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,4, 4°C) resuspendiert und erneut unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet nochmals in Endpuffer resuspendiert und ein letztes Mal zentrifugiert. Die Pellets wurden nun in Abhängigkeit von der Pelletgrösse in 8-12 ml Lagerungspuffer resuspendiert. Aliquota von 300-500 µl wurden sofort bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.2 Protein-Gehaltsbestimmung der Membransuspensionen

Die Quantifizierung des Proteingehaltes sämtlicher Membransuspensionen wurde nach der Methode von Lowry et al. [50] durchgeführt, wobei abweichend von der Methode nach Lowry humanes Serumalbumin als Standard eingesetzt wurde.

Membransuspension	Proteingehalt [mg/ml]	Anzahl untersuchter Homogenate
Schweineherzventrikel	3,44 ± 0,38	7
CHO M ₁	2,37 ± 0,16	4
CHO M ₂	1,48 ± 0,16	7
CHO M ₃	2,59 ± 0,07	4
CHO M ₄	1,66 ± 0,30	10
CHO M ₅	2,71 ± 0,11	3

Tab. 1: Zusammenstellung des nach Lowry et al. [50] bestimmten Proteingehaltes der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Membransuspensionen (Mittelwert ± Standardfehler).

2.3 Radioligandbindungsstudien

2.3.1 Allgemeine theoretische Grundlagen zu Radioligandbindungsstudien

Die reversible Bindungsreaktion eines Liganden [L] mit einem Rezeptor [R] folgt dem Massenwirkungsgesetz und wird mit folgender Gleichung beschrieben:



k_{+1} : Assoziations-Geschwindigkeitskonstante

k_{-1} : Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante

Die Geschwindigkeit der Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes v_{hin} wird folgendermassen beschrieben:

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

Die Gleichung für die Geschwindigkeit der Dissoziation eines Ligand-Rezeptor-Komplexes $v_{\text{rück}}$ lautet:

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

In der reversiblen, dynamischen Gleichgewichtssituation der Ligand-Rezeptor-Komplexe sind die Werte für die Geschwindigkeit der Hin- und der Rückreaktion genau gleich gross. In diesem Zustand ändert sich [RL] nicht mehr. Es gilt:

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

Aus obiger Gleichung lässt sich die Gleichung für die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D ableiten:

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

Die Dissoziationskonstante K_D beschreibt diejenige Konzentration des Liganden, bei der die Hälfte der vorhandenen Rezeptoren durch den Liganden besetzt wird, sie ist somit ein Mass für die Affinität des Liganden zum Rezeptor. Der Kehrwert von K_D wird als Gleichgewichts-Assoziationskonstante K_A bezeichnet.

2.3.2 Homologe Competition zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der eingesetzten Homogenate

2.3.2.1 Theoretische Grundlagen

Mit Hilfe von homologen Competitionsexperimenten werden die Affinität eines Liganden zum Rezeptor (K_D) sowie die Konzentration der vorhandenen Bindungsstellen (B_{max}) des jeweiligen Homogenates für den entsprechenden Liganden unter den gewählten Bedingungen bestimmt. Die homologe Competition stellt eine spezielle Form von Inhibitionsexperimenten dar, bei der Radioligand und Inhibitor strukturell identisch sind. Sie dient der Charakterisierung von Homogenaten, die zu weiterführenden Untersuchungen eingesetzt werden sollen.

Die Konzentration des eingesetzten Radioliganden wird bei diesem Experiment konstant gehalten, die Konzentration des kalten, nicht radioaktiv markierten Liganden (Inhibitor) hingegen wird stufenweise erhöht. Durch die steigende Konzentration des Inhibitors wird der Radioligand von seinen Bindungsstellen „verdrängt“. Zusätzlich werden die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung des Radioliganden ermittelt. Die Gesamtbindung wird durch alleinige Zugabe des Radioliganden bestimmt, die unspezifische durch Zugabe eines Überschusses an strukturverschiedenem, rezeptorspezifischem Inhibitor. Die gemessene Bindung, die Gesamtbindung inklusive der unspezifischen Bindung wird halblogarithmisch gegen die Ligandkonzentration aufgetragen und computergestützt mittels nichtlinearer Regressionsanalyse unter Verwendung der „Vier Parameter Logistischen Gleichung“ analysiert.

$$B_{ges} = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + (\text{IC}_{50}/10^{[x]})^{n_H}} \quad \text{Gleichung 6}$$

B_{ges} : Gesamtbindung

Max: Gesamtbindung in Abwesenheit des Inhibitors

Min: Gesamtbindung in Anwesenheit hoher Konzentrationen des strukturverschiedenen Inhibitors (nicht sättigbare Radioligandbindung, üblicherweise der unspezifischen Radioligandbindung entsprechend.)

IC_{50} : Ligandkonzentration, die die Bindung des Radioliganden um 50% reduziert

- [X]: Konzentration des nicht radioaktiv markierten Inhibitors
 n_H : Hill-Koeffizient [51] (Mass für die Steigung der Kurve)

Aus der Inhibitionskurve kann der IC_{50} -Wert ermittelt werden. Dieser Wert beschreibt diejenige Konzentration des Inhibitors, bei der die spezifische Bindung des Liganden auf 50% ihres Ausgangswertes reduziert wird. Ebenfalls kann die Steigung der Kurve bestimmt werden, die numerisch dem Hill-Koeffizienten n_H entspricht [52]. Eine aus dieser Analyse resultierende Steigung, die nicht signifikant verschieden ist von $n_H = -1,0$, weist auf eine homogene Rezeptorpopulation mit einer konstanten Affinität des Liganden hin [53, 54].

Nach der Gleichung von Cheng und Prussoff [55] kann daraus folgend die Inhibitionskonstante K_i berechnet werden, wobei die Ligandkonzentration $[L]$ und die Dissoziationskonstante K_D bekannt sein müssen. Zudem muss die Reaktion dem Massenwirkungsgesetz der oben beschriebenen Form gehorchen und das Reaktionsgleichgewicht erreicht sein.

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

K_i und K_D sind die Dissoziationskonstanten des „kalten“ (Inhibitor) und des radioaktiv markierten Liganden. Weil in dieser Arbeit beide strukturell identisch sind, gilt: $K_i = K_D$, daraus folgt:

$$K_D = IC_{50} - [L] \quad \text{Gleichung 8}$$

DeBlasi et al. [56] leiteten aus dem Massenwirkungsgesetz und Gleichung 7 folgende Funktion her:

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

- B_{\max} : Konzentration der vorhandenen Bindungsstellen
 $[RL]_0$: spezifische Radioligandbindung in Abwesenheit des Inhibitors

Gleichung 8 und Gleichung 9 ermöglichen, aus den gemessenen Werten für $[RL]_0$ und IC_{50} , sowie der bekannten Ligandkonzentration $[L]$, K_D und B_{max} zu berechnen.

Die Bindungsisotherme nach Langmuir, die die Bindung eines Liganden an eine einheitliche Rezeptorpopulation beschreibt, lautet folgendermassen:

$$B = \frac{B_{max} [L]}{K_D + [L]} \quad \text{Gleichung 10}$$

B: Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe

Durch diese Sättigungsisotherme wird in Abhängigkeit von der Ligandkonzentration die Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe im Reaktionsgleichgewicht beschrieben. Ausgehend von der Sättigungsisotherme lässt sich die fraktionelle Rezeptorbesetzung im Gleichgewicht nach folgender Gleichung berechnen:

$$\frac{B}{B_{max}} = \frac{[L]}{K_D + [L]} \quad \text{Gleichung 11}$$

Eine mögliche Linearisierung von Gleichung 10 stellt die Umformung nach Scatchard [57] dar.

$$\frac{B}{[L]} = \frac{B_{max} - B}{K_D} = -\frac{1}{K_D} B + \frac{B_{max}}{K_D} \quad \text{Gleichung 12}$$

Bei bekannter Konzentration von freiem und gebundenem Liganden lassen sich K_D und B_{max} unter Einsatz dieser Beziehung graphisch ermitteln. Die Linearisierung nach Scatchard stellt also neben der Methode nach DeBlasi [56] eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung von Bindungseigenschaften eines Homogenates dar.

Aufgrund der unterschiedlichen Gewichtung der Messpunkte durch die Reziprok-Auftragung bei der Linearisierung nach Scatchard ist die Bestimmung von K_D und B_{max} mit einer gewissen Ungenauigkeit behaftet und sollte wenn möglich nicht als alleinige Methode zur Charakterisierung von Bindungseigenschaften von Homogenaten eingesetzt werden.

Voraussetzung für den korrekten Einsatz der Scatchard-Analyse sind nach Bennett und Yamamura [58]:

1. Das Bindungsgleichgewicht zwischen Rezeptoren und Liganden muss zum Zeitpunkt der Messung erreicht sein und dem Massenwirkungsgesetz der obigen Form folgen.
2. Es muss eine einheitliche Rezeptor- und Ligandpopulation vorliegen.
3. B_{\max} sollte nicht mehr als 10% des K_D -Wertes betragen.
4. Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor darf nachfolgende Rezeptor-Ligand-Interaktionen nicht beeinflussen.
5. Die unspezifische Bindung muss genau bestimmbar sein.
6. Maximal 10% der eingesetzten Ligandkonzentration dürfen gebunden werden, damit die freie Ligandkonzentration als konstant und identisch mit der eingesetzten angesehen werden kann.

2.3.2.2 Versuchsdurchführung

Zur Charakterisierung der in den weitergehenden Untersuchungen eingesetzten Homogenate wurden homologe Konkurrenzexperimente durchgeführt. Die Dichte der spezifischen Bindungsstellen (B_{\max}) des muskarinischen Antagonisten [^3H]NMS in Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikelgewebe bzw. in den Membransuspensionen, die aus den stabil transfizierten CHO-Zellen gewonnen worden waren, sowie der Affinitätsparameter K_D der Bindung von [^3H]NMS an die jeweiligen Muskarinrezeptoren wurden mittels oben beschriebener homologer Konkurrenzversuche bestimmt. Zur Untersuchung der Homogenate aus Herzventrikelgewebe und aus CHO-Zellen wurden verschiedene Methoden angewandt, die im folgenden getrennt beschrieben werden.

2.3.2.2.1 Charakterisierung der Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein

Der hier beschriebene Reaktionsansatz wurde für sämtliche homologen Konkurrenzversuche mit Herzventrikel-Suspensionen vom Hausschwein beibehalten. Die Inkubationen wurden in konisch zulaufenden Zentrifugengläsern vorgenommen, wobei Reaktionsansätze von jeweils 1500 μl eingesetzt wurden. Die Reihenfolge des Zupipettierens der einzelnen Komponenten erfolgte gemäss dem aufgeführten Schema. Sofern nicht anders geschrieben, wurden die Versuche als Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Zugefügtes Volumen [μ l]	Art der zugefügten Lösung
100	Wässrige [3 H]NMS-Lösung
50	Aqua dest. (Gesamtbdg.), bzw wässrige Atropinlösung $3 \cdot 10^{-5}$ M (unspez. Bdg.), bzw. Ligand-Verdünnungsreihe in Wasser
1100	Puffer (s. 2.4.4, S. 39)
250	Homogenat in Wasser

Tab. 2: Pipettierschema für die Ansätze für die homologen Kompetitions-Versuche mit Homogenaten aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein.

Die Endkonzentration der [3 H]NMS-Lösung betrug 0,2 nM. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde der orthosterische Antagonist Atropin in einer Endkonzentration von 10^{-6} M eingesetzt. Zwei verschiedene Pufferbedingungen kamen zum Einsatz: Ein Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer (s. 2.4.4.1) oder ein Na, K, P_i-Puffer (s. 2.4.4.2). Das frisch aufgetaute Homogenat wurde mit aqua dest. auf das gewünschte Volumen ergänzt und vor der Zugabe während mindestens 5 Minuten mit dem Magnetrührer in Suspension gebracht.

Nach dem Pipettieren des Versuchsansatzes wurden die Zentrifugengläser einzeln kurz geschüttelt (Vortex Genie2[®], Bender & Holbein AG, Zürich, CH). Anschliessend wurden sie mit Parafilm (American National CanTM, Chicago, USA) abgedichtet und im vortemperierten Wasserbad (GFL[®] 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, D) unter ständigem Schütteln während 2 Stunden inkubiert.

Nach dem Erreichen der Gleichgewichtssituation wurde die Reaktion gestoppt, indem den einzelnen Ansätzen nach erneutem kurzen Schütteln ein Volumen von 1 ml entnommen wurde, über Glasfaserfilter (GF6, Schleicher & Schüll, Dassel, D) mittels Vakuumfiltration filtriert und anschliessend zweimal mit je 5 ml eisgekühltem aqua dest. (Mg, Tris, Cl, P_i-Ansätze) oder Puffer (Na, K, P_i-Ansätze) gespült wurde. Die Glasfaserfilter für die Ansätze mit Na, K, P_i-Puffer waren vor der Filtration während mindestens 12 Stunden mit 0,2%-iger Polyethylenimin-Lösung (PEI) benetzt worden, um die unspezifische Bindung der Radioliganden an das Filtermaterial zu reduzieren. Vor dem Filtrieren wurden die Filter einmal mit 5 ml eisgekühltem aqua dest. gespült.

Die Filter wurden in Polyethylen-Szintillationsgefässe (21 ml Gefässe, Labomedic, Bonn, D) überführt und mit 5 ml einer gewebe lösenden Szintillationslösung (Ready-Protein[®], Beckman) bedeckt. Vor dem Messen der in den einzelnen Proben enthaltenen

Radioaktivität wurden die Filter eine Stunde mit der Szintillationslösung inkubiert, damit sämtliche Gewebefragmente aufgelöst und die Radioaktivität der Flüssigkeitsszintillations-Messung (3 min) (Beckman LS6000 SC) zugänglich gemacht werden konnte. Die Daten wurden wie unter 2.3.2.1 beschrieben analysiert.

2.3.2.2.2 Charakterisierung der aus CHO-Zellen gewonnenen Homogenate

Sämtliche Radioligandbindungsstudien mit Membransuspensionen, die aus verschiedenen CHO-Zelllinien gewonnen worden waren, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels eines Harvesters 96[®] (Mach III M, Tomtec, Hamden, USA) durchgeführt. Dies ermöglicht einen wesentlich geringeren Verbrauch an Membransuspension und Radioligand, als das mit den Homogenaten aus Herzventrikelgewebe vom Hauschwein durchgeführte, manuelle Filtrationsverfahren. Als Reaktionsgefäße dienten für alle Versuche 96-well-Mikrotiterplatten aus Polypropylen (Deep Well Plates, Cat. No. AB-0564, Abgene House, Epsom, UK).

Die Inkubationen wurden in den oben beschriebenen Mikrotiterplatten durchgeführt. In der folgenden Tabelle werden die Reaktionsansätze beschrieben.

Reihenfolge der Zugabe	Zugefügtes Volumen [μ l]	Art der zugefügten Lösung
1.	10	Aqua dest. (Gesamtbdg.), bzw. wässrige Atropinlösung $3 \cdot 10^{-5}$ M (unspez. Bdg), bzw. NMS-Verdünnungsreihe in Wasser
2.	20	Wässrige [3 H]NMS-Lösung
	250	Mg, Tris, HCl, P _i -Puffer (s. 2.4.4.1)
	30	Homogenat (M ₁ -M ₅) in HEPES-Lagerungspuffer (s. 2.4.4.4)

Tab. 3: Pipettierschema für die Ansätze für die homologen Kompetitions-Versuche mit Membransuspensionen aus CHO- M₁- bis M₅-Zellen.

Die in Tab. 3 unter 1. aufgeführten Lösungen wurden in die Bohrungen der Mikrotiterplatte vorgelegt. Ein Vielfaches der unter 2. aufgeführten Lösungen wurde in PP-Röhrchen zusammenpipettiert und gemischt. Aus diesen Röhrchen wurden mit einer Multipipette (Finnpipette[®] 4540, Labsystems, Helsinki, SF) jeweils 300 μ l in die einzelnen Bohrungen zugegeben. Die [3 H]NMS-Endkonzentration betrug 0,2 nM. Im Gegensatz zu den Untersuchungen mit manuellem Filtrationsverfahren ist zu beachten, dass

die in die Mikrotiterplatte vorgelegte NMS-Verdünnungsreihe im Endansatz um den Faktor 31 verdünnt wird und nicht um den Faktor 30. Dieser Unterschied kommt durch den Einsatz der Multipipette zustande. Er ist zu vernachlässigen und wird im folgenden nicht weiter berücksichtigt.

Die in HEPES-Lagerungspuffer eingefrorenen CHO-Membransuspensionen wurden mit HEPES-Lagerungspuffer verdünnt, da eine Verdünnung mit aqua dest. sofort zum Ausfallen von Suspensionsbestandteilen führte, die nicht mehr resuspendierbar waren. Der Eigeneffekt der so eingeführten geringen HEPES-Menge im Endansatz wurde in Versuchen mit Suspensionen vom Schweineherz überprüft. Es wurde kein signifikanter Effekt auf die ermittelten Ergebnisse detektiert (Daten nicht gezeigt).

Die Verdünnung der Homogenate wurde so gewählt, dass nicht mehr als 10% der eingesetzten Radioligandmenge gebunden wurden und ein ausreichend grosses Messfenster erzielt werden konnte. Der fertige Versuchsansatz wurde mit Parafilm[®] M abgedichtet, auf dem Rotationsmischer geschüttelt und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit wurde so gewählt, dass sie mindestens das Fünffache der Dissoziationshalbwertszeit von [³H]NMS für den jeweiligen Rezeptorsubtyp unter Kontrollbedingungen betrug. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion gestoppt, indem alle Proben gleichzeitig mittels des oben beschriebenen Harvesters 96[®] über eine Filtermatte (Printed Filtermat A, 1450-421, Wallac, Turku, SF) filtriert wurden. Die Filtermatte wurde daraufhin mit aqua dest. 4°C einmal gespült. Sie war vor dem Filtrationsprozess während 1 h mit 0,2%-iger PEI-Lösung benetzt worden (s. u.). Anschliessend wurde die Filtermatte zuerst bei Raumtemperatur und dann während 3 min bei 400 W in der Mikrowelle (Sharp P611, Hamburg, D) getrocknet. Zur Messung der an die Rezeptoren gebundenen Ligandmenge wurde eine Wachsplatte (Meltilex[™] A, 1450-441, Wallac, Turku, SF), die Szintillationscocktail enthielt, auf die Filtermatte geschmolzen (Dri-Block[®] DB-2A, Techne, Duxford Cambridge, UK). Die mit Szintillationswachs durchtränkte Filtermatte wurde nach dem Erstarren des Wachses in eine Klarsichthülle (Sample Bag, 1450-432, Wallac, Turku, SF) verpackt und in eine Zählkassette (Plate Cassette, 1450-105, Wallac, Turku, SF) überführt. Die Rezeptorgebundene Aktivität wurde mittels Szintillationsspektrometrie gemessen (1450-Microbeta-Plus Liquid Scintillation Counter, Wallac, Turku, SF und 1450 Microbeta Trilux Liquid Scintillation & Luminescence counter, Wallac, Perkin Elmer, Turku, SF), wobei jede Probe während 3 min vermessen wurde. Die Analyse der Daten erfolgte entsprechend den Versuchen mit Homogenaten aus Schweineherzventrikel.

Die Filtermatte war vor dem Filtrationsprozess abweichend von den manuell filtrierten Versuchen mit Glasfaserfilter und Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer in PEI-Lösung eingelegt worden, weil dadurch das Verhältnis von unspezifischer Bindung zu Gesamtbindung deutlich optimiert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

2.3.3 Heterologe Interaktionsexperimente

2.3.3.1 Theoretische Grundlagen

Mit diesem Experiment kann die Affinität einer Testsubstanz - in der vorliegenden Arbeit des allosterischen Modulators - zum nicht mit Ligand besetzten Rezeptor sowie die Kooperativität zwischen eingesetztem allosterischen Modulator und orthosterischem Ligand ermittelt werden. Die Kooperativität ist ein Mass für die gegenseitige Beeinflussung der Affinität zur jeweiligen Bindungsstelle von Ligand und allosterischem Modulator.

Allosterische Modulatoren verhalten sich nicht kompetitiv mit dem Radioliganden. Folglich gelten andere Bedingungen für die Beschreibung der Interaktionen zwischen Radioligand [L], Alloster [A] und Rezeptor [R]. Ehlert [29] publizierte dazu das folgende Modell, welches diese Interaktionen beschreibt:

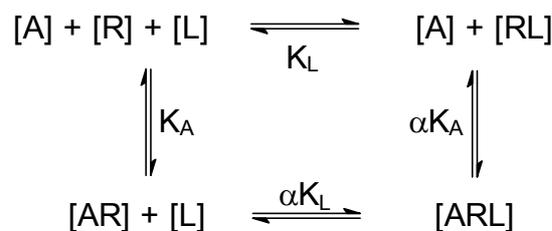


Abb. 3: Ternäres Modell allosterischer Interaktion resp. Kooperativitätsmodell nach Lit.[29].

- K_L : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Radioliganden. Sie gilt als das Mass für die Affinität zur Radioligand-Bindungsstelle.
- K_A : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Allostere als Mass für die Affinität zur Alloster-Bindungsstelle, bzw. Affinität des Allostere zum nicht-Ligand-besetzten Rezeptor.
- α : Kooperativitätsfaktor. Er definiert das Mass für die Affinitätsänderung des Allostere, die durch die Bindung von [L] an [R] bedingt ist, sowie das Mass

für die Affinitätsänderung des Radioliganden, die durch die Bindung von [A] an [R] bedingt ist.

Ein Kooperativitätsfaktor > 1 bedeutet, wie unter *Einleitung* beschrieben, eine negative allosterische Wechselwirkung, d. h., der Modulator hat einen bindungshemmenden Effekt auf den Liganden und umgekehrt. Die Assoziationshemmung ist stärker ausgeprägt als die Dissoziationsverzögerung. Ein α -Wert = 1 zeigt neutrale Kooperativität an, assoziationshemmender Effekt und dissoziationsverzögernder Effekt heben sich in der Bilanz auf. Bei α -Werten < 1 handelt es sich um eine positive, bindungsfördernde Wechselwirkung, hier überwiegt der dissoziationsverzögernde Effekt.

Mit Hilfe des von Ehlert entwickelten ternären Modells lassen sich der Kooperativitätsfaktor α sowie die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A eines allosterischen Modulators mittels computerunterstützter nichtlinearer Regressionsanalyse gemäss folgender Gleichung ermitteln:

$$B_A = \frac{B_0 \cdot (10^{\log L} + 10^{\log K_L})}{10^{\log L} + 10^{\log K_L} \left[\frac{10^{\log K_A} + 10^{\log X}}{10^{\log K_A} + 10^{\frac{\log X}{\alpha}}} \right]} \quad \text{Gleichung 13}$$

B_A : spezifische Radioligandbindung in Anwesenheit des allosterischen Modulators

B_0 : spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Modulators

K_L : K_D des Radioliganden [M]

K_A : K_D des Modulators am unbesetzten Rezeptor [M]

α : Kooperativitätsfaktor

X : Konzentration des Modulators [M]

L : Radioligand-Konzentration [M]

K_L wird gemäss der unter 2.3.2.1 aufgeführten Methode ermittelt und konstant gesetzt, L ist ebenfalls konstant zu setzen.

Es muss gewährleistet sein, dass zum Zeitpunkt der Messung für die Bestimmung von K_A und α Gleichgewichtsbedingungen herrschen.

Die Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung lässt sich nach der modifizierten Gleichung von Lazareno und Birdsall [59] folgendermassen abschätzen:

$$t_{1/2\text{obs}} = t_{1/2\text{off}} \left(1 + X \cdot \frac{1}{EC_{0,5, \text{diss}}}\right) \quad \text{Gleichung 14}$$

- $t_{1/2\text{obs}}$: Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung.
- $t_{1/2\text{off}}$: Halbwertszeit der Radioligand-Dissoziation unter Kontrollbedingungen.
- X: Konzentration des allosterischen Modulators [M].
- $EC_{0,5, \text{diss}}$: Modulator-Konzentration bei halbmaximaler Reduktion der Radioligand-Dissoziation.

Es wird angenommen, dass nach der fünffachen $t_{1/2\text{obs}}$ Gleichgewichtsbedingungen herrschen.

Annähernd neutral kooperative, sowie sehr stark positiv bzw. negativ kooperative Substanzwirkungen lassen sich teilweise nicht mittels nichtlinearer Regressionsanalyse nach Gleichung 13 analysieren. In diesen Fällen wird in Gleichung 13 der Term K_A durch den Term $EC_{0,5, \text{diss}}/\alpha$ ersetzt [60].

2.3.3.2 Versuchsdurchführung

In den Experimenten zur heterologen Interaktion von orthosterischem Ligand und allosterischem Modulator wurden sämtliche in dieser Arbeit untersuchten allosterischen Modulatoren bezüglich ihrer Wirksamkeit an Homogenaten aus Hausschweinherzventrikelgewebe untersucht. Die Silicium-haltige Substanz W84-NPSiN⁺NP wurde zusätzlich in einem "Screening-Verfahren" an allen fünf klonierten humanen Muskarinrezeptoren M₁ bis M₅ hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Beeinflussung des Gleichgewichtsbindungsverhaltens von [³H]NMS untersucht.

2.3.3.2.1 Versuchsdurchführung mit Homogenaten aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein

Mit dieser Versuchsanordnung sollte die Affinität der allosterischen Modulatoren zum freien Rezeptor sowie deren Kooperativität mit dem eingesetzten Radioliganden [³H]NMS unter verschiedenen Versuchsbedingungen bestimmt werden.

Die Versuche wurden in Analogie zu den unter 2.3.2.2.1 beschriebenen Experimenten durchgeführt. Das Vorgehen beim Pipettieren der Ansätze wurde gleich belassen,

ebenso der Filtrations- und Messprozess. Im Gegensatz zu den homologen Kompetition-Versuchen wurden hier die Ansätze für die Si-enhaltenden Substanzen nicht in Zentrifugengläsern angesetzt und inkubiert, sondern in 1,5 ml Reaktionsgefässen (Greiner Labortechnik, Cat. No. 616201, Frickenhausen, D), die zuvor mit Sigmacote[®] silanisiert worden waren. Der Wechsel von Zentrifugengläsern auf silanisierte Reaktionsgefässe war vorgenommen worden, um eine mögliche Interaktion der allosterischen Testsubstanzen mit den Reaktionsgefässen möglichst gering zu halten. Im folgenden werden die Ansatz-Parameter und Inkubationsbedingungen für die mit den Schweineherzhomogenaten durchgeführten Versuche aufgeführt.

Zugefügtes Volumen [μ l]	Art der zugefügten Lösung
100	Wässrige [3 H]NMS-Lösung
50	aqua dest. (Gesamtdg.), bzw. wässrige Atropinlösung $3 \cdot 10^{-5}$ M (unspez. Bdg.), bzw. Alloster-Verdünnungsreihe in Wasser
1100	Puffer (s. 2.4.4)
250	Homogenat in Wasser

Tab. 4: Pipettierschema für die Ansätze für die heterologen Interaktions-Versuche mit Homogenaten aus Schweineherzventrikelgewebe. Die Reihenfolge der Zugabe wurde eingehalten. Als Puffer wurde entweder Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer oder Na, K, P_i-Puffer eingesetzt (s. 2.4.4). Das Homogenat wurde mit aqua dest. basierend auf den homologen Kompetition-Versuchen soweit verdünnt, dass ein genügend breites Messfenster für die Versuche gewährleistet war.

Um bei einigen allosterischen Testsubstanzen, deren Interaktionsverhalten sich in der Analyse nach Ehlert als komplexer herausstellte, Simultananalysen mittels nichtlinearer Regression durchführen zu können, wurden die Konzentrationen der eingesetzten Radioligandlösungen bei einigen Modulatoren zwischen 0,2 nM, 0,1 nM und 0,05 nM variiert. Dabei wurde bei den ersten Untersuchungen einer Testsubstanz immer eine Radioligandkonzentration von 0,2 nM eingesetzt. Die Inkubationstemperaturen und -zeiten wurden in Abhängigkeit vom jeweiligen Modulator, dessen Konzentration und der Pufferbedingung gemäss Gleichung 14 abgeschätzt.

Nach Erreichen des Bindungsgleichgewichts wurde die Reaktion wie unter 2.3.2.2.1 beschrieben durch Filtration gestoppt. Anschliessend wurde die Radioaktivität, die in den einzelnen Proben enthalten war, gemessen. Diese Daten wurden wie unter 2.3.3.1 beschrieben analysiert.

2.3.3.2.2 Versuchsdurchführung mit Homogenaten aus CHO-Zellen

Die symmetrisch mit Naphthalimid-Resten substituierte allosterische Testsubstanz W84-NPSiN⁺NP wurde exemplarisch für die Untersuchungen des Bindungsverhaltens der in dieser Arbeit erstmalig beschriebenen Si-haltigen W84-Derivate an M₁- bis M₅-Rezeptorsuspensionen aus CHO-Zellen eingesetzt. Sie hatte sich in den Untersuchungen mit Homogenaten vom Schweineherz als sehr potent bezüglich der Förderung der Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS erwiesen [61].

In einem "Screening-Verfahren" adaptiert nach Lit. [62] wurde der Effekt dieser Substanz auf das Gleichgewichtsbindungsverhalten von [³H]NMS an humanen muskarinischen M₁- bis M₅-Rezeptoren untersucht. Hierbei wurde ein Protokoll verwendet, das von jenem der Untersuchungen mit Schweineherzhomogenat abweicht. Die einzelnen Proben wurden in Bohrungen von 96-well-Mikrotiterplatten aus Polypropylen angesetzt. Das Endvolumen betrug für jede Probe 310 µl. Die genaue Zusammensetzung der Proben wird in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Reihenfolge der Zugabe	Zugefügtes Volumen [µl]	Art der zugefügten Lösung
1.	10	Aqua dest. (Gesamtbdg.), bzw. wässrige Atropinlösung 3*10 ⁻⁵ M (unspez. Bdg.), bzw. Alloster-Verdünnungsreihe in Wasser
2.	20	wässrige [³ H]NMS-Lösung
	250	Mg, Tris, Cl, P _i -Puffer (s. 2.4.4.1)
	30	Homogenat (CHO M ₁ bis M ₅) in Lagerungspuffer (s. 2.1.2.2)

Tab. 5: Pipettierschema für die Ansätze für Gleichgewichtsbindungs-Versuche mit allosterischen Modulatoren und humanen muskarinischen Rezeptoren der Subtypen M₁ bis M₅. Für jede Alloster-Konzentration wurden triplizierte Werte angesetzt.

In der 96-well-Mikrotiterplatte wurden 10 µl Aqua dest., bzw. Atropinlösung, bzw. Alloster-Verdünnungsreihe vorgelegt. Die in Tab. 5 unter 2. aufgeführten Lösungen waren gemeinsam für alle Bohrungen in einem 50 ml PP-Röhrchen gemischt worden. Daraus wurden anschliessend 300 µl für die einzelnen Bohrungen entnommen. Entsprechend den homologen Konkurrenzexperimenten wurde auch hier durch den Einsatz der Multipipette die in die Mikrotiterplatte vorgelegte Alloster-Verdünnungsreihe im Endansatz um den Faktor 31 verdünnt. Er ist zu vernachlässigen und wird im folgenden nicht wei-

ter berücksichtigt. Die [^3H]NMS-Endkonzentration betrug 0,2 nM. Der Wert für jede Konzentration der Testsubstanz wurde dreifach bestimmt. Der fertige Versuchsansatz wurde analog zu den homologen Kompetitions-Versuchen (s. 2.3.2.2.2) mit Parafilm[®] M abgedichtet, auf dem Rotationsmischer geschüttelt und im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Es wurden Veränderungen der Inkubationszeiten vorgenommen, um zu überprüfen, ob sich dadurch eine deutliche Veränderung der qualitativ ermittelten Ergebnisse ergab. Zwei Versuche mit sämtlichen muskarinischen Rezeptorsubtypen waren während 3 Stunden inkubiert worden, ein dritter Versuch während 6 Stunden. Für die Membransuspensionen aus M₁-Rezeptoren wurde noch ein zusätzlicher Versuch mit 22 Stunden Inkubationszeit durchgeführt. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion wie unter 2.3.2.2.2 beschrieben gestoppt und zur Messung aufbereitet. Die ermittelten Daten für die spezifische Bindung wurden bezogen auf die spezifische Gesamtbindung in Abwesenheit allosterischer Testsubstanz normalisiert und semilogarithmisch gegen die Konzentration der eingesetzten Testsubstanz aufgetragen. Bei diesem "Screening-Verfahren" muss beachtet werden, dass die fraktionelle Rezeptorbesetzung (s. Gleichung 11) der Kontrollwerte nicht zu hoch ist, so dass bei einer stark positiv kooperativen Substanz genügend freie Bindungskapazität zur Verfügung steht. Analog zu den homologen Konkurrenzexperimenten gilt auch hier, dass nicht mehr als 10% des Radioliganden gebunden werden sollten. Das Erreichen von Gleichgewichtsbedingungen war bei diesem Screening-Verfahren nicht angestrebt. Lediglich eine qualitative Aussage über die gegenseitige Beeinflussung von Alloster und [^3H]NMS an den fünf Muskarin-Rezeptorsubtypen M₁ bis M₅ war beabsichtigt.

2.3.3.3 Überprüfung des bindungsfördernden Effektes von allosterischen Modulatoren

Da die Analyse der heterologen Interaktionsversuche gemäss Gleichung 13 für stark positiv kooperative Substanzen auch unter Zuhilfenahme von Simultananalysen mit unterschiedlichen Radioligandkonzentrationen einige Fragen offen liess, wurde zu Kontrollzwecken die im folgenden beschriebene Methode angewandt. Diese sollte zeigen, dass die mittels heterologer Interaktionsversuchen beobachteten, starken bindungsfördernden Effekte auf einer Steigerung der Affinität und nicht auf einer Erhöhung der Anzahl Bindungsstellen beruhen.

Dieser Versuch stellt eine leicht modifizierte Variante einer homologen Konkurrenz (s.2.3.2) dar und steht in Analogie zu Lit. [25]. Dabei werden parallel zwei Ansätze ein-

gesetzt. Bei dem einen handelt es sich um den Ansatz einer homologen Konkurrenz (Kontrolle), bei dem anderen wird zusätzlich jeder Probe eine konstante, hohe Konzentration an zu untersuchendem allosterischen Modulator zugegeben, wobei in der vorliegenden Arbeit für diese Versuche exemplarisch W84-Si_{1/5} eingesetzt wurde. Die Versuche wurden mit dem manuellen Filtrationsverfahren mit Schweineherz-Homogenat durchgeführt. In der folgenden Tabelle wird der Versuchsansatz dargestellt.

Zugefügtes Volumen [μ l]	Art der zugefügten Lösung
100	Wässrige [³ H]NMS-Lösung (0,2 nM Endkonz.)
50	Aqua dest. (Gesamtdg.), bzw wässrige Atropinlösung $3 \cdot 10^{-5}$ M (unspez. Bdg.), bzw. NMS-Verdünnungsreihe in Wasser
1050	Mg, Tris, Cl, P _i -Puffer (s. 2.4.4.1)
250	Homogenat in Wasser
50	Aqua dest. (Kontrolle), bzw. W84-Si _{1/5} in einer konstanten Konzentration

Tab. 6: Pipettierschema für die Ansätze zur Überprüfung des bindungsfördernden Effektes von Allosterischen Testsubstanzen. Es wurden Dreifachbestimmungen vorgenommen.

Die einzelnen Proben wurden in zuvor silanisierten 1,5 ml Reaktionsgefässen angesetzt. Die Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Komponenten wurde so wie in der Tabelle aufgeführt eingehalten. Die Homogenatsuspension war vor der Zugabe während mindestens 5 min auf dem Magnetrührer gerührt worden. Die Endkonzentration von W84-Si_{1/5} betrug 3 μ M, was derjenigen Konzentration entsprach, bei der im heterologen Interaktions-Experiment das obere Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve erreicht war. Anschliessend wurden die einzelnen Proben kurz geschüttelt und bei 37°C im Wasserbad bis zum Erreichen von Gleichgewichtsbedingungen während 3,5 Stunden inkubiert. Die Inkubationszeit war gemäss Gleichung 14 abgeschätzt worden. Die Proben wurden der Messung auf die gleiche Art zugänglich gemacht, wie in allen homologen und heterologen Interaktionsexperimenten, die mit Homogenaten aus Hausschweinherzventrikeln gewonnen worden waren. Die Analyse entsprach jener der homologen Konkurrenzexperimente, wobei sowohl eine Analyse nach Hill, als auch eine nach Scatchard erfolgte (s. 2.3.2.1).

2.3.4 Kinetische Experimente

2.3.4.1 Theoretische Grundlagen

Kinetische Radioligandbindungsuntersuchungen stellen laut Literatur [63] vermutlich eine der empfindlichsten Methoden zur Erfassung und Quantifizierung allosterischer Interaktionen an G-Protein gekoppelten Rezeptoren dar. Bei dieser Art von Untersuchungen wird die Bindung des Radioliganden als Funktion der Zeit erfasst, es handelt sich hierbei um Untersuchungen, die nicht im thermodynamischen Gleichgewicht durchgeführt werden. Dissoziationsexperimente ermöglichen es, die Affinität eines zu untersuchenden allosterischen Modulators an seine Bindungsstelle zu bestimmen, während die orthosterische Bindungsstelle besetzt ist. Damit ist gewährleistet, dass nur Wechselwirkungen des allosterischen Modulators mit einer anderen als der orthosterischen Bindungsstelle erfasst werden [22]. Dies steht im Gegensatz zu den oben beschriebenen heterologen Interaktionsexperimenten (s. 2.3.3). Bei der Analyse von Daten, die aus heterologen Interaktionsexperimenten unter Gleichgewichtsbedingungen gewonnen worden sind, können topologisch kompetitive Interaktionen zwischen allosterischem Modulator und orthosterischem Liganden nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden (s. stark negativ kooperative Substanzen) [64, 65]. Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Modulatoren verzögerten mit steigender Konzentration die Dissoziation der eingesetzten Liganden von der orthosterischen Bindungsstelle.

Mit der im folgenden beschriebenen Versuchsanordnung lässt sich die Potenz einer eingesetzten allosterischen Testsubstanz hinsichtlich der Dissoziations-Verzögerung von Rezeptor-Ligand-Komplexen bestimmen [66]. Zur Quantifizierung dieser Potenz dient der $EC_{0,5,diss}$ -Wert. Dieser beschreibt die Konzentration an Testsubstanz, bei der der halbmaximale Effekt dieser Substanz im entsprechenden Experiment erreicht wird, respektive der Wendepunkt einer entsprechenden sigmoiden Konzentrations-Wirkungs-Kurve liegt. Ist der allosterische Modulator in der Lage, den maximalen Effekt (=100%) auf 0% zu reduzieren, liegt der Wendepunkt der Konzentrations-Wirkungs-Kurve bei 50% des Kontrollwertes. Dieser Punkt wird auch als $EC_{50,diss}$ -Wert bezeichnet. Der $EC_{0,5,diss}$ -Wert entspricht derjenigen Konzentration an allosterischem Modulator, bei der 50% der mit Orthoster besetzten Rezeptoren mit allosterischem Modulator besetzt sind [67], er ist also ein Mass für die Affinität des allosterischen Modulators zum Orthoster-besetzten Rezeptor.

Dissoziations- und Assoziationsprozesse verlaufen im Rahmen des Experimentes parallel, was durch folgende Differentialgleichung beschrieben werden kann:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{+1} [R] [L] - k_{-1} [RL] \quad \text{Gleichung 15}$$

Der Dissoziationsprozess wird einer Messung zugänglich gemacht, indem dem Reaktionsansatz zum "Starten" ein Überschuss eines kompetitiven Antagonisten zugegeben wird. Dieser verhindert die Re-Assoziation des Radioliganden. Die Dissoziation des Receptor-Ligand-Komplexes folgt dann einer monoexponentiellen Funktion:

$$B_t = B_0 e^{-k_{-1}t} + u \quad \text{Gleichung 16}$$

B_t : Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t

B_0 : spezifische Bindung des Radioliganden zum
Zeitpunkt $t = 0$ unmittelbar vor Zugabe der Startlösung

u : unspezifische Radioligandbindung

Anhand von Gleichung 15 wird computerunterstützt mittels nichtlinearer Regressionsanalyse die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante k_{-1} ermittelt. Aus dieser lässt sich mit der folgenden Gleichung die Dissoziationshalbwertszeit $t_{1/2}$ errechnen:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{-1}} \quad \text{Gleichung 17}$$

$t_{1/2}$ gibt die Zeit an, in der die spezifische Bindung des Radioliganden auf die Hälfte des Wertes zum Zeitpunkt $t = 0$ direkt vor Zugabe des kompetitiven Antagonisten abnimmt. Je nach Potenz des allosterischen Modulators verändert sich mit Veränderung der Alloster-Konzentration $t_{1/2}$ und somit die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante. k_{-1} stellt in der Gegenwart einer allosterischen Testsubstanz die „apparente“ Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante dar, weil die Dissoziation nicht mehr allein Gleichung 3 folgt. Die apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante wird in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit von allosterischer Testsubstanz in Abhängigkeit von der Konzentration des untersuchten allosterischen Modulators halblogarithmisch aufgetragen. Anhand der Konzentrations-Wirkungs-Kurven, welche computergestützt mittels

nichtlinearer Regressionsanalyse gemäss Gleichung 6 basierend auf diesen Daten errechnet werden, werden die $EC_{0,5}$ -Werte ermittelt.

Dabei ist zu prüfen, ob das Minimum der Kurven signifikant von 0% abweicht, und ob sich das Steilheitsmass n_H der einzelnen Kurven von $n_H = -1$ unterscheidet. Falls sich das untere Plateau einer Konzentrations-Wirkungskurve statistisch signifikant von 0% unterscheidet, ist die entsprechende allosterische Testsubstanz auch in hohen Konzentrationen nicht in der Lage, die Dissoziation des orthosterischen Liganden vollständig zu verhindern, was auf eine wesentlich schwieriger interpretierbare Interaktion hinweisen kann [68]. Ein von -1,0 abweichender Hill-Koeffizient könnte für eine komplexere stöchiometrische Interaktion von Alloster und Rezeptor sprechen [52, 53].

2.3.4.2 Dissoziationsexperimente unter Einsatz von Homogenaten aus Schweineherzventrikelgewebe

Ziel dieser Versuche war die Ermittlung der Affinität der eingesetzten allosterischen Modulatoren zu ihrer Bindungsstelle an muskarinischen M_2 -Rezeptoren, wobei die orthosterische Bindungsstelle mit [3H]NMS besetzt war. Für alle Testsubstanzen wurde die Affinität zum [3H]NMS-besetzten Rezeptor in Mg, Tris, Cl, P_i -Puffer bestimmt. Zusätzlich wurde die Affinität von W84, W84t und W84-Si_{1/6} auch in Na, K, P_i -Puffer untersucht, um Einflüsse der Inkubationsbedingungen auf die Affinität zum besetzten Rezeptor zu erfassen. Die Versuchsansätze wurden in Erlenmeyer-Kolben aus Glas à 50 ml pipettiert. Während der gesamten Inkubations- und Dissoziationsphase wurde der Versuchsansatz auf dem Magnetrührer gerührt. Im folgenden werden die Ansatzparameter aufgeführt, die in der angegebenen Reihenfolge pipettiert wurden.

Zugefügtes Volumen [μ l]	Art der zugefügten Lösung
1600	Wässrige [3H]NMS-Lösung
200	Aqua dest.
16800	Puffer (s 2.4.4, S. 39)
4000	Homogenat in Wasser

→ 30 min Inkubationsphase, anschliessend Bestimmung der Gesamtbindung (je 3 Proben à 1 ml)

1400	Startlösung (bestehend aus: 700 µl wässriger Atropinlösung ($3 \cdot 10^{-5}$ M) und 700 µl der zu untersuchenden Testsubstanz in aqua dest.)
------	--

Tab. 7: Pipettierschema für die Ansätze für die Dissoziations-Versuche. Das Gesamtvolumen je Ansatz betrug 22600 µl wurde unter ständigem Rühren im Wasserbad inkubiert. Nach dem Vorinkubieren und dem Bestimmen der Gesamtbindung, wurde die Startlösung zugegeben. Die Homogenatsuspension wurde vor Zugabe zu den einzelnen Probegefäßen mittels eines Magnetrührers auf Eis in Suspension gehalten.

Nach Zugabe der wässrigen Membransuspension wurde der Reaktionsansatz während 30 min unter ständigem Rühren (Janke & Kunkel ES5, Staufen, D, Stufe 3) bei 37°C (Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer) bzw. 23°C (Na, K, P_i-Puffer) vorinkubiert, so dass eine Gleichgewichtseinstellung zwischen Radioligand und Rezeptoren sowie Radioligand-Rezeptor-Komplexen möglich war.

Nach 30 Minuten Vorinkubation wurden jedem Ansatz dreimal 1 ml Suspension entnommen und wie unter 2.3.2.2 beschrieben filtriert und vermessen. Dies diente der Messung der Gesamtbindung im jeweiligen Versuchsansatz. Anschliessend wurde die Messung der Dissoziationskinetik gestartet, indem dem Ansatz 1,4 ml einer „Startlösung“ zupipettiert wurden. Letztere setzte sich zusammen aus 700 µl Atropinlösung ($3 \cdot 10^{-5}$ M) und 700 µl der zu untersuchenden Alloster-Konzentration. Nach Zugabe der Startlösung wurden zu genau festgelegten Zeitpunkten Proben à 1 ml gezogen und wie unter 2.3.2.2 beschrieben weiterbearbeitet. Die Zeitpunkte des Probenziehens waren zuvor so festgelegt worden, dass die Radioligand-Rezeptor-Dissoziation unter Kontrollbedingungen anhand der ermittelten Aktivitäten gut beschrieben werden konnte.

Die Volumen- und die damit verbundene Konzentrationsveränderung gegenüber den später entnommenen Proben, die durch das Bestimmen der Gesamtbindung und die Zugabe der "Startlösung" auftrat, wurde durch Multiplizieren der Werte der Gesamtbindung mit dem Faktor 0,94 berücksichtigt. Aus den so ermittelten Werten konnten die Konzentrations-Wirkungs-Kurven wie unter 2.3.4.1 beschrieben errechnet werden.

2.3.4.3 Dissoziationsexperimente mit Homogenaten aus CHO-Zellen, die bestimmte Muskarinrezeptorsubtypen exprimieren

Ziel dieser Untersuchungen war es einerseits zu untersuchen, ob sich die Affinität beispielhafter allosterischer Testsubstanzen zu [³H]NMS besetzten M₂ Rezeptoren unterschiedlicher Provenienz (Hausschwein versus Human aus CHO-Zellen) unterscheidet.

Andererseits sollte die Affinität der exemplarisch eingesetzten Substanz W84-NPSi5N⁺NP zu den mit [³H]NMS besetzten M₁- bis M₅-Rezeptorsubtypen ermittelt werden. Genau wie bei den Untersuchungen unter Gleichgewichtsbedingungen wich auch hier die Methode von derjenigen ab, die mit Membransuspensionen aus Hausschweinerzventrikelgewebe angewandt wurde. Im folgenden wird zuerst die Dissoziationsmessung an den muskarinischen M₁- bis M₃- und M₅-Rezeptoren beschrieben, anschließend wird die für M₄-Rezeptoren leicht abgewandelte Methode beschrieben:

In Bohrungen der schon genannten 96-well-Mikrotiterplatten wurde je eine "Startlösung" von 20 µl vorgelegt. Diese bestand aus:

1. 10 µl wässrige Atropinlösung 3·10⁻⁵ M
2. 10 µl aqua dest. (Kontrolle) oder 10 µl Alloster-Verdünnungsreihe in Wasser

Zu zuvor klar definierten Zeitpunkten wurden zu diesen "Startlösungen" 300 µl einer im folgenden beschriebenen Rezeptor-Radioligand-Suspension zupipettiert:

- a. 20 µl wässrige [³H]NMS-Lösung (0,2 nM (M₂) bzw. 0,8 nM (M₁, M₃, M₄, M₅) Endkonzentration)
- b. 240 µl Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer (s. 2.4.4.1)
- c. 30 µl Homogenat (M₁, M₂, M₃, M₅) in Lagerungspuffer (s. 2.1.2.2) (M₄ s.u.)

Ein Vielfaches der Komponenten der oben beschriebenen Rezeptor-Radioligand-Suspension war zuvor in der angegebenen Reihenfolge in einem 50 ml PP-Röhrchen gemischt worden und bei 37°C im Wasserbad während mindestens 60 min (M₁, M₂, M₃) bzw. 180 min (M₅) vorinkubiert worden, um eine Sättigung der Rezeptoren mit [³H]NMS zu erreichen. Zwischen den einzelnen Zeitpunkten, zu denen 300 µl dieser Rezeptor-Radioligand-Suspension zur Atropin-Testsubstanz-Lösung in die Mikrotiterplatte zugegeben wurde, wurden sowohl das PP-Röhrchen mit der Rezeptor-Radioligand-Suspension, als auch die mit Parafilm abgedichtete 96-well-Mikrotiterplatte im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Zu den zuvor bestimmten Zeitpunkten wurden für jede Alloster-Konzentration und für die Kontrollwerte zwei Messpunkte erfasst. Der Dissoziationsverlauf unter jeder Konzentration wurde in Abhängigkeit von der Dissoziationskinetik des einzelnen Rezeptorsubtyps während ca. 120 min mittels acht Messpunkten beschrieben. Am Ende des Dissoziationsexperimentes wurden alle Proben gleichzeitig wie unter 2.3.2.2.2 beschrieben filtriert und der Messung der Rezeptor-gebundenen Aktivität zu-

gänglich gemacht. Die Auswertung der Daten erfolgte entsprechend den Experimenten mit Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikelgewebe.

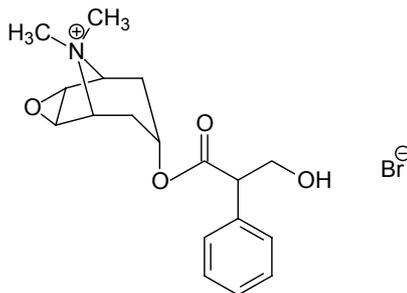
Da für den muskarinischen M_4 -Rezeptor beobachtet wurde, dass die allosterische Testsubstanz W84-NPSi5N⁺NP keine instantane Assoziation aufwies, wurde die allosterische Testsubstanz nicht in die Bohrungen der 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegt, sondern zur Rezeptor-Radioligand-Suspension zugegeben und mit dieser während 180 min vorinkubiert. Anschliessend wurde gleich verfahren wie mit den anderen Rezeptorsubtypen.

Entsprechend den Experimenten zur heterologen Interaktion wurde auch hier ein Verdünnungsfaktor von 32 im Gegensatz zu einem Faktor von 30 bei den Versuchen mit den Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikelgewebe in Kauf genommen.

2.4 Materialien

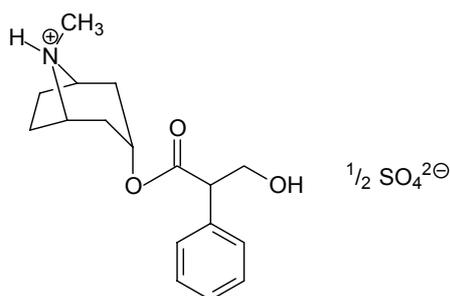
2.4.1 Muskarinrezeptor- Antagonisten

Als Antagonist an der orthosterischen Bindungsstelle wurde *N*-Methylscopolamin (NMS) als Bromid in der „kalten“, nicht radioaktiv markierten Form (Sigma, Deisenhofen, D, M = 398,3 g/mol) und in tritiiertem Form (NEN-Dupont, Homburg, D; spezifische Aktivität: 84,6; 82,0; 70 und 83,5 Ci/mmol) eingesetzt.



N-Methylscopolamin (NMS)

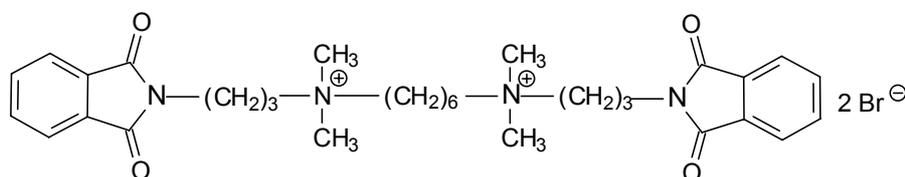
In den Bindungsuntersuchungen wurde zur Bestimmung der unspezifischen Bindung bzw. in den kinetischen Experimenten zur Verhinderung der Reassoziaton als kompetitiver Antagonist an der orthosterischen Bindungsstelle Atropin in Form des Di-Atropinsulfates eingesetzt (Sigma, Deisenhofen, D, M = 676,8 g/mol).



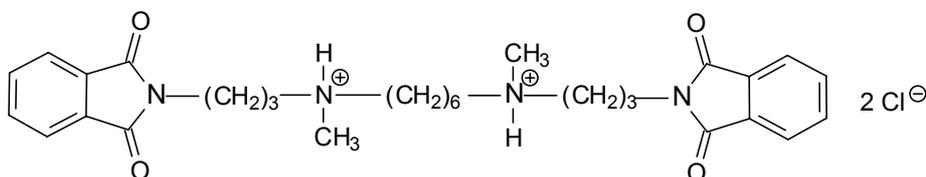
Atropin

2.4.2 Allosterische Modulatoren

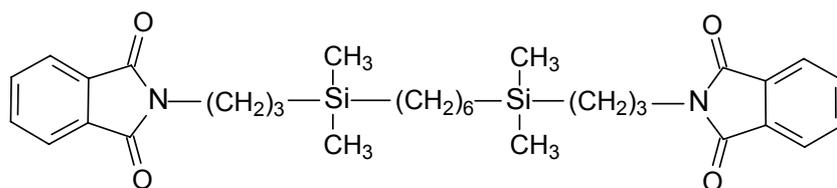
Die im Rahmen der Arbeit untersuchten allosterischen Modulatoren wurden von Herrn Dr. Pfeffer (W84; Pharmakologisches Institut der Universität Kiel) und in den Arbeitsgruppen von Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe (tertiäres W84; Pharmazeutisches Institut der Universität Würzburg) sowie Herrn Prof. Dr. R. Tacke (Si-substituierte W84-Derivate; Institut für Anorganische Chemie der Universität Würzburg) synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.



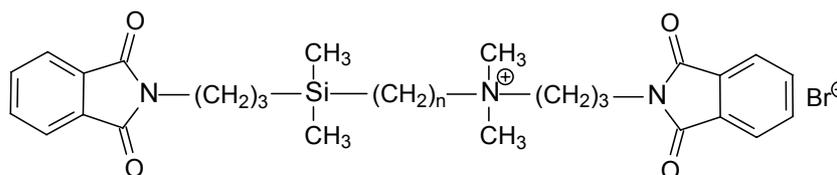
W84, $M = 708,5 \text{ g/mol}$, synthetisiert von Dr. J. Pfeffer nach der Vorschrift von Wassermann (1970)



W84t, $M = 591,58 \text{ g/mol}$, synthetisiert von I. Schwesig (Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe, Pharmazeutisches Institut der Universität Würzburg)



W84-Si₂/6, M = 576,89 g/mol

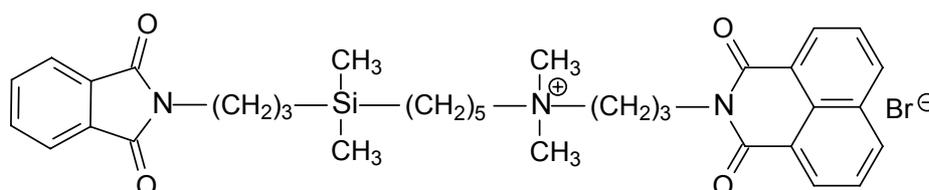


W84-Si₁/n

In der folgenden Tabelle (Tab. 8) werden ausgehend von der oben abgebildeten Strukturformel die einzelnen Substanzen, die sich in der Anzahl CH₂-Gruppen in der Zwischenkette unterscheiden, aufgeführt [47, 69].

Anzahl CH ₂ -Gruppen (n) in der Zwischenkette	Bezeichnung	Molare Masse (g/mol)
4	W84-Si ₁ /4	614,65
5	W84-Si ₁ /5	628,68
6	W84-Si ₁ /6	642,71
7	W84-Si ₁ /7	656,73
8	W84-Si ₁ /8	670,76

Tab. 8: Auflistung der untersuchten Silicium-haltigen W84-Derivate, die sich durch eine unterschiedliche Länge der Zwischenkette unterscheiden.



W84-PSi₅N⁺NP, M=678,74 g/mol

Erläuterung zur Nomenklatur:

Die Nomenklatur beschreibt die abgebildete Strukturformel von links nach rechts

"W84": Es handelt sich bei dieser Verbindung um ein W84-Derivat

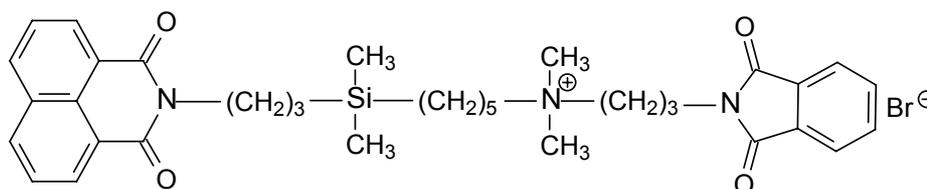
"P": Phthalimid-Substituent

"Si": Silicium - Atom, das den einen quartären Stickstoff des W84 ersetzt

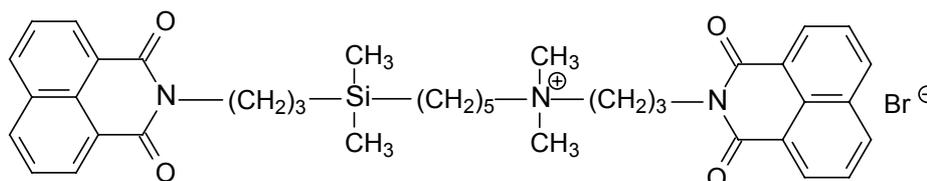
"5": Anzahl der CH₂-Gruppen der Zwischenkette

"N⁺": noch vorhandener quartärer Stickstoff des W84

"NP": Naphthalimid-Substituent



W84-NPSi5N⁺P, M=678,74 g/mol (Nomenklatur s. o.)



W84-NPSi5N⁺NP, M=728,80 g/mol (Nomenklatur s. o.)

Sämtliche Si-substituierten W84-Derivate wurden von Herrn J. Daiß (Arbeitskreis Prof. Dr. R. Tacke, Institut für Anorganische Chemie der Universität Würzburg) synthetisiert.

2.4.3 Reagenzien

Aqua pro analysi, CaCl₂, CuSO₄·5H₂O, Folin Ciocalteus Phenolreagens, K₂HPO₄, KH₂PO₄, KCl, MgCl₂, NaH₂PO₄, NaHCO₃, Na₂HPO₄, Na₂CO₃, NaCl, NaK-Tartrat, o-Phosphorsäure 85%, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) und Glucose·H₂O wurden von der Firma Merck, Darmstadt, D, bezogen; Albumin Human (HSA), Fraction V, 96-99% Albumin, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Kälberserum (FKS, Bestnr. F-7524), L-Glutamin (Bestnr. G-7513), Polyethylenimin-Lösung (PEI), (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]) (HEPES), (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]) Natrium Salz, fetales Nutrient

mixture F12 Ham (Bestnr. N-4888), Penicillin/Streptomycin (Bestnr. P-0781), Sigmacote[®], Trypsin/EDTA-Lösung (Bestnr. T-3924) wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D, geliefert; Natriumbutyrat von Acros Organics, Geel, B; Geneticindisulfat (G418, Bestnr. 345810) von Calbiochem, La Jolla, USA; $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ und Dimethylsulfoxid von Fluka, Buchs, CH und HCl, NaOH und EDTA-di Na-Lösung 0,1 M von der Firma Grüssing GmbH, Filsum, D.

2.4.4 Pufferlösungen

Für die Bindungsstudien wurden entweder ein Mg, Tris, Cl, P_i -Puffer oder ein Na, K, P_i -Puffer eingesetzt, die im folgenden beschrieben werden.

2.4.4.1 Mg, Tris, Cl, P_i -Puffer

Dieser Puffer wurde sowohl für die Bindungsversuche mit Membranen, die aus Schweineherzventrikelgewebe gewonnen worden waren, als auch für die Bindungsversuche mit den Membranpräparationen aus CHO-Zellen eingesetzt. Er setzte sich aus $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ und Tris zusammen. Die Endkonzentrationen im Versuchsansatz betragen 3 mM für MgHPO_4 und 50 mM für Tris. Der pH-Wert wurde nach Lösen der einzelnen Komponenten in Wasser durch die Zugabe von 1N-HCl auf 7,3 eingestellt (pH-Meter: pH523, MTW, Weilheim, D). Die Versuche mit diesem Puffer wurden immer bei einer Temperatur von 37°C inkubiert.

2.4.4.2 Na, K, P_i -Puffer

Der Na, K, P_i -Puffer setzte sich aus Na_2HPO_4 und KH_2PO_4 zusammen. Er wurde für einige Bindungsversuche mit Membranen aus Schweineherzventrikelgewebe eingesetzt. Im jeweiligen Versuch betrug die Endkonzentrationen 4 mM Na_2HPO_4 und 1 mM KH_2PO_4 . Der pH-Wert wurde mit 1N- H_3PO_4 auf 7,4 eingestellt. Die Inkubationstemperatur mit diesem Puffer wurde immer bei 23°C gehalten.

2.4.4.3 Phosphatpuffer (PBS , Phosphate buffered saline)

Im Rahmen der Zellvereinzlung wurde ein von bivalenten Kationen freier Phosphatpuffer eingesetzt, um den Zellrasen vor der Zugabe der Trypsin-EDTA-Lösung einmal zu

spülen. In der folgenden Tabelle ist die Zusammensetzung dieses Puffers aufgeführt. Unter Zugabe von 1N-HCl oder 0,1N-NaOH wurde der pH-Wert auf 7,3 eingestellt, anschließend wurde der Puffer bei 121°C während 20 Minuten autoklaviert.

Salz	Menge [g/l]	Endkonzentration [mM]
NaCl	8,0	137,0
KCl	0,2	2,7
Na ₂ HPO ₄	1,15	8,1
KH ₂ PO ₄	0,2	1,4

Tab. 9: Einwaagen für den in der Zellkultur eingesetzten Phosphatpuffer.

2.4.4.4 HEPES-Puffer (*N*-[2-Hydroxyethyl]piperazin-*N'*-[2-ethansulfonsäure])

Zur Membranpräparation von CHO-Zellen und zur Lagerung der Membransuspensionen wurde ein HEPES Puffer 200 mM eingesetzt. Dieser bestand aus 17,353 g/l HEPES-Base und 31,773 g/l HEPES-Säure, der pH-Wert wurde mittels NaOH und HCl auf 7,4 eingestellt. Je nach Bedarf wurde dieser Puffer verdünnt.

2.4.5 Nährmedium

Zur Kultivierung der CHO-Zellen wurde ein Nährmedium verwendet, dessen Zusammensetzung in der folgenden Tabelle aufgeführt ist. Das fertig gemischte Nährmedium ist zum sofortigen Verbrauch bestimmt.

Komponente	Volumen [ml]	Endkonzentration
Nutrient mixture F-12 Ham	500	
fetales Kälberserum (FKS)	50	ca. 10%
Penicillin/Streptomycin	5	ca. 100 Einheiten/ml
L-Glutamin	2,5	ca. 1 mM
Geneticinsulfat (G418)	1	0,2 mg/ml

Tab. 10: Zusammensetzung des für die Züchtung der CHO-Zellen eingesetzten Nährmediums. Die einzelnen Komponenten wurden der Nutrient mixture F-12 Ham unter aseptischen Bedingungen zugefügt. Lagerung des fertig gemischten Nährmediums zum sofortigen Verbrauch bei 4-8°C im Kühlschrank.

2.5 Eingesetzte Computerprogramme

Die Auswertung der Gleichgewichtsbindungs- und der Dissoziationsexperimente, die graphische Darstellung der Ergebnisse, sowie die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels computergestützten Analyse- und Darstellungsverfahren. Dazu wurden folgende Programme, bezogen von der Firma GraphPad Software, Inc., (San Diego, USA) eingesetzt:

GraphPad Prism 2.0/3.0/3.02

GraphPad InStat 3.0

Zur Simultananalyse der heterologen Interaktions-Versuche wurde SigmaPlot 4.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) eingesetzt.

Die Proteinbestimmung erfolgte unter Einsatz von Microsoft Excel 97 (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Die chemischen Strukturformeln wurden mit Hilfe folgender Software gezeichnet:

ChemWin3, Version 3.0.2 (Soft Shell, Grand Junction, USA).

2.6 Statistik

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende statistische Parameter eingesetzt, die hier kurz erklärt werden sollen:

Arithmetisches Mittel \bar{x} :

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Gleichung 18

x_i : gemessener Wert

n : Anzahl der Messwerte

Standardabweichung SD:

Die Standardabweichung stellt ein Mittel dar, die Streuung eines Werte-Kollektives zu quantifizieren. Sie berechnet sich aus der Quadratwurzel der Varianz s^2 .

$$SD = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Gleichung 19}$$

Standardfehler des Mittelwertes SEM:

Der Standardfehler des Mittelwertes ist ein Mass für die Präzision des Mittelwertes der Messungen [70], wobei die Berechnung des Standardfehlers erst ab mindestens drei Messpunkten sinnvoll erscheint:

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad \text{Gleichung 20}$$

F-Test

Mittels F-Test wird überprüft, ob die Varianzen zweier Stichproben oder zweier analytischer Verfahren identisch sind oder sich signifikant unterscheiden [71]. In dieser Arbeit werden beispielsweise Konzentrations-Wirkungs-Kurven, die sich bezüglich einer zusätzlichen Variablen (z. B. variable Hill-Steigung) unterscheiden, im Hinblick auf die jeweiligen Fehlerquadrate mittels F-Test verglichen:

$$F = \frac{\frac{SS_a - SS_b}{df_a - df_b}}{\frac{SS_b}{df_b}} \quad \text{Gleichung 21}$$

ss_a : Summe der Fehlerquadrate unter Einsatz der einfacheren Gleichung a

ss_b : Summe der Fehlerquadrate unter Einsatz der Gleichung b, die eine Variable mehr aufweist

df_a : Anzahl Freiheitsgrade von Gleichung a

df_b : Anzahl Freiheitsgrade von Gleichung b

Liegt der errechnete F-Wert oberhalb eines tabellierten Wertes oder ist er mit diesem identisch, so ist diejenige Kurvenanpassung signifikant besser, die eine Variable mehr aufweist.

t-Test

Zum Vergleich von Mittelwerten unterschiedlicher Messreihen a und b wurde ein zweiseitiger ungepaarter t-Test eingesetzt, wobei die Voraussetzung gewährleistet sein muss, dass sich die Standardabweichungen SD der zwei Messreihen nicht signifikant unterscheiden und die Messwerte einer Normalverteilung nach Gauss unterliegen. Der t-Test beantwortet die Frage nach der Wahrscheinlichkeit, mit der sich die Mittelwerte verschiedener Messreihen unterscheiden.

$$t_b = \frac{\bar{X}_a - \bar{X}_b}{\sqrt{\text{SE der Differenz}}} \quad \text{Gleichung 22}$$

wobei gilt:

Wenn die zu vergleichenden Messreihen a und b die gleiche Anzahl Messungen aufweisen, gilt für den Standardfehler der Differenz:

$$\text{Standardfehler der Differenz} = \sqrt{\text{SEM}_a^2 + \text{SEM}_b^2}$$

Sind die zu vergleichenden Messreihen unterschiedlich gross, dann gilt für den Standardfehler der Differenz:

$$\text{Standardfehler der Differenz} = \sqrt{\frac{(n_a - 1) \cdot \text{SD}_a^2 + (n_b - 1) \cdot \text{SD}_b^2}{n_a + n_b - 2}} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_a} + \frac{1}{n_b}}$$

Basierend auf dem berechneten t_b -Wert kann nun mittels Tabellen oder computergestützt ein p-Wert bestimmt werden, der die Wahrscheinlichkeit angibt, mit der sich Mittelwerte zweier Messreihen signifikant unterscheiden.

Falls die Voraussetzung zur Durchführung eines t-Testes, dass sich die Standardabweichungen SD von zwei zu vergleichenden Werten nicht signifikant unterscheiden dürfen, nicht erfüllt war, wurde ein nach Welch modifizierter t-Test durchgeführt.

Bei Signifikanztests wurde für die gesamte Arbeit ein Signifikanzniveau von $p = 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Homologe Konkurrenz mit dem Radioliganden [³H]NMS zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der eingesetzten Membransuspensionen

Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der in dieser Arbeit eingesetzten Homogenate aus Hausschweinherzventrikelgewebe und CHO-Zellen (M₁ bis M₅) wurden homologe Konkurrenzexperimente durchgeführt (2.3.2.2). Mit diesen konnte der Affinitätsparameter pK_D der Bindung des Radioliganden [³H]NMS an die muskarinischen Rezeptoren bestimmt werden. Zusätzlich wurde mit diesen Experimenten die Gesamtzahl der vorhandenen Bindungsstellen (B_{max}) für den muskarinischen Antagonisten [³H]NMS bestimmt. Die Konkurrenzversuche wurden für die Homogenate aus Hausschweinherzventrikelgewebe sowohl in Mg, Tris, Cl, P_i- als auch in Na, K, P_i-Puffer durchgeführt (2.3.2.2.1). Für die Homogenate aus CHO-Zellen wurde ein leicht abgewandeltes Protokoll eingesetzt (2.3.2.2.2), diese Untersuchungen wurden nur in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer durchgeführt. Die Analyse sämtlicher Versuche erfolgte wie unter 2.3.2.1 beschrieben. Im folgenden (Abb. 4) ist exemplarisch das Ergebnis eines homologen Konkurrenzexperimentes mit einem Homogenat aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein dargestellt.

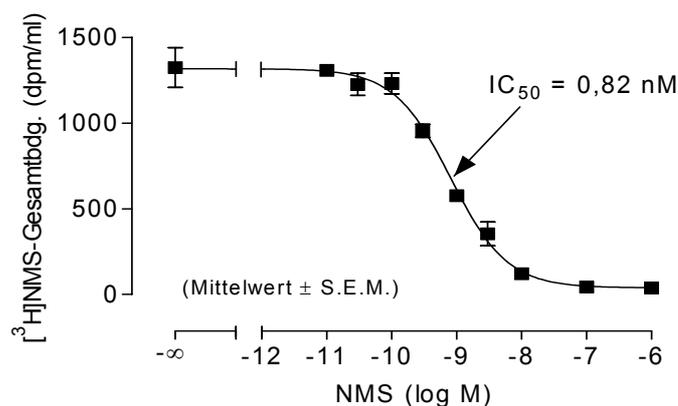


Abb. 4: Repräsentatives Experiment einer homologen Konkurrenz zwischen [³H]NMS (0,2 nM) und steigenden Konzentrationen von nicht markiertem NMS. Ordinate: [³H]NMS-Gesamtbindung in dpm/ml, Abszisse: NMS-Konzentration (log M). Der Ansatz wurde bei 37°C in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer für 2 Stunden im Schüttelwasserbad inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (Dreifachbestimmung). Der Hill-Koeffizient (n_H) ist auf -1 konstant gesetzt. Näheres im Text.

Bei einer Verdünnung des Homogenates mit aqua dest. um den Faktor zwei ergab sich ein oberes Plateau von 1317 dpm/ml. Das untere Plateau, das nicht signifikant von der unspezifischen Bindung abwich (54 dpm/ml, in Gegenwart von 1 μ M Atropin), lag bei einem Wert von 38 dpm/ml. Es resultierte ein IC_{50} -Wert von 0,82 nM. Der daraus berechnete K_D -Wert beträgt 0,62 nM. Der B_{max} -Wert von 88,9 fmol/mg_{Protein} errechnete sich nach DeBlasi [56], wobei die Proteinkonzentration des entsprechenden Homogenates (3,95 mg/ml) und die Verdünnung des Homogenates im Versuchsansatz berücksichtigt wurden. Die nichtlineare Regressionsanalyse ergab keine signifikant bessere Kurvenanpassung für einen frei belassenen Hill-Koeffizienten (F-Test, $p > 0,05$), daher wurde das Steigungsmass auf den Wert von $n_H = -1$ festgelegt.

Die folgende Abbildung (Abb. 5) zeigt die nach Scatchard [57] linearisierte Auftragung von dem selben Experiment (Abb. 4). Diese stellt eine weitere Möglichkeit dar, die K_D - und B_{max} -Werte eines Homogenates zu ermitteln.

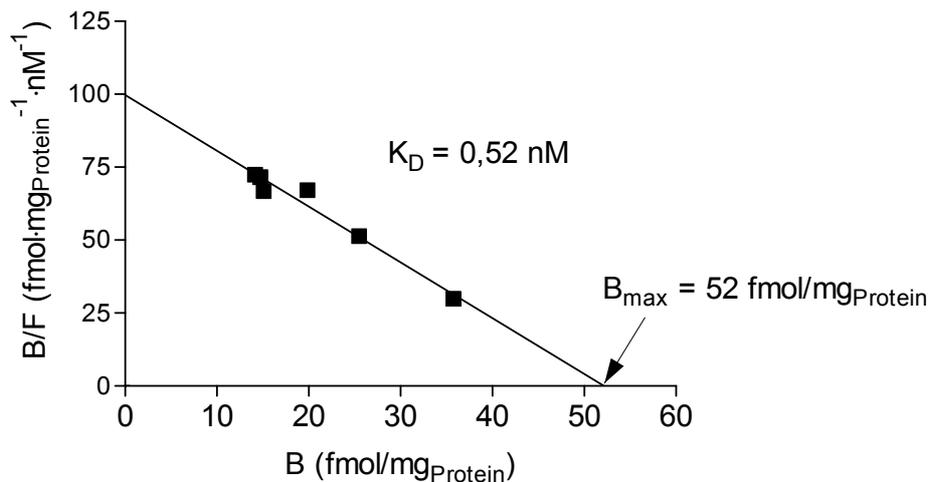


Abb. 5: Nach Scatchard linearisierte Auftragung der Messwerte eines homologen Konkurrenzexperimentes. Ordinate: Quotient der Konzentration des spezifisch gebundenen Liganden B (fmol/mg_{Protein}) und des ungebundenen Liganden F (nM), Abszisse: Konzentration des spezifisch gebundenen Liganden B (fmol/mg_{Protein}). Der Darstellung liegt der gleiche Versuch zugrunde wie in Abb. 4 gezeigt.

Durch die nach Scatchard [57] ermittelten Punkte konnte eine Regressionsgerade mit der Steigung -1,9 gelegt werden. Der negative Kehrwert der Steigung entspricht dem K_D -Wert, dieser beträgt für dieses Experiment 0,52 nM. Aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse ergibt sich ein B_{max} -Wert von 52 fmol/mg_{Protein}. Die Messwerte bei einer NMS-Konzentration von 0,01, 0,1 und 1 μ M wurden nicht in die Auswertung nach Scatchard miteinbezogen, da sie im Bereich der unspezifischen Bindung lagen. Die Messwerte der

NMS-Konzentration von 0,003 μM wurden ebenfalls nicht berücksichtigt, da sie wegen der grösseren Streuung der Einzelwerte nach der Linearisierung deutlich ausserhalb des Koordinatensystems lagen.

In den folgenden Tabellen (Tab. 11 und Tab. 12) werden die Ergebnisse der homologen Konkurrenzexperimente für jedes Homogenat, das im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde, zusammengefasst. Die erste Tabelle umfasst die Ergebnisse der Charakterisierungen der Homogenate aus Hausschweinherzventrikelgewebe, die zweite diejenigen der Homogenate aus CHO-Zellen.

Haus- schwein- herzventri- kelhomo- genat vom	Puffer	pK_D		B_{\max} (fmol/mg _{Protein})		Anzahl Ver- suche
		nach DeBlasi	nach Scatchard	nach DeBlasi	nach Scatchard	
26.11.98	Mg, Tris, Cl, P _i	9,18 $\pm 0,06$	9,18 $\pm 0,06$	83 ± 3	84 ± 3	5
20.01.99		9,45 $\pm 0,02$	9,36 $\pm 0,08$	56 ± 16	58 ± 15	2
09.05.00		9,40 $\pm 0,05$	9,47 $\pm 0,08$	121 ± 27	111 ± 27	2
22.01.01		9,46 $\pm 0,06$	9,32 $\pm 0,09$	100 ± 21	132 ± 16	3
29.11.01		9,36 $\pm 0,11$	9,27 $\pm 0,10$	129 ± 12	147 ± 13	2
Mittelwert	Mg, Tris, Cl, P _i	9,37 $\pm 0,05$	9,32 $\pm 0,05^{\text{n.s.}}$	98 ± 30	106 $\pm 36^{\text{n.s.}}$	
20.01.99	Na, K, P _i	9,99 $\pm 0,14$	9,78 $\pm 0,03$	115 ± 3	117 ± 9	2
10.08.99		9,99 $\pm 0,07$	9,74 $\pm 0,29$	95 ± 1	134 ± 13	2
09.05.00		10,44 $\pm 0,48$	9,96 $\pm 0,01$	165 ± 38	163 ± 42	2
Mittelwert	Na, K, P _i	10,14 $\pm 0,15^*$	9,83 $\pm 0,07^{\text{n.s.}}$	125 $\pm 36^{\text{a}}$	138 $\pm 23^{\text{n.s.}}$	

Tab. 11: Zusammenfassung der Ergebnisse der homologen Konkurrenzexperimente, die mit sämtlichen im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Homogenaten aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein durchgeführt worden sind. Die Daten sind getrennt nach eingesetztem Puffersystem aufgeführt. Die Analyse der ermittelten Daten erfolgte sowohl nach DeBlasi [56], als auch nach Scatchard [57], wobei die Daten aus der Analyse nach DeBlasi für die Durchführung und Auswertung der weiteren Experimente berücksichtigt wurden. Zusätzlich sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der pK_D - und B_{\max} -Werte aller Homogenate aus 2-5 unabhängigen Experimenten für das jeweilige Puffersystem aufgeführt. (Die Mittelwertbildung aus 2 Experimenten ist statistisch nicht sinnvoll, wurde hier aber der Übersichtlichkeit halber dennoch durchgeführt.)

^{n.s.}: Die Mittelwerte der pK_D - und B_{\max} -Werte der untersuchten Homogenate nach Scatchard unter-

schieden sich nicht signifikant von jenen nach DeBlasi ($p > 0,05$).

- *: Es besteht ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den pK_D -Werten die in den unterschiedlichen Puffermedien ermittelt worden sind ($p < 0,05$).
- ^a: Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den B_{max} -Werten, die in den unterschiedlichen Puffermedien ermittelt worden sind ($p > 0,05$).

Homogenat	pK_D		B_{max} (fmol/mg _{Protein})		Anzahl der Versuche
	nach DeBlasi ^b	nach Scatchard	nach DeBlasi	nach Scatchard	
CHO M ₁	9,20 ± 0,03	9,15 ± 0,08 ^{n.s.}	1060 ± 167	1186 ± 287	3
CHO M ₂	9,10 ± 0,08	n.b.	1357 ± 263	n.b.	1-5 ^a
CHO M ₃	9,19 ± 0,08	9,20 ± 0,06 ^{n.s.}	2986 ± 733	2901 ± 734	3
CHO M ₄	9,34 ± 0,15	9,35 ± 0,13 ^{n.s.}	1997 ± 401	2191 ± 352	3
CHO M ₅	8,96 ± 0,02*	9,01 ± 0,04 ^{n.s.}	661 ± 35	591 ± 27	3

Tab. 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der homologen Konkurrenzexperimente, die mit CHO-Zellhomogenaten in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer durchgeführt worden sind. Dargestellt werden für jeden muskarinischen Rezeptorsubtyp die pK_D - und B_{max} -Werte, wobei die Werte einerseits nach DeBlasi [56] berechnet und andererseits nach der Linearisierung gemäss Scatchard [57] grafisch ermittelt wurden. Die nach DeBlasi ermittelten Daten wurden für die weiterführenden Untersuchungen und Auswertungen verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler.

- ^a: Von zwei Homogenaten, die aus CHO-M₂-Zellen gewonnen worden waren, waren die Charakterisierungsparameter in 4 bzw. 5 unabhängigen Versuchen bestimmt worden, da sich die pK_D -Werte für diese Homogenate nicht signifikant voneinander unterschieden ($p > 0,05$), wurde im folgenden für jedes Homogenat nur noch ein homologes Konkurrenzexperiment durchgeführt.
- ^b: Sofern nicht anders geschrieben unterscheiden sich die pK_D -Werte der einzelnen muskarinischen Rezeptor-Subtypen nicht statistisch signifikant voneinander ($p > 0,05$).
- ^{n.s.}: Die nach DeBlasi und Scatchard ermittelten Parameter für die einzelnen Homogenate unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$).
- *: Der pK_D -Wert der untersuchten M₅-Rezeptoren unterschied sich unter den gewählten Versuchsbedingungen statistisch signifikant von den pK_D -Werten der M₁- und M₃-Rezeptoren ($p < 0,05$).
- n.b.: Diese Parameter wurden nicht graphisch bestimmt.

Tab. 11 und Tab. 12 enthalten die nach DeBlasi [57] und Scatchard [56] ermittelten Daten für die pK_D - und B_{max} -Werte, wobei sich bei keinem Homogenat ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Bestimmungsmethoden ergab.

Insgesamt 4 Homogenate aus CHO-M₂-Zellen wurden für weiterführende Studien eingesetzt, für zwei dieser Homogenate wurden 4 bzw. 5 unabhängige homologe Konkurrenzexperimente durchgeführt und nach DeBlasi analysiert. Ein statistischer Vergleich der Mittelwerte der pK_D-Werte ergab zwischen diesen keinen signifikanten Unterschied, so dass für die im folgenden eingesetzten Homogenate jeweils nur noch ein homologes Konkurrenzexperiment durchgeführt wurde, um zu überprüfen, ob der pK_D-Wert dieses neuen Homogenates sich von dem pK_D-Wert vorher geprüfter Homogenate unterschied. Von den restlichen muskarinischen Rezeptorsubtypen (M₁, M₃ bis M₅) wurde nur je ein Homogenat für weitere Untersuchungen eingesetzt, mit diesem wurden je drei homologe Konkurrenzexperimente durchgeführt.

Der statistische Vergleich der pK_D-Werte der Homogenate aus Schweineherzventrikulgewebe, die in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer erhoben worden sind, mit demjenigen der CHO-M₂-Homogenate ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den Affinitäten von [³H]NMS ($p < 0,05$) (s. *Diskussion*).

3.2 Charakterisierung der Interaktionen von W84-artigen allosterischen Modulatoren mit muskarinischen Rezeptoren mittels dem orthosterischen Antagonisten [³H]NMS

Die Affinität allosterischer Testsubstanzen zum mit Orthoster besetzten muskarinischen Rezeptoren wurde mittels Dissoziationsexperimenten bestimmt. Diese ermöglichen es, eine eindeutige Aussage darüber zu machen, ob eine Testsubstanz in allosterische Wechselwirkung mit einem Rezeptor-Ligand-Komplex tritt [22]. Dies ist im Falle einer im Gleichgewichtsbindungsexperiment beobachteten starken negativen Kooperativität sowie einer neutralen Kooperativität essentiell, um eine kompetitive bzw. eine nicht vorhandene Interaktion ausschliessen zu können.

Die Affinität sich nach dem ternären Modell allosterischer Interaktion verhaltender allosterischer Testsubstanzen zu nicht mit orthosterischem Ligand besetzten Rezeptoren (K_A) kann unter Einsatz heterologer Interaktionsexperimente bestimmt werden. Zusätzlich kann auf diese Weise die Kooperativität α zwischen (Radio-)Ligand - im Fall dieser Arbeit dem muskarinischen Antagonisten [³H]NMS - und den allosterischen Testsubstanzen, hier W84 und seinen Derivaten, bestimmt werden.

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Dissoziationsexperimente und der heterologen Interaktionsversuche, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt worden sind,

dargestellt. Sämtliche beschriebene Untersuchungen wurden, wenn nicht explizit erwähnt, mit Homogenaten aus Hausschweinherzventrikelgewebe durchgeführt.

3.2.1 W84 und das bis-tertiäre Derivat W84t

3.2.1.1 Vergleich der Dissoziationsuntersuchungen von W84 und W84t mit [³H]NMS

In Dissoziationsuntersuchungen in Mg, Tris, Cl, P_i- und Na, K, P_i-Puffer wurde die allosterische Potenz der Muttersubstanz W84 sowie des bis-tertiären Derivates W84t zur Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation und somit die Affinität zum mit [³H]NMS besetzten muskarinischen M₂-Rezeptoren aus Herzventrikelhomogenaten vom Hausschwein ermittelt. Dabei wurde die unter 2.3.4.2 aufgeführte Methode eingesetzt. Hierbei wird durch die Zugabe von 1 μM Atropin die Dissoziation von Rezeptor-Radioligand-Komplexen einer Messung zugänglich gemacht. In den hier beschriebenen Experimenten wurde der Dissoziationsverlauf über 2 Stunden beobachtet. Die folgende Abbildung (Abb. 6) zeigt beispielhaft den Effekt der angegebenen Konzentrationen von W84 auf den Zeitverlauf der [³H]NMS-Dissoziation.

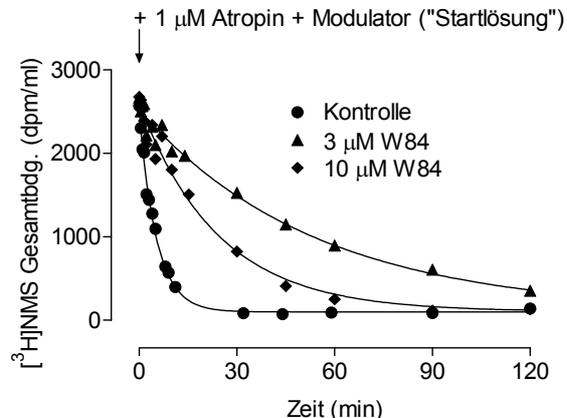


Abb. 6: Effekt der angegebenen W84 Konzentrationen auf den Zeitverlauf der [³H]NMS-Dissoziation in einem repräsentativen Experiment. Ordinate: [³H]NMS Gesamtbindung (dpm/ml), Abszisse: Zeitverlauf nach Zugabe der "Startlösung" in Minuten.

Ausgehend von den apparenten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} , die durch nichtlineare Regressionsanalyse aus den oben dargestellten Daten ermittelt werden, können Konzentrations-Wirkungs-Kurven generiert werden, indem die k_{-1} -Werte in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit allosterischer Testsubstanzen gegen die Konzentration des Modulators ($\log M$) aufgetragen werden ($t_{1/2, \text{Kontrolle}} = 2,6 \pm 0,09$ min, $n = 30$, Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer; $t_{1/2, \text{Kontrolle}} = 8,25 \pm 0,9$ min, $n = 12$, Na, K, P_i-Puffer).

Mittels computerunterstützter nichtlinearer Regressionsanalyse gemäss Gleichung 6 werden sigmoidale Konzentrations-Wirkungs-Kurven erhalten, auf Grund derer die Affinität der jeweiligen Testsubstanz zum Orthoster-besetzten Rezeptor ermittelt werden kann. Abb. 7 fasst die Ergebnisse dieser Untersuchungen für W84 und W84t zusammen.

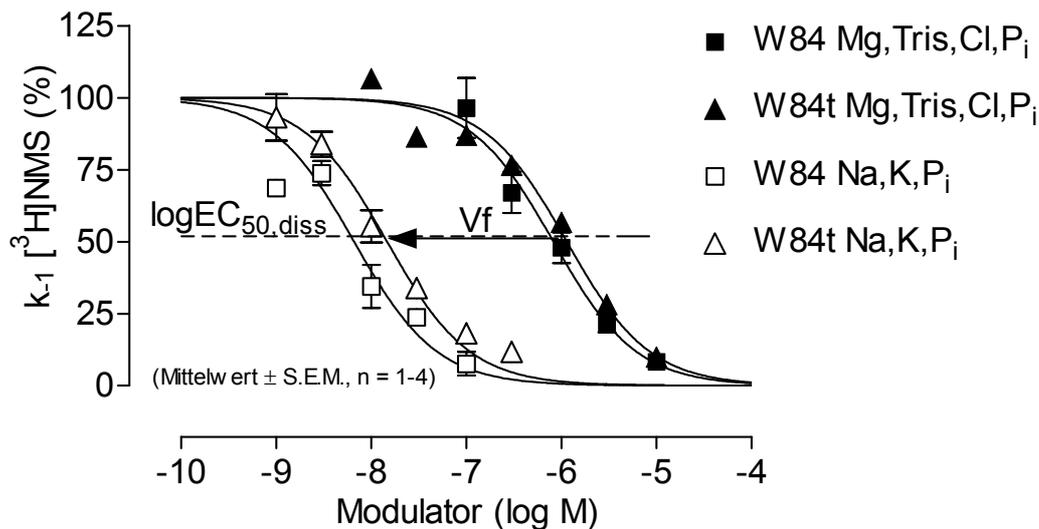


Abb. 7: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den Einfluss der allosterischen Modulatoren W84 und W84t auf die apparente Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation des muskarinischen Antagonisten $[^3\text{H}]\text{NMS}$ in Mg, Tris, Cl, P_i - und Na, K, P_i -Puffer. Ordinate: apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} in Prozent bezogen auf den Kontrollwert, Abszisse: Konzentration der eingesetzten allosterischen Modulatoren (log M). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 3-6 unabhängigen Experimenten, wobei die Datenpunkte 1-4-fach bestimmt worden sind. Die gebrochene Linie markiert die Lage der $\log\text{EC}_{50,\text{diss}}$ -Werte der Konzentrations-Wirkungs-Kurven, deren unteres Plateau sich in keinem Fall signifikant von 0% und deren Steigungsmass n_H sich auch nicht signifikant von -1 unterschied (F-Test, $p > 0,05$). Für die Kurvenanpassung wurde diese Steigung festgesetzt. Das obere Plateau wurde auf den Wert von 100% konstant gesetzt. Vf: Verschiebungsfaktoren der $\text{EC}_{50,\text{diss}}$ -Werte, die durch den Wechsel des Inkubationsmediums induziert wurden.

In der folgenden Tabelle (Tab. 13) sind die Kenndaten der Wirkung von W84 und W84t auf die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation zusammengefasst.

Modulator	Mg, Tris, Cl, P _i -Puffer		Anzahl Versuche	Na, K, P _i -Puffer		Anzahl Versuche	Verschiebungsfaktor (Vf)
	pEC _{50,diss}	Hill-Koeffizient n _H ^a		pEC _{50,diss}	Hill-Koeffizient n _H ^a		
W84	6,08 ± 0,07	-0,98 ± 0,16	6	8,16 ± 0,06	-1,01 ± 0,17	3	120
W84t	5,94 ± 0,04 ^{n.s.}	-0,90 ± 0,07	4	7,83 ± 0,05 [*]	-0,88 ± 0,09	3	78

Tab. 13: Zusammenfassung der Kenndaten der [³H]NMS-Dissoziationsexperimente unter der Einwirkung der allosterischen Modulatoren W84 und W84t in Abhängigkeit von den gewählten Puffermedien. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler.

^a: Die Hill-Koeffizienten der Konzentrations-Wirkungs-Kurven unterscheiden sich nicht signifikant von n_H = -1.

^{n.s.}: Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den pEC_{50,diss}-Werten von W84t und W84 in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer (p > 0,05).

^{*}: Statistisch signifikanter Unterschied zwischen den pEC_{50,diss}-Werten von W84t und W84 in Na, K, P_i-Puffer (p < 0,05).

Die pEC_{50,diss}-Werte von W84 und W84t unterscheiden sich in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer nicht voneinander. Die Wendepunkte der Konzentrations-Wirkungs-Kurven im hypoosmolarischen Na, K, P_i-Puffer sind statistisch signifikant verschieden voneinander. Dies könnte darauf hinweisen, dass die bis-tertiäre Substanz W84t eine etwas geringere Pufferabhängigkeit aufweist, als die Muttersubstanz W84. Die hier beschriebenen Ergebnisse stehen im Gegensatz zu früher erhobenen Daten [46], in denen für W84t in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer eine 6-fach höhere Affinität zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren beschrieben worden ist als für W84 (s. *Diskussion*).

3.2.1.2 Heterologe Interaktion: Übergang von negativer zu neutraler Kooperativität

Zur Ermittlung der Kooperativität α zwischen dem Prototyp-Modulator W84 bzw. seinem tertiären Derivat W84t und [³H]NMS an muskarinischen M₂-Rezeptoren und zur Quantifizierung der Affinität K_A dieser Substanzen zum Orthoster-freien Rezeptor wurden steigende Konzentrationen an allosterischem Modulator zum Versuchansatz gegeben. Dieser enthielt eine konstante Konzentration des Radioliganden [³H]NMS (0,2 nM). Zusätzlich wurden die Gesamtbindung sowie die unspezifische Bindung, letztere durch Zugabe von Atropin 1 μ M, bestimmt. In der folgenden Abbildung (Abb. 8) wird das Ergebnis

der [^3H]NMS-Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen mit W84 und W84t in Mg, Tris, Cl, P_i -Puffer nach computergestützter nichtlinearer Regressionsanalyse gezeigt. Die Inkubationszeit bis zum Erreichen des Gleichgewichtes wurde nach Gleichung 14 bestimmt und auf 2 h festgelegt. Wenn in dieser Arbeit nicht anders beschrieben, wurden sämtliche heterologen Interaktionsexperimente bis zum Erreichen von Gleichgewichtsbedingungen inkubiert und anschliessend filtriert.

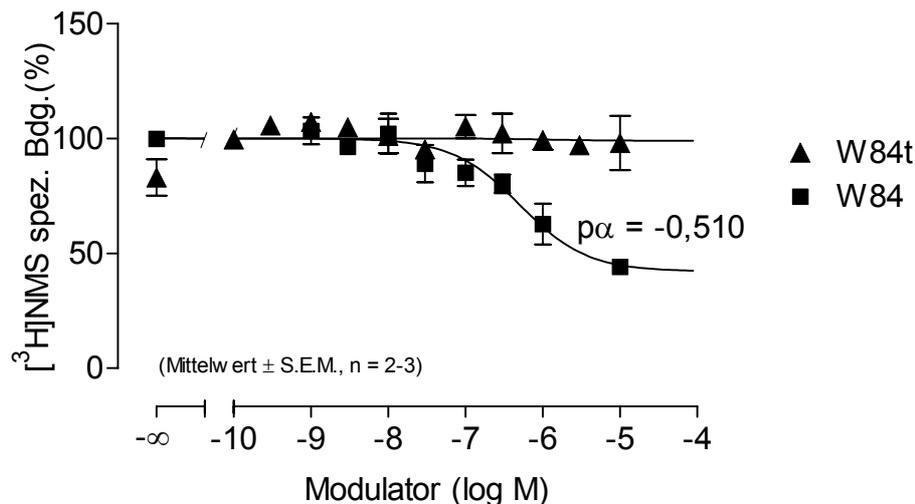


Abb. 8: Ergebnis der heterologen Interaktionsexperimente mit [^3H]NMS (0,2 nM) und steigenden Konzentrationen der allosterischen Modulatoren W84 und W84t. Ordinate: spezifische [^3H]NMS-Bindung (%), normalisiert auf B_0 (s. Gleichung 13), Abszisse: Konzentration der eingesetzten allosterischen Modulatoren (log M). Dargestellt sind die Mittelwerte sowie Standardfehler von 3 (W84) bzw. 2 (W84t) unabhängigen Versuchen, die jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt worden sind. Weitere Details im Text.

Die in den Experimenten erhaltenen Daten wurden in spezifische Bindung umgerechnet und bezogen auf den B_0 -Wert aus der Analyse der nicht normalisierten Daten gemäss Gleichung 13 normalisiert. Die Analyse der normalisierten Einzelversuche erfolgte nach Gleichung 13, wobei die Analyse der Daten von W84t mittels der modifizierten Gleichung (s. 2.3.3.1) vorgenommen wurde, da eine Analyse der Daten mittels Gleichung 13 auf Grund der neutralen Kooperativität nicht möglich war.

Zur Zusammenfassung der Einzelergebnisse wurden die Mittelwerte der jeweiligen Ergebnisse für $p\alpha$ und pK_A sowie der eingesetzten Radioligandkonzentration gebildet (s. Tab. 14). Ausgehend von diesen Mittelwerten wurde die jeweilige Konzentrations-Wirkungs-Kurve generiert (s. Abb. 8). Die normalisierten %-Werte der [^3H]NMS-Bindung der Einzelversuche wurden für jeden Versuch getrennt gemittelt. Die daraus resultierenden Mittelwerte wurden erneut unter Berechnung des Mittelwertes \pm Standardfehler

zusammengefasst. Letztere sind zusammen mit der generierten Kurve abgebildet. Sämtliche im weiteren Verlauf der Arbeit beschriebenen heterologen Interaktionsexperimente wurden auf diese Weise zusammengefasst.

Die Kooperativität zwischen W84 und [³H]NMS ist leicht negativ ($p\alpha = -0,510$), die Affinität zum freien Rezeptor liegt unter diesen Pufferbedingungen bei $pK_A = 6,43$. W84t verhält sich hingegen neutral kooperativ ($p\alpha = 0,007$; $\alpha = 1$), die Affinität zum Orthosterfreien Rezeptor $pK_A = 5,94$ sollte also jener zum Orthoster-besetzten Rezeptor entsprechen (s. 3.2.1.1). Analoge Untersuchungen wurden auch im unter 2.4.4.2 aufgeführten Na, K, P_i-Puffer durchgeführt und werden in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 14) gemeinsam mit den in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer erhobenen Daten zusammengefasst.

Modulator	Mg, Tris, Cl, P _i -Puffer			Na, K, P _i -Puffer		
	pK _A	pα	Anzahl Versuche	pK _A	pα	Anzahl Versuche
W84	6,43 ± 0,26	-0,510 ± 0,015	3	8,07 ± 0,44	-0,294 ± 0,025	2
W84t	5,94 ± 0,04 ^{n.s.}	0,007 ± 0,085*	2	7,83 ± 0,05 ^{n.s.}	0,010 ± 0,024*	5

Tab. 14: Aufstellung der Daten aus den heterologen Interaktionsexperimenten zwischen [³H]NMS und W84 sowie dem tertiären Derivat W84t in Abhängigkeit des Inkubationsmediums. Dargestellt sind die Mittelwerte ± S.E.M. der pK_A- und pα-Werte von 2-5 Experimenten. (Die Mittelwertbildung von nur zwei Experimenten ist aus statistischer Sicht wenig sinnvoll, wird hier der Übersichtlichkeit halber aber dennoch angewandt).

^{n.s.}: Diese Parameter unterscheiden sich nicht statistisch signifikant zwischen W84 und W84t ($p > 0,05$).

*: Diese Parameter unterscheiden sich statistisch signifikant zwischen W84 und W84t ($p < 0,05$).

3.2.2 Neuartige organometallische allosterische Modulatoren

Nachdem die Untersuchungen mit W84t ergeben hatten, dass der Verlust der permanenten positiven Ladungen verglichen mit W84 nicht zu deutlichen Veränderungen bezüglich der Affinität dieses Modulators zum M₂-Rezeptor geführt hatte und dass sich die Kooperativität von leicht negativer für W84 hin zu neutraler für W84t verschoben hatte, wurden zwei neue Substanzen eingesetzt, die auch unter physiologischen Bedingungen eine oder keine permanente positive Ladung aufweisen (W84t liegt unter physiologischen Bedingungen grösstenteils in protonierter Form vor [72]). In diesen sind ein oder

beide quartären Stickstoffe von W84 durch ein Siliciumatom ersetzt (W84-Si₁/6 bzw. W84-Si₂/6) [60].

3.2.2.1 Dissoziationsexperimente zur Bestimmung der Affinität von W84-Si₁/6 und W84-Si₂/6 zum [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptor

Der Einfluss der neuartigen W84-Derivate W84-Si₂/6 und W84-Si₁/6 auf das Bindungsverhalten von [³H]NMS wurde in Analogie zu W84 in Dissoziationsexperimenten und in Gleichgewichtsbindungsstudien untersucht. Die Beeinflussung der Dissoziationskinetik von [³H]NMS durch W84-Si₁/6 wurde sowohl in Mg, Tris, Cl, P_i- als auch in Na, K, P_i-Puffer überprüft. Der Einfluss von W84-Si₂/6 wurde ausschliesslich in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer untersucht.

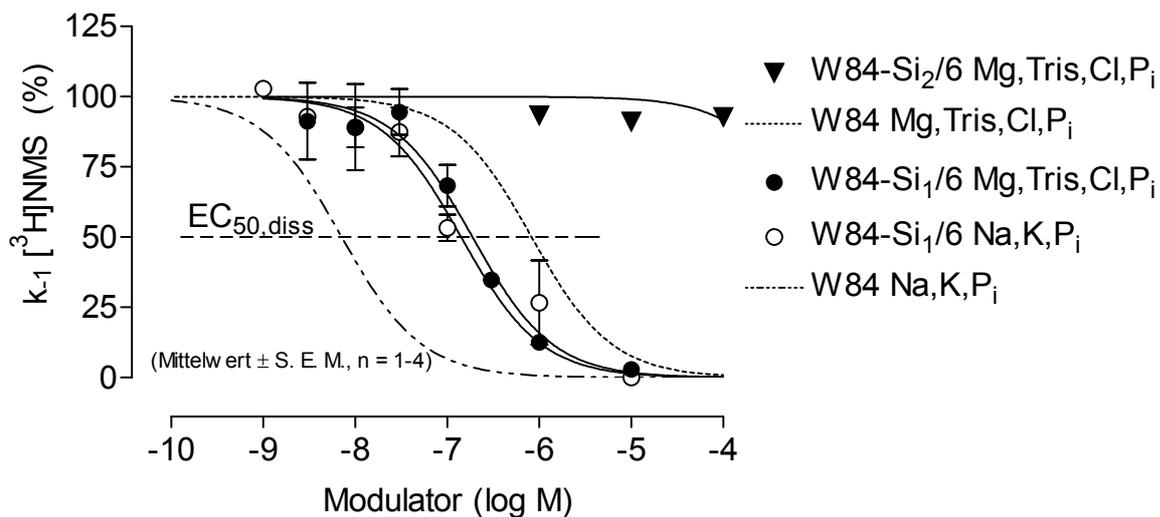


Abb. 9: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die allosterische Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation von M₂-Rezeptoren aus Herzventrikelhomogenaten vom Hausschwein in unterschiedlichen Puffermedien durch W84-Si₁/6 und W84-Si₂/6. Ordinate: apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} in Prozent bezogen auf den Kontrollwert, Abszisse: Konzentration der eingesetzten allosterischen Modulatoren (log M). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler von 1-4 unabhängigen Experimenten je Datenpunkt. Zusätzlich sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von W84 in Mg, Tris, Cl, P_i- und Na, K, P_i-Puffer als gepunktete Linien dargestellt. Die horizontale gebrochene Linie markiert die Lage der Wendepunkte der Konzentrations-Wirkungs-Kurven. Die Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven unterschied sich nicht signifikant von $n_H = -1$ und wurde auf diesen Wert festgesetzt. Das obere Plateau wurde auf einen Wert von 100% konstant gesetzt, das untere wurde auf 0% festgesetzt, da es sich nicht signifikant von 0% unterschied.

Das Ergebnis der Dissoziationsuntersuchungen von W84-Si₁/6 und W84-Si₂/6 mit dem Radioliganden [³H]NMS ist in der vorangehenden Abbildung (Abb. 9) zusammengestellt. Es wird deutlich, dass W84-Si₂/6 im Bereich der eingesetzten Konzentrationen zu keiner erkennbaren Dissoziationsverzögerung führt. Der allosterische Modulator W84-Si₁/6 zeigt bei den gewählten Bedingungen keine Pufferabhängigkeit bezüglich der Fähigkeit zur Verzögerung der Dissoziation von [³H]NMS. Die pEC_{50,diss}-Werte liegen bei 6,72 ± 0,09, n = 6 (Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer) und 6,85 ± 0,11, n = 4 (Na, K, P_i-Puffer). Der Unterschied zwischen diesen pEC_{50,diss}-Werten ist nicht statistisch signifikant, (p > 0,05). Im Gegensatz dazu konnte für W84 eine starke Pufferabhängigkeit beobachtet werden, was durch die abgebildeten gebrochenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven in der gleichen Abbildung verdeutlicht werden soll (s. Tab. 13, S. 51).

3.2.2.2 Umkehrung von negativer zu positiver Kooperativität durch einen N⁺/Si-Austausch

Der Einfluss der neuartigen allosterischen Modulatoren auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS wurde in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer untersucht. Die Inkubationszeit für diese heterologen Interaktionsexperimente für das Erreichen von Gleichgewichtsbedingungen betrug 3,5 Stunden. In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 10) ist das Ergebnis dieser Versuche dargestellt.

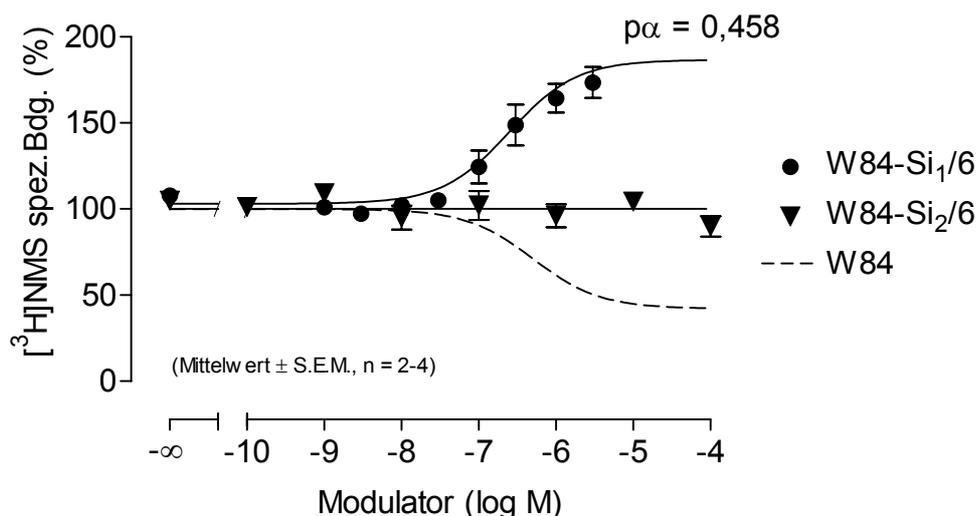


Abb. 10: Ergebnis aus Gleichgewichtsbindungsstudien der allosterischen Modulatoren W84-Si₁/6 und W84-Si₂/6 mit dem Radioliganden [³H]NMS (0,2 nM) in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer. Ordinate: spezifische Bindung von [³H]NMS normalisiert bezogen auf B₀ in Prozent, Abszisse: Konzentration der eingesetzten allosterischen Modulatoren (log M). Dargestellt ist die Zusammenfassung aus 4 (W84-Si₁/6) bzw. 2 (W84-

Si₂/6) unabhängigen Experimenten, die jeweils mit triplicierten Ansätzen durchgeführt worden sind. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. Die gebrochene Linie simuliert die Lage der entsprechenden Konzentrations-Wirkungs-Kurve von W84 (s. Abb. 8).

In die obige Abbildung (Abb. 10) ist zusätzlich die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der entsprechenden Untersuchungen mit W84 als gebrochene Linie integriert. Durch den asymmetrischen Austausch nur eines quartären Stickstoffes durch ein Si-Atom wurde eine Substanz mit starker positiver Kooperativität ($p\alpha = 0,458 \pm 0,075$, $n = 4$) erhalten, deren Affinität zum freien Rezeptor bei einem pK_A -Wert von $6,40 \pm 0,14$ liegt. Diese Substanz unterscheidet sich hinsichtlich ihrer Kooperativität mit [³H]NMS sehr deutlich von W84, ihre Affinität zum freien Rezeptor hingegen ist durch den N⁺/Si-Austausch offenbar nicht beeinflusst worden. Die pK_A -Werte von W84-Si₁/6 und W84 unterscheiden sich nicht signifikant. Der Austausch beider quartären Stickstoffe von W84 führt zu einer Substanz, die im heterologen Interaktionsversuch keinen Einfluss auf die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung ausübt. Basierend auf den Ergebnissen aus den Dissoziationsuntersuchungen ist daher anzunehmen, dass diese Substanz entweder nur in extrem hohen Konzentrationen oder gar nicht mit dem muskarinischen M₂-Rezeptor allosterisch interagiert. Da W84-Si₂/6 aber sehr schlecht wasserlöslich ist, können aus versuchstechnischen Gründen keine höheren Konzentrationen eingesetzt werden, um eine endgültige Aussage treffen zu können. Ein Ausfallen der Substanz unter den gewählten Versuchsbedingungen wurde nicht beobachtet.

3.2.3 Modifikation in der Länge der Zwischenkette ausgehend von W84-Si₁/6

Aus der Literatur [34, 73] ist bekannt, dass W84-Derivate mit unterschiedlich vielen CH₂-Gruppen zwischen den zwei quartären Stickstoffen sich bezüglich ihrer Affinität zu mit [³H]NMS besetzten Rezeptoren unterscheiden. Dabei zeigte das W84-Derivat mit einer Zwischenkette von 7 CH₂-Gruppen die höchste Affinität zum besetzten Rezeptor. In Analogie zu diesen Studien sollte nun in Dissoziationsversuchen und heterologen Interaktionsexperimenten die optimale Länge der Zwischenkette zwischen dem Si-Atom und dem quartären Stickstoff im Hinblick auf Dissoziations-Hemmvermögen und Kooperativität ermittelt werden. Dazu wurden verschiedene Substanzen, die 4 bis 8 CH₂-Gruppen zwischen dem Si-Atom und dem quartären Stickstoff aufwiesen, synthetisiert [60] und untersucht.

3.2.3.1 Dissoziationsexperimente mit Si-haltigen W84-Analoga mit unterschiedlichen Längen der Si/N⁺-Zwischenkette

Entsprechend den Untersuchungen mit der Ausgangssubstanz W84 und der neuen Leitsubstanz W84-Si₁/6 wurden auch die Si-haltigen W84-Analoga mit unterschiedlicher Länge der Zwischenkette in Dissoziationsexperimenten auf ihre allosterische Potenz zur Verzögerung der Dissoziation von Rezeptor-Ligand-Komplexen untersucht. Zur Abklärung der Lage der Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden zwei Konzentrationen (0,3 und 0,03 μ M) der allosterischen Modulatoren hinsichtlich ihrer Wirksamkeit im Dissoziationsexperiment untersucht. Dazu wurde der Dissoziationsverlauf über zwei Stunden beobachtet. Ausgehend von den daraus resultierenden Datenpunkten wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven berechnet, für welche das obere Plateau auf 100% und das untere auf 0% konstant gesetzt wurden. Diese Parameter wurden basierend auf den Ergebnissen der Untersuchungen mit W84 und W84-Si₁/6 als Konstanten eingesetzt. In Abb. 11 werden die Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus den Dissoziationsstudien mit den Zwischenketten-modifizierten allosterischen Modulatoren gezeigt.

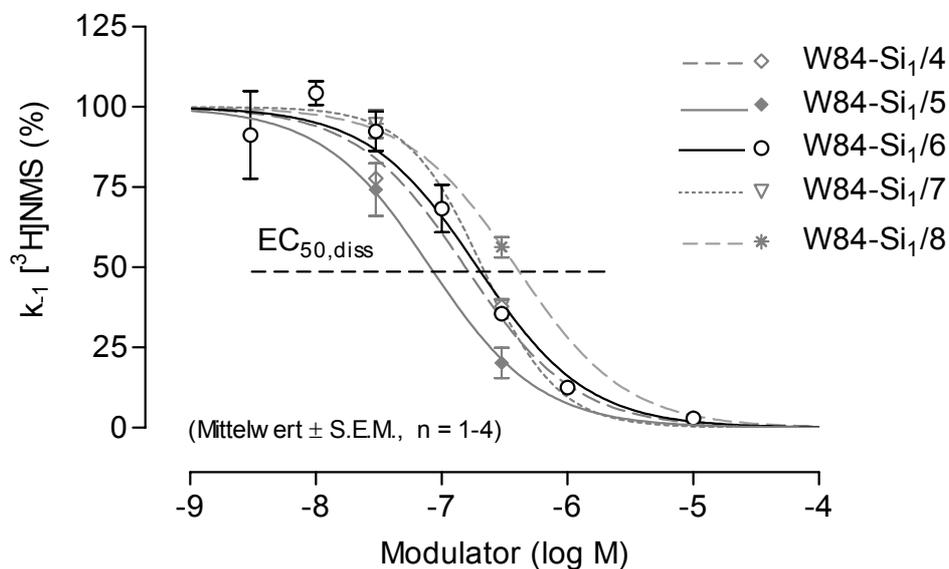


Abb. 11: Effekt der allosterischen Modulatoren auf die Dissoziationskinetik von [³H]NMS. Ordinate: apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} in Prozent des Kontrollwertes, Abszisse: Konzentration der Testsubstanzen (log M). Die Steigung dieser Konzentrations-Wirkungs-Kurven unterschied sich nur für die Substanz W84-Si₁/7 statistisch signifikant von $n_H = -1$ (F-Test, $p < 0,05$), für die anderen Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurde sie auf $n_H = -1$ festgesetzt. Die horizontale gebrochene Linie markiert die Lage der Wendepunkte. Die $EC_{50,diss}$ -Werte und Steigungsmasse werden in Tab. 15 (S. 59) angegeben. Je Datenpunkt wurden 1-4 unabhängige Versuche durchgeführt.

3.2.3.2 Heterologe Interaktionsversuche mit Si-haltigen W84-Derivaten mit unterschiedlicher Länge der Si-N⁺-Zwischenkette

Wie unter 2.3.3.1 beschrieben, wurde in heterologen Interaktionsuntersuchungen die Kooperativität zwischen den W84-Si₁/6-Derivaten mit verschiedenen langen Zwischenketten und [³H]NMS bestimmt. Auch die Affinität der eingesetzten allosterischen Modulatoren zum freien Rezeptor wurde so ermittelt. In der folgenden Abbildung (Abb. 12) sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

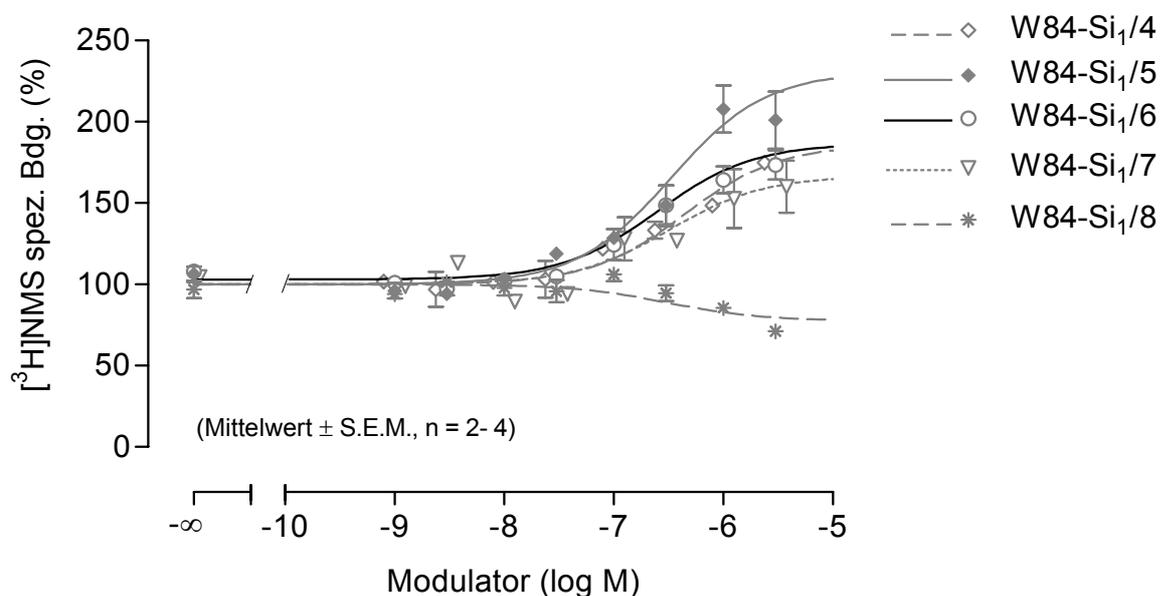


Abb. 12: Zusammenfassung der Ergebnisse der heterologen Interaktionsuntersuchungen von [³H]NMS (0,2 nM) mit den Silicium-haltigen allosterischen Modulatoren W84-Si₁/4 bis W84-Si₁/8, die sich durch eine unterschiedliche Zwischenkettenlänge voneinander unterscheiden. Ordinate: spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf B₀, Abszisse: Konzentration der eingesetzten allosterischen Testsubstanzen (log M). Die Untersuchungen wurden in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer durchgeführt (3,5 h Inkubation). Dargestellt sind die Ergebnisse aus 2-4 unabhängigen Experimenten, die jeweils als Dreifachbestimmungen durchgeführt worden sind (nichtlineare Regressionsanalyse nach Gleichung 13).

Abb. 12 zeigt, dass diejenige Substanz mit einer Zwischenkettenlänge von 5 CH₂-Gruppen die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS am stärksten fördert. Zusätzlich ist deutlich erkennbar, dass nicht der alleinige Austausch eines quartären Stickstoffes gegen ein Si-Atom für den Übergang von negativer zu positiver Kooperativität zuständig sein kann, da die Substanz mit einer Zwischenkettenlänge von 8 CH₂-Gruppen negativ kooperativ mit [³H]NMS interagiert.

Die Daten der Untersuchungen mit der schwach negativ kooperativen Substanz W84-Si₁/8 wurden mit der modifizierten Gleichung nach Ehlert (s. 2.3.3.1) analysiert. Die pK_A- und p α -Werte zu den abgebildeten Konzentrations-Wirkungs-Kurven werden in Tab. 15 zusammengefasst.

Substanz	p α	pK _A	Anzahl Versuche	pEC _{50,diss}	n _H	Anzahl Versuche
W84-Si ₁ /4	0,516 ± 0,031 ^c	6,11 ± 0,22 ^c	2	6,81 ± 0,07 ^{e,f}	-0,76 ± 0,06 ^{n.s.}	2
W84-Si ₁ /5	0,827 ± 0,164 ^c	6,01 ± 0,12 ^c	4	7,09 ± 0,10 ^{d,f}	-1,06 ± 0,24 ^{n.s.}	3
W84-Si ₁ /6	0,463 ± 0,037	6,40 ± 0,14	4	6,72 ± 0,06 ^f	-1,27 ± 0,18 ^{n.s.}	6
W84-Si ₁ /7	0,400 ± 0,108 ^c	6,31 ± 0,09 ^c	2	6,68 ± 0,07 ^e	-1,45 ± 0,09*	2
W84-Si ₁ /8	-0,156 ± 0,022 ^{a,b}	6,57 ^a	3	6,41 ± 0,06	-1,15 ± 0,34 ^{n.s.}	2

Tab. 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der Gleichgewichtsbindungs- und der Dissoziationsuntersuchungen mit den allosterischen Modulatoren W84-Si₁/4, W84-Si₁/5, W84-Si₁/6, W84-Si₁/7 und W84-Si₁/8 mit dem Radioliganden [³H]NMS (0,2 nM) in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler.

- ^a: Die heterologe Interaktion von W84-Si₁/8 wurde unter Einsatz der modifizierten Ehlert Gleichung (s. 2.3.3.1) ausgewertet, der pK_A-Wert wurde nicht zu statistischen Vergleichen hinzugezogen.
- ^b: Dieser Wert unterscheidet sich statistisch signifikant vom p α -Wert der Substanz W84-Si₁/6.
- ^c: Diese Werte unterscheiden sich nicht statistisch signifikant vom entsprechenden Wert der Substanz W84-Si₁/6.
- ^d: Dieser Wert unterscheidet sich statistisch signifikant vom pEC_{50,diss}-Wert von W84-Si₁/6 ($p < 0,05$).
- ^e: Diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant vom pEC_{50,diss}-Wert von W84-Si₁/6 ($p > 0,05$).
- ^f: Diese Werte unterscheiden sich statistisch signifikant von dem pEC_{50,diss}-Wert der negativ kooperativen Substanz W84-Si₁/8.
- ^{n.s.}: Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von n_H = -1.
- *: der F-Test ergab eine signifikant bessere Kurven-Anpassung für einen Wert für n_H ≠ -1.

Die Veränderung der Zwischenkettenlänge hat weitere deutlich positiv kooperativ wirksame Substanzen ergeben. Eine Länge von 8 CH₂-Gruppen hat allerdings zu einer negativen Kooperativität zwischen W84-Si₁/8 und [³H]NMS geführt.

Insgesamt ist der Einfluss der Veränderung der Zwischenkettenlänge auf die dissoziationsverzögernden Eigenschaften dieser Substanzgruppe eher gering, die EC_{50,diss}-Werte liegen alle im Bereich einer halben Dekade. Die in der Literatur beschriebenen Dissoziationsuntersuchungen mit den Zwischenketten-modifizierten W84-Derivaten [34] hat-

ten für die entsprechende Anzahl von CH₂-Gruppen in der Zwischenkette ein ähnliches Bild ergeben. Auch bei den in der Literatur beschriebenen Substanzen lagen die EC_{50,diss}-Werte im Bereich einer halben Dekade, doch insgesamt waren die Affinitäten geringer. Für die hier beschriebenen Substanzen ist im Gegensatz zu den Alkan-bis-ammonium-Verbindungen nicht bekannt, wie gross die Distanz zwischen Si-Atom und quartärem Stickstoff ist. Es ist allerdings davon auszugehen, dass die Einführung des Si-Atoms im Vergleich zum quartären Stickstoff zu etwas grösseren Distanzen führen kann [74].

Für die Substanz W84-Si_{1/5}, die in den beschriebenen Experimenten am stärksten positiv kooperativ mit [³H]NMS interagierte, wurden weitere Gleichgewichtsbindungsexperimente durchgeführt, die sich von den oben erwähnten dadurch unterschieden, dass die [³H]NMS-Konzentration auf 0,1 nM und 0,05 nM reduziert wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 15 enthalten (s. 3.2.5, S. 65).

3.2.4 Einfluss des allosterischen Modulators W84-Si_{1/5} auf die Affinität von [³H]NMS zum muskarinischen M₂-Rezeptor

Bei dem hier gewählten Versuchsaufbau handelt es sich vom Prinzip her um ein homologes Konkurrenzexperiment in An- und Abwesenheit einer konstanten hohen Konzentration eines allosterischen Modulators (s. 2.3.3.3, S. 28). Im Falle einer positiven Kooperativität nach Ehlert [29] dürfte bei einer Analyse des Versuches kein Unterschied zwischen den B_{max}-Werten aus Kontroll- und Testkurve auftreten. Einzig der K_D-Wert sollte sich verändern. Mit diesem Versuchsansatz kann überprüft werden, ob ein bindungsfördernder Effekt, wie er in den heterologen Interaktionsexperimenten mit Si-haltigen W84-Analoga beobachtet werden konnte, durch eine Veränderung der Affinität des Orthoster zu seiner Bindungsstelle zustande kommt, oder ob die Anzahl Bindungsstellen beeinflusst wird. Die folgende Abbildung zeigt das Ergebnis eines Experimentes mit der Substanz W84-Si_{1/5} (3 μM) in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer ([³H]NMS 0,2 nM, Herzventrikelhomogenat vom Hausschwein). Bei der eingesetzten Alloster-Konzentration konnte in den Gleichgewichtsbindungsexperimenten der maximale Bindungsfördernde Effekt beobachtet werden. Ca. 90% der in Suspension vorliegenden Rezeptoren werden bei dieser W84-Si_{1/5}-Konzentration nach Erreichen der Gleichgewichtsbedingungen mit allosterischem Modulator besetzt sein.

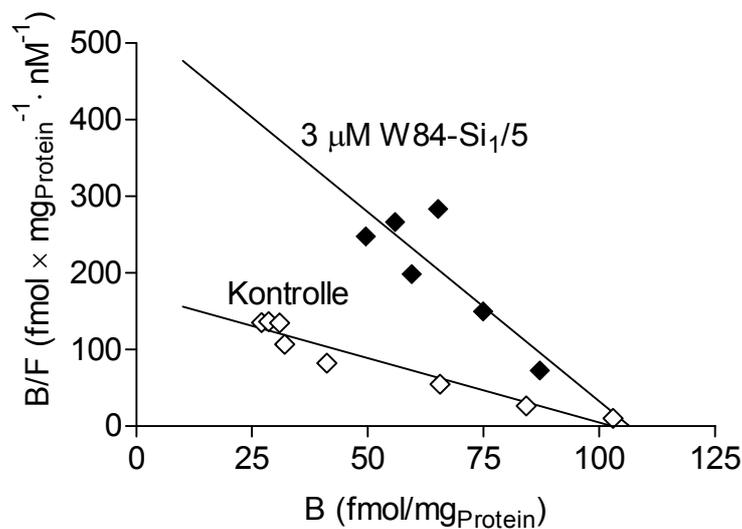


Abb. 13: Scatchard Auftragung eines homologen Wettbewerbsexperimentes, gemessen in An- und Abwesenheit von W84-Si_{1/5} (3 μM) (triplicierte Werte). Ordinate: Verhältnis von gebundenem NMS (B) (fmol·mg_{Protein}⁻¹) zu freiem NMS (F) (nM), Abszisse: gebundenes NMS (B) (fmol·mg_{Protein}⁻¹). Inkubationszeit bis zum Erreichen von Gleichgewichtsbedingungen: 3,5 Stunden.

Obige Abbildung (Abb. 13) zeigt deutlich, dass der eingesetzte allosterische Modulator W84-Si_{1/5} die Anzahl der Bindungsstellen B_{\max} nicht beeinflusst (Kontrolle: 103 fmol·mg⁻¹ versus 106 fmol·mg⁻¹ unter 3 μM W84-Si_{1/5}). Hingegen hat sich die Affinität von [³H]NMS zu den muskarinischen Rezeptoren um den Faktor 2,9 von $K_D = 0,59$ nM auf $K_D = 0,20$ nM erhöht. Die beobachteten bindungsfördernden Effekte können somit ausschliesslich auf eine Steigerung der Affinität von [³H]NMS zu den muskarinischen M₂-Rezeptoren durch die positiv kooperative Interaktion zwischen allosterischem Modulator und Radioligand zurückgeführt werden. Die für diese Substanz beobachtete positive Kooperativität (Tab. 15, S. 59, Tab. 16, S. 68) konnte somit qualitativ bestätigt werden. Da unter Gleichgewichtsbedingungen bei der eingesetzten Alloster-Konzentration nicht sämtliche Rezeptoren mit Alloster besetzt sind, kann durch dieses Experiment nicht direkt ein α -Wert bestimmt werden. Denn neben vielen ternären Komplexen (Rezeptor, Orthoster und Alloster) werden auch binäre Komplexe (Rezeptor, Orthoster) vorliegen, die das Ergebnis verfälschen würden.

3.2.5 Einführung von Naphthalimid-Substituenten in Silicium-haltige W84-artige allosterische Modulatoren

Das Silicium-haltige W84-Analogon mit einer Zwischenkettenlänge von 5 Methylen-Gruppen hatte sich in den zuvor beschriebenen Radioligandbindungsuntersuchungen als am stärksten potent bezüglich Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS-Rezeptor-Komplexen herausgestellt. Ebenfalls hatte diese Substanz - unter den gewählten Versuchsbedingungen – die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS am stärksten gefördert. Daher wurden ausgehend von dieser Substanz weitere Strukturmodifikationen vorgenommen. Hierbei wurden die Phthalimid-Substituenten schrittweise durch Naphthalimid-Substituenten ersetzt. Diese Substanzen wurden wiederum in Dissoziationsversuchen und heterologen Interaktionsexperimenten untersucht.

3.2.5.1 [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung der Naphthalimid-substituierten organometallischen W84-Derivate

Wie die zuvor beschriebenen Substanzen wurden auch die Naphthalimid-substituierten W84-Si_{1/5} Derivate in Dissoziationsexperimenten untersucht. Die Versuche wurden in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer bei einer [³H]NMS-Konzentration von 0,2 nM durchgeführt. Es wurden komplette Dissoziationsverläufe über 2 Stunden beobachtet, wobei nur zwei Alloster-Konzentrationen (0,3 und 0,03 μM) eingesetzt wurden (s. 3.2.3.1). Für W84-NPSi5N⁺NP und W84-NPSi5N⁺P wurden zusätzliche Dissoziationsmessungen bei einer Alloster-Konzentration von 0,1 μM vorgenommen. In der folgenden Abbildung (Abb. 14) sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven dieser Versuche abgebildet.

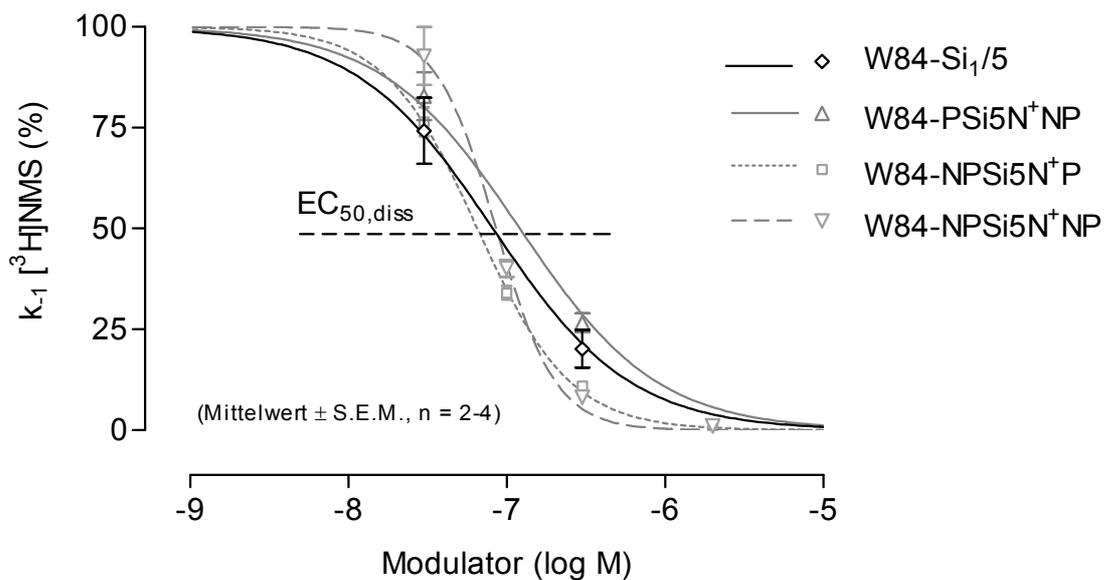


Abb. 14: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Dissoziationsuntersuchungen des allosterischen Modulators W84-Si₁/5 und seiner Naphthalimid-substituierten Derivate W84-PSi5N⁺NP, W84-NPSi5N⁺NP und W84-NPSi5N⁺P in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer (0,2 nM [³H]NMS). Ordinate: apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} in Prozent bezogen auf den Kontrollwert, Abszisse: Konzentration der eingesetzten allosterischen Modulatoren (log M). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten je Datenpunkt. Die gebrochene horizontale Linie markiert die Lage der Wendepunkte der Kurven. Die Steigung der Kurven von W84-Si₁/5 und W84-PSi5N⁺NP unterschied sich nicht signifikant von $n_H = -1$ (F-Test, $p > 0,05$). Die Steigungen der Kurven von W84-NPSi5N⁺NP und W84-NPSi5N⁺P unterscheiden sich signifikant von $n_H = -1$ (F-Test, $p < 0,05$). Details im Text.

Der schrittweise Austausch der Phthalimid-Substituenten gegen Naphthalimid-Reste in der Substanz W84-Si₁/5, die sich in vorhergehenden Untersuchungen als am stärksten dissoziationsverzögernd erwiesen hatte, führte nicht zu einer signifikanten Veränderung bezüglich der Lage der Wendepunkte der Konzentrations-Wirkungs-Kurven, die $pEC_{50,diss}$ -Werte der einzelnen Substanzen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander ($p > 0,05$). Jedoch bewirkte der Austausch des Phthalimid-Substituenten in unmittelbarer Nähe zum Si-Atom, dass sich die Steilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurven deutlich veränderte. Die Hill-Steigung für die Substanz W84-NPSi5N⁺NP beträgt $n_H = -2,3 \pm 0,48$, jene von W84-NPSi5N⁺P $n_H = -1,5 \pm 0,10$. In Tab. 16 (S. 68) werden die Kenndaten dieser Konzentrations-Wirkungs-Kurven aufgeführt.

3.2.5.2 Heterologe Interaktionsversuche mit Naphthalimid-haltigen organometallischen Verbindungen

In diesen Versuchen wurde der Einfluss der drei Naphthalimid-substituierten Si-haltigen W84-Analoga W84-PSi5N⁺NP, W84-NPSi5N⁺P und W84-NPSi5N⁺NP auf die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden [³H]NMS in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer untersucht. Zusätzlich zu der in den übrigen Versuchen eingesetzten Radioligandkonzentration von 0,2 nM wurden zwei weitere, geringere Konzentrationen von [³H]NMS eingesetzt (0,1; 0,05 nM). Dies geschah, um den Einfluss der allosterischen Modulatoren auf die Gleichgewichtsbindung noch besser darstellen zu können, als bei der höheren Konzentration von [³H]NMS. Denn gemäss dem ternären Modell allosterischer Interaktion nimmt unter Einfluss positiv kooperativer allosterischer Modulatoren die Gleichgewichtsbindung in Prozent bezogen auf die Gesamtbindung in Abwesenheit von allosterischem Modulator bei geringeren Radioligandkonzentrationen stärker zu als bei höheren, wobei die Parameter $p\alpha$ und pK_A unverändert bleiben.

Die Dissoziationsuntersuchungen mit den Substanzen W84-NPSi5N⁺NP und W84-NPSi5N⁺P hatten Konzentrations-Wirkungs-Kurven ergeben, die signifikant von einer Steigung von $n_H = -1$ abwichen (s. Tab. 16, S. 68). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass sich diese Substanzen unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht gemäss dem ternären Modell allosterischer Interaktion verhalten. Daher wurden die ermittelten Daten aus den Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen zuerst gemäss einer nichtlinearen Regressionsanalyse nach Hill ausgewertet. Auch hier ergab sich für die Substanzen mit einem Phthalimid/Naphthalimid-Austausch in Si-Nähe unter den gewählten Versuchsbedingungen in einigen Fällen eine von $n_H = +1$ abweichende Steigung, Kenndaten zu oberem Plateau, Wendepunkt und Steigungsmass s. Tab. 16, S. 68 (Abbildung nicht gezeigt).

Vor dem Hintergrund des ungewöhnlich hohen Steigungsmasses der Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus den Dissoziations- und Gleichgewichtsexperimenten wurden die Daten aus diesen heterologen Interaktionsexperimenten gemäss Gleichung 13 analysiert.

In der folgenden Abbildung (Abb. 15) werden diese Konzentrations-Wirkungs-Kurven gemäss dem ternären Modell allosterischer Interaktion gezeigt. Zusätzlich werden die mit der Ausgangssubstanz W84-Si_{1/5} (beidseitige Phthalimid-Substitution) erhobenen Ergebnisse aufgeführt.

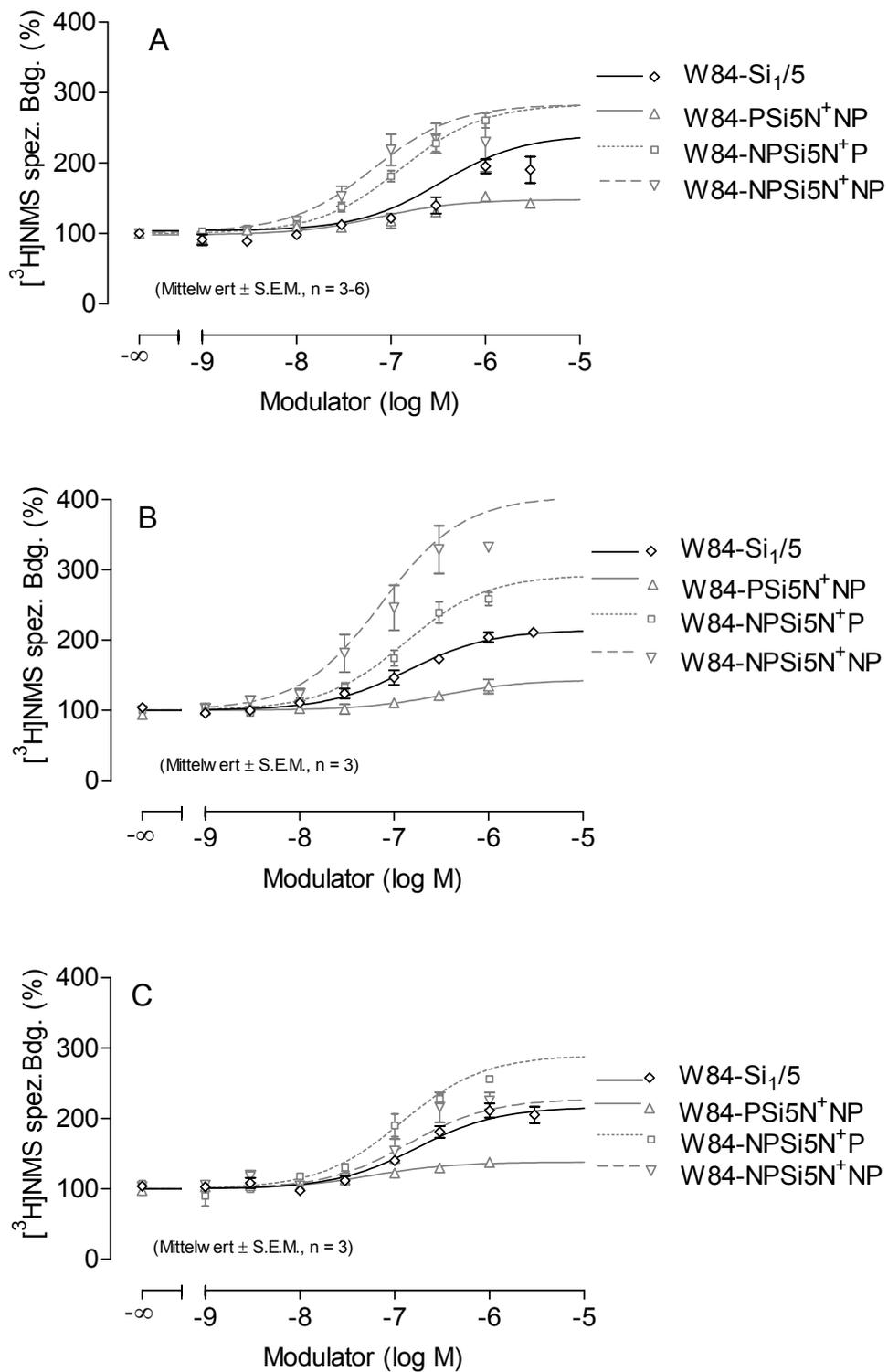


Abb. 15: Heterologe Interaktionsexperimente von W84-Si₁/5, W84-PSi5N⁺NP, W84-NPSi5N⁺P und W84-NPSi5N⁺NP mit [³H]NMS (A): 0,2 nM, (B): 0,1 nM, (C): 0,05 nM. Ordinate: [³H]NMS spezifische Bindung in Prozent bezogen auf B₀, Abszisse: Konzentration der eingesetzten organometallischen Verbindungen (log M). Aufgetragen sind die Ergebnisse aus 3-6 unabhängigen Experimenten (Dreifachbestimmung). Kurvenanpassung gemäss dem ternären Modell allosterischer Interaktion. Weitere Details im Text.

Die den Graphen zugrundeliegenden 3-6 Versuche wurden wie unter 3.2.1.2 beschrieben zusammengefasst. In Tab. 16 (S. 68) sind die $p\alpha$ - und die pK_A -Werte der in den Graphen dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit den zugehörigen statistischen Vergleichen zusammengestellt. Das alleinige Austauschen des Phthalimid-Substituenten in direkter Nähe zum quartären Stickstoff durch einen Naphthalimid-Rest (W84-PSi5N⁺NP) bewirkt unter allen gewählten Versuchsbedingungen eine deutliche Reduktion der Förderung der Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS durch W84-PSi5N⁺NP im Vergleich zu der Ausgangssubstanz W84-Si₁/5, wobei sich die gemäss Gleichung 13 ermittelten $p\alpha$ -Werte dieser Substanz unter keiner Bedingung signifikant von den $p\alpha$ -Werten der Ausgangssubstanz unterscheiden. Im Gegensatz zu den $p\alpha$ -Werten kann ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Lage des oberen Plateaus der Konzentrations-Wirkungs-Kurven einer Regressionsanalyse nach Hill beobachtet werden (s. Tab. 16, S. 68). Hier wird deutlich, dass sich eine einseitige Phthalimid/Naphthalimid-Substitution in direkter Nähe zum quartären Stickstoff niederschlägt in einer signifikanten Reduktion des maximalen bindungsfördernden Effektes im Vergleich zur Ausgangssubstanz, bestimmbar durch die Lage des oberen Plateaus der Konzentrations-Wirkungs-Kurven, die aus einer Analyse der Daten nach Hill resultieren.

Die Substanzen mit beidseitiger Naphthalimid- bzw. einseitiger Naphthalimid-Substitution in unmittelbarer Si-Nähe förderten die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung im Vergleich zur Ausgangssubstanz W84-Si₁/5 deutlich stärker. Die $p\alpha$ -Werte sowie die oberen Plateaus der Konzentrations-Wirkungs-Kurven, die aus heterologen Interaktionsexperimenten mit der Substanz W84-NPSi5N⁺P resultieren und gemäss einer Regressionsanalyse nach Hill ermittelt wurden, unterscheiden sich unter den gewählten Versuchsbedingungen statistisch signifikant von den entsprechenden Daten der Ausgangssubstanz. Für die Substanz W84-NPSi5N⁺NP fiel dieser Unterschied weder bezogen auf die $p\alpha$ -Werte, noch auf die Lage der oberen Plateaus signifikant aus. Hier ist die hohe Kurvensteilheit der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der heterologen Interaktionsexperimente mit dieser Substanz sowie der Standardfehler zu beachten (s. Tab. 16, S. 68). Die Lage der Wendepunkte der Konzentrations-Wirkungs-Kurven (pEC_{50}), die gemäss Hill ermittelt worden sind, unterscheidet sich für die Substanz W84-NPSi5N⁺NP in keinem Fall vom $pEC_{50,diss}$ -Wert dieser Substanz. Für die Substanz W84-NPSi5N⁺P besteht ein signifikanter Unterschied zwischen dem pEC_{50} -Wert bei 0,2 nM [³H]NMS und dem $pEC_{50,diss}$ -Wert (s. *Diskussion*).

Die Regressionsanalyse gemäss Gleichung 13 war im Wissen um die teilweise hohen Konzentrations-Wirkungs-Kurven-Steilheiten aus den Dissoziationsuntersuchungen durchgeführt worden. Aus diesem Grund sind die Kenndaten für $p\alpha$ und pK_A , die aus diesen Analysen resultieren zunächst von orientierendem Charakter.

Bei der Analyse gemäss Gleichung 13 hatte sich interessanterweise für alle hier beschriebenen Substanzen in Abhängigkeit von der eingesetzten Radioligandkonzentration eine Veränderung der Kenndaten für $p\alpha$ und pK_A ergeben (s. Tab. 16, S. 68), was auf Grund des ternären Modells allosterischer Interaktionen nicht zu erwarten ist. Diese Abhängigkeit fiel zwar nicht immer statistisch signifikant aus, doch erscheint sie nicht vernachlässigbar. Für alle Substanzen, auch für jene, deren Verhalten in den Dissoziationsexperimenten unauffällig war, ist mit sinkender Radioligandkonzentration in den einzelnen Versuchen eine Tendenz hin zu geringerer positiver Kooperativität, d.h. zu kleineren $p\alpha$ -Werten zu beobachten (s. Tab. 16, S. 68). Das Ausmass der Veränderung ist umso deutlicher, je stärker bindungsfördernd sich eine Substanz in den Untersuchungen mit 0,2 nM [^3H]NMS gezeigt hat. Die hier beschriebene unterschiedliche Wirksamkeit dieser Substanzen im Gleichgewichtsbindungsexperiment in Abhängigkeit von der eingesetzten Radioligandkonzentration scheint nicht im Einklang mit der Literatur zu stehen [29] und weist auf ein atypisches Verhalten dieser Substanzen hin (s. *Diskussion*).

In der folgenden Tabelle (Tab. 16, S. 68) werden die Ergebnisse der Dissoziationsversuche sowie der heterologen Interaktionsexperimente mit W84-Si₁/5 und den Naphthalimid-substituierten Derivaten dieser Substanz zusammengefasst. Wie bereits geschrieben, haben die Werte für $p\alpha$ und pK_A von W84-NPSi5N⁺P und W84-NPSi5N⁺NP orientierenden Charakter, da die Steigungen der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Dissoziationsuntersuchungen dieser Substanzen von einem Wert von $n_H = -1$ abweichen und auch die Steigungen der Konzentrations-Wirkungs-Kurven einiger Gleichgewichtsbindungsexperimente von $n_H = +1$ verschieden sind, was darauf hinweist, dass sich diese Substanzen eventuell atypisch, vom ternären Modell allosterischer Interaktion abweichend, verhalten.

Substanz	Konz [³ H]NMS (nM)	pK _A	pα	Top Hill	pEC ₅₀ Hill	Anzahl Versu- che	pEC ₅₀ , diss	n _H	Anzahl Versu- che
W84- Si ₁ /5	0,2	6,01 ± 0,12	0,827 ± 0,164	210,5 ± 18,3	6,45 ± 0,06 ^c	4	7,09 ± 0,10	-1,1 ± 0,24 ^d	3
	0,1	6,72 ± 0,16*	0,456 ± 0,013 ^{n.s.}	207,4 ± 7,4	6,80 ± 0,17	3			
	0,05	6,70 ± 0,04*	0,405 ± 0,030 ^{n.s.}	208,4 ± 12,1	6,86 ± 0,14	3			
W84- PSi5 N ⁺ NP	0,2	6,99 ± 0,41 ^b	0,316 ± 0,026 ^a	148 ± 5,6 ^b	7,10 ± 0,24	3	6,92 ± 0,07 ^a	-1,1 ± 0,17 ^d	2
	0,1	6,43 ± 0,06 ^a , n.s.	0,206 ± 0,056 ^a , n.s.	145,0 ± 14,3 ^b	6,89 ± 0,08	3			
	0,05	7,22 ± 0,10 ^b , n.s.	0,161 ± 0,011 ^a , n.s.	142,5 ± 4,2 ^b	7,34 ± 0,28	3			
W84- NPSi 5N ⁺ P	0,2	5,17 ± 0,36 ^a	2,180 ± 0,375 ^b	281,2 ± 10,0 ^b	6,91 ± 0,07 ^c	6	7,18 ± 0,02 ^a	-1,5 ± 0,10 ^e	5
	0,1	6,56 ± 0,12 ^{a,*}	0,789 ± 0,057 ^{b,*}	288,6 ± 12,1 ^b	6,86 ± 0,11	3			
	0,05	6,83 ± 0,08 ^{a,*}	0,559 ± 0,015 ^{b,*}	252,4 ± 12,2 ^a	6,99 ± 0,09 ^H	3			
W84- NPSi 5N ⁺ N P	0,2	6,02 ± 0,43 ^a	1,602 ± 0,387 ^a	250,6 ± 22,3 ^a	7,12 ± 0,24 ^(H)	4	7,07 ± 0,05 ^a	-2,3 ± 0,52 ^e	4
	0,1	6,40 ± 0,43 ^a , n.s.	1,337 ± 0,265 ^a , n.s.	333,4 ± 47,0 ^a	7,29 ± 0,25 ^H	3			
	0,05	6,78 ± 0,07 ^a , n.s.	0,434 ± 0,049 ^a , n.s.	210,9 ± 18,4 ^a	6,97 ± 0,05 ^H	3			

Tab. 16: Zusammenfassung der Parameter der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der heterologen Interaktionsexperimente (Analyse gemäss ternärem allosterischem Modell, Gleichung 13 sowie gemäss der "Vier Parameter logistischen Gleichung" nach Hill, Gleichung 6) in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer bei unterschiedlichen Radioligandkonzentrationen, sowie der Dissoziationsexperimente, die im gleichen Puffermilieu

durchgeführt worden sind, allerdings bei einer konstanten [³H]NMS-Konzentration von 0,2 nM. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler.

- *: Diese Werte unterscheiden sich signifikant vom Wert der entsprechenden Substanz bei 0,2 nM [³H]NMS ($p < 0,05$).
- ^{n.s.}: Diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant vom Wert der entsprechenden Substanz bei 0,2 nM [³H]NMS ($p > 0,05$).
- ^{a.}: Diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant vom entsprechenden Wert für W84-Si1/5 ($p > 0,05$).
- ^{b.}: Diese Werte unterscheiden sich signifikant vom entsprechenden Wert für W84-Si1/5 ($p < 0,05$).
- ^{H.}: Steigung der Hillanalysen bei der Mehrzahl der Einzelanalysen abweichend von $n_H = +1$ (F-Test, $p < 0,05$).
- ^(H): Bei zwei Experimenten wich die Steigung der Hillanalyse von $n_H = +1$ ab, bei zwei Experimenten wich sie nicht signifikant von $n_H = +1$ ab.
- ^{c.}: Dieser Wert weicht vom $pEC_{50,diss}$ Wert der entsprechenden Substanz ab ($p < 0,05$).
- ^{d.}: Kein signifikanter Unterschied von $n_H = -1$ (F-Test, $p > 0,05$).
- ^{e.}: Signifikanter Unterschied von $n_H = -1$ (F-Test, $p < 0,05$).

3.2.5.3 Simultane Analysen von heterologen Interaktionsexperimenten mit verschiedenen Radioligandkonzentrationen

Die unter 3.2.5.2 beschriebenen heterologen Interaktionsexperimente mit unterschiedlichen Radioligandkonzentrationen hatten für die Kenndaten $p\alpha$ und pK_A eine Abhängigkeit von der eingesetzten Radioligandkonzentration ergeben, welche teilweise statistisch signifikant ausfiel (s. Tab. 16, S. 68). Dieses Phänomen sollte durch simultane Analysen in 3D-Form weiter untersucht werden. Mit Hilfe dieser Analysen können gleichzeitig Datenpunkte aus zwei parallel durchgeführten Versuchen mit unterschiedlichen Radioligandkonzentrationen mittels nichtlinearer Regressionsanalyse ausgewertet werden. In der folgenden Abbildung wird das Ergebnis einer Simultananalyse mit der Substanz W84-NPSi5N+P ([³H]NMS 0,2 und 0,1 nM) gezeigt.

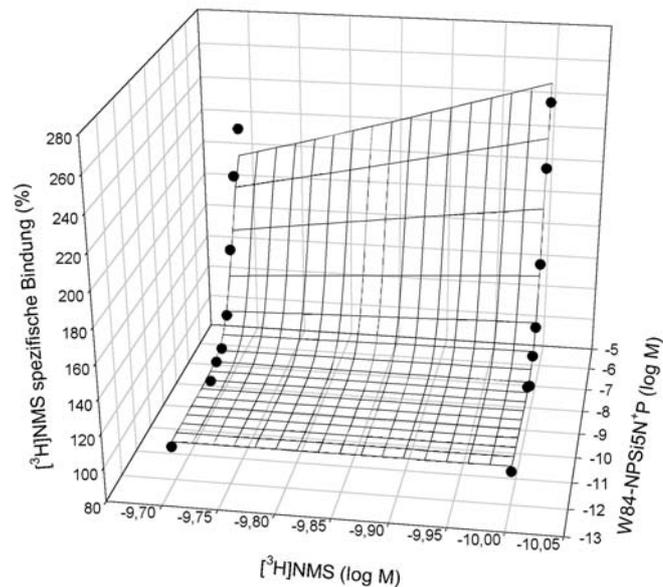


Abb. 16: Simultananalyse eines heterologen Interaktionsexperimentes von W84-NPSi5N⁺P und [³H]NMS 0,2 und 0,1 nM in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer. X-Achse: [³H]NMS-Konzentration (log M), die hohe Spreizung der Achse ist zu beachten! Y-Achse: Konzentration des allosterischen Modulators (log M), Z-Achse: [³H]NMS spezifische Bindung in Prozent normalisiert bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Die Versuche wurden mit triplizierten Werten durchgeführt.

Der Kooperativitätsfaktor α aus dieser Simultananalyse beträgt $0,191 \pm 0,058$, pK_A liegt bei $6,41 \pm 0,18$. Das starke Abweichen des angepassten "Netzes" von dem Punkt mit der höchsten Alloster-Konzentration bei einer Radioligandkonzentration von 0,2 nM ist augenfällig. Dies führt dazu, dass der α -Wert ($\alpha = 0,099 \pm 0,014$), der bei dieser Radioligandkonzentration in der Einzelanalyse erhoben worden ist, von dem α -Wert aus der Simultananalyse deutlich abweicht. Der α -Wert der Einzelanalyse bei 0,1 nM [³H]NMS betrug $0,210 \pm 0,013$ und liegt damit viel näher bei dem durch die Simultananalyse ermittelten Wert für α . Auch die Werte bezüglich Affinität (pK_A) der allosterischen Modulatoren zum freien Rezeptor weichen in Abhängigkeit von der Radioligandkonzentration voneinander ab (0,2 nM [³H]NMS: $pK_A = 6,22 \pm 0,08$; 0,1 nM [³H]NMS: $pK_A = 6,47 \pm 0,06$) bzw. der Simultananalyse ($pK_A = 6,41 \pm 0,18$). Hier stimmt das Er-

gebnis aus der Simultananalyse ebenfalls besser mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen mit der Radioligandkonzentration von 0,1 nM [³H]NMS überein.

In den durchgeführten Simultananalysen wurde immer diejenige 3D-Anpassung favorisiert, die sich an der Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit der geringeren eingesetzten Radioligandkonzentration orientierte. Dabei wurden Messpunkte der höheren Radioligandkonzentration, die auf eine stärkere positive Kooperativität hingewiesen hätten, nicht erkennbar berücksichtigt. Die Gründe für diese unerwartete Anpassung bleiben offen.

Die α - und pK_A -Werte der zugrunde liegenden Einzelanalysen unterscheiden sich statistisch signifikant voneinander, jedoch nicht von den entsprechenden Werten, die aus der Simultananalyse resultieren. Für die statistische Analyse dieser Einzelversuche wurde abweichend von üblicherweise durchgeführten Signifikanztests nicht die Anzahl durchgeführter Versuche, sondern die Anzahl eingesetzter Konzentrationen als n-Zahl verwendet.

Die hier beschriebenen Simultananalysen wiesen ebenfalls - wie zuvor schon die Einzelanalysen der heterologen Interaktionsexperimente mit unterschiedlichen [³H]NMS-Konzentrationen - deutlich auf das atypische Verhalten dieser neuartigen Si-haltigen W84-Derivate in Radioligandbindungsstudien hin.

3.2.5.4 Vergleichende Untersuchungen mit Alcuronium

Für den neuromuskulären Blocker Alcuronium ist seit längerem bekannt, dass er in der Lage ist, die Gleichgewichtsbindung von [^3H]NMS an muskarinischen M_2 -Rezeptoren deutlich zu fördern [75]. Diese Substanz ist in verschiedenen Arbeiten als Referenzsubstanz für positiv kooperatives Verhalten an muskarinischen Rezeptoren, sowohl mit agonistisch als auch antagonistisch wirksamen orthosterischen Liganden eingesetzt worden [76, 31]. Daher wurde Alcuronium auch in dieser Arbeit unter den für die Silicium-substituierten W84-Derivate angewandten Bedingungen in Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen als Vergleichssubstanz eingesetzt. In der folgenden Abbildung (Abb. 17) werden die Ergebnisse der Untersuchungen mit Alcuronium mit 0,2 nM und 0,05 nM [^3H]NMS aufgeführt. Zusätzlich wurde nach Gleichung 13 basierend auf den für Alcuronium erhobenen Ergebnissen mit 0,2 nM [^3H]NMS eine Konzentrations-Wirkungskurve für eine Radioligandkonzentration von 0,05 nM [^3H]NMS simuliert. Diese wird als gebrochene Kurve aufgeführt.

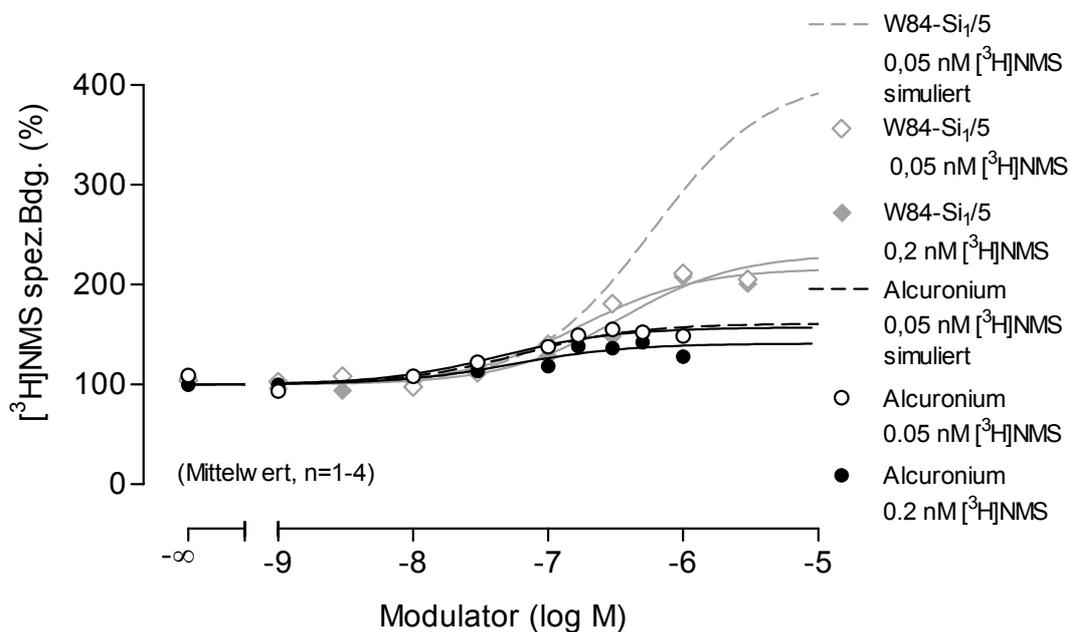


Abb. 17: Ergebnisse der Gleichgewichtbindungsuntersuchungen mit dem allosterischen Modulator Alcuronium (schwarz). Ordinate: spezifische [^3H]NMS-Bindung in Prozent normalisiert auf die Gesamtbindung in Abwesenheit von Testsubstanz. Abszisse: Konzentration des eingesetzten allosterischen Modulators (log M). (Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer, 0,2 nM bzw. 0,05 nM [^3H]NMS). In hellgrau werden die entsprechenden Daten für W84-Si₁/5 abgebildet. Sämtliche Versuche wurden mit triplicierten Werten durchgeführt. Die Daten für die Versuche mit Alcuronium basieren auf je einem durchgeführten Versuch. (Der Übersichtlichkeit halber werden keine Standardfehler abgebildet).

Die Untersuchung ergab zwar für Alcuronium - unter den gleichen Versuchsbedingungen wie für die organometallischen Modulatoren - eine vergleichbar geringe positive Kooperativität, doch wurde für Alcuronium keine Abhängigkeit der Kenndaten α und pK_A von der eingesetzten Radioligandkonzentration beobachtet. Die für Alcuronium für eine [^3H]NMS-Konzentration von 0,05 nM simulierte Kurve ist beinahe deckungsgleich mit der im Experiment bestimmten Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Im Gegensatz dazu sind beispielhaft in schwachem Grau die entsprechenden gemessenen und simulierten Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Substanz W84-Si₁/5 abgebildet (Abb. 17). Hierbei wird sehr deutlich, dass sich diese Substanz, wie auch die anderen, hier nicht aufgeführten Si-haltigen W84-Derivate, unter den gewählten Bedingungen in heterologen Interaktionsexperimenten abweichend von Alcuronium nicht gemäss dem ternären Modell allosterischer Interaktion [29] verhält.

W84-Si₁/5 war in den Dissoziationsexperimenten nicht durch eine von $n_H = -1$ abweichende Kurvensteilheit aufgefallen.

3.2.6 Orientierende Bindungsstudien mit dem allosterischen Modulator W84-NPSi5N⁺NP an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen

In orientierenden Versuchen wurde der Einfluss des zuvor an Herzventrikelhomogenaten vom Schwein untersuchten allosterischen Modulators W84-NPSi5N⁺NP auf die Bindungseigenschaften von [^3H]NMS an den humanen muskarinischen Rezeptorsubtypen M₁ bis M₅ untersucht. Die einzelnen Rezeptorsuspensionen waren aus stabil transfizierten CHO-Zellen gewonnen worden. Diese allosterische Testsubstanz war ausgewählt worden, da sie in den vorausgehenden Untersuchungen neben der Substanz W84-NPSi5N⁺P zu den zwei am stärksten [^3H]NMS-Bindungs-fördernd wirkenden Substanzen gehört hatte, und die Veränderungen in Abhängigkeit von der eingesetzten Radioligandkonzentration bezüglich $p\alpha$ und pK_A etwas geringer ausgefallen waren als bei der ebenfalls stark Gleichgewichtsbindungs-fördernden Substanz W84-NPSi5N⁺P. Mittels heterologen Interaktionsexperimenten mit dem orthosterischen Liganden [^3H]NMS (0,2 nM) in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer wurde der Einfluss auf die Gleichgewichtsbindung dieses muskarinischen Antagonisten bestimmt. In Dissoziationsexperimenten wurde der Einfluss von W84-NPSi5N⁺P auf die Dissoziation von [^3H]NMS-Muskarinrezeptor-Komplexen bestimmt, die Pufferbedingungen entsprachen denjenigen der Gleichgewichtsbindungsexperimente. Sämtliche hier beschriebenen Versuche mit den verschie-

denen muskarinischen Rezeptorsubtypen waren unter Einsatz eines Harvesters durchgeführt worden. Zur Erfassung der apparenten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{-1} wurde die Dissoziation der [^3H]NMS-Rezeptor-Komplexe mit acht duplizierten Messpunkten während ca. 120 Minuten beschrieben. Auf Grund der Versuchsanordnung in den Dissoziationsexperimenten wurden je Versuch maximal drei apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten und ein Kontrollwert ermittelt, für die M_4 -Rezeptoren nur ein Wert für k_{-1} , da für diese Rezeptoren das Versuchsprotokoll leicht verändert war (s. 2.3.4.3). Die anfänglichen Schwierigkeiten bei der Bestimmung der k_{-1} -Werte an M_4 -Rezeptoren zeigten deutlich auf, dass für die hier beschriebenen allosterischen Modulatoren die Zweipunkt-Kinetik-Experimente [77] nicht die Methode der Wahl zur Charakterisierung der allosterischen Potenz darstellen.

In der folgenden Abbildung (Abb. 18) werden die Ergebnisse der Radioligandbindungsuntersuchungen von W84-NPSi5N⁺NP und [^3H]NMS mit den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen zusammengefasst. Tab. 17 listet die Parameter der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Dissoziationsexperimente auf.

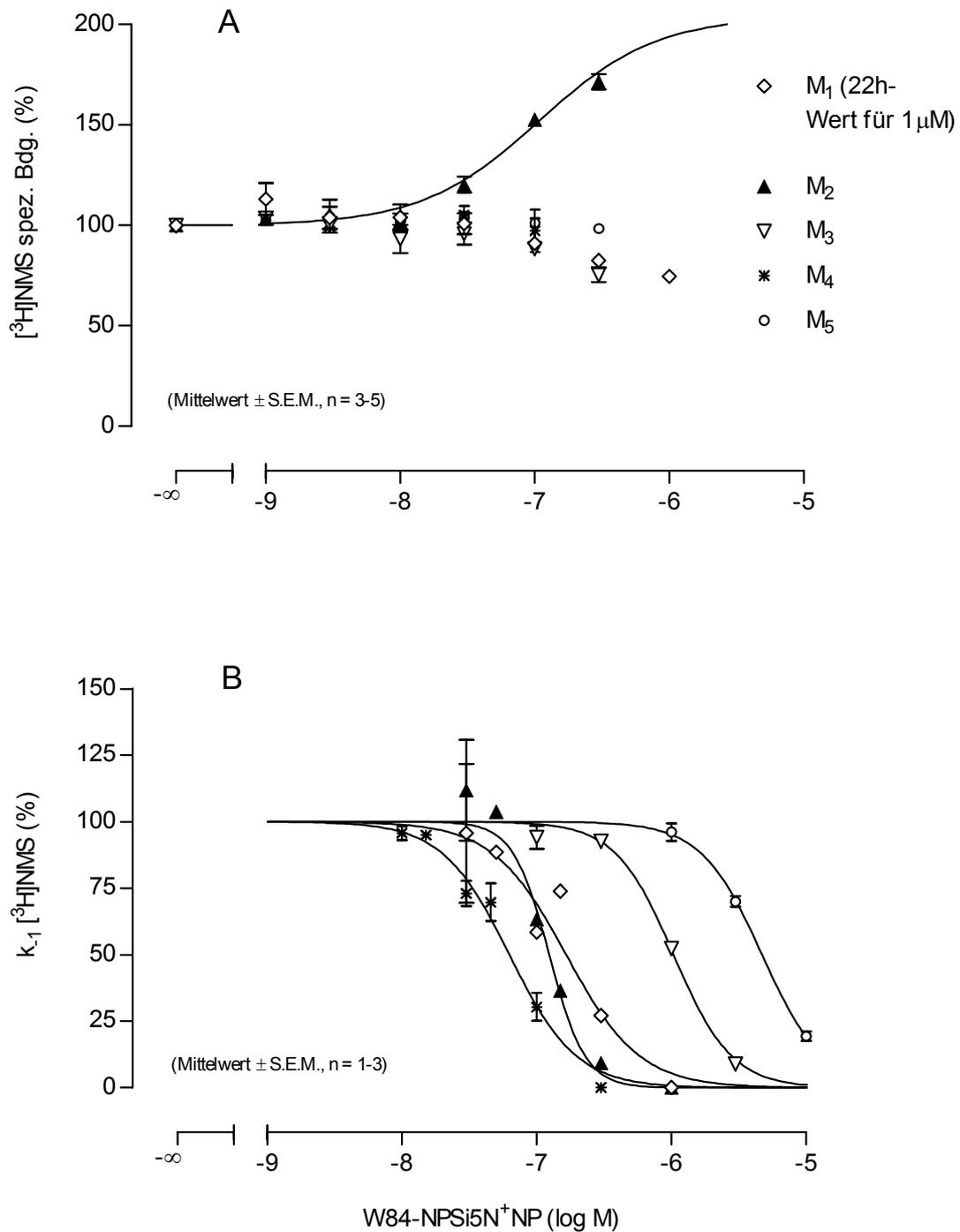


Abb. 18: Zusammenfassung der heterologen Interaktionsexperimente (A) und der Dissoziationsexperimente (B) mit dem organometallischen allosterischen Modulator W84-NPSi5N⁺NP an muskarinischen Rezeptoren M₁ bis M₅. Ordinate: (A) [³H]NMS spezifische Bindung in Prozent bezogen auf den Kontrollwert in Abwesenheit der Testsubstanz, (B) apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} in Prozent. Abszisse: Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Versuche wurden in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer mit dem Radioliganden [³H]NMS (0,2 nM) durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwer-

te \pm Standardfehler. (A) Die Analyse der Daten aus den Untersuchungen an M_2 -Rezeptoren erfolgte gemäss Gleichung 13. Die Einzelversuche mit den vier Rezeptorsubtypen M_1 , M_3 , M_4 , M_5 wurden nicht computergestützt ausgewertet. Am muskarinischen M_1 -Rezeptor wurde ein Versuch 22 Stunden inkubiert, die Daten der Konzentration von $1 \mu\text{M}$ Modulator aus diesem Versuch sind in die Abbildung mit aufgenommen worden. (B) Die Kenndaten der sigmoidalen Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Dissoziationsexperimente sind in Tab. 17 zusammengefasst. Die Werte für das Steigungsmass der Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden nicht konstant gesetzt. Für die Gleichgewichtsbindungsversuche wurden triplizierte Werte erfasst, jedem Datenpunkt der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Dissoziationsexperimente liegen komplette Dissoziationsverläufe über ca. 2 Stunden mit duplizierten Datenpunkten zugrunde.

Rezeptorsubtyp	$pEC_{50,diss}^a$	n_H	Anzahl Versuche
M_1	$6,77 \pm 0,13^b$	$-1,59 \pm 0,49^{n.s.}$	7
M_2	$6,91 \pm 0,04$	$-3,25 \pm 1,11^*$	7
M_3	$5,98 \pm 0,03$	$-2,02 \pm 0,36^*$	4
M_4	$7,20 \pm 0,04$	$-1,75 \pm 0,23^*$	9
M_5	$5,33 \pm 0,02$	$-1,92 \pm 0,13^*$	5

Tab. 17: Kenndaten zu den Dissoziationsuntersuchungen der Substanz W84-NPSi5N⁺NP an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer mit dem Radioliganden [³H]NMS (0,2 nM). Mittelwerte \pm Standardfehler aus 1-3 unabhängigen Experimenten pro Datenpunkt einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Die Werte für die Steilheiten der Konzentrations-Wirkungs-Kurven unterscheiden sich nicht statistisch signifikant voneinander ($p > 0,05$).

^a: Sofern nicht anders geschrieben, unterscheiden sich die $pEC_{50,diss}$ -Werte signifikant voneinander ($p < 0,05$).

^b: Der $pEC_{50,diss}$ von W84-NPSi5N⁺NP an M_1 -Rezeptoren unterscheidet sich nicht signifikant von jenem an M_2 -Rezeptoren ($p > 0,05$).

^{n.s.}: Kein signifikanter Unterschied zu $n_H = -1$ (F-Test, $p > 0,05$).

*: Signifikant verschieden von $n_H = -1$ (F-Test, $p < 0,05$).

Bei den abgebildeten heterologen Interaktionsexperimenten handelt es sich um erste orientierende Experimente. Bei den in Abb. 18 A abgebildeten Datenpunkten waren Gleichgewichtsbedingungen gemäss Gleichung 14 nach einer Inkubationszeit von 3 Stunden erreicht. Für den Rezeptorsubtyp M_1 war zusätzlich ein Versuch mit triplizierten Werten durchgeführt worden, der 22 Stunden inkubiert wurde. Der Wert bei $1 \mu\text{M}$ W84-NPSi5N⁺NP für den M_1 -Rezeptor in der obigen Abbildung (Abb. 18) ist diesem Versuch entnommen. An M_2 -Rezeptoren kann eine stark ausgeprägte Förderung der [³H]NMS-

Bindung durch W84-NPSi5N⁺NP beobachtet werden, der $p\alpha$ -Wert beträgt $0,449 \pm 0,043$, der pK_A -Wert liegt bei $6,83 \pm 0,06$ - auf Grund der hohen Steilheit der Dissoziations-Konzentrations-Wirkungs-Kurve haben auch diese Werte nur orientierenden Charakter (s. 3.2.5.2). Bei der Alloster-Konzentration von $0,3 \mu\text{M}$, bei der an den M₂-Rezeptoren eine sehr deutliche Förderung der [³H]NMS-Bindung beobachtet werden kann - die spezifische Bindung liegt bei $172 \pm 4\%$ - zeigt sich bei den anderen Rezeptorsubtypen kaum eine Veränderung der Gleichgewichtsbindung im Vergleich zur Gesamtbindung in Abwesenheit von Testsubstanz. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Dissoziationsexperimente zeigen zumindest für die Rezeptoren vom Subtyp M₄ und M₁, dass in diesem Konzentrationsbereich des Alloster eine deutliche Interaktion zwischen Alloster und Radioligand-besetztem Rezeptor stattfindet, so dass hier davon ausgegangen werden kann, dass sich die Effekte auf die [³H]NMS-Rezeptor-Komplex-Dissoziation und -Assoziation an diesen Subtypen aufheben. Bei $0,3 \mu\text{M}$ W84-NPSi5N⁺NP wird bei den M₃- und M₅-Rezeptoren kaum eine Dissoziationsverzögerung beobachtet, daher wird angenommen, dass die Testsubstanz mit diesen Rezeptoren im beobachteten Konzentrationsbereich kaum in Interaktion tritt.

Die [³H]NMS-Dissoziationshalbwertszeiten unter Kontrollbedingungen lauten wie folgt:

M₁: $12,5 \pm 1,4$ min, n = 7; M₂: $3,7 \pm 0,2$ min, n = 17; M₃: $13,5 \pm 1,5$ min, n = 4;

M₄: $14,4 \pm 1,1$ min, n = 15; M₅: $25,3 \pm 2,5$ min, n = 5; (Mittelwert \pm Standardfehler).

Diese orientierenden Untersuchungen, die zum Ziel hatten, eine erste Aussage über das subtypspezifische Bindungs- und Kooperativitätsverhalten der neu entwickelten organometallischen allosterischen Modulatoren zu treffen, sind sehr vielversprechend. Erstmals konnte eine Substanz beschrieben werden, die eine nahezu vollständige M₂-Subtypselektivität hinsichtlich der Beeinflussung der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung hin zu einer starken Bindungsförderung zeigt.

Die untersuchte Gruppe der Si-haltigen allosterischen Modulatoren hat sich auch in diesen Versuchen an humanen muskarinischen Rezeptoren als sehr erfolgversprechend erwiesen.

4 Diskussion

4.1 Wirkung von W84t im Vergleich mit Literaturdaten

Ein erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ausgehend vom Pharmakophor-Modell allosterischer Modulatoren vom Alkan-bis-ammonium-Typ an muskarinischen M_2 -Rezeptoren (s. 1.4, S. 5), die Notwendigkeit zweier quartärer Stickstoffe als Elemente dieses Pharmakophors zu prüfen. In Radioligandbindungsuntersuchungen wurde für die Beantwortung dieser Frage ein bis-tertiäres Derivat (W84t) des Prototypmodulators W84 eingesetzt. Es wurde hinsichtlich dessen Affinität zu Orthoster-besetzten und Orthoster-freien M_2 -Rezeptoren untersucht, sowie wurde dessen Effekt auf die Gleichgewichtsbindung von [^3H]NMS gemessen.

W84t weist im Gegensatz zur Muttersubstanz W84 keine permanente positive Ladung auf. Allerdings wird davon ausgegangen, dass diese Substanz unter physiologischen Bedingungen zweifach protoniert vorliegt [72]. In einer früheren Arbeit [46] wurde W84t erstmals synthetisiert und in Dissoziationsexperimenten mit dem Radioliganden [^3H]NMS in Mg, Tris, Cl, P_i -Puffer auf die allosterische Potenz geprüft. Die Daten hatten auf eine Zunahme der Wirksamkeit hingewiesen, die Affinität von W84t zum [^3H]NMS-besetzten Rezeptor war im Vergleich zu W84 um den Faktor 7 gesteigert. Die in der erwähnten Arbeit [46] durchgeführten Untersuchungen zur Bedeutung der quartären Zentren des Pharmakophor-Modells (1.4, S. 5) hatten orientierenden Charakter und sollten in dieser Arbeit vertieft werden.

Hier ergab sich im Gegensatz zu den erwähnten orientierenden Versuchen [46] kein deutlicher Unterschied in den Dissoziationsergebnissen von W84t im Vergleich zu W84 (s. Tab. 13, S. 51). Die Affinität von W84t zu mit [^3H]NMS besetzten M_2 -Rezeptoren unterschied sich in Mg, Tris, Cl, P_i -Puffer nicht von der Affinität von W84. In Na, K, P_i -Puffer wurde eine geringfügige Verschiebung des $\text{EC}_{50,\text{diss}}$ -Wertes von W84t um den Faktor 2,1 im Vergleich zu W84 hin zu geringerer Wirksamkeit beobachtet, wobei beide Substanzen eine deutliche Abhängigkeit vom gewählten Puffermedium zeigten (Verschiebungsfaktor: W84t: 78; W84: 120).

In der vorangegangenen Dissertationsarbeit [46] wurden keine Experimente unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt, so dass diesbezüglich kein Vergleich angestellt werden kann.

Die hier beschriebenen Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen ergaben deutliche Unterschiede hinsichtlich des Einflusses der Modulatoren auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS. W84t fiel in beiden gewählten Puffermedien durch neutrale Kooperativität auf, W84 hingegen zeigte sich - in Übereinstimmung mit Literaturdaten [78] - leicht negativ kooperativ (s. Tab. 14, S. 53). Es sind Daten für zwei weitere bis-tertiäre Derivate von W84 bekannt, welche unter den analogen Versuchsbedingungen ebenfalls eine neutrale Kooperativität mit [³H]NMS ergeben hatten [79]. Dies weist deutlich darauf hin, dass bis-tertiäre W84-Derivate ein anderes Kooperativitätsverhalten aufweisen als W84. Im Gegensatz zu W84t wiesen diese zitierten Substanzen Cyclohexyl-Substituenten an den Stickstoffen der Zwischenkette auf [79]. Eine der beiden Substanzen war zusätzlich an den Phthalimidsubstituenten methyliert.

W84t und W84 unterscheiden sich weder in ihrer Affinität zum [³H]NMS-besetzten noch zum -freien Rezeptor stark voneinander. In der folgenden Tabelle (Tab. 18) werden alle in dieser Arbeit mit dem Radioliganden [³H]NMS ermittelten Kenndaten von W84 und W84t zusammengefasst. Zusätzlich werden Daten für ein methyliertes W84-Derivat (s. Abb. 19) mit aufgeführt. Dieses ist die erste in der Literatur [78] beschriebene positiv kooperative Substanz aus der Reihe der Alkan-bis-ammonium-Verbindungen.

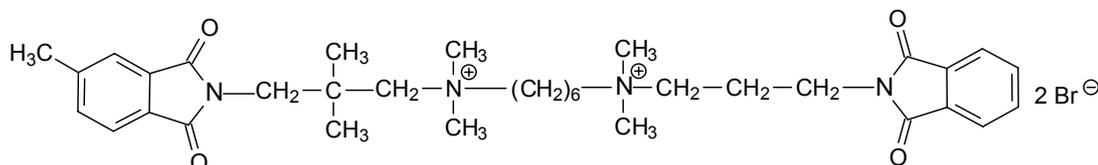


Abb. 19: Methyliertes W84-Derivat [78].

Substanz	Puffer	pEC _{50,diss}	pK _A	pα	p(αK _A)	pEC _{50,diss} - p(αK _A)
W84	Mg, Tris, Cl, P _i	6,08 ± 0,07	6,43 ± 0,26	-0,510 ± 0,015	5,92	0,16
W84t		5,94 ± 0,04 ^{n.s.}	5,94 ± 0,04 ^{n.s.}	0,007 ± 0,085 [*]	5,95	-0,01 ^b
me- thyliertes W84 ^a		7,26 ± 0,02	7,26 ± 0,03	0,19 ± 0,02	7,45	0,19
W84	Na, K, P _i	8,16 ± 0,06	8,07 ± 0,44	-0,294 ± 0,025	7,78	0,38
W84t		7,83 ± 0,05 [*]	7,83 ± 0,05 ^{n.s.}	0,010 ± 0,024 [*]	7,84	-0,01 ^b

Tab. 18: Zusammenfassung der Kenndaten der Substanzen W84 und W84t, sowie eines methylierten W84-Derivates [78] aus Dissoziations- und Gleichgewichtsbindungsexperimenten. Zusätzlich werden die

Daten für $p(\alpha K_A)$ sowie für die Differenz des $pEC_{50,diss}$ -Wertes und $p(\alpha K_A)$ mitaufgeführt.

^a: Aus der Literatur entnommene Daten für ein methyliertes Derivat von W84 (Struktur s. Abb. 19).

^b: Die Analyse der heterologen Interaktionsexperimente erfolgte gemäss der modifizierten Gleichung 13 (s. 24)

^{n.s.}: Diese Parameter unterschieden sich nicht signifikant von den entsprechenden mit W84 erhobenen Werten ($p > 0,05$).

^{*}: Diese Werte unterschieden sich signifikant zwischen den Untersuchungen mit W84 und W84t ($p < 0,05$).

Auf Grund des ternären Modells allosterischer Interaktion [29] wäre zu erwarten, dass im Fall übereinstimmender $pEC_{50,diss}$ - und pK_A -Werte auch kein Unterschied hinsichtlich der Kooperativität von W84 und W84t mit dem orthosterischen Liganden [³H]NMS besteht, da gilt: $\alpha K_A = EC_{50,diss}$ [29]. Die in dieser Arbeit in heterologen Interaktionsexperimenten bestimmten Kooperativitätsdaten von W84t und W84 mit [³H]NMS unterscheiden sich jedoch signifikant.

In der letzten Spalte von Tab. 18 ist die Differenz von $pEC_{50,diss}$ und $p(\alpha K_A)$ aufgeführt. Diese Differenz sollte gemäss dem ternären Modell allosterischer möglichst gering sein. Die mit dem methylierten W84-Derivat (s. Abb. 19, Tab. 18) erhobenen Daten zeigen auf, dass die Differenz $pEC_{50,diss} - p(\alpha K_A)$ selbst bei äusserst geringen Standardfehlern der einzelnen Kenndaten nicht in jedem Fall sehr niedrig ausfällt. Sie liegt für das methylierte W84 bei 0,19. Auf Grund der mit dem methylierten W84-Derivat ermittelten Affinitäten zum Orthoster-besetzten und -freien Rezeptor wäre zu erwarten, dass sich diese Substanz mit [³H]NMS neutral kooperativ verhält, da gilt $\alpha = EC_{50,diss}/K_A$. Doch diese Substanz ist das erste in der Literatur beschriebene organische Derivat von W84, welches sich unter den gewählten Versuchsbedingungen mit [³H]NMS positiv kooperativ verhält. Hiermit wird deutlich, dass die alleinige Bestimmung der Affinitäts-Parameter keine absolute Sicherheit gewährt, das Kooperativitätsverhalten eines Modulators mit dem entsprechenden orthosterischen Liganden vorauszusagen. Dies unterstreicht die Bedeutung der Durchführung von heterologen Interaktionsexperimenten.

Dadurch wird verständlich, dass sich die für die allosterischen Modulatoren W84t und W84 experimentell ermittelten α -Werte signifikant voneinander unterscheiden können, obwohl sich die jeweiligen Daten für die Affinität zu Orthoster-freien und -besetzten Rezeptoren nicht signifikant unterscheiden .

4.2 Zur Notwendigkeit zweier positiver Ladungen als Elemente des Pharmakophors allosterischer Modulatoren vom Alkan-bis-ammonium-Typ

Frühere Untersuchungen zum Pharmakophor allosterischer Modulatoren vom Alkan-bis-ammonium-Typ von M₂-Rezeptoren hatten sich alleine auf Daten aus Dissoziationsexperimenten gestützt. Im vorliegenden Fall wurde deutlich, dass zusätzlich durchgeführte Experimente unter Gleichgewichtsbedingungen weitere Erkenntnisse bezüglich des Pharmakophors solcher Modulatoren ergeben können. Darauf soll im Folgenden eingegangen werden.

In den hier beschriebenen Dissoziationsexperimenten mit W84t hatte sich ein äusserst geringer Unterschied im Vergleich zu den Untersuchungen mit W84 ergeben. In Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen verhielt sich W84t mit [³H]NMS neutral kooperativ, W84 hingegen negativ kooperativ. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass W84 und W84t an Orthoster-besetzten M₂-Rezeptoren mit anderen Epitopen interagieren als am freien Rezeptor. Es ist denkbar, dass das Fehlen der zwei permanenten positiven Ladungen auf die Interaktion mit den Epitopen des Orthoster besetzten Rezeptors keinen Einfluss hat, W84 und das bis-tertiäre Derivat W84t könnten mit den gleichen Epitopen interagieren. Im Falle eines Orthoster-freien Rezeptors könnten nun andere Epitope für die Interaktion eines allosterischen Modulators mit dem Rezeptor "zuständig" sein. Dies könnte dazu führen, dass die untersuchten Testsubstanzen durch ein sehr unterschiedliches Verhalten nur im Falle der Interaktion mit dem Orthoster-freien Rezeptor auffallen. Mittels Punktmutationen im Bereich der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle oder durch Bildung von chimären Rezeptoren [23, 24] könnte diese Hypothese überprüft werden. Der Austausch von einzelnen Aminosäuren des Rezeptorepitopes, mit welchem die Modulatoren an [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren interagieren, durch korrespondierende Aminosäuren anderer Rezeptorsubtypen oder durch Alanin, sollte gemäss diesem Postulat dazu führen, dass sich die Interaktion mit dem Orthoster-freien Rezeptor nicht in dem Mass verändert, wie jene mit dem Orthoster-besetzten Rezeptor.

Auf Grund der vorliegenden Daten aus den Radioligandbindungsstudien mit W84t und W84 erscheint keine Änderung des Pharmakophor-Modelles allosterischer Modulatoren der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle von M₂-Rezeptoren (s. 1.4, S. 5) notwendig. Die vorliegende Arbeit zeigt aber als neue Erkenntnis, dass für die Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor zwei quartäre Stickstoffe keine Voraussetzung sind. W84t

ist unter den hier gewählten Versuchsbedingungen genau so affin wie seine Muttersubstanz. Die positiven Ladungen des Pharmakophor-Modelles könnten bezüglich der Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor gleichgesetzt werden mit unter physiologischen Bedingungen protonierbaren tertiären Stickstoffen.

4.3 Bedeutung heterologer Interaktionsexperimente für die Entwicklung allosterischer Modulatoren

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten aus heterologen Interaktionsexperimenten mit W84t, W84 und den organometallischen W84-Derivaten haben sehr deutlich aufgezeigt, dass hinsichtlich der Entwicklungen allosterischer Modulatoren muskarinischer Rezeptoren vermehrt auch Aspekte der Kooperativität und der Affinität zu Orthoster-freien Rezeptoren miteinbezogen werden sollten. Dadurch könnten genauere Kenntnisse bezüglich der strukturellen Anforderungen an allosterische Modulatoren der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle von M₂-Rezeptoren gewonnen werden. Dies könnte dazu führen, dass unterschiedliche Pharmakophor-Modelle für die Interaktion mit Orthoster-besetzten und -freien Rezeptoren entwickelt werden müssten. Für die Entwicklung eines optimal wirksamen allosterischen Modulators - der sich durch eine hohe Affinität und positive Kooperativität mit einem orthosterischen Liganden auszeichnen könnte - müssten diese Modelle anschliessend zusammengeführt werden.

Zusätzlich könnten heterologe Interaktionsexperimente durchgeführt werden, um genauere Kenntnisse über die Topologie der allosterischen Bindungsstelle zu gewinnen. Denn wie erwähnt, scheinen für die Interaktion allosterischer Modulatoren mit Orthoster-freien Rezeptoren andere Epitope verantwortlich zu sein, als für die Interaktion mit Orthoster-besetzten Rezeptoren.

4.4 Atypisches Verhalten der organometallischen Verbindungen in Radioligandbindungsstudien

Auf die mit W84t durchgeführten Untersuchungen zur Bedeutung der zwei kationischen Zentren allosterischer Modulatoren vom Alkan-bis-ammonium-Typ aufbauend, wurden mono-quartäre Si-haltige Derivate des Prototypmodulators W84 ausgewählt und in Radioligandbindungsstudien eingesetzt. Diese sind strukturell von W84 abgeleitet, weisen jedoch im Gegensatz zu W84 nur eine permanente positive Ladung in Form eines

quartären Stickstoffes auf. Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss die vollständige Elimination einer positiven Ladung auf die Wirksamkeit dieser Substanzen in Dissoziations- und Gleichgewichtsbindungsexperimenten hat.

Bemerkenswerterweise hat sich herausgestellt, dass sich diese organometallischen Verbindungen in Radioligandbindungsstudien an M_2 -Rezeptoren mit dem Antagonisten [3H]NMS sehr deutlich abweichend von der Muttersubstanz W84 und dem bis-tertiären Derivat W84t verhalten.

Anschliessend soll auf folgende Punkte eingegangen werden, die zur Hypothese führen, dass es sich bei den hier untersuchten Si-haltigen Substanzen um atypische allosterische Modulatoren der [3H]NMS-Bindung an muskarinischen Rezeptoren handelt:

1. Die Gleichgewichtsbindung von [3H]NMS wird durch diese Substanzen im Gegensatz zu W84 sehr stark gefördert (s. 3.2.2.2, S. 55).
2. Heterologe Interaktionsexperimente mit verschiedenen Radioligandkonzentrationen zeigten teilweise abweichend vom ternären Modell allosterischer Interaktion eine Abhängigkeit der Kenndaten für $p\alpha$ und pK_A von der Radioligandkonzentration (s. 3.2.5.2, S. 64).
3. Die Substanz W84-Si_{1/6} fiel auf durch eine fehlende Pufferabhängigkeit in den Dissoziationsexperimenten (s. 3.2.2.1, S.54).
4. In Dissoziationsexperimenten wichen die Steilheiten der Konzentrations-Wirkungskurven einiger getesteter Substanzen sehr deutlich von einem Wert von $n_H = -1$ ab (s. 3.2.5.1, S. 62).
5. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit bis-quartären Alkan-bis-ammonium-Verbindungen konnte durch den Austausch von Phthalimid- durch Naphthalimid-Substituenten bei den Si-haltigen Substanzen keine Steigerung der Affinität zum [3H]NMS besetzten M_2 -Rezeptor beobachtet werden (s. 3.2.5.1, S. 62).

4.4.1 Starke Förderung der Gleichgewichtsbindung von [3H]NMS durch die organometallischen Modulatoren

Die organometallischen W84-Derivate zeigten in Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen mit einer Ausnahme (W84-Si_{1/8}, $p\alpha = -0,156$) an M_2 -Rezeptoren eine deutliche Förderung der [3H]NMS-Gleichgewichtsbindung. Die Förderung der Gleichgewichtsbindung beruht, wie unter 3.2.4 (S. 60) berichtet, auf einer Steigerung der Affinität von [3H]NMS zu M_2 -Rezeptoren in Gegenwart der eingesetzten Testsubstanzen und nicht

auf einer Erhöhung der Anzahl Bindungsstellen. In dieser Arbeit wurden somit erstmals Derivate von Alkan-bis-ammonium-Verbindungen gefunden, die durch den alleinigen N^+/Si -Austausch in der Lage sind, die $[^3H]NMS$ -Gleichgewichtsbindung sehr stark zu fördern. Kürzlich publizierte Daten zu weiteren strukturmodifizierten W84-Derivaten (s. Abb. 19, S. 79, Abb. 20, S. 84) zeigten unter analogen Versuchsbedingungen ebenfalls eine positive Kooperativität zwischen $[^3H]NMS$ und strukturell modifizierten Alkan-bis-ammonium-Verbindungen [78, 83].

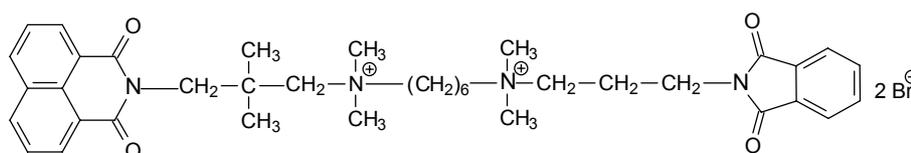


Abb. 20: Naphthalimid-substituiertes Derivat von W84 [83].

Doch die beschriebenen bis-quartären W84-Derivate, die sich mit $[^3H]NMS$ positiv kooperativ verhielten, wiesen deutlich grössere strukturelle Modifikationen auf, als die hier eingesetzten organometallischen Verbindungen. Zusätzlich fiel die Gleichgewichtsbindungsförderung von $[^3H]NMS$ durch die organometallischen Modulatoren wesentlich stärker aus, als durch die strukturell stärker abgewandelten W84-Derivate, die in der Literatur beschrieben sind [78, 83].

4.4.2 Teilweise Abhängigkeit der Parameter $p\alpha$ und pK_A von der eingesetzten Radioligandkonzentration

Das aussergewöhnliche Verhalten der organometallischen Verbindungen in Gleichgewichtsbindungsstudien sollte in weiteren heterologen Interaktionsexperimenten in Mg, Tris, Cl, Pi-Puffer untersucht werden. Dazu sollten neben den durchgeführten Versuchen mit einer $[^3H]NMS$ -Konzentration von 0,2 nM Versuche mit 0,1 nM und 0,05 nM $[^3H]NMS$ durchgeführt werden. Durch eine Reduktion der eingesetzten Radioligandkonzentration sollte - gemäss dem ternären Modell allosterischer Interaktion - der bindungsfördernde Effekt der Si-haltigen W84-Derivate stärker hervorgehoben werden. Die Zunahme der fraktionellen Rezeptorbesetzung bei geringerer Radioligandkonzentration in Abwesenheit des allosterischen Modulators sollte nach Zugabe eines Förderers der Gleichgewichtsbindung noch wesentlich deutlicher ausfallen.

Die mit diesen reduzierten Radioligandkonzentrationen durchgeführten Untersuchungen ergaben, wie unter 3.2.3 (s. S. 56) und 3.2.5 (s. S. 62) beschrieben, kein eindeutiges

Bild bezüglich Quantifizierbarkeit dieser Bindungsförderung. Es zeigte sich eine Abhängigkeit des Kooperativitätsfaktors und der pK_A -Werte von der eingesetzten Radioligandkonzentration. Zwar waren die Unterschiede zwischen den Kenndaten $p\alpha$ und pK_A in Abhängigkeit von der Radioligandkonzentration nicht für jede Substanz statistisch signifikant, doch konnte immer eine deutliche Tendenz festgemacht werden, und zwar förderten die allosterischen Modulatoren die [^3H]NMS-Bindung mit sinkender Radioligandkonzentration weniger stark, als auf Grund des ternären Modells allosterischer Interaktion zu erwarten wäre.

Die Streuung der Kenndaten $p\alpha$ und pK_A für die einzelnen Experimente war aussergewöhnlich gross, obwohl die Messdaten nicht durch starke Streuung auffielen. Dies deutet darauf hin, dass Schwierigkeiten hinsichtlich der Regressionsanalyse gemäss dem ternären Modell bestehen. Wie unter 1.3 (S. 3) beschrieben, beeinflussen allosterische Modulatoren beide Prozesse, die die Gleichgewichtsbindung eines orthosterischen Liganden an seine spezifische Bindungsstelle bestimmen, die Ligand-Assoziation und -Dissoziation. Im Falle von positiver Kooperativität überwiegt die Dissoziationshemmung die Hemmung der Assoziation. Es ist vorstellbar, dass die neuartigen organometallischen Modulatoren einen viel stärkeren Einfluss auf die Dissoziation, als auf die Assoziation ausüben, so dass die experimentell gefundenen Kurven für die Beeinflussung der [^3H]NMS-Gleichgewichtsbindung die Assoziationshemmung nicht mehr widerspiegeln. Dies könnte dazu führen, dass eine Regressionsanalyse der Messdaten aus Gleichgewichtsbindungsexperimenten nicht in der Lage ist, die Affinität der Modulatoren zum Orthoster-freien Rezeptor mit Sicherheit zu bestimmen, was die hier beobachtete starke Streuung von $p\alpha$ und pK_A erklären könnte.

Die Analyse der ermittelten Daten der Gleichgewichtsbindungsexperimente gemäss der vier Parameter logistischen Gleichung nach Hill hat aufgezeigt, dass sich die Wendepunkte der resultierenden Konzentrations-Wirkungs-Kurven - abgesehen von zwei Ausnahmen (s. Tab. 16, S. 68) - nicht signifikant von den $EC_{50,diss}$ -Werten der entsprechenden Substanzen unterscheiden. Dies deutet darauf hin, dass die angeführte Erklärung für die Analysenschwierigkeit zutreffen könnte und für die hier beschriebenen Substanzen ein Effekt auf die [^3H]NMS-Assoziation im beobachteten Konzentrationsbereich durch die Durchführung von Gleichgewichtsbindungsexperimenten kaum erfassbar ist. Kinetische Assoziationsexperimente, wie sie in der Literatur beschrieben sind [86], könnten eine Möglichkeit darstellen, die Affinität der Modulatoren zum Orthoster-freien

Rezeptor ($EC_{50,ass}$) zu bestimmen. Der Kooperativitätsfaktor α liesse sich anschliessend berechnen.

Unabhängig von durchgeführten Analysen ist jedoch zu beobachten, dass die maximale prozentuale Bindungsförderung bei Reduktion der eingesetzten Radioligandkonzentration keine so starke Zunahme erfährt, wie das ternäre Modell allosterischer Interaktion erwarten lässt.

Auch die simultanen Regressionsanalysen gemäss dem ternären Modell allosterischer Interaktion waren nicht in der Lage, die Kooperativitätsfaktoren und die Parameter für die Affinität zum Orthoster-freien Rezeptor unabhängig von der eingesetzten Radioligandkonzentration zu quantifizieren (s. 3.2.5.3, S. 69).

Dieses beobachtete Phänomen der Abhängigkeit der $p\alpha$ - und pK_A -Werte von der eingesetzten Radioligandkonzentration zeugt von dem atypischen Verhalten der organometallischen Verbindungen.

In keinem der durchgeführten Versuche hätte das ungewöhnliche Ergebnis dadurch erklärt werden können, dass auf Grund der starken positiven Kooperativität die fraktionale Rezeptorbesetzung im Bereich des oberen Plateaus an Grenzen gestossen wäre und dadurch möglicherweise das Ergebnis verfälscht worden wäre. Ebenfalls bestand kein technisch-experimentelles Problem hinsichtlich der Wegbindung des eingesetzten Radioliganden. In sämtlichen Versuchen wurden nur maximal 10% der eingesetzten Radioligandmenge gebunden.

4.4.3 Fehlende Pufferabhängigkeit der allosterischen Wirkung des neuartigen allosterischen Modulators W84-Si₁/6

Wie bereits beschrieben (s. 3.2.2.1, S. 54), konnte in dieser Arbeit durch Veränderung des Inkubationsmediums in den Dissoziationsexperimenten keine Veränderung hinsichtlich der Affinität der Substanz W84-Si₁/6 zum [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptor beobachtet werden, die $pEC_{50,diss}$ -Werte liegen bei $6,72 \pm 0,09$ (Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer) und bei $6,85 \pm 0,11$ (Na, K, P_i-Puffer). Nach bestem Wissen ist bis zu diesem Zeitpunkt keine Substanz beschrieben, deren Bindung an [³H]NMS-M₂-Rezeptor-Komplexe keine Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen, die in dieser Arbeit gewählt worden sind, zeigt. Die Verschiebungsfaktoren für klassische Liganden der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle von M₂-Rezeptoren lauten wie folgt: Gallamin: 89 [66];

Alcuronium: 14 [66]; W84: 120 (diese Arbeit). Für den atypischen Modulator Duo3, eine Bispyridinium-Verbindung, wird in der Literatur ein Verschiebungsfaktor von 3,2 als geringster Wert für eine Verschiebung zwischen $EC_{50,diss}$ in Mg, Tris, Cl, P_i -Puffer und $EC_{50,diss}$ in Na, K, P_i -Puffer beschrieben [66].

Mg^{2+} -Ionen sind in der Lage, den dissoziationsverzögernden Effekt von W84 kompetitiv zu beeinflussen, geringfügiger wird auch der entsprechende Effekt des W84-Derivates Chin3/6 [85], einem weiteren Modulator der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle durch Mg^{2+} -Ionen beeinflusst. Dies führte zur Annahme, dass Mg^{2+} mit der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle an muskarinischen M_2 -Rezeptoren interagiert [26].

Da W84-Si₁/6 keine Pufferabhängigkeit gezeigt hat, ist anzunehmen, dass dieser allosterische Modulator eine andere Form der Interaktion mit der allosterischen Bindungsstelle am muskarinischen M_2 -Rezeptor aufweist, respektive mit anderen Epitopen interagiert als die Muttersubstanz W84. Um diese Frage beantworten zu können, dürften Untersuchungen an punktmutierten muskarinischen M_2 -Rezeptoren nützlich sein [23]. Es wäre auch denkbar, unter Einsatz des tritiiert vorliegenden allosterischen Modulators der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle [³H]Dimethyl-W84 [67] Konkurrenzexperimente mit den organometallischen Modulatoren durchzuführen. Würden diese neuartigen Modulatoren die gemeinsame allosterische Bindungsstelle besetzen, könnte eine Reduktion der Bindung von [³H]Dimethyl-W84 beobachtet werden.

Inwiefern sämtliche in dieser Arbeit untersuchten Si-haltigen Substanzen in ihrem Bindungsverhalten zur allosterischen Bindungsstelle durch die Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen unbeeinflusst bleiben, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht und könnte Inhalt weiterer Untersuchungen sein.

Die Tatsache, dass die Affinität eines allosterischen Modulators zum Orthosterbesetzten Rezeptor keine Pufferabhängigkeit zeigt, ist ein weiterer Hinweis dafür, dass sich die organometallischen Verbindungen abweichend von der Muttersubstanz W84 verhalten.

4.4.4 Hohe Steilheit von Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Dissoziationsuntersuchungen

Wie unter *Ergebnisse* beschrieben, zeigte sich nicht nur in den heterologen Interaktionsexperimenten mit den Si-substituierten allosterischen Modulatoren ein komplexes Verhalten dieser Substanzgruppe. In Dissoziationsexperimenten zeichneten sich sämt-

liche Substanzen durch eine im Vergleich zu W84 bis um 12,6-fach (W84-NPSi5N⁺P) höhere Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor aus. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven weisen zudem für einige getestete Substanzen eine ungewöhnlich hohe Steilheit auf.

Dies betraf sowohl die Untersuchungen mit aus Hausschweinherzventrikelgewebe gewonnenen muskarinischen M₂-Rezeptoren als auch die Untersuchungen der Substanz W84-NPSi5N⁺NP mit den humanen muskarinischen Rezeptorsubtypen M₁ bis M₅, die aus stabil transfizierten CHO-Zellen gewonnen worden waren. Mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = -3,25 \pm 1,11$ verlief die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Dissoziationsexperimente mit der Substanz W84-NPSi5N⁺NP an humanen M₂-Rezeptoren am steilsten. Dieses abnorme allosterische Verhalten ist ein weiterer Hinweis dafür, dass diese Substanzen auf eine atypische Weise mit den muskarinischen Rezeptoren allosterisch interagieren.

Vom Massenwirkungsgesetz abweichende grosse Steigungen von Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus Dissoziationsuntersuchungen wurden nicht nur für strukturverwandte Substanzen von Brucin [28], sondern bereits in früheren Arbeiten für den Acetylcholinesterase-Hemmstoff Tacrin unter den gleichen Versuchsbedingungen an seinen M₂-Rezeptoren berichtet ($n_H = -1,8$) [66]. Tacrin ist wesentlich kleiner und weist im Vergleich zu W84 im protonierten Zustand nur einen positiv geladenen Stickstoff auf. Die Grösse eines Tacrin-Moleküls sowie die einfache positive Ladung legten die Vermutung nahe, dass zwei Tacrin-Moleküle in der allosterischen Bindungsstelle Platz finden könnten [80].

Inwieweit für den vorliegenden Fall die Erklärung zutreffen könnte, die für steile Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Tacrin in Dissoziationsexperimenten die Interaktion zweier Moleküle des allosterischen Modulators mit dem orthosterischen Liganden für möglich hält [81, 80], ist unklar. Die Si-substituierten W84-Derivate weisen wie Tacrin ebenfalls nur einen quartären Stickstoff auf. Doch bezüglich ihrer Grösse stimmen sie eher mit W84 überein, so dass das Argument der Molekülgrösse wegfällt. Zusätzlich spricht gegen diese Hypothese, dass die Affinität der Si-haltigen W84-Derivate zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor im Gegensatz zu Tacrin deutlich höher ist, als die von W84. Auch sind die Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Dissoziationsexperimente in dieser Arbeit teilweise wesentlich steiler ausgefallen, als diejenigen für Tacrin in früheren Arbeiten. Dies könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass ein gänzlich anderer Wirkmechanismus vorliegt als für Tacrin postuliert.

Inwiefern Rezeptordimerisierungen - wie sie für unklareres allosterisches Verhalten in Betracht gezogen werden [31] - für das hier in Radioligandbindungsstudien beobachtete Verhalten eine Rolle spielen könnten, kann auf Grund der vorliegenden Daten nicht beurteilt werden.

Kürzlich publizierte Arbeiten weisen darauf hin, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zusätzlich zu den G-Proteinen mit einer Vielzahl von weiteren Proteinen, sogenannten "assozierten Proteinen" in Interaktion treten können [63]. Welchen Einfluss diese assoziierten Proteine im komplexen System der allosterischen Modulation von Muskarinrezeptoren durch die organometallischen Verbindungen ausüben, ist nicht bekannt.

In eine völlig andere Richtung könnte der Erklärungsansatz weisen, der ausgeht von den Beobachtungen einer Erniedrigung der Phasenübergangstemperatur in Untersuchungen mit der als Beispiel gewählten Substanz W84-Si₁/5. Orientierende Versuche mit dieser Substanz, die zum Ziel hatten, deren Interaktion mit Phospholipid-Membranen zu charakterisieren [82], hatten unter den gewählten Bedingungen einen deutlichen Unterschied bezüglich des Einflusses von W84-Si₁/5 und W84 auf die Phasenübergangstemperatur ergeben. Basierend auf diesen Ergebnissen kann vermutet werden, dass die organometallischen W84-Derivate deutlich stärker mit Interphasen interagieren können, als eine Vielzahl weiterer untersuchter Substanzen wie beispielsweise W84.

Die ausserordentlich hohe beschriebene Kurvensteilheit einiger Substanzen in den Dissoziationsexperimenten könnte darin begründet sein, dass ein gewisser Anteil der allosterischen Modulatoren in die Membranen eingelagert wird. Man könnte sich vorstellen, dass diese Einlagerung sättigbar wäre. Dies würde dazu führen, dass die effektiv für die Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation vorhandene Konzentration an allosterischem Modulator geringer ist, als die nominell vorhandene, und dass sich dies besonders bei kleinen Alloster-Konzentrationen auswirkt. Messungen bei niedrigen Allosterkonzentrationen würden also eine geringere Dissoziationsverzögerung ergeben, als für die nominell eingesetzte Konzentration zu erwarten. Mit steigender Allosterkonzentration und Sättigung der unspezifischen Bindung würde dieses Phänomen zurücktreten. Dies würde fälschlicherweise steile Konzentrations-Wirkungs-Kurven ergeben. Wie bereits beschrieben (s. 3.2.5.2, S. 64) wurden auch in den einzelnen heterologen Interaktionsexperimenten teilweise steile, von $n_H = +1$ abweichende Konzentrations-Wirkungs-Kurven beobachtet. Es ist denkbar, dass - wie unter 4.4.2 (S. 84) beschrieben - der Einfluss der Dissoziationsverzögerung den Effekt auf die Assoziations-

hemmung stark überwiegt und sich diese steilen Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Dissoziationsexperimente in den Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Gleichgewichtsbindungsexperimente niederschlagen.

Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve der Substanz W84-Si₁/5, für welche beispielhaft der Effekt der Senkung der Phasenübergangstemperatur beobachtet worden ist, ist in den Dissoziationsexperimenten nicht durch eine von $n_H = -1$ abweichende Steigung aufgefallen, doch auf Grund der physikochemischen Eigenschaften der Naphthalimid-substituierten Verbindungen ist zu erwarten, dass diese noch stärker in die Membranen eingelagert werden könnten. Es ist denkbar, dass sich dieser Effekt erst ab einem bestimmten Ausmass erkennbar in Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus Dissoziationsexperimenten niederschlägt.

Für organische W84-Derivate sind keine mit den hier ermittelten Daten vergleichbaren, von $n_H = -1$ abweichende Steigungen von Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus Dissoziationsexperimenten bekannt, wiederum ein deutliches Indiz für atypisches Verhalten der Si-haltigen W84-Derivate.

4.4.5 Der Austausch von Phthalimid-Substituenten durch Naphthalimid-substituenten bewirkt bei den organometallischen Modulatoren keine Veränderung der Affinität zu [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren

Für verschiedene Naphthalimid-substituierte bis-quartäre W84-Derivat ist berichtet worden, dass diese in kinetischen Experimenten die Dissoziation von [³H]NMS-M₂-Rezeptor-Komplexen signifikant stärker verzögern als die Muttersubstanz W84 [83, 84]. Die Verschiebungsfaktoren der EC_{50,diss}-Werte in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer lagen bei 12 bei einseitiger Naphthalimid-Substitution und bei 98 im Falle von beidseitiger Naphthalimid-Substitution. In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte Si-haltige W84-Derivate untersucht, die an einer oder zwei Positionen einen Phthalimid/Naphthalimid-Austausch erfahren hatten und eine Zwischenkettenlänge von fünf Methylen-Gruppen aufwiesen. Erstaunlicherweise konnte in dieser Arbeit in Dissoziationsexperimenten kein signifikanter Affinitätsunterschied der getesteten Substanzen W84-PSi5N⁺NP, W84-NPSi5N⁺P und W84-NPSi5N⁺NP im Vergleich zur Ausgangssubstanz W84-Si₁/5 beobachtet werden (s. Tab. 16, S. 68). Hingegen veränderte sich die Steigung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven im Falle eines Austausches des Phthalimid-Substituenten auf der Si-haltigen Seite des Moleküls statistisch signifikant im Vergleich zur Ausgangssubstanz.

Eine Veränderung des Steigungskoeffizienten ist für den Phthalimid/Naphthalimid-Austausch der Alkan-bis-ammonium-Verbindungen nicht beobachtet worden.

Auch diese Daten weisen deutlich darauf hin, dass es sich bei dieser Gruppe allosterischer Modulatoren nicht nur strukturell um eine neuartige Substanzklasse handelt, sondern dass sich diese Substanzen in Radioligandbindungsuntersuchungen auch atypisch verhalten.

4.4.6 Mögliche Erklärungen für die beobachteten atypischen Phänomene

Die beschriebenen Ergebnisse aus den Untersuchungen mit den organometallischen allosterischen Modulatoren haben deutlich aufgezeigt, dass diese neuartigen Substanzen hochpotente Förderer der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung sind. Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass sich diese Substanzen in Radioligandbindungsstudien deutlich abweichend von der Ausgangssubstanz dieser Studien, dem Prototypmodulator W84, sowie von verschiedenen bis-quartären Derivaten von W84 verhalten (s. beispielsweise [35, 78, 83, 84]).

In der Literatur wurde von einem Liganden berichtet (Staurosporin-Derivat KT5720), der seine allosterische Wirkung am muskarinischen M₁-Rezeptor über eine zweite allosterische Bindungsstelle entfaltet [28]. Diese Substanz zeichnete sich in Radioligandbindungsuntersuchungen durch ein sehr komplexes Verhalten in [³H]NMS-Dissoziationsexperimenten aus. Eine weitere strukturverwandte, mit [³H]NMS stark positiv kooperativ wirksame Substanz (KT5823) war zuvor in Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen durch ausserordentlich steile, von n_H = 1 abweichende Konzentrations-Wirkungs-Kurven aufgefallen [28]. Ausgehend von diesen Ergebnissen äussern die Autoren, dass mit dem zur Zeit bekannten „ternären Modell allosterischer Interaktion“ nicht alle Daten erklärt werden können. Die Daten zu KT5720 und KT5823, sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten darauf hinweisen, dass das aktuelle „ternäre Modell allosterischer Interaktion“ nicht in der Lage ist, sämtliche komplexen allosterische Effekte ausreichend zu beschreiben. Es wäre denkbar, dass alle oder zumindest einige der Si-haltigen Verbindungen zu der Gruppe dieser „atypischen Modulatoren“ gehören, die mit einer von der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle abweichenden topographischen Region der Rezeptormoleküle interagieren.

Wie bereits beschrieben (s. 4.4.4, S. 87), konnte für die in dieser Arbeit beschriebene Substanz W84-Si_{1/5} eine deutliche Interaktion mit Interphasen nachgewiesen werden.

Eine weitere mögliche Hypothese für die in Radioligandbindungsuntersuchungen beobachteten Phänomene ist, dass diese neuartigen allosterischen Modulatoren auf eine bis jetzt nicht bekannte Weise in der Lage sind, mit der orthosterischen Bindungsstelle an muskarinischen M_2 -Rezeptoren allosterisch zu interagieren. Möglich wäre, dass sich diese Substanzen teilweise in die Membranen einlagern und die Rezeptoren auf diese Weise beeinflussen.

Das hier beschriebene atypische Verhalten der organometallischen Modulatoren wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

4.5 Affinität von [^3H]NMS zu muskarinischen Rezeptoren unterschiedlicher Spezies und zu verschiedenen Subtypen; Vergleich mit Literaturbefunden

Die Affinität des eingesetzten Radioliganden [^3H]NMS zu den aus verschiedenen Spezies stammenden muskarinischen M_2 -Rezeptoren unterschiedlich sich zwischen den in der vorliegenden Arbeit gewählten Versuchsbedingungen. Der pK_D -Wert für die Homogenate aus Hausschweinherzventrikelgewebe beträgt $9,37 \pm 0,05$, die Affinität zu den humanen M_2 -Rezeptoren, die in CHO-Zellen exprimiert worden waren, liegt bei $\text{pK}_D = 9,10 \pm 0,08$. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. In der Literatur werden verschiedene unter den entsprechenden Versuchsbedingungen mit Homogenaten aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein ermittelte Werte für pK_D aufgeführt (beispielsweise: 9,00 [85]; $9,33 \pm 0,06$ [86]). Die in dieser Arbeit ermittelten Parameter für die Affinität von [^3H]NMS zu humanen und suinen M_2 -Rezeptoren liegen im Bereich dieser Werte. Folglich wird angenommen, dass die in dieser Arbeit für [^3H]NMS an M_2 -Rezeptoren erhobenen pK_D -Werte im Bereich der experimentellen Streuung liegen.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Affinität von [^3H]NMS zu sämtlichen muskarinischen Rezeptor-Subtypen in Mg, Tris, Cl, P_i -Puffer bestimmt. Dabei wurden teilweise signifikante Unterschiede bezüglich der Affinität von [^3H]NMS zu den verschiedenen humanen Muskarinrezeptor-Subtypen gemessen (s. Tab. 12, S. 47). Dies war auf Grund des hohen Konservierungsgrades im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle nicht unbedingt zu erwarten. In der folgenden Tabelle werden die hier erhobenen Daten für die Affinität von [^3H]NMS Daten aus der Literatur [87, 88] gegenübergestellt.

Rezeptorsubtyp	pK _D (Rang) ^a	pK _D (Rang) [87] ^b	pK _D (Rang) [88] ^c
M ₁	9,20 (2.)	10,10-9,82 (2.)	10,27 (3.)
M ₂	9,10 (4.)	9,70-9,39 (4.)	10,08 (4.)
M ₃	9,19 (3.)	9,82-9,60 (3.)	10,28 (2.)
M ₄	9,34 (1.)	10,30-10,00 (1.)	10,59 (1.)
M ₅	8,96 (5.)	9,30-9,15 (5.)	9,97 (5.)

Tab. 19 Gegenüberstellung von in dieser Arbeit ermittelten pK_D-Werten von [³H]NMS und Daten aus der Literatur. Zusätzlich wird eine Rangfolge der Affinitätsparameter angegeben, wobei nicht auf statistische Unterschiede geachtet wird.

^a: 3 mM MgHPO₄, 50 mM TrisHCl (pH 7,3, 37°C), Standardbedingungen für diese Arbeit.

^b: Keine Angabe zu den Inkubationsmedien, Daten stammen aus verschiedenen Arbeiten, wobei die jeweiligen Daten nicht direkt einer Arbeit zugeordnet werden.

^c: 25 mM Na-Phosphatpuffer mit 5 mM MgCl (pH 7,4, 22°C).

Die in der vorliegenden Arbeit erhobene Affinität für [³H]NMS zu den humanen M₁-M₅-Rezeptoren ist deutlich geringer, als die in der Literatur beschriebene (s. Tab. 19). Doch wie unter 3.1 (s. S. 44) aufgeführt, hängt der pK_D-Wert vom gewählten Puffermedium ab. So war in dieser Arbeit beispielsweise die Affinität von [³H]NMS zu M₂-Rezeptoren in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer (pK_D = 9,37) signifikant geringer, als in Na, K, P_i-Puffer (pK_D = 10,14). Daher erscheint es nicht von Bedeutung, dass hier sämtliche gemessenen Affinitäten zu M₁-M₅-Rezeptoren geringer ausfielen als in der Literatur unter anderen Versuchsbedingungen ermittelte Werte. Wie die Gegenüberstellung von eigenen Daten und Literaturwerten deutlich zeigt, ergibt sich kein relevanter Unterschied in der Rangfolge bezüglich der Affinität von [³H]NMS zu den einzelnen Rezeptorsubtypen. Dies wird als Bestätigung dafür angesehen, dass die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode zur Bestimmung der Affinität von [³H]NMS zu den einzelnen Rezeptorsubtypen (s. 2.3.2.2.2, S. 21) valide ist.

4.6 Subtypeselektivität von W84-NPSi5N⁺NP und Bedeutung der organometallischen Modulatoren für die weitere Entwicklung allosterischer Modulatoren muskarinischer Rezeptoren

Die Substanz W84-NPSi5N⁺NP wurde beispielhaft ausgewählt, um ein mögliches subtypspezifisches Verhalten dieser neu entwickelten Substanzgruppe zu untersuchen. Dissoziationsuntersuchungen an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen haben deutliche Unterschiede hinsichtlich der Affinität dieser Substanz zu den [³H]NMS-besetzten Rezeptoren ergeben und zwar in der Rangfolge $M_4 > M_2 \geq M_1 > M_3 > M_5$.

Mit dem W84-Derivat Dimethyl-W84, welches auch in tritierter Form eingesetzt wird [67], wurden Dissoziationsexperimente mit dem Radioliganden [³H]NMS an den muskarinischen Rezeptoren vom Subtyp M_2 , M_4 und M_5 durchgeführt [89]. Hierbei war die Rangfolge bezüglich der Affinität dieses Alkan-bis-ammonium-Derivates die folgende: $M_2 > M_4 > M_5$. Somit zeigte sich auch in diesen Untersuchungen, dass sich die organometallischen Modulatoren deutlich abweichend von Alkan-bis-ammonium-Verbindungen verhalten.

Wesentlich bedeutender noch als die Ergebnisse der Dissoziationsuntersuchungen an M_1 - bis M_5 -Rezeptoren sind die Daten der Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen, die mit W84-NPSi5N⁺NP an allen fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen durchgeführt worden sind. In dieser Arbeit ist mit der Substanz W84-NPSi5N⁺NP im beobachteten Konzentrationsbereich erstmals eine subtypselektive Förderung der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung an muskarinischen Rezeptoren beobachtet worden. Nur an M_2 -Rezeptoren wird die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung gefördert, an den anderen vier muskarinischen Rezeptorsubtypen scheint unter Gleichgewichtsbedingungen bei den beobachteten Konzentrationen neutrale Kooperativität vorzuliegen (M_1 , M_4) oder noch keine Interaktion mit dem Rezeptor stattzufinden (M_3 , M_5).

Auf welche Weise die hier getesteten Substanzen mit Acetylcholin in heterologen Interaktionsexperimenten interagieren, ist nicht bekannt und sollte Inhalt weiterführender Untersuchungen sein.

Die in dieser Arbeit erstmals beschriebene starke Förderung der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung an muskarinischen Rezeptoren in Kombination mit einer hohen Affinität zu diesen Rezeptoren unterstreicht sehr deutlich die Bedeutung dieser neuartigen atypischen organometallischen Modulatoren für die Entwicklung hochpotenter subtypselektiver allosterischer Modulatoren der Muskarin-Rezeptor-Familie.

5 Zusammenfassung

Die "gemeinsame allosterische Bindungsstelle" von M₂-Rezeptoren ist hinsichtlich der Beeinflussbarkeit durch strukturell unterschiedliche Modulatoren gut charakterisiert. So konnten die Epitope bestimmt werden, mit welchen eine Vielzahl allosterischer Modulatoren an Orthoster-besetzten Rezeptoren interagieren. Ebenfalls wird ein Pharmakophor-Modell für Modulatoren vom Alkan-bis-ammonium-Typ postuliert, welches auf Experimenten zur Untersuchung des Dissoziationsverlaufes von [³H]NMS-Rezeptor-Komplexen basiert.

In dieser Arbeit ist es gelungen, dieses Pharmakophor-Modell durch Dissoziations-Untersuchungen mit dem bis-tertiären Derivat W84t des Prototyp-Modulators W84 (*N,N'*-Bis[3-(1,3-dihydro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)propyl]-*N,N,N',N'*-tetramethyl-1,6-hexan-diammoniumdibromid]) weiter zu spezifizieren. In diesen Experimenten hatte sich im Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer kein und in Na, K, P_i-Puffer ein minimaler Unterschied dieser zwei Modulatoren im Bezug auf deren Potenz zur Verzögerung der Dissoziation von Orthoster-Rezeptor-Komplexen ergeben. Die zwei im postulierten Pharmakophor-Modell enthaltenen positiven Ladungen dürften folglich auch durch protonierbare tertiäre Stickstoffe ersetzbar sein.

W84 verhielt sich in beiden eingesetzten Puffer-Milieus negativ kooperativ mit [³H]NMS, im Gegensatz dazu zeigten W84t und [³H]NMS unter den gleichen Versuchsbedingungen neutrale Kooperativität.

Eine Weiterentwicklung von W84t, welches keine permanent positiv geladenen Stickstoffe aufweist, stellen die in dieser Arbeit erstmals untersuchten organometallischen W84-Derivate dar. Diese weisen einen quartären Stickstoff auf, die zweite positive Ladung wurde ersetzt durch ein Silicium-Atom. Zudem unterscheiden sich die Si-haltigen W84-Derivate voneinander bezüglich der Länge der Zwischenketten und/oder der Substitution von Phthalimid- durch Naphthalimid-Reste.

Die neuartigen allosterischen Modulatoren fielen in den kinetischen und Gleichgewichtsbindungsexperimenten durch ihr atypisches, vom Verhalten der Alkan-bis-ammonium-Verbindungen und vom ternären Modell allosterischer Interaktion abweichendes Verhalten auf. Das atypische Verhalten ist durch folgende Punkte gekennzeichnet:

1. eine starke Förderung der [³H]NMS Gleichgewichtsbindung;
2. eine teilweise Abhängigkeit der Kenndaten $p\alpha$ und pK_A von der eingesetzten Radioligandkonzentration;
3. eine fehlende Puffer-Abhängigkeit der Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation;
4. hohe Steilheiten der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Hemmung der [³H]NMS-Dissoziation;
5. einen fehlenden Einfluss des Phthalimid/Naphthalimid-Austausches auf die Affinität der Substanzen zu [³H]NMS-besetzten M_2 -Rezeptoren.

Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass die hier untersuchten Si-haltigen Substanzen M_2 -Rezeptoren auf andere Weise allosterisch beeinflussen als der Prototyp-Modulator W84 und seine organischen Derivate.

Erstmals konnte in dieser Arbeit mit der Substanz W84-NPSi5N⁺NP ein allosterischer Modulator beschrieben werden, der in der Lage ist, die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung an humanen M_2 -Rezeptoren absolut subtypeselektiv zu fördern. Das subtypeselektive Verhalten unterstreicht neben den oben beschriebenen Phänomenen deutlich die Bedeutung der neuartigen organometallischen allosterischen Modulatoren als potente Werkzeuge für die weitere Entwicklung allosterischer Modulatoren muskarinischer Rezeptoren.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Hargrave PA and McDowell JH (1992) Rhodopsin and phototransduction: a model system for G protein-linked receptors. *FASEB J.* **6**: 2323-2331
- [2] Shichida Y and Imai H (1998) Visual pigment: G-protein-coupled receptor for light signals. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**: 1299-1315
- [3] Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal Structure of rhodopsin: a G-protein-coupled receptor. *Science* **289**: 739-745
- [4] Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K, Kojima M, Hisayuki M, Hirose T, and Numa S (1986) Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **323**: 411-416
- [5] Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, and Brann MR (1987) Identification of a family of muscarinic Acetylcholine receptor genes. *Science (Wash DC)* **237**: 527-532
- [6] Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Smith DH, Ramachandran J, and Capon DJ (1987) Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J.* **6**: 3923-3929
- [7] Wess J (1996) Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Neurobiology* **10**: 69-99
- [8] Dörje F, Levey AI, and Brann MR (1991) Immunological detection of muscarinic receptor subtype proteins (m1-m5) in rabbit peripheral tissues. *Mol. Pharmacol.* **40**: 459-462
- [9] Ferrari-Dileo G, Waelbroeck M, Mash DC, and Flynn DD (1994) Selective labelling and localization of the M₄ muscarinic receptor. *Mol. Pharmacol.* **46**: 1028-35
- [10] Reeve CM, Ferrari-DiLeo G, Flynn DD (1997) The M₅ receptor subtype: fact or fiction? (1997) *Life Sciences* **60**:1105-1112
- [11] Krejčí A and Tuček S (2002) Quantitation of mRNAs for M₁ to M₅ subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. *Mol. Pharmacol.* **61**: 1267-1272
- [12] Mutschler E, Moser U, Wess J, and Lambrecht G (1995) Muscarinic receptor subtypes- pharmacological, molecular biological and therapeutical aspects. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* **69**: 243-258
- [13] Broadley KJ and Kelly DA (2001) Muscarinic receptor agonists and antagonists. *Molecules* **6**: 142-193
- [14] Zahn K, Eckstein N, Tränkle C, Sadée W, and Mohr K (2002) Allosteric modulation of muscarinic receptor signaling: alcuronium-induced conversion of pilocarpine from an agonist into an antagonist. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**: 1-9
- [15] Felder CC, Bymaster FP, Ward J, and DeLapp N (2000) Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J. Med. Chem.* **43**: 4333-4353
- [16] Bonner TI (1989) The molecular basis of muscarinic receptor diversity. *Trends in Neurosciences* **12**: 148-151
- [17] Caulfield MP and Birdsall NJM (1998) International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.* **50**: 279-290

-
- [18] Fachinformation zur Markteinführung von Spiriva[®], (2002) Boehringer Ingelheim Pharma KG
- [19] Ellis J, Huyler J, and Brann MR (1991) Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes. *Biochem. Pharmacol.* **42**: 199-205
- [20] Holzgrabe U and Mohr K (1998) Allosteric modulators of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors. *Drug discovery today* **3**: 214-222
- [21] Christopoulos A, Lanzafame A, and Mitchelson F (1998) Allosteric interactions at muscarinic cholinergic receptors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **25**: 185-194
- [22] Ellis J and Seidenberg M (1992) Two allosteric modulators interact at a common site on cardiac muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* **42**: 638-641
- [23] Buller S, Zlotos DP, Mohr K, and Ellis J (2002) Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: A single amino acid in transmembrane region 7 is critical to the subtype selectivities of caracurine V derivatives and alkane-bisammonium ligands. *Mol. Pharmacol.* **61**: 160-168
- [24] Voigtländer U, Raasch A, Tränkle C, Buller S, Ellis J, and Mohr K (2002) Allosteric site on muscarinic Acetylcholine receptors: Identification of two amino acids in the muscarinic M₂ receptor that account entirely for the M₂/M₃ subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands. *Mol. Pharmacol.* (eingereicht)
- [25] Proška J and Tuček S (1993) Mechanisms of steric and cooperative actions of alcuronium on cardiac muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* **45**: 709-717
- [26] Burgmer U, Schulz U, Tränkle C, and Mohr K (1998) Interaction of Mg²⁺ with the allosteric site of muscarinic M₂ receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **357**: 363-370
- [27] Tränkle C and Mohr K (1997) Divergent modes of action among cationic allosteric modulators of muscarinic M₂ receptors. *Mol. Pharmacol.* **51**: 674-682
- [28] Lazareno S, Popham A, and Birdsall NJM (2000) Allosteric interactions of staurosporine and other indolocarbazoles with *N*-[methyl-³H]scopolamine and acetylcholine at muscarinic receptor subtypes: Identification of a second allosteric site. *Mol. Pharmacol.* **58**: 194-207
- [29] Ehlert FJ (1988) Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol. Pharmacol.* **33**: 187-194
- [30] Christopoulos A (2002) Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nature reviews, Drug Discovery* **1**: 1-12
- [31] Gharagozloo P, Lazareno S, Miyauchi M, Popham, and Birdsall NJM (2002) Substituted pentacyclic Carbazolones as novel muscarinic allosteric agents: Synthesis and structure-affinity and cooperativity relationships. *J. Med. Chem.* **45**: 1259-1274
- [32] Holzgrabe U, Wagener M, Gasteiger J (1996) Comparison of structurally different allosteric modulators of muscarinic receptors by self-organizing neural networks. *J. Mol. Graph.* **14**: 185-193
- [33] Holzgrabe U, Hopfinger A J (1996) Conformational analysis, molecular shape comparison and pharmacophore identification of different allosteric modulators of Muscarinic receptors. *J. Chem. Inf. Comp. Sci.* **36**: 1018-1024

-
- [34] Nassif-Makki T, Tränkle C, Bejeuhr G, Cambareri A, Pfletschinger C, Kostenis E, Mohr K, Holzgrabe U (1999) Bisquaternary ligands of the common allosteric site of M₂ acetylcholine receptors: optimization of the distances between the pharmacophoric elements. *J. Med. Chem.* **42**: 849-858
- [35] Holzgrabe U, Bender W, Botero Cid H M, Staudt M, Pick R, Pfletschinger C, Balatková E, Tränkle C, Mohr K (2000) Ligands for the common allosteric site of acetylcholine M₂-receptors: development and application. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* **74**: 149-155
- [36] Böhm H J, Klebe G und Kubinyi H (1996) Wirkstoffdesign, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford, 363
- [37] Choo L K and Mitchelson F (1989) Characterization of the antimuscarinic effect of heptane-1,7-bis-(dimethyl-3'-phthalimidopropyl ammonium bromide). *Eur. J. Pharmacol.* **162**: 429-435
- [38] Staudt M, Tränkle C, Mohr K and Holzgrabe U (1998) Contribution of lateral substituents in Heptane-bisammonium derivatives to the allosteric stabilization of antagonist binding to M₂-receptors. *Life Sciences* **62**: 423-429
- [39] Botero Cid H M, Tränkle C, Baumann K, Pick R, Mies-Klomfass E, Kostenis E, Mohr K and Holzgrabe U (2000) Structure-activity relationships in a series of bisquaternary bisphthalimidine derivatives modulating the muscarinic M₂-receptor allosterically. *J. Med. Chem.* **43**: 2155-2164
- [40] Bender W, Staudt M, Tränkle C, Mohr K and Holzgrabe U (2000) Probing the size of a hydrophobic binding pocket within the allosteric site of muscarinic acetylcholine M₂-receptors. *Life Sciences* **66**: 1675-82
- [41] Monod J, Changeux JP, and Jacob F (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J. Mol. Biol.* **6**: 306-329
- [42] Soudijn W, van Wijngaarden I, and Ijzerman A (2001) Allosteric modulation of G-protein-coupled receptors. *Exper. Opin. Ther. Patents* **11**: 1889-1904
- [43] Santos MD, Alkondon M, Pereira EFR, Aracava Y, Eisenberg HM, Maelicke A, and Albuquerque EX (2002) The nicotinic allosteric potentiating ligand galantamin facilitates synaptic transmission in the mammalian central nervous system. *Mol. Pharmacol.* **61**: 1222-1234
- [44] Abraini JH, Rostain JC, Kriem B (1998) Sigmoidal compression rate-dependence of inert gas narcotic potency in rats: implication for lipid vs. protein theories of inert gas action in the central nervous system. *Brain Research.* **808**:300-304
- [45] Tränkle C, Kostenis E, Mohr K (2001) Muscarinic allosteric modulation: M₂/M₃ subtype selectivity of gallamine is independent of G-protein coupling specificity. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **364**: 172-178
- [46] Nassif-Makki T (1995) Synthese und pharmakologische Untersuchung allosterer Modulatoren der muscarinischen M₂-Acetylcholinrezeptoren. Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn
- [47] Daiß J. O (2000) Synthese Biologisch wirksamer siliciumorganischer Verbindungen. Beiträge zur Aufklärung der Pharmakophors der allosteren Muscarinrezeptormodulatoren des Bisammoniumtyps: Elektrostatische Variationen der Leitverbindung W84. Diplomarbeit, Institut für Anorganische Chemie, Universität Würzburg

- [48] Tacke R and Zilch H (1986) Sila-substitution - a useful strategy for drug design. *Endeavour* **10**: 191-197
- [49] Kruh J (1982) Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. [Review] *Mol. & Cell. Biochem.* **42**: 65-82
- [50] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275
- [51] Hill AV (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.* **40**: iv-vii
- [52] Barlow R and Blake JF (1989) Hill coefficients and the logistic equation. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**: 440-441
- [53] Monod J, Wyman J, and Changeux J-P (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Mol. Biol.* **12**: 88-118
- [54] Cornish-Bowden A and Koshland Jr. DE (1975) Diagnostic uses of the Hill (Logit and Nernst) plots. *J. Mol. Biol.* **95**: 201-212
- [55] Cheng YC and Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**: 3099-3108
- [56] DeBlasi A, O'Reilly K, and Motulsky HJ (1989) Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol. Sci.* **10**: 227-229
- [57] Scatchard G (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**: 660-666
- [58] Bennett JP and Yamamura HI (1985) Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding. *Neurotransmitter receptor binding methods* (2nd ed.), edited by Yamamura, H. I. et al., Raven Press, New York, 61-89
- [59] Lazareno S and Birdsall NJM (1995) Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G-protein-coupled receptors: Interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* **48**: 362-378
- [60] Daiss JO, Duda-Johner S, Burschka C, Holzgrabe U, Mohr K, and Tacke R (2002) N⁺/Si replacement as a tool for probing the pharmacophore of allosteric modulators of muscarinic M₂ receptors: synthesis, allosteric potency, and positive cooperativity of silicon-based W84 derivatives. *Organometallics* **21**: 803-811
- [61] Duda-Johner S, Daiß J, Holzgrabe U, Tacke R, and Mohr K (2002) Stronger allosteric increase of ligand binding at muscarinic M₂ receptors by introduction of naphthalimido-moieties in silicon-containing W84-type agents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol (suppl)* **365**: R86
- [62] Ellis J and Seidenberg M (2000) Interactions of alcuronium, TMB-8, and other allosteric ligands with muscarinic acetylcholine receptors: studies with chimeric receptors. *Mol. Pharmacol.* **58**: 1451-1460
- [63] Christopoulos A and Kenakin T (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol. Rev.* **54**: 323-374
- [64] DeBlasi A and Motulsky H J (1987) Alternative molecular interpretations of binding curves: compelling competition? *Trends Pharmacol. Sci.* **8**: 421-423

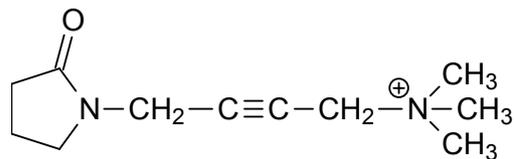
-
- [65] Tomlinson G (1988) Inhibition of radioligand binding to receptors: a competitive business. *Trends Pharmacol. Sci.* **9**: 159-162
- [66] Tränkle C, Kostenis E, Burgmer U, and Mohr K (1996) Search for lead structures to develop new allosteric modulators of muscarinic receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **279**: 962-965
- [67] Tränkle C, Mies-Klomfass E, Botero Cid MH, Holzgrave U, and Mohr K, (1998) Identification of a [³H]ligand for the common allosteric site of muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* **54**: 139-145
- [68] Gnagey A L, Seidenberg M, and Ellis J (1999) Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* **56**: 1245-1253
- [69] Daiss J, Duda-Johner S, Holzgrave U, Mohr K, and Tacke R. 34th Organosilicon Symposium, White Plains, NY, May 3-5, 2001; Abstract PS1-7
- [70] Motulsky H (1995) *Intuitive Biostatistics*, 1st ed. Oxford University Press, Inc., New York
- [71] Kollegium Biomathematik NW Hrsg., *Biomathematik für Mediziner, Begleittext zum Gegenstandskatalog*, 2nd ed. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- [72] Holzgrave, U (1999): Persönliche Mitteilung, e-mail vom 7. 5. 1999
- [73] Christopoulos A and Mitchelson F (1994) Assessment of the allosteric interactions of the bisquaternary Heptane-1,7-bis(dimethyl-3'-phthalimidopropyl)ammonium bromide at M₁ and M₂ muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* **46**: 105-114
- [74] Daiß J: Persönliche Mitteilung
- [75] Tuček S, Musilkova J, Nedoma J, Proška J, Shelkovnikov SW, and Vorliček J (1990) Positive cooperativity in the binding of alcuronium and *N*-methylscopolamine to muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* **38**: 674-680
- [76] Jakubik J, Bačakova L, El-Fakahany EE, and Tuček S (1997) Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.* **52**: 172-179
- [77] Kostenis E, Mohr K (1996) Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**: 280-283
- [78] Raasch A, Scharfenstein O, Tränkle C, Holzgrave U, and Mohr K (2002) Elevation of ligand binding to muscarinic M₂ acetylcholine receptors by bis(ammonio)alkane-type allosteric modulators. *J. Med. Chem.* **45**: 3809-3812
- [79] Johner S, Pick R, Buller S, Tränkle C, Holzgrave U, and Mohr K (1999) Topology of alloster binding in free and antagonist liganded muscarinic acetylcholine receptors. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem (suppl.)* **332**: R69
- [80] Mohr K and Tränkle C (1994) Allosteric effects of the alkane-bis-ammonium compound W84 and of tacrine on [³H]pirenzepine binding at M₁-receptors in rat cerebral cortex. *Pharmacol. Toxicol.* **75**: 391-394
- [81] Potter LT, Ferrendelli CA, Hanchett HE, Hollifield MA, and Lorenzi MV (1989) Tetrahydroaminoacridine and other allosteric antagonists of hippocampal M₁ muscarinic receptors. *Mol. Pharmacol.* **35**: 652-660

- [82] Gerald Tabeteh Frunjang: persönliche Mitteilung
- [83] Balatková E, Muth M, Bender W, Holzgrabe U, and Mohr K (2002) Molecular events leading to positive cooperativity in bis(ammonio)alkane-type muscarinic allosteric agents. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. (suppl.)* **335**: 125
- [84] Muth M, Balatková E, Tränkle C, Mohr K, and Holzgrabe U (2002) Synthesis of bis(ammonio)alkane-type muscarinic allosteric modulators combining high affinity and positive cooperativity. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. (suppl.)* **335**: 92
- [85] Burgmer U (1997) Effekte kationischer Pufferkomponenten auf die Wirkung allosterischer Modulatoren an kardialen Muscarinrezeptoren. Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn
- [86] Schröter A (1999) Interaktionsmodus allosterischer Modulatoren an freien und [³H]N-Methylscopolamin-besetzten Acetylcholin M₂-Rezeptoren abgeleitet aus pufferinduzierten Wirksamkeitsveränderungen. Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn
- [87] IUPHAR Committee on Receptor Nomenclature and Drug classification (1998) The IUPHAR compendium of receptor characterization and classification. IUPHAR Media, London: 37-45
- [88] Jones SVP, Levey AI, Weiner DM, Ellis J, Novotny E, Yu S-H, Dorje F, Wess J, and Brann MR (1992) muscarinic acetylcholine receptors. *Molecular biology of G-protein coupled receptors*. M.R. Brann (ed.) Birkhäuser, Boston: 170-197
- [89] Buller SM (2002) Identifizierung von Rezeptorepitopen für die Subtyp-selektive Interaktion allosterischer Modulatoren mit muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren anhand von Mutagenese Untersuchungen. Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn

7 Anhang

Orientierende Radioligandbindungsstudien und funktionelle Experimente mit den allosterischen Modulatoren W84 und W84t und dem muskarinischen Agonisten Oxotremorin Methiodid

In orientierenden Radioligandbindungsstudien an Homogenaten aus Hausschweinherzventrikelgewebe und in funktionellen Experimenten mit Meerschweinchenherzvorhöfen mit den allosterischen Modulatoren W84 und W84t wurde der muskarinische Agonist Oxotremorin-Methiodid (Oxo M) in der "kalten" nicht radioaktiv markierten Form (RBI, Natrick, USA, $M_r = 322,19 \text{ g/mol}$) und in tritierter Form (NEN-Dupont, Homburg, D, spezifische Aktivität: $85,8 \text{ Ci/mmol}$) eingesetzt.



Oxotremorin-Methiodid (Oxo M)

Ziel dieser Studien war es, zwischen dem Prototyp-Modulator W84 und dem bis-tertiären Derivat W84t mögliche Unterschiede bezüglich des Einflusses auf das Bindungsverhalten von Oxo M und auf die Oxo M-Wirkung zu erfassen.

7.1 Radioligandbindungsstudien

Entsprechend den beschriebenen Untersuchungen mit dem Antagonisten [^3H]NMS wurden mit dem Agonisten [^3H]Oxo M Experimente unter Gleichgewichtsbedingungen sowie kinetische Experimente durchgeführt. Der jeweilige Versuchsaufbau entsprach jenem mit dem Antagonisten. Sämtliche im folgenden beschriebenen Bindungsversuche sind mit Homogenaten aus Hausschweinherzventrikelgewebe in Na, K, P_i -Puffer durchgeführt worden.

7.1.1 Homologe Wettbewerbsversuche

Die Bestimmung der Affinität (K_D) sowie der Anzahl spezifischer Bindungsstellen (B_{max}) von [3H]Oxo M in Homogenaten aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein erfolgte wie unter 2.3.2.2.1 (s. S. 19) beschrieben. Sämtliche Radioligandbindungsuntersuchungen mit [3H]Oxo M wurden mit demselben Homogenat durchgeführt. Der pK_D -Wert dieses Homogenates betrug bei der Bestimmung nach DeBlasi [56] $9,45 \pm 0,15$, der B_{max} -Wert lag bei 20 ± 3 (fmol/mg_{Protein}) ($n = 2$). Die Bestimmung der Bindungscharakteristika nach Scatchard [57] ergab die folgenden Daten: $pK_D = 9,23 \pm 0,03$, $B_{max} = 23 \pm 2$ fmol/mg_{Protein}. Die Werte für pK_D stehen in Übereinstimmung mit Daten aus anderen Arbeiten [i], die B_{max} -Werte liegen im Vergleich eher etwas tiefer.

7.1.2 Kinetische Untersuchungen

Aus dem Vermögen von W84 und W84t, die Dissoziation von [3H]Oxo M-Rezeptor-Komplexen zu verzögern, kann auf die Affinität dieser Modulatoren zur allosterischen Bindungsstelle von M_2 -Rezeptoren geschlossen werden. Wie bei den Untersuchungen mit dem anticholinerg wirksamen Radioliganden [3H]NMS (s. 2.3.4, S. 30) wurde die Radioligandlösung während 30 Minuten mit der Suspension aus Hausschweinherzventrikelgewebe vorinkubiert. Durch Zugabe der "Startlösung" wurde die Dissoziation einer Messung zugänglich gemacht. In der folgenden Abbildung (Abb. A) werden die Ergebnisse der Dissoziationsuntersuchungen mit dem Agonisten [3H]Oxo M (1 nM) und den Modulatoren W84 und W84t aufgeführt.

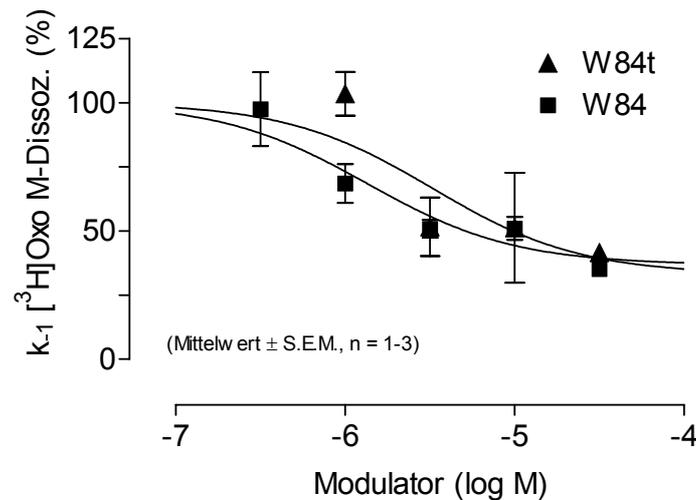


Abb. A: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Dissoziationsverzögerung von [³H]Oxo M-Rezeptor-Komplexen. Ordinate: apparente Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante k_{-1} in Prozent bezogen auf den Kontrollwert. Abszisse: Konzentration der allosterischen Modulatoren (log M). Für die nichtlineare Regressionsanalyse mit sigmoidaler Kurvenanpassung wurde das obere Plateau auf 100% konstant gesetzt, die Hill-Steigung der Kurven unterschied sich nicht signifikant von $n_H = -1$ und wurde auf diesen Wert festgesetzt. Die $pEC_{50, \text{diss}}$ -Werte für W84 liegen bei $5,87 \pm 0,27$, für W84t bei $5,48 \pm 0,42$. Die unteren Plateaus lagen für W84 bei $36,8 \pm 11,6$ bzw. für W84t bei $33,04 \pm 18,57$ und wurden für die Kurvenanpassung nicht konstant gesetzt. Je Datenpunkt wurden 1-3 unabhängige Experimente durchgeführt, welche jeweils den Dissoziationsverlauf über ca. 2 Stunden beschrieben.

Die Streuung der einzelnen Messungen fällt bei diesem Radioliganden wesentlich stärker aus als bei [³H]NMS. In Tab. A werden die Ergebnisse sämtlicher Bindungsuntersuchungen mit dem Radioliganden [³H]Oxo M zusammengefasst.

7.1.3 Heterologe Interaktions-Experimente

In heterologen Interaktions-Experimenten wurde die Affinität (K_A) der allosterischen Modulatoren W84 und W84t zu Orthoster-freien M_2 -Rezeptoren bestimmt. Zusätzlich wurde in diesen Versuchen die Kooperativität (α) zwischen dem muskarinischen Agonisten Oxo M und den allosterischen Modulatoren W84 und W84t ermittelt. Diese Experimente wurden in Analogie zu den Versuchen mit [³H]NMS in Na, K, P_i -Puffer (s. 2.3.3.2, S. 25) durchgeführt und ausgewertet, wobei alle Untersuchungen mit W84t und 3 Untersuchungen mit W84 bis zum Erreichen von Gleichgewichtsbedingungen während 2 Stunden sowie zwei Versuche mit W84 während 6 Stunden inkubiert worden sind. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Inkubationszei-

ten für W84. Die folgende Abbildung (Abb. B) zeigt die Zusammenfassung dieser Untersuchungen.

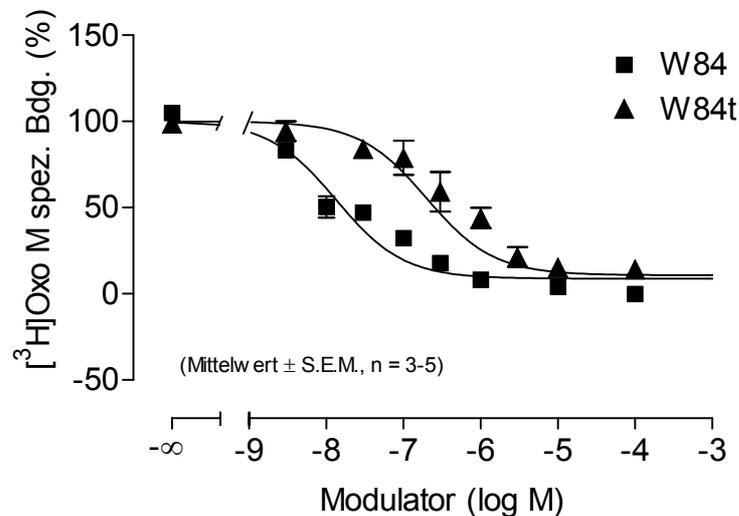


Abb. B: Zusammenfassung der heterologen Interaktionsexperimente der allosterischen Modulatoren W84 und W84t mit dem Radioliganden [³H]Oxo M (1 nM) in Na, K, P_i-Puffer. Ordinate: spezifische [³H]Oxo M Bindung in Prozent bezogen auf B₀. Abszisse: Konzentration der eingesetzten allosterischen Modulatoren (log M). Nichtlineare Regressionsanalyse nach Gleichung 13, dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler, Dreifachbestimmung, Kenndaten s. Tab. A.

Die Untersuchungen mit dem Radioliganden [³H]Oxo M und dem Prototypmodulator W84 ergaben keinen statistisch signifikanten Unterschied für das Mass der negativen Kooperativität im Vergleich mit W84t (s. Tab. A). Allerdings unterscheiden sich diese zwei allosterischen Modulatoren bezüglich ihrer Affinität zum Orthoster-freien muskari-nischen Rezeptor. Die unter entsprechenden Versuchsbedingungen mit dem Radioli-ganden [³H]NMS erhobenen Daten hatten keinen Unterschied bezüglich der Affinität dieser zwei Modulatoren zum M₂-Rezeptor ergeben (s. Tab. 14, S. 53). Hierzu müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Substanz	$p\alpha$	pK_A	Anzahl Versuche	$pEC_{50, diss}$	n_H	unteres Plateau (%)	Anzahl Versuche
W84	-1,57 $\pm 0,08$	8,38 $\pm 0,10$	5	5,87 $\pm 0,27$	-2,60 $\pm 2,29^c$	36,8 $\pm 11,6^a$	3
W84t	-1,47 $\pm 0,06^{n.s.}$	7,20 $\pm 0,09^*$	3	5,48 $\pm 0,42^{n.s.}$	-12,72 $\pm 38811^{c, d, n.s.}$	33,0 $\pm 18,6^{b, n.s.}$	2

Tab. A: Zusammenfassung der Kenndaten der Radioligandbindungsstudien mit dem Radioliganden [3H]Oxo M (1 nM) und den allosterischen Modulatoren W84 und W84t in Na, K, P_i -Puffer. Angegeben werden Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte.

^{n.s.}: kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten von W84 und W84t ($p > 0,05$).

*: statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Daten von W84 und W84t ($p < 0,05$).

^{a.}: statistisch signifikant verschieden von 0% (F-Test, $p < 0,05$).

^{b.}: nicht verschieden von 0% (F-Test, $p > 0,05$).

^{c.}: kein signifikanter Unterschied von $n_H = -1$.

^{d.}: auf Grund der geringen Anzahl Versuche und wegen der höheren Streuung der Experimente mit dem Radioliganden [3H]OxoM ist der Standardfehler für n_H so gross.

Ausser den pK_A -Werten unterscheiden sich sämtliche Kenndaten der Radioligandbindungsuntersuchungen mit dem Agonisten [3H]Oxo M und den allosterischen Modulatoren W84 und W84t in Na, K, P_i -Puffer nicht statistisch signifikant voneinander. Da die Untersuchungen mit diesem Radioliganden aber deutlich höhere Streuungen aufweisen, als jene mit dem Antagonisten [3H]NMS, sollten zusätzliche Versuche durchgeführt werden, um klarere Aussagen bezüglich der Wirksamkeit dieser strukturell sehr nahe verwandten Substanzen treffen zu können.

7.2 Funktionelle Experimente

7.2.1 Theoretische Grundlagen

Die im folgenden beschriebenen funktionellen Experimente an kontrahierenden Meer-schweinchen-Herzvorhöfen stellen eine Möglichkeit dar, den Einfluss der bis-quartären Substanz W84 und der bis-tertiären Substanz W84t auf die negativ inotrope Wirksamkeit von Oxotremorin M (Oxo M) zu bestimmen.

In orientierenden Versuchen wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven des Agonisten Oxo M in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der allosterischen Modulatoren ermittelt, wobei die negativ inotrope Wirkung auf die isometrische Kontraktionskraft

elektrisch gereizter linker Vorhöfe von Meerschweinchenherzen anhand von Mechanogrammen gemessen wurde.

Die antimuskarinische Wirkung der allosterischen Modulatoren lässt sich über die Bestimmung von Verschiebungsfaktoren (V_f , „dose ratio“) quantifizieren und vergleichen.

Der Verschiebungsfaktor V_f berechnet sich folgendermassen:

$$V_f = \frac{EC_{1/2Top, Modulator}}{EC_{1/2Top, Kontrolle}} \quad \text{Gleichung 23}$$

Er gibt das Ausmass der Parallel-Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve einer Kontrollsubstanz in Gegenwart einer Testsubstanz, im Rahmen dieser Arbeit eines allosterischen Modulators, an.

Clark [ii] leitete den Zusammenhang der Dissoziationskonstanten und des Verschiebungsfaktors in folgender Gleichung her:

$$V_f - 1 = \frac{EC_{1/2TopAntagonist}}{EC_{1/2TopKontrolle}} - 1 = \frac{[x]}{K_D} \quad \text{Gleichung 24}$$

[x]: Konzentration des Antagonisten, in dieser Arbeit des allosterischen Modulators

K_D : Dissoziationskonstante des Antagonisten

Durch die graphische Auftragung von $\log(V_f - 1)$ gegen $\log[x]$ ergibt sich eine Regressionsgerade. Die Gleichung dieser Gerade lautet nach Arunlakshana & Schild [iii]:

$$\log(V_f - 1) = pA_2 + s \log[x] \quad \text{Gleichung 25}$$

Die Steigung dieser Gerade wird als Schild-Steigung (s) bezeichnet. Der Schnittpunkt dieser Gerade mit der Abszisse ist der pA_2 -Wert. Dieser Wert beschreibt diejenige Antagonist-Konzentration (Modulator-), die die Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Agonisten um den Faktor 2 nach rechts verschiebt.

7.2.2 Versuchsdurchführung

7.2.2.1 Präparation der Meerschweinchen-Herzvorhöfe

Die hier beschriebenen orientierenden Versuche wurden mit Präparaten von linken Vorhöfen von Herzen von Meerschweinchen des Stammes Dunkin-Hartley (Firma Charles-River, Exertal, D) durchgeführt. Die Meerschweinchen wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn gehalten. Zum Zeitpunkt der Organentnahme wogen die Tiere 850 ± 148 g ($n=3$). Sie wurden mit einer Guillotine enthauptet, anschliessend wurde der Thorax eröffnet und das Perikard mittels Skalpell und Schere freigelegt. Man trennte alle Gefässe vom noch schlagenden Herzen ab und entfernte anschliessend sorgfältig das Perikard. Für den Transport wurden jeweils die ganzen Herzen in eisgekühlte, am gleichen Tag hergestellte Tyrodelösung überführt, um den Sauerstoffverbrauch zu senken. Die Tyrodelösung entsprach einer nach von Muralt modifizierten Tyrodelösung der folgenden Zusammensetzung: 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 11,9 mM NaHCO₃, 1,05 mM MgCl₂, 0,21 mM NaH₂PO₄ und 5,5 mM Dextrose. Aufgrund der Kälte der Lösung stellte sich eine Asystolie ein. Die Präparate wurden eisgekühlt innerhalb von ca. 15 Minuten ins Pharmazeutische Institut überführt, wo sogleich die weitere Präparation erfolgte. Bei Raumtemperatur wurden die Herzen in eine mit Tyrode-Lösung gefüllte Petrischale überführt. Mit einer Präparationsschere wurde das linke Herzohr sorgfältig abgetrennt. An zwei gegenüberliegende Enden wurde Nähgarn geknotet. Die Länge der Garnfäden wurde so gewählt, dass der benötigte Abstand zum Kraftaufnehmer beziehungsweise zur Platinelektrodenhalterung (Anfertigung des Instituts für Pharmakologie der Universität Kiel, D) zur Reizleitung gewährleistet war.

7.2.2.2 Aufbau der Versuche

Die nach Kapitel 7.2.2.1 präparierten Herzvorhöfe wurden an die Elektroden-Halterung angeschlossen und dann in das Organbad (Anfertigung des Instituts für Pharmakologie der Universität Kiel, D) eingetaucht, das zuvor mit 18 ml 32°C warmer Tyrodelösung befüllt worden war. Das Organbad bestand aus zwei baugleichen Hälften, wobei jede eine Glasküvette mit eingeschmolzener Fritte in einer mit temperiertem Wasser gefüll-

ten Plexiglaskammer enthielt (Wasserbad mit Thermostat zur Durchströmung des Organbadmantels: L D1 Fisons, Haake, Karlsruhe, D).

Das Organbad wurde während der gesamten Versuchsdauer mit Carbogen-Gas (95% O₂, 5% CO₂) durchperlt, so dass ein pH-Wert von 7,3 herrschte.

Auf das Organpräparat wurde durch Zug am Kraftaufnehmer (Swema, Stockholm, S) eine Vorspannung von 5 mN eingestellt. Mit Hilfe eines Reizgerätes (HSE Stimulator P, Hugo Sachs Elektronik, March, D) wurde der Vorhof mit einer Frequenz von 3 Hz als Rechteckimpuls mit 5 ms Reizbreite gereizt. Darauf wurde am Taktgeber als Reizintensität das 1,5-fache der Schwellenspannung des jeweiligen Präparates eingestellt. Die Schwellenspannung ist als die minimale Spannung definiert, bei der das Präparat unter externer Reizung regelmässig zu schlagen beginnt. Die Reizintensität lag im Mittel bei $0,37 \pm 0,12$ V. Mittels eines Hitzeschreibers (Graphitec Lineacorder WR 3310[®], Hugo Sachs Elektronik, March, D) wurden die Signale einer Messung zugänglich gemacht.

7.2.2.3 Einfluss von W84t und W84 auf die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Oxotremorin M

Nachdem das jeweilige Präparat in der unter 7.2.2.2 beschriebenen Weise ins Organbad eingetaucht worden war, wurde es während einer Stunde äquilibriert. Dabei wurde nach 20 und 40 Minuten die Tyrodelösung durch frisch temperierte ausgetauscht. Nach der 60-minütigen Äquilibrierungsphase folgte die Aufnahme einer kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit dem Agonisten Oxotremorin M. Die Kontraktionskraft am Ende der Äquilibrierungsphase wurde gleich 100% gesetzt. In Abständen von jeweils 10 Minuten wurde eine genau definierte Menge des Agonisten in möglichst geringem Volumen mittels Eppendorfpipette zugegeben und die Kontraktionskraft beobachtet. Die Oxo M-Konzentration wurde so lange gesteigert, bis die Kontraktionskraft unter 20% des Ausgangsniveaus absank. Darauf folgte eine erneute Auswasch- und Äquilibrierungsphase von 30 Minuten, wobei die Tyrodelösung dreimal erneuert wurde. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden bestimmt, indem die ermittelten normierten Kontraktionskräfte halblogarithmisch gegen die Konzentration von Oxo M aufgetragen und mittels nichtlinearer Regressionsanalyse gemäss der modifizierten Hill-Gleichung berechnet. Aus diesen so ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Kurven können EC_{0,5}-Werte bestimmt werden. Zusätzlich wurde bei denjenigen Konzentrations-Wirkungs-Kurven, wo die Kontraktionskraft bei maximaler Agonist-Zugabe den Nullwert nicht er-

reichte, diejenige Konzentration des Agonisten Oxo M bestimmt, bei welcher die Ausgangs-Kontraktionskraft (100%) auf 50% reduziert wurde, diese Konzentration wurde als $EC_{\frac{1}{2}, \text{Top}}$ -Wert definiert und ist nicht mit dem $EC_{0,5}$ -Wert gleichzusetzen. (Nach der Auswaschphase wurde die Kontraktionskraft des Vorhofes bestimmt, dann wurde die zu untersuchende Konzentration des allosterischen Modulators (W84t oder W84) dem Vorhof zugegeben und während 60 Minuten inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde erneut die Kontraktionskraft bestimmt und gleich 100% gesetzt. So konnte der Eigeneffekt des Modulators auf die Kontraktionskraft des Vorhofes im Vergleich zum Ausgangspunkt vor Modulator-Zusatz ermittelt werden.

Darauf folgte eine weitere Aufnahme einer kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit Oxo M als Agonisten. Die eingesetzten Oxo M-Konzentrationen zu Beginn dieser erneuten kumulativen Messung wurden teilweise in kürzeren Zeitabständen zugegeben, da durch den Modulator die Konzentrations-Wirkungs-Kurve in Abhängigkeit von der eingesetzten Modulator-Konzentration und dessen Wirkstärke in höhere Konzentrationsbereiche verschoben wurde, und deren Lage nicht genau bekannt war. Der Prozess des Auswaschens, Inkubierens und Erstellens weiterer Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurde solange wiederholt, bis das Organ auch ohne Zugabe eines muskarinischen Agonisten eine Kontraktionskraft von nur noch maximal 1,5 mN aufwies.

7.2.2.4 Berechnung der Kontraktionskraft nach Oxo M-Zugabe

Die Amplitude vor Zugabe des Agonisten Oxo M wurde gemessen (in cm), entsprechend der Verstärkung in Kraft (mN) umgerechnet und als 100% festgelegt. 10 Minuten nach Zugabe des Agonisten wurde die Amplitude erneut gemessen und auf die Kraft vor der Agonist-Zugabe bezogen.

7.2.3 Ergebnisse der funktionellen Experimente

Ziel der funktionellen Experimente war es, zu überprüfen, ob sich die bis-quartäre Substanz W84 und die bis-tertiäre Substanz W84t bezüglich ihres Effektes auf die negativ inotrope Wirksamkeit von Oxotremorin M unterscheiden. Zusätzlich liess sich mit dieser Versuchsanordnung eine Eigenwirkung dieser zwei allosterischen Testsubstanzen auf die Kontraktionskraft erfassen.

Diese Untersuchungen wurden im Hinblick auf die Ergebnisse aus den Radioligandbindungsstudien mit dem Agonisten [^3H]Oxo M und dem Antagonisten [^3H]NMS, die keine einheitliche Beantwortung der Frage auf gleiches Verhalten der bis-quartären und der tertiären Testsubstanz zuließen, vorgenommen. Die Ergebnisse haben auf Grund der wenigen durchgeführten Versuche orientierenden Charakter.

7.2.3.1 Eigenwirkung der allosterischen Modulatoren

Zur Bestimmung der Eigenwirkung der allosterischen Testsubstanzen wird die Kontraktionskraft direkt vor Zugabe des allosterischen Modulators bestimmt. Dieser Wert wird als 100% festgelegt. Nach einer Stunde Inkubation mit der Testsubstanz wird die Kontraktionskraft erneut gemessen und bezogen auf die Ausgangskraft vor Modulatorzugabe normalisiert.

Die Kraftabnahme pro Stunde unter den gewählten Versuchsbedingungen liegt bei linken Meerschweinchen-Herzvorhöfen bei ca. 10% des Ausgangswertes [iv]. Eine Abnahme um 10% entspricht somit der spontanen Kraftabnahme und kann nicht der Testsubstanz zugeschrieben werden. In der folgenden Tabelle (Tab. B) werden die erhobenen Daten für die zwei durchgeführten Versuche aufgeführt. Es wurde zu Vergleichszwecken nur ein Experiment mit dem Prototyp-Modulator W84 durchgeführt. Dazu wurde eine hohe W84-Konzentration eingesetzt, die sich in früheren Untersuchungen [vii] als stark wirksam herausgestellt hatte. Durch den Einsatz dieser hohen Konzentration sollte sichergestellt werden, dass die experimentell bedingte Streuung gering ausfiel.

Testsubstanz	Konz. (μM)	Kontraktionskraft vor Zugabe (mN)	Kontraktionskraft nach Zugabe (mN)	Veränderung der Kraft nach 60 min
W84t	1 (1. Versuch)	3,5	3,25	-7%
	1 (2. Versuch)	2,25	1,9	-16%
	10	2,8	2,2	-21%
W84	30	2,4	4,2	+75%

Tab. B: Ermittelte Eigenwirkungen der Testsubstanzen W84t und W84 in den funktionellen Experimenten.

Die Eigenwirkung der Testsubstanzen wird in Tab. B zusammengefasst. Auf Grund dieser wenigen Daten kann keine endgültige Aussage über die Eigenwirkung dieser Substanzen getroffen werden, zumal auch unterschiedliche Konzentrationen der Testsub-

stanzen eingesetzt worden sind. Interessant scheint jedoch, dass die Eigenwirkungen der zwei Substanzen tendenziell entgegengesetzt sind, so nimmt bei dem einen Versuch mit W84t und einer Konzentration von 10 μM die Kontraktionskraft leicht ab und W84 steigert die Kontraktionskraft - allerdings in dreifach höherer Konzentration als W84t - massiv. Der hier beobachtete positiv inotrope Effekt von W84 deckt sich mit Befunden aus der Literatur [v], wobei jene Angaben auf wesentlich mehr Versuchen basierten.

7.2.3.2 Antimuskarinischer Effekt der allosterischen Modulatoren W84t und W84

Es wurden kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit dem orthosterischen Agonisten Oxo M aufgenommen und die Kontraktionskraft der Ventrikel nach jeweils 10 Minuten bestimmt. Diese Konzentrations-Wirkungs-Kurven dienen als Kontrollkurven für die anschliessend aufgenommenen kumulativen Konzentrations-Wirkungs-Kurven in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der Testsubstanz W84t und der Referenzsubstanz W84.

Im Falle von W84 liegen viele Daten anderer Arbeiten vor, z.B. [iv, vi], so dass in dieser Arbeit der Effekt von W84 nur einmalig zur Validierung der Methode gemessen wurde.

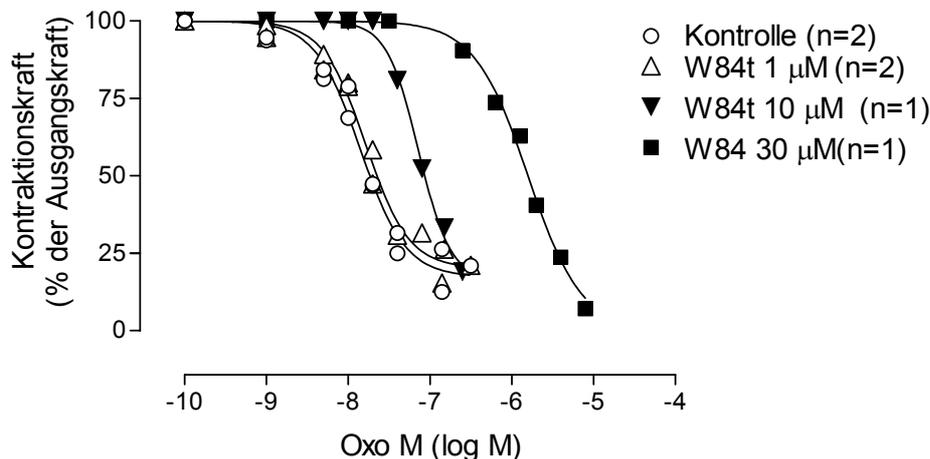


Abb. C: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von funktionellen Experimenten mit Oxo M ohne Zugabe einer allosterischen Testsubstanz (Kontrolle) und in Gegenwart zweier Konzentrationen von W84t sowie einer Konzentration von W84 (Validierung). Ordinate: Kontraktionskraft der linken Ventrikel von Meerschweinchenherzen normiert auf die Ausgangskraft vor Zugabe von Oxotremorin M (in %). Abszisse: Konzentration des muskarinischen Agonisten Oxo M (log M). Die Versuche wurden bei 32°C in einer modifizierten Tyrode-Lösung durchgeführt. Dargestellt sind die Einzelwerte der Versuche. Das obere Plateau der Kurvenanpassung wurde jeweils auf 100% festgesetzt.

In obiger Abbildung sind die Einflüsse zweier unterschiedlicher Konzentrationen von W84t und einer Konzentration von W84 auf die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Oxo M in funktionellen Experimenten dargestellt. Dabei ist nach Zugabe der allosterischen Modulatoren eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve erkennbar, wobei aufgrund der wenigen erhobenen Daten und dem Nicht-Übereinstimmen der getesteten Alloster-Konzentrationen bezüglich eines Unterschiedes in der Wirksamkeit von W84t und W84 noch keine endgültige Aussage getroffen werden kann. Basierend auf den zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Daten liegt allerdings die Vermutung nahe, dass W84 zu einer stärkeren Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Oxo M führt als W84t, also stärker antimuskarinisch wirksam ist.

In der folgenden Abbildung (Abb. D) wird basierend auf den vorhandenen Daten eine Auftragung nach Arunlakshana und Schild [iii] simuliert.

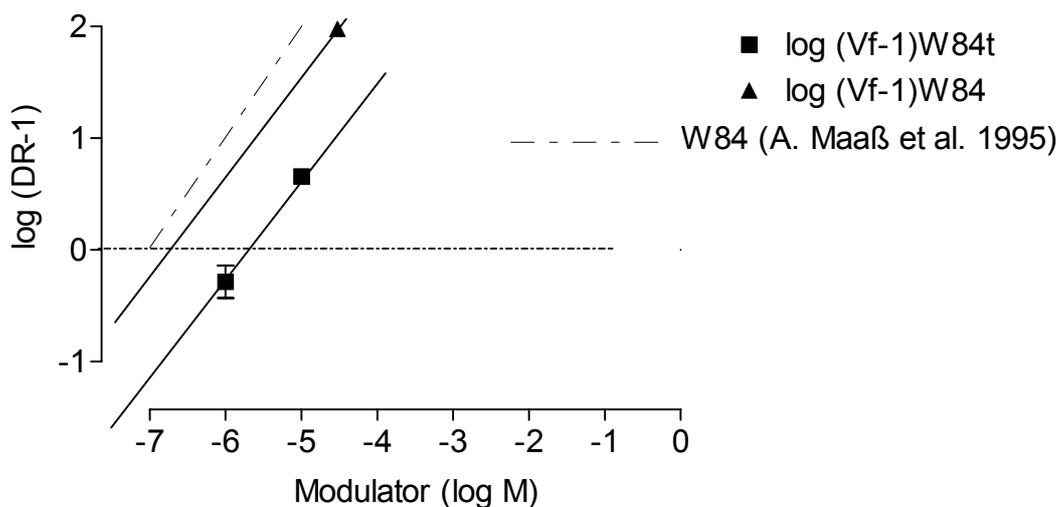


Abb. D: Auftragung der in den funktionellen Versuchen ermittelten Werte für W84t und W84 gemäss Arunlakshana und Schild. Ordinate: Logarithmus von (Verschiebungsfaktor (DR)-1). Abszisse: Logarithmus der Konzentration des eingesetzten Modulators. Da für eine Regressionsanalyse zu wenige Daten vorliegen, wurde eine Gerade beruhend auf nur zwei Punkten (W84t) konstruiert, bzw. eine Parallele (W84) zu dieser Geraden konstruiert. Die gebrochene Linie beruht auf Literaturangaben [vii] und wurde zu Vergleichszwecken eingeführt.

Der zur Validierung ermittelte Wert für W84 liegt im Bereich der Literaturwerte. Der Schnittpunkt der jeweiligen konstruierten Geraden mit der X-Achse ergibt den pA_2 -Wert, der diejenige Modulator-Konzentration beschreibt, die die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Oxo M um den Faktor 2 nach rechts verschiebt. Der pA_2 -Wert beträgt für

W84 in Untersuchungen mit dem Agonisten Oxo M $6,94 \pm 0,04$ [vii], für W84t liegt er nach diesen orientierenden Versuchen bei einem Wert < 6 .

Diese orientierenden Ergebnisse aus den funktionellen Experimenten weisen darauf hin, dass W84t geringer antimuskarinisch wirksam ist als W84.

7.3 Zusammenfassung sämtlicher Radioligandbindungsstudien

In Tab. D werden alle Kenndaten zum Bindungsverhalten der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten allosterischen Modulatoren an Homogenaten aus Hausschweinherzventrikelgewebe zusammengefasst. Auf Angaben zu statistischen Auswertungen wird in dieser Tabelle verzichtet, diese finden sich in den entsprechenden Abschnitten unter *Ergebnisse*.

Die Ergebnisse zu den Radioligandbindungsuntersuchungen mit Homogenaten aus CHO-Zellen in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer mit dem Radioliganden [³H]NMS und dem exemplarisch ausgewählten allosterischen Modulator W84-NPSi5N⁺NP werden in der darauf folgenden Tabelle (Tab. D) aufgeführt, auch in dieser Tabelle sind keine Angaben zur Statistik vorgenommen worden.

Modulator	Konz. [³ H]NMS (nM)	Mg, Tris, Cl, P _i -Puffer						Na, K, P _i -Puffer					
		pα	pK _A	Anzahl Versuche	pEC _{50, diss}	n _H	Anzahl Versuche	pα	pK _A	Anzahl Versuche	pEC _{50, diss}	n _H	Anzahl Versuche
W84	0,2	-0.510 ± 0.015	6.43 ± 0.26	3	6,08 ± 0,07	-0,98 ± 0,16	6	-0.294 ± 0.025	8,07 ± 0,44	2	8,16 ± 0,06	-1,01 ± 0,17	3
W84t	0,2	0.007 ± 0,085	5,94 ± 0,04	2	5,94 ± 0,04	0,90 ± 0,07	4	0,010 ± 0,024	7,83 ± 0,05	5	7,83 ± 0,05	-0,88 ± 0,09	3
W84-Si ₂ /6	0,2	-	-	2	-	-	2	-	-		-		
W84-Si ₁ /4	0,2	0,516 ± 0,031	6,11 ± 0,22	2	6,81 ± 0,07	-0,76 ± 0,06	2	-	-		-		
W84-Si ₁ /5	0,2	0,827 ± 0,164	6,01 ± 0,12	4	7,09 ± 0,1	-1,06 ± 0,24	3	-	-		-		
	0,1	-0,456 ± 0,013	6,72 ± 0,16	3	-	-		-	-		-		
	0,05	-0,405 ± 0,030	6,70 ± 0,04-	3	-	-		-	-		-		
W84-Si ₁ /6	0,2	0,463 ± 0,037	6,40 ± 0,14	4	6,72 ± 0,06	-1,27 ± 0,18	6	-	-		6,85 ± 0,11	-0,73 ± 0,15	4
W84-Si ₁ /7	0,2	0,400 ± 0,108	6,31 ± 0,09	2	6,68 ± 0,07	-1,45 ± 0,09	2	-	-		-		
W84-Si ₁ /8	0,2	-0,156 ± 0,022	6,57	3	6,41 ± 0,06	-1,15 ± 0,34	2	-	-		-		

Modulator	Konz. [³ H]NMS (nM)	Mg, Tris, Cl, P _i -Puffer						Na, K, P _i -Puffer					
		pα	pK _A	Anzahl Versuche	pEC _{50, diss}	n _H	Anzahl Versuche	pα	pK _A	Anzahl Versuche	pEC _{50, diss}	n _H	Anzahl Versuche
W84-PSi5N ⁺ NP	0,2	0,316 ± 0,026	6,99 ± 0,41	3	6,92 ± 0,07	-1,1 ± 0,17	2	-	-		-		
	0,1	0,206 ± 0,056	6,43 ± 0,06	3	-	-		-	-		-		
	0,05	0,161 ± 0,011	7,22 ± 0,10	3	-	-		-	-		-		
W84-NPSi5N ⁺ P	0,2	2,180 ± 0,375	5,17 ± 0,36	6	7,18 ± 0,02	-1,5 ± 0,10	5	-	-		-		
	0,1	0,789 ± 0,057	6,56 ± 0,12	3	-	-		-	-		-		
	0,05	0,559 ± 0,015	6,83 ± 0,08	3	-	-		-	-		-		
W84-NPSi5N ⁺ NP	0,2	1,602 ± 0,387	6,02 ± 0,43	4	7,07 ± 0,05	-2,3 ± 0,52	4	-	-		-		
	0,1	1,337 ± 0,265	6,40 ± 0,43	3	-	-		-	-		-		
	0,05	0,434 ± 0,049	6,78 ± 0,07	3	-	-		-	-		-		
W84	Oxo M (1nM)	-	-		-	-		-1,57 ± 0,08	8,38 ± 0,10	5	5,87 ± 0,27	-2,60 ± 2,29	3
W84t	Oxo M (1 nM)	-	-		-	-		-1,47 ± 0,06	7,20 ± 0,09	3	5,48 ± 0,42	-12,72 ± 38811	2

Tab. C: Zusammenfassung sämtlicher im Rahmen der vorliegenden Daten erhobenen Kenndaten der untersuchten allosterischen Modulatoren. In der Tabelle werden nur die Daten, die mit Homogenaten aus Hausschweinherzventrikelgewebe ermittelt worden sind, aufgeführt.

Rezeptor-Subtyp	Kooperativität	Anzahl Versuche	pEC _{50, diss}	n _H	Anzahl Versuche
M ₁	neutral	4	6,77 ± 0,13	-1,59 ± 0,49	7
M ₂	positiv, pα = 0,449 ± 0,043	3	6,91 ± 0,04	-3,25 ± 1,11	7
M ₃	neutral	5	5,98 ± 0,03	-2,02 ± 0,36	4
M ₄	neutral	3	7,20 ± 0,04	-1,75 ± 0,23	9
M ₅	neutral	3	5,33 ± 0,02	-1,92 ± 0,13	5

Tab. D: Zusammenfassung der Ergebnisse der Radioligandbindungsstudien mit dem exemplarisch ausgewählten allosterischen Modulator W84-NPSi5N⁺NP an den fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen M₁-M₅ mit dem Radioliganden [³H]NMS in Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer. Zu den statistischen Angaben s. 3.2.6. S. 73.

7.4 Literaturverzeichnis des Anhangs

- [i] Maaß A (1995) Vergleich der allosterische Beeinflussbarkeit der Agonist- und Antagonist-Bindung an Muscarin-Rezeptoren des Hausschwein-Myokards. Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn
- [ii] Clark AJ (1937) General Pharmacology. In: Heubner, W., Schüller, J. (eds.): Haffner's Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Band 4, Springer Verlag, Berlin
- [iii] Arunlakshana O and Schild H O (1959) Some quantitative uses of drug antagonists. Brit. J. Pharmacol. **14**: 48-58
- [iv] Zahn K: Persönliche Mitteilung
- [v] Zahn K (1999) Verminderung der intrinsischen Aktivität eines Muskarin-Rezeptor-Agonisten durch allosterische Modulatoren im Meerschweinchen-Herzvorhof. Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn
- [vi] Kostenis E (1995) Suche nach essentiellen Strukturelementen von allosterischen Modulatoren an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren. Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn
- [vii] Maaß A, Kostenis E, and Mohr K (1995) Potentiation by alcuronium of the antimuscarinic effect of N-methylscopolamine in guinea pig left atria. Eur. J. Pharmacol. **272**: 103-106

8 Publikationsliste

8.1 Wissenschaftliche Originalarbeiten

Daiss JO, Duda-Johner S, Burschka C, Holzgrabe U, Mohr K, and Tacke R (2002) N⁺/Si replacement as a tool for probing the pharmacophore of allosteric modulators of muscarinic M₂ receptors: synthesis, allosteric potency, and positive cooperativity of silicon-based W84-derivatives. *Organometallics* **21**: 803-811

Pietzonka P, Walter E, Duda-Johner S, Langguth P, and Merkle HP (2002) Compromised integrity of excised porcine intestinal epithelium obtained from the abattoir affects the outcome of in vitro particle uptake studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* **15**: 39-47

8.2 Abstracta/ Kongressmitteilungen

Johner S, Pick R, Buller S, Tränkle C, Holzgrabe U, and Mohr K (1999) Topology of alloster binding in free and antagonist liganded muscarinic acetylcholine receptors. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. (suppl.)* **332**: R69

Pick R, Buller S, Johner S, Tränkle C, Mohr K, and Holzgrabe U (1999) Contribution of middle chain N-substituents on the allosteric potency of phthalimidopropyl substituted hexane-bisammonium compounds in M₂ acetylcholine receptors. *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. (suppl.)* **332**: R130

Duda-Johner S, Daiß J, Raasch A, Tränkle C, Tacke R, Holzgrabe U, and Mohr K (2001) Switching the allosteric action of W84-type agents on muscarinic Ligand binding from negative to positive cooperativity by an N⁺/Si Exchange. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol (suppl.)* **363**: R25

Daiss J, Duda-Johner S, Holzgrabe U, Mohr K, and Tacke R 34th Organosilicon Symposium, White Plains, NY, May 3-5, 2001; Abstract PS1-7

Duda-Johner S, Daiß J, Holzgrabe U, Tacke R, and Mohr K (2002) Stronger allosteric increase of ligand binding at muscarinic M₂ receptors by introduction of naphthalimido-moieties in silicon-containing W84-type agents. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol (suppl.)* **365**: R25