

**INTERAKTION ALLOSTERISCHER MODULATOREN MIT DEM AGONISTEN
[³H]OXOTREMORIN M UND DEM ANTAGONISTEN [³H]N-METHYLSCOPOLAMIN
AN MUSKARINISCHEN M₂-REZEPTOREN**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich–Wilhelms-Universität zu Bonn

vorgelegt von

Maren Großmüller

aus

Bergisch Gladbach

Bonn 2003

1	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2	METHODEN UND MATERIALIEN	
2.1	Theoretische Grundlagen der Radioligand-Bindungsstudien	4
2.2	Die Membransuspension	5
2.2.1	Herstellung	5
2.2.2	Proteinbestimmung	6
2.2.3	Inkubationsbedingungen	6
2.3	Gleichgewichtsbindungs-Untersuchungen	
2.3.1	Theorie der kompetitiven Interaktion	7
2.3.2	Theorie der allosterischen Interaktion	8
2.3.3	Durchführung	10
2.4	Kinetische Untersuchungen	12
2.4.1	Dissoziations-Experimente	13
2.4.2	Assoziations-Experimente	16
2.5	Daten-Analyse und Statistische Auswertung	18
2.6	Materialien	20
3	ERGEBNISSE	
3.1	Charakterisierung der Bindungseigenschaften des Agonisten [³ H]OxoM und des Antagonisten [³ H]NMS unter Kontroll- Bedingungen	22
3.1.1	Bindungseigenschaften des Agonisten [³ H]OxoM und des Antagonisten [³ H]NMS unter Gleichgewichts-Bedingungen	22
3.1.2	Dissoziation von [³ H]OxoM und [³ H]NMS unter Kontrollbedingungen	30
3.1.3	Untersuchungen zum allosterischen Eigeneffekt von Oxo M	28
3.2	Untersuchungen zur Pufferabhängigkeit des Effektes allosterischer Modulatoren auf die Dissoziation des Agonisten [³ H]OxoM am Beispiel von W84	32
3.3	Interaktion verschiedener allosterischer Modulatoren mit dem freien, dem [³ H]OxoM- und dem [³ H]NMS-besetzten M ₂ -Rezeptor unter Na,K,P _i -Bedingungen	35
3.3.1	W84	35
3.3.2	SH30	39
3.3.3	SH28	42

Inhaltsverzeichnis

3.3.4	Gallamin	45
3.3.5	Obidoxim	50
3.3.6	WDuo 3	56
3.3.7	Duo 3	66
3.3.8	TD 2	69
3.4	Analyse der antagonistischen Interaktion zwischen Obidoxim und WDuo 3	73
3.4.1	Interaktion am [³ H]NMS-besetzten Rezeptor	73
3.4.2	Interaktion am [³ H]OxoM-besetzten Rezeptor	74
3.4.3	Analyse der antagonistischen Wirkung von Obidoxim gegenüber dem Dissoziations-verzögernden Effekt von WDuo 3 am [³ H]OxoM- und [³ H]NMS-besetzten Rezeptor	77
4	DISKUSSION	
4.1	Erörterung der Befunde aus den Radioligand-Bindungsstudien.....	79
4.1.1	Bindungsverhalten des Agonisten [³ H]OxoM	79
4.1.2	Bindungsverhalten des allosterischen Modulators Gallamin	81
4.1.3	Bindungsverhalten des allosterischen Modulators Obidoxim	82
4.1.4	Bindungsverhalten der allosterischen Modulatoren vom Alkan-bis- ammonium-Typ	84
4.1.5	Bindungsverhalten der allosterischen Modulatoren vom Bispyridinium-Typ.....	87
4.1.6	Bindungsverhalten der allosterischen Modulatoren in Antagonismus- Untersuchungen.....	89
4.2	Modellvorstellungen zur Interaktion zwischen Rezeptor, G-Protein, orthosterischem und allosterischem Modulator	90
4.3	Schlussbetrachtung.....	91
5	ZUSAMMENFASSUNG	95
6	LITERATURVERZEICHNIS	97
7	ANHANG.....	103

1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

Einleitung

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Insgesamt wurden 5 Subtypen beschrieben, von denen in dieser Arbeit nur der M₂-Subtyp betrachtet wird. Die Aminosäurekette des Rezeptorproteins durchzieht siebenfach die Plasmamembran. Die transmembranären Domänen (TM) haben eine helikale Struktur und sind ringförmig angeordnet. Die Bindungsstelle für den endogenen Agonisten Acetylcholin befindet sich tief zwischen den Helices (Hulme et al., 1990; Schwarz et al., 1995; Wess, 1996). Neben Acetylcholin binden auch Antagonisten wie *N*-Methylscopolamin oder Atropin an diese orthosterische Bindungsstelle.

Neben der orthosterischen Bindungsstelle weisen muskarinische Rezeptoren eine zweite, sogenannte allosterische Bindungsstelle auf (z. B. Stockton et al., 1983; Ehlert, 1988), welche vermutlich weiter extrazellulär lokalisiert ist (Nedoma et al., 1985; Ellis et al., 1991, 1993; Jakubík et al., 1995). Für die Interaktion der nunmehr drei Komponenten Rezeptor (R), orthosterischer Ligand (Z) und allosterischer Ligand (A) entwarfen Stockton und Mitarbeiter (1983) das in Abbildung 1 gezeigte Modell. Der Kooperativitätsfaktor α gibt an, in welchem Ausmaß die Bindung des zweiten Liganden durch den schon gebundenen Liganden beeinflusst wird. Daher kann der Wert des Kooperativitätsfaktors α jeweils nur für eine bestimmte Kombination von Substanzen stehen. Fördert die Bindung des einen Liganden die Bindung des zweiten, spricht man von positiver Kooperativität. Hingegen bedeutet die Bindungshemmung des einen Liganden durch den anderen eine negativ kooperative Interaktion.

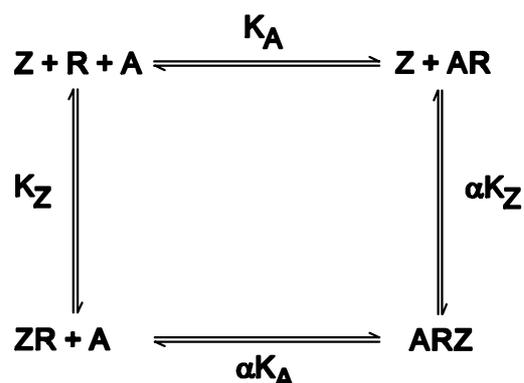


Abbildung 1: Ternäres Modell allosterischer Interaktion (Stockton et al., 1983).

Ellis und Seidenberg postulierten 1992 eine „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ für die beiden Modulatoren Gallamin und Obidoxim am M₂-Rezeptor. Für zahlreiche Prototyp-Modulatoren (z. B.: d-Tubocurarin, Alcuronium) konnte diese Beobachtung

bestätigt werden (Waelbroeck, 1994; Proska und Tucek, 1995; Lanzafame et al., 1997). Tränkle und Mohr (1997) zeigten, dass die Modulatoren W84 und WDuo 3 ebenfalls über die gemeinsame allosterische Bindungsstelle wirken, während Duo 3 ein andersartiges Wirkbild aufweist (Abbildung 2). Befunde von Tränkle und Mitarbeitern (2002) zur Epitop-Abhängigkeit der Bindung von Duo 3 deuten darauf hin, dass Duo 3 tatsächlich einen Teil seiner Haftpunkte abseits der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle sucht.

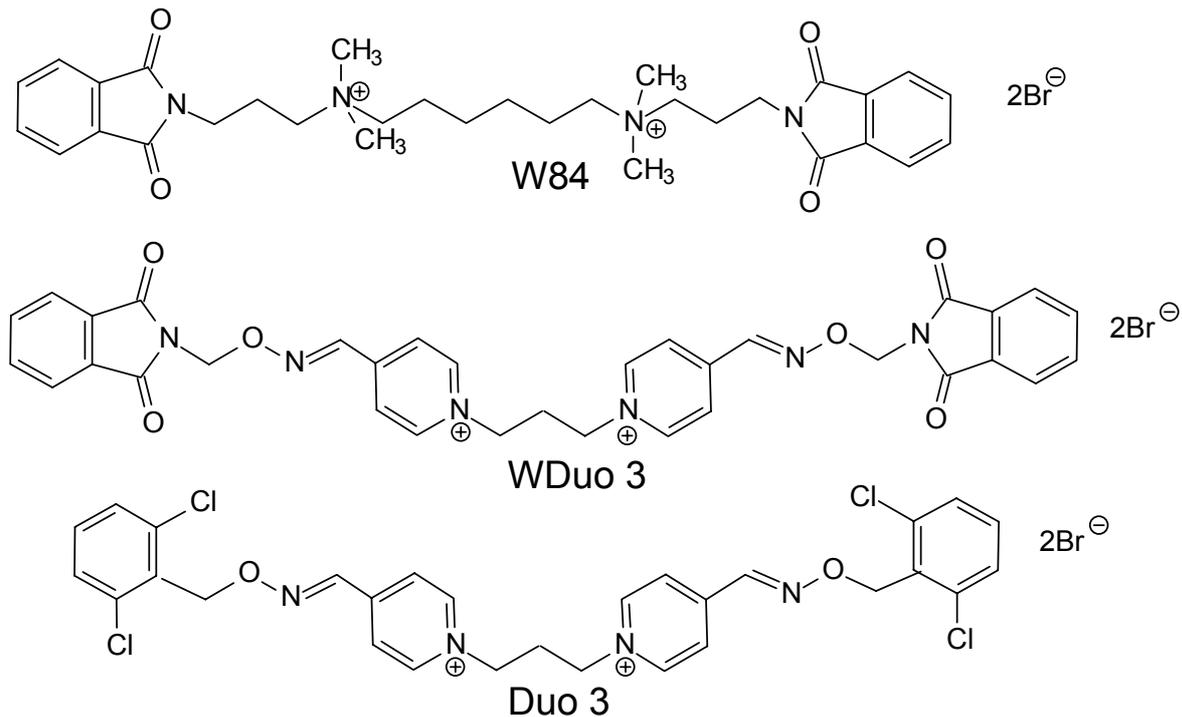


Abbildung 2: Strukturformeln der von Tränkle und Mohr (1997) untersuchten allosterischen Modulatoren vom Alkan-bis-ammonium- (W84) und vom Bispyridinium-Typ (WDuo 3 und Duo 3).

Jakubík und Mitarbeiter (1997) konnten zeigen, dass einige allosterische Modulatoren nur an bestimmten Subtypen eine positiv kooperative Interaktion mit Acetylcholin aufweisen. Die Situation, in der ein allosterischer Modulator die Bindung von Acetylcholin an einem Subtyp fördert oder senkt und an allen anderen Subtypen unbeeinflusst lässt, bezeichneten Lazareno und Mitarbeiter (1998) als „absolute Subtyp-Selektivität“. Dies könnte einen neuen Ansatz zur Subtyp-selektiven Therapie bestimmter Erkrankungen darstellen, zumal ein Effekt nur in Gegenwart des endogenen Überträgers ausgelöst würde (Ellis, 1997). Schließlich konnten Zahn und Mitarbeiter (2002) erstmals auch eine allosterische Modulation der intrinsischen Aktivität eines Liganden nachweisen, was wiederum neue Einsatzmöglichkeiten allosterischer Modulatoren erschließt.

Fragestellung

Rezeptoren können in mindestens zwei Konformationen (Übersicht: Leff, 1995) vorliegen, nämlich einer „aktiven Konformation“ und einer „inaktiven Konformation“, die von agonistischen und antagonistischen Liganden ungleich bevorzugt werden.

Die räumliche Anordnung des Rezeptorproteins, insbesondere aber die der extra- und intrazellulären Schleifen muss in den verschiedenen Rezeptorzuständen nicht gleich sein. Die allosterische Bindungsstelle wird im Bereich der extrazellulären Schleifen vermutet und könnte demnach ebenfalls in verschiedenen Rezeptorzuständen verschiedene Ausformungen annehmen.

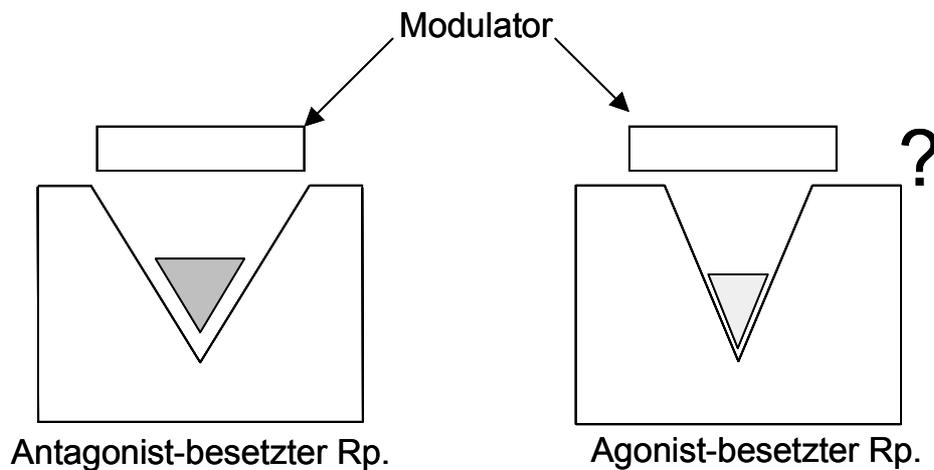


Abbildung 3: Hypothese zur unterschiedlichen Konformation der allosterischen Bindungsstelle am Antagonist- bzw. Agonist-besetzten M_2 -Rezeptor in stark schematisch vereinfachter Darstellung.

Die Bindung allosterischer Modulatoren lässt sich als Modulation der Dissoziation des orthosterischen Liganden vom Rezeptor beobachten (Kostenis und Mohr, 1996). Vor der Beobachtungsphase des Dissoziationsexperiment wird die Einstellung des Bindungsgleichgewichts zwischen dem orthosterischen Liganden und dem Rezeptor abgewartet. Durch die Wahl eines Agonisten, hier $[^3\text{H}]$ Oxotremorin M ($[^3\text{H}]$ OxoM), oder Antagonisten, hier $[^3\text{H}]N$ -Methylscopolamin ($[^3\text{H}]$ NMS), als orthosterischen Liganden wird ein Rezeptorzustand bevorzugt.

In dieser Arbeit wurden allosterische Modulatoren mit unterschiedlichen Grundgerüsten sowie systematisch verkürzte Derivate des Prototyp Modulators W84 als Sonden eingesetzt, um Einblick in die Bindungseigenschaften der allosterischen Bindungsstelle am Agonist- oder Antagonist-besetzten Rezeptor zu erlangen. Parallel dazu wurde der Effekt der Modulatoren auf die Gleichgewichtsbindung des Agonisten $[^3\text{H}]$ OxoM und des Antagonisten $[^3\text{H}]$ NMS verglichen.

2 METHODEN UND MATERIALIEN

2.1 Theoretische Grundlagen der Radioligand- Bindungsstudien

Die Wechselwirkungen zwischen Rezeptor [R] und Ligand [L] lassen sich durch das Massenwirkungsgesetz beschreiben:



Die Reaktion des Liganden mit dem unbesetzten Rezeptor zum Rezeptor-Ligand-Komplex [RL] ist durch die Assoziations-Geschwindigkeitskonstante k_{+1} gekennzeichnet. Die Rezeptor-Ligand-Komplexe zerfallen anschließend in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante k_{-1} . Im Gleichgewicht gilt:

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

Als Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor verwendet man die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D , die sich aus dem Quotienten aus k_{-1} und k_{+1} ergibt:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R][L]}{[RL]} \quad \text{Gleichung 3}$$

Die spezifische Bindung des Liganden an den Rezeptor ist sättigbar. Die Summe der freien und besetzten Rezeptoren ergibt B_{\max} .

$$B_{\max} = [R] + [RL] \quad \text{Gleichung 4}$$

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_D), sowie die Gesamtzahl der Rezeptoren B_{\max} können durch homologe Kompetitions-Experimente bestimmt werden (siehe 2.3.1). Die Messung der Effekte allosterischer Modulatoren auf die Assoziations- oder Dissoziationskinetik des jeweiligen Radioliganden erfolgt durch die Erfassung der Anzahl der Rezeptor-Ligand-Komplexe in Abhängigkeit von der Zeit (siehe 2.4). Dazu werden die Versuchsbedingungen derart gewählt, dass Assoziations- oder Dissoziationsvorgänge isoliert beobachtet werden können, die im Gleichgewicht durch folgende Gleichung beschrieben werden können.

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

Gleichung 5

Darüber hinaus kann mittels der Gleichung von Ehlert (siehe 2.3.2) die Affinität der allosterischen Modulatoren zum freien und zum Radioligand-besetzten Rezeptor aus Gleichgewichts-Bindungs-Experimenten bestimmt werden.

2.2 Die Membransuspension

2.2.1 Herstellung

Alle Experimente wurden mit Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe durchgeführt, da dieses Gewebe besonders reich an Rezeptoren vom Subtyp M₂ ist. Die frischen Schweineherzen wurden vom Schlachthof Köln bezogen. Alle weiteren Arbeitsschritte werden bei 4°C durchgeführt. Die Schweineherzen wurden zunächst in etwa 40 g schwere Stücke zerteilt und bei -80°C eingefroren. Am Tage der Membranpräparation wurde eine solche Portion genau gewogen, angetaut, mit dem Wiegemesser fein zerkleinert und mit einer 0,32 molaren Saccharoselösung blutfrei gewaschen. Die weitere Zerkleinerung erfolgte mit einem Waring Blendor Homogenisator (New Hartford, USA). Dazu wurden 5 Zerkleinerungsvorgänge von je 10 Sekunden auf Stufe „high“, mit jeweils 30 Sekunden Pause durchgeführt, um eine zu starke Erwärmung der Suspension zu vermeiden. Anschließend folgte eine Verdünnung des Suspensionsvolumens mit Saccharoselösung auf etwa das 20fache der Einwaage. Die Suspension wurde nun mit einem Potter Elvehjem Glashomogenisator bei einer Umdrehungszahl von 1750 U/min homogenisiert. Zur Abtrennung von Partikeln mit hoher Dichte wurde das Homogenat 11 min bei 300 x g zentrifugiert (Ultrazentrifuge Beckman L7-35, Beckman Rotor Typ 35). Die erhaltenen Pellets wurden verworfen und der Überstand einer zweiten Zentrifugation zur Abtrennung der Rezeptorfraktion unterworfen (41 min bei 80.000 x g). Die nun entstandenen Pellets wurden mit Aqua dest. aufgenommen (4ml/g Gewebe-Einwaage) und mit dem Potter Elvehjem Glashomogenisator bei einer Umdrehungszahl bei 1500 U/min resuspendiert. Unter ständigem Rühren wurde die Membransuspension in Aliquota von jeweils 1 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Aufbewahrung erfolgte wiederum bei -80°C.

2.2.2 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Suspensionen wird nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt; als Standard wird dabei Human-Serumalbumin verwendet.

Die mittlere Proteinkonzentration der hergestellten Membransuspensionen betrug $5,01 \pm 1,00$ mg/ml (MW \pm SF, n = 11).

2.2.3 Inkubationsbedingungen

In dieser Arbeit fanden zwei unterschiedliche Puffer als Inkubationsmedium Verwendung. Die angegebenen Werte entsprechen den Konzentrationen in Millimol pro Liter Puffer, die eingeklammerten Werte geben die Konzentrationen an, die im Versuchsansatz vorlagen.

Mg,Tris,Cl,P_i-Puffer

MgHPO ₄ x 3H ₂ O	3,6	[2,6]
--	-----	-------

Tris-HCl	61	[45]
----------	----	------

Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,3 erfolgte mit 1N HCl

Na,K,P_i-Puffer (Inkubations-Puffer)

KH ₂ PO ₄	1,3	[1,0]
---------------------------------	-----	-------

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	5,5	[4,0]
--	-----	-------

Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,4 erfolgte mit 1N H₃PO₄

Na,K,P_i-Puffer (Spül-Puffer)

KH ₂ PO ₄	1,0
---------------------------------	-----

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	4,0
--	-----

Einstellung des pH-Wertes auf pH 7,4 erfolgte mit 1N H₃PO₄

Die Inkubationstemperatur betrug in beiden Fällen 23°C.

2.3 Gleichgewichtsbindungs-Untersuchungen

2.3.1 Theorie der kompetitiven Interaktion

Die Fähigkeit einer Testsubstanz, den Radioliganden aus seiner Bindung am Rezeptor zu verdrängen, wird mit Hilfe von Kompetitions-Experimenten untersucht. Im Falle der homologen Konkurrenz sind Radioligand und Substanz strukturidentisch, wohingegen bei heterologen Konkurrenzen Radioligand und Kompetitor verschiedene Strukturmerkmale aufweisen. In beiden Fällen wird eine Konkurrenz des Radioliganden und der Testsubstanz um die gleiche, zumeist die orthosterische, Bindungsstelle angenommen.

Mit Hilfe der homologen Konkurrenzversuche lassen sich die Affinität des Liganden zum Rezeptor (K_D) und die Gesamtzahl der Rezeptoren (B_{max}) bestimmen. Durch halblogarithmische Auftragung der Daten und anschließende Analyse mittels nichtlinearer Regressionsanalyse unter Verwendung der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“ (siehe 2.3.3) ergibt sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf. Aus dieser Analyse wird der IC_{50} -Wert erhoben; er gibt diejenige Ligandkonzentration an, bei der die spezifische Radioligandbindung auf 50% des Ausgangswertes reduziert wird. Unter Zugrundelegung des ermittelten IC_{50} -Wertes, sowie der eingesetzten Radioligand-Konzentration $[L]$ und der Bindungsaffinität des Radioliganden (K_D), lässt sich die Affinität des Kompetitors zum Rezeptor nach der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973) berechnen.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad \text{Gleichung 6}$$

K_i : Affinität des Kompetitors zu seiner Bindungsstelle

Da Radioligand und Kompetitor im Falle der homologen Konkurrenz strukturell identisch sind und somit die gleiche Bindungs-Affinität zum Rezeptor aufweisen, ist hier $K_D = K_i$ und die Gleichung vereinfacht sich zu:

$$K_D = IC_{50} - [L] \quad \text{Gleichung 7}$$

Nach De Blasi (1989) ergibt die Substitution von K_D entsprechend obiger Gleichung im Massenwirkungsgesetz:

$$B_{\max} = \frac{B_0 \cdot IC_{50}}{[L]} \quad \text{Gleichung 8}$$

B_0 : spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit eines Kompetitors

Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung der Bindungsparameter K_D und B_{\max} stellt die Analyse nach Scatchard (1949) dar. Dazu werden die in homologen Konkurrenzexperimenten erhobenen Bindungsdaten einer linearen Regressionsanalyse anhand der Scatchard–Gleichung (1949) unterzogen:

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_D} \cdot B + \frac{B_{\max}}{K_D} \quad \text{Gleichung 9}$$

B entspricht hier der Gesamtkonzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe und F steht für die freie Ligand-Konzentration. Der Schnittpunkt der erhaltenen Gerade mit der Abszisse gibt den B_{\max} -Wert an und der K_D -Wert entspricht dem negativen Kehrwert ihrer Steigung. Zur Ermittlung der Werte mittels dieser Analyse müssen nach Bennett und Yamamura (1985) bestimmte Voraussetzungen erfüllt sein:

- Das Bindungsverhalten muss dem Massenwirkungsgesetz folgen.
- Die Experimente müssen unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt werden.
- Es muss eine einheitliche Rezeptorpopulation vorliegen.
- B_{\max} sollte nicht größer sein als 10% des K_D -Wertes.
- Es sollten nicht mehr als 10% des Radioliganden gebunden vorliegen, damit die freie Ligandkonzentration als konstant betrachtet werden kann.

2.3.2 Theorie der allosterischen Interaktion

Die Interaktion zweier strukturverschiedener Liganden kann kompetitiver Art sein, wenn beide um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren, oder aber, wie im Falle der in dieser Arbeit untersuchten Testsubstanzen, allosterisch, wenn die Testsubstanz an ein anderes, allosterisches Haftareal bindet. Im Falle einer allosterischen Interaktion ist demnach auch die Bildung eines ternären Komplexes aus Rezeptor, orthosterischem und allosterischem Liganden möglich. Ein erstes Modell zur Beschreibung allosterischer

Interaktionen stammt von Stockton et al. (1984, siehe Einleitung). Dieses wurde durch Ehlert (1988) mittels einer Gleichung beschrieben, die die Analyse von Experimentalbefunden unter dieser Modellvorstellung ermöglicht:

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

- B_A: Radioligand-Bindung in Anwesenheit von Alloster
- B₀: Radioligand-Bindung in Abwesenheit von Alloster
- K_L: Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Radioliganden für die orthosterische Bindungsstelle am freien Rezeptor
- K_A: Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Allosters für die allosterische Bindungsstelle am freien Rezeptor
- α: Kooperativitätsfaktor
- L: molare Konzentration des Radioliganden
- A: molare Konzentration des Allosters

Die Kooperativität, quantifiziert durch den Faktor α, beschreibt die Fähigkeit des Allosters, durch Besetzen der allosterischen Bindungsstelle des Rezeptorproteins die Affinität des orthosterischen Liganden zu dessen Bindungsstelle zu modulieren. Analog, und zwar im gleichen Ausmaß, verändert der rezeptorgebundene orthosterische Ligand die Bindungsaffinität des allosterischen Modulators zu dessen Bindungsstelle. Der allosterische Modulator kann demnach zum freien Rezeptor eine andere Bindungsaffinität aufweisen als zum Radioligand-besetzten Rezeptor. Daraus resultieren Unterschiede zwischen der Fähigkeit eines allosterischen Modulators, die Assoziation oder die Dissoziation eines Radioliganden zu hemmen.

An muskarinischen Rezeptoren ist der Zusammenhang zwischen den Wirkungen allosterischer Modulation auf die Gleichgewichtsbindung eines orthosterischen Liganden und seiner Bindungskinetik in der Regel wie folgt: Die Hemmung der Dissoziation stellt einen bindungsfördernden Effekt dar, während die Hemmung der Assoziation zu einer Verminderung der Gleichgewichts-Bindung des Radioliganden

führt. Eine bindungsfördernde, positiv-kooperative Substanz hemmt die Dissoziation des orthosterischen Liganden stärker als seine Assoziation, was einen Anstieg der zu messenden membrangebundenen Aktivität bedeutet. Solches Verhalten wird nach der Gleichung von Ehlert durch einen Wert $\alpha < 1$ beschrieben. Eine Substanz, die Dissoziation und Assoziation gleich stark hemmt, wird als neutral kooperativ betrachtet und durch ein α von 1 beschrieben. Hingegen kennzeichnen α -Werte, die einen Wert $\alpha > 1$ annehmen eine negative Kooperativität, hier hemmt die Testsubstanz die Assoziation stärker als die Dissoziation.

Wenn eine Interaktion des Modulators mit dem freien Rezeptor stattfindet, ist die Affinität desselben unabhängig vom orthosterischen Liganden. Hingegen kann sich das Ausmaß bindungsfördernder oder bindungshemmender Beeinflussung eines orthosterischen Liganden mit Wechsel des Liganden verändern, da Kooperativität eine an den orthosterischen Liganden und den allosterischen Modulator gebundene Größe darstellt.

2.3.3 Durchführung

Die Durchführung der Kompetitions-Experimente und der Untersuchungen zur allosterischen Interaktion unterscheiden sich methodisch kaum und werden im folgenden gemeinsam dargestellt. Die unten aufgelisteten Lösungen wurden in der angegebenen Reihenfolge in Zentrifugengläschen oder in silanisierte Eppendorff-Reaktionsgefäße pipettiert:

- | | |
|----|--|
| 1. | 100 μ l Radioligand in Aq. dest. (siehe 2.6) |
| 2. | 50 μ l Kompetitor oder Alloster in verschiedenen Konzentrationen
bzw. Aqua dest. (zur Bestimmung der Gesamtbindung)
bzw. Atropin in Aq. dest. (zur Bestimmung der unspezifischen
Bindung; Endkonzentration 1 μ M) |
| 3. | 1100 μ l Inkubationspuffer (siehe 2.2.3) |
| 4. | 250 μ l Membransuspension |
| | 1500 μ l Ansatzvolumen |

Durch Zugabe der Membransuspension wurde die Reaktion gestartet, es folgte eine Inkubationsphase von mindestens 120 Minuten bei 23°C im Schüttelwasserbad. Die zum Erreichen des Bindungsgleichgewichts erforderliche Inkubationszeit bei Untersuchungen zur allosterischen Interaktion wurde mittels der Befunde aus Dissoziationsexperimenten berechnet (siehe 2.4.1), da die Dissoziation orthosterischer Liganden vom M₂-Rezeptor in Gegenwart allosterischer Modulatoren verzögert wird. Es wurde angenommen, dass ein fünffaches der gemessenen Dissoziations-Halbwertszeit des orthosterischen Liganden in Gegenwart des jeweiligen Modulators zum Erreichen des Bindungsgleichgewichts ausreicht.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Reaktion durch Vakuumfiltration beendet. Die Filtration von 1ml Versuchsansatz je Gläschen erfolgte über Glasfaserrundfilter, die nachfolgend mit 2 mal 5ml eisgekühltem Aqua dest. (bei Mg,P_i,Tris-Bedingungen) oder Na,K,P_i-Puffer (bei Na,K,P_i-Bedingungen) gespült wurden. Die verwendeten Filter wurden vor Gebrauch für mindestens 24 Stunden in 0,2%iger Polyethylenimin-Lösung vorbehandelt und unmittelbar vor Gebrauch mit 5ml Aqua dest. gespült. Der membrangebundene Anteil des Radioliganden wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt.

Silanisierung von Eppendorff-Reaktionsgefäßen

Da einige Substanzen, insbesondere das W84-Derivat TD 2, eine hohe Neigung aufweisen, sich an Glas anzulagern, wurden für die Untersuchung von TD 2, Duo 3 und WDuo 3 silanisierte Reaktionsgefäße verwendet. Dazu wurden die Gefäße einmalig mit Sigmacote[®] durchspült und getrocknet. Anschließend wurden eventuelle Reste durch Waschen mit Aqua dest. entfernt und die Gefäße wiederum über Nacht getrocknet.

Auswertung

Die Auswertung erfolgte im Falle von Kompetitions-Experimenten mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“ (Barlow und Blake, 1989). Diese erlaubt eine Analyse der Steilheit der Bindungskurve, die der nach Hill (1910) analog ist.

Die angewandte Gleichung lautet:

$$B_{Ges} = Min + \frac{(Max - Min)}{(1 + 10^{((\log IC_{50} - \log X) \cdot n_H)})}$$

Gleichung 11

- B_{Ges} : Gesamtbindung des Radioliganden
Max: Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Kompetitors (Ausgangsniveau)
Min: Bindung des Radioliganden in Anwesenheit hoher Konzentrationen des Kompetitors, entspricht der nicht sättigbaren Radioligand-Bindung (unteres Kurvenplateau, „unspezifische Bindung“)
 IC_{50} : Konzentration des Kompetitors, welche die spezifische Radioligand-Bindung um 50% reduziert
X: Konzentration des nicht markierten Kompetitors
 n_H : Hill-Koeffizient (Maß für die Kurvensteilheit)

Es wurde geprüft, ob die Steilheit der Bindungskurve signifikant verschieden von $n_H = -1$ und das untere Kurvenplateau verschieden von $Min = 0$ war (F-Test, siehe 2.5).

Anschließend wurden der K_i -Wert oder im Falle homologer Kompetitionsexperimente K_D und B_{max} anhand der unter 2.3.1 angegebenen Gleichungen ermittelt. Letztere wurden durch eine weitere Analyse der transformierten Bindungsdaten mittels der Scatchard-Gleichung überprüft. Im Falle der Untersuchungen zur allosterischen Interaktion wurden die Bindungsdaten anhand der Gleichung von Ehlert (1988) analysiert und daraus sowohl die Affinität des Allosters zum freien Rezeptor (K_A), als auch der Kooperativitätsfaktor α bestimmt.

2.4 Kinetische Untersuchungen

Die Differenzierung der Effekte allosterischer Modulatoren am Radioligand-besetzten oder freien Rezeptor erfordert die getrennte Betrachtung der Assoziations- und Dissoziationsvorgänge, die im Gleichgewicht nebeneinander ablaufen. In kinetischen Untersuchungen müssen deshalb die Experimental-Bedingungen so gewählt werden, dass die jeweils nicht interessierende Assoziations- oder Dissoziationsreaktion „ausgeblendet“ wird.

2.4.1 Dissoziations-Experimente

Die Affinität der allosterischen Modulatoren zum Ligand-besetzten Rezeptor wird mithilfe von Dissoziations-Experimenten ermittelt. Da die hier untersuchten allosterischen Modulatoren nicht in radioaktiv-markierter Form zur Verfügung stehen, muss auf eine indirekte Messanordnung zurückgegriffen werden, indem die Verzögerung der Dissoziation des Orthosters in Anwesenheit des Modulators bestimmt wird. Aus der Konzentrations-Effekt-Beziehung dieser Dissoziations-verzögernden Wirkung kann als Maß für die Affinität des Allosters zum besetzten Rezeptor der $EC_{0,5,Dis}$ -Wert bestimmt werden. Im Gegensatz zu Gleichgewichts-Bindungs- und Assoziations-Experimenten ist bei den hier dargestellten Untersuchungen sichergestellt, dass ausschließlich Effekte, die über die allosterische Bindungsstelle vermittelt werden, beobachtet werden.

2.4.1.1 Theoretische Grundlagen

Dissoziations- und Assoziationsreaktion laufen im Gleichgewicht mit konstanter Geschwindigkeit im gleichen Ausmaß gleichzeitig ab, wie dies durch die Differentialgleichung (6) in 2.1 beschrieben wird. Zur isolierten Erfassung der Dissoziation müssen Assoziationsvorgänge unterbunden werden. Dies wird durch Zugabe eines Überschusses Atropin ($1\mu\text{M}$) nach Erreichen des Bindungsgleichgewichts des Radioliganden erreicht. Für die Zerfallsgeschwindigkeit gilt dann:

$$-\frac{d[RL]}{dt} = k_{-1}[RL] \quad \text{Gleichung 12}$$

Der Zerfall folgt einer monoexponentiellen Funktion, die durch Intergration aus Gleichung 12 entsteht:

$$B_{Ges,t} = B_{spez,e} \cdot e^{-k_{-1}t} + U \quad \text{Gleichung 13}$$

$B_{Ges,t}$: Gesamtbindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t

$B_{spez,e}$: Spezifische Bindung des Radioliganden im Gleichgewicht

U: Unspezifische Bindung des Radioliganden

Die nicht-lineare Regressionsanalyse ergibt einen hyperbolen Kurvenverlauf mit der Dissoziations-Geschwindigkeits-Konstanten k_{-1} . Die Halbwertszeit lässt sich berechnen als:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{-1}}$$

Gleichung 14

Es wurde geprüft, ob eine monoexponentielle oder eine biexponentielle Funktion eine signifikant bessere Anpassung an die Daten ermöglichte (F-Test, siehe 2.5). Als Maß für die Dissoziationsgeschwindigkeit biphasischer Kurven wurde neben den Halbwertszeiten für die beiden Komponenten, der $t_{50\%}$ -Wert als ein „über-Alles-“ Maß verwendet. Dieser gibt die Zeit nach Beginn der Dissoziationsmessung an, zu welcher die Anfangsbindung auf 50% reduziert ist. Im Falle eines monoexponentiellen Verlaufes der Dissoziation entspricht der $t_{50\%}$ -Wert der Halbwertszeit.

2.4.1.2 Durchführung

Zur Erfassung der Dissoziationsverläufe von [^3H]NMS oder [^3H]OxoM wurde in fünf Erlenmeyerkolben der folgende Ansatz bereitet:

1.	1600 μl Radioligand in Aq. dest.(s. 2.6)
2.	200 μl Aqua dest.
3.	16800 μl Puffer (s. 2.2.3)
4.	4000 μl Membransuspension

Die Bindungsreaktion zwischen Radioligand und Rezeptor wurde durch Zugabe der Membransuspension gestartet. Dann schloss sich eine 30 minütige Inkubationsphase an, damit Rezeptor und Radioligand ihr Bindungsgleichgewicht erreichen. Bevor nun die Dissoziation des Radioliganden durch Zugabe eines Überschusses Atropin-Lösung sichtbar gemacht wurde, wurden drei Aliquota von 1ml zur Ermittlung der Gesamtbindung entnommen. Zeitgleich mit der Atropin-Lösung wurde eine Konzentration des Modulators oder dessen Lösungsmittel (zur Ermittlung des Kontrollwertes des Dissoziationsverlaufs) zugegeben. Die „Startlösung“ setzte sich daher aus 700 μl Atropin (Endkonzentration: 1 μM) und 700 μl Testsubstanz bzw. Lösungsmittel zusammen. Der Dissoziationsverlauf wurde über 120 Minuten durch die Entnahme und Filtration (s. 2.3.3) von Aliquota von je 1 ml nach einem festgesetzten Zeitplan verfolgt. Während der Inkubations- und der Dissoziationsphase wurde der Ansatz unter permanentem Rühren in einem Wasserbad bei 23°C temperiert.

Auswertung

Die Dissoziationsgeschwindigkeit in An- und Abwesenheit des Modulators wurde bestimmt wie unter 2.4.1.1 beschrieben und gegen die jeweils eingesetzte Konzentration des allosterischen Modulators in halb-logarithmischer Form aufgetragen. Eine nicht-

lineare Regressions-Analyse mit Hilfe der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“ (Gl. 11; S. 12) ermöglichte die Bestimmung des Wendepunktes und des unteren Kurvenplateaus, welches die maximal erreichbare Verzögerung der Dissoziation angab. Das obere Kurvenplateau wurde wesentlich durch die Werte unter Kontrollbedingungen bestimmt, da diese immer in größerer Zahl vorlagen (aus jedem Versuch ein Kontrollwert). Im Falle einer Normalisierung der Daten wurde dieses Plateau als 100% gesetzt. In jedem Fall wurde mittels eines F-Testes (siehe 2.5) geprüft, ob sich die Steigung signifikant von $n_H = -1$ und das untere Kurvenplateau sich signifikant von $\text{Min} = 0$ unterschied.

Der $EC_{0,5, \text{Diss}}$ entspricht dem Wendepunkt der Kurve und steht für diejenige Modulatorkonzentration, bei der die apparente Dissoziations-Geschwindigkeits-Konstante k_{-1} halbmaximal reduziert wird. Falls der Modulator in der Lage ist, die Dissoziation des Radioliganden vollständig zu unterbinden ($\text{Min} = 0$), so entspricht der $EC_{0,5, \text{Diss}}$ dem $EC_{50, \text{Diss}}$. $EC_{0,5, \text{Diss}}$ bzw. $EC_{50, \text{Diss}}$ können als die Konzentration des Modulators betrachtet werden, bei der eine halbmaximale Besetzung der Rezeptoren durch den Modulator stattfindet (Lazareno & Birdsall, 1995), vorausgesetzt die Kinetik des Modulators ist schneller als die des Radioliganden. Der $EC_{0,5, \text{Diss}}$ ist demnach ein Maß für die Affinität des Modulators zum besetzten Rezeptor.

2.4.1.3 Kombinations-Experimente

Um zu prüfen, ob die Effekte zwei verschiedener Modulatoren am Ligand-besetzten Rezeptor über die gleiche Bindungsstelle vermittelt werden, können Dissoziations-Experimente mit einer Kombination bestimmter Konzentrationen der beiden Modulatoren durchgeführt werden. Falls Modulator A an die gleiche Bindungsstelle des Rezeptors bindet wie Modulator B, müsste eine relative Abschwächung des dissoziationsverzögernden Effekts der Substanz A zu beobachten sein. Innerhalb eines Versuches wurden 4 verschiedene Ansätze vermessen:

- 1) Kontrolle (nur durch Zugabe von Atropin sichtbar gemachte Dissoziation des Agonisten oder Antagonisten)
- 2) Modulator A + Atropin (Eigeneffekt der in der Kombination eingesetzten Konzentration des Modulators A)
- 3) Modulator B + Atropin (Eigeneffekt der in der Kombination eingesetzten Konzentration des Modulators B)

- 4) Kombination + Atropin (beide Modulatoren in der gleichen Konzentration wie in der jeweiligen Kontrolle)

2.4.2 Assoziations-Experimente

Assoziationsexperimente stellen eine Möglichkeit zur Bestimmung der Affinität allosterischer Modulatoren zum freien Rezeptor dar. Der gemessene Parameter ist die Assoziations-Geschwindigkeits-Konstante k_{obs} (da observiert) der jeweiligen Radioligand-Bindung. Diese ermöglicht die Berechnung der apparenten Assoziations-Geschwindigkeits-Konstante k_{+1} . Diese Größe dient dann zur Quantifizierung der Modulator-Effekte auf die Assoziations-Reaktion. Aus der Konzentrations-Effekt-Beziehung der Assoziations-verzögernden Wirkung kann als Maß für die Affinität des Allostere zum freien Rezeptor der $EC_{0,5, \text{Ass}}$ -Wert bestimmt werden.

2.4.2.1 Theoretische Grundlagen

Voraussetzung zur alleinigen Erfassung der Assoziations-Kinetik wäre der Ausschluss der Rückreaktion. Da dies methodisch nicht möglich ist, betrachtet man die den Assoziations-Prozess am Ursprung bei $t=0$.

Die unter 2.1 angegebene Gleichung 5, die den Gleichgewichtszustand beschreibt, vereinfacht sich zu:

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

Schröter (1999) beschreibt die Berechnung von k_{+1} aus k_{obs} , welches aus nicht-linearer Regressionsanalyse der Datenpunkte erhalten wird.

$$B_t = B_e \cdot (1 - e^{-k_{\text{obs}} \cdot t}) \quad \text{Gleichung 16}$$

B_t : Spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t

B_e : Spezifische Bindung des Radioliganden im Gleichgewicht

k_{obs} : Beobachtete Assoziations-Geschwindigkeits-Konstante

Die erste Ableitung der monophasischen Assoziations-Gleichung (16) gestattet die Berechnung der Steigung der Kurve zu jedem beliebigen Zeitpunkt t .

$$B_t = k_{obs} \cdot B_e \cdot e^{-k_{obs} \cdot t}$$

Gleichung 17

Zum Zeitpunkt $t=0$ ergibt sich daher die Steigung der Kurve zu $k_{obs} \times B_e$.

Da die Bestimmung der Affinität des Allosters zum freien Rezeptor Gegenstand dieser Untersuchungen ist, muss gewährleistet werden, dass überwiegend freie Rezeptoren zur Verfügung stehen. Daher wurde die Radioligand-Konzentration so gering gewählt, dass der Anteil der Radioligand-besetzten an der Gesamtkonzentration der Rezeptoren nicht mehr als 10% betrug. Dann kann die Interaktion des Allosters mit dem freien Rezeptor als Verringerung der Assoziations-Wahrscheinlichkeit des Radioliganden beobachtet werden. Wie bei Schröter (1999) wurde die eingesetzte Radioligand-Konzentration so gewählt, dass sie etwa einem Zehntel des K_D -Wertes entsprach ($[^3\text{H}]\text{NMS}$: $0,013 \pm 0,002\text{nM}$, $n=6$; $[^3\text{H}]\text{OxoM}$: $0,11 \pm 0,01\text{nM}$, $n=8$ (MW \pm SF)). Gleichzeitig wurde die Rezeptorkonzentration so niedrig gehalten, dass nicht mehr als 10% der eingesetzten Radioligand-Menge „weggebunden“ wurde. Das Probenvolumen musste der geringen Radioligand-Konzentration angepasst werden, um ein hinreichend großes Messsignal zu erhalten, und betrug daher hier 3 ml.

2.4.2.2 Durchführung

Zur Erfassung der Assoziationsverläufe von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ oder $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ wurde in fünf Erlenmeyerkolben der folgende Ansatz bereitet:

- | | |
|-------|---|
| 1. | 22000 μl Puffer (siehe 2.2.3) |
| <hr/> | |
| 2. | 5000 μl Membransuspension |
| <hr/> | |
| 3. | 1000 μl Aqua dest. (Kontrolle) oder Testsubstanz oder Atropin
in Aq. dest. (Bestimmung der unspezifischen
Bindung) |

Die Erlenmeyerkolben wurden ins Wasserbad verbracht, wo der Ansatz unter ständigem Rühren bei konstanten 23°C vorinkubiert wurde. Ferner wurden 5 Polyethylenimin-Gefäße mit Radioligand-Lösung im Wasserbad temperiert. Durch Zugabe von 2.000 μl dieser temperierten Radioligand-Lösungen zum Ansatz wurde die Assoziationsreaktion nach 15 Minuten gestartet. Im folgenden wurden zu bestimmten Zeitpunkten 10 Proben von jeweils 3 ml entnommen und filtriert, wie unter 2.3.3 beschrieben.

Auswertung

Die spezifische Bindung des jeweiligen Radioliganden wurde gegen die Zeit aufgetragen und der Kurvenverlauf einer nicht-linearen Regressionsanalyse unterworfen (siehe Gleichung 16, 2.4.2.1).

Nach Schröter (1999) lässt sich die apparente Assoziations-Geschwindigkeits-Konstante k_{+1} aus k_{obs} , B_{max} und L berechnen:

$$k_{+1} = \frac{k_{obs} \cdot B_{spez,e}}{[L] \cdot B_{max}} \quad \text{Gleichung 18}$$

- $B_{spez,e}$: Spezifische Radioligandbindung im Gleichgewicht in nM
- k_{obs} : Beobachtete Assoziations-Geschwindigkeits-Konstante in min^{-1}
- k_{+1} : Apparente Assoziations-Geschwindigkeits-Konstante in $\text{nM}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$
- L : Radioligand-Konzentration in nM
- B_{max} : Rezeptorkonzentration in nM

Auf diese Weise wurde zunächst der k_{+1} -Wert unter Kontrollbedingungen errechnet. Anschließend wurden k_{+1} -Werte für jeden Assoziationsverlauf in Gegenwart einer bestimmten Konzentration der Testsubstanz berechnet und auf die Tageskontrolle bezogen. Die prozentualisierten k_{+1} -Werte wurden im folgenden gegen die jeweilige Konzentration des Modulators halblogarithmisch aufgetragen. Die sigmoidale Konzentrations-Effekt-Beziehung konnte nun mittels nicht-linearer Regressionsanalyse anhand der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“ (siehe 2.3.3) analysiert werden.

Das Ausgangsniveau der Konzentrations-Effekt-Kurve wurde bei 100% konstant gesetzt, da eine Beschleunigung der Assoziation bisher nicht beschrieben wurde. Es wurde geprüft, ob die Steilheit der Kurve signifikant verschieden von $n_H = -1$ und das untere Kurvenplateau signifikant verschieden von $\text{Min} = 0$ war (F-Test, siehe 2.5).

2.5 Daten-Analyse und Statistische Auswertung

Die in Radioligand-Bindungsstudien erhobenen Daten wurden mit dem Programm Prism, Version 3.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) ausgewertet. Die zugrundeliegenden mathematischen Funktionen sind im Zusammenhang mit dem jeweiligen experimentellen Verfahren dargestellt. Simultananalysen wurden mit Sigma Plot, Version 4.0 (SPSS, Chicago, USA) vorgenommen.

Die statistische Auswertung wurde mit der Software InStat (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt.

Die in dieser Arbeit aufgeführten Mittelwerte sind arithmetische Mittelwerte (MW). Als Streuungsmaß diente der Standardfehler (SF) des Mittelwertes.

Der Vergleich von jeweils normalverteilten Mittelwerten untereinander erfolgte mittels zweiseitigem t-Test. Im Falle eines signifikanten Unterschiedes zwischen den jeweiligen Standardabweichungen der Stichproben wurde der nicht-parametrische Welch-Test verwendet.

F-Test

Die Auswertung der Messdaten erfolgte oft unter Verwendung verschiedener Modellvorstellungen. Die Entscheidung, welches der Modelle die gemessenen Datenpunkte am besten beschreibt, wurde mittels des F-Testes gesucht. Bei gleicher Anzahl von Variablen der Modellgleichungen wird die jeweilige Summe der Abweichungsquadrate (ss) verglichen. Das Modell, bei dem die errechnete Summe kleiner war, wurde als das geeignetere Modell angenommen.

Enthielten die Modellgleichungen ungleich viele Variablen, wurden zwei unabhängige Kurvenanpassungen durchgeführt und mittels der folgenden Gleichung verglichen. Diese berücksichtigt neben der Summe der Abweichungsquadrate auch die Anzahl der Freiheitsgrade (df). Die Anzahl der Freiheitsgrade ergibt sich aus der Differenz der Anzahl der Datenpunkte und der bei der Analyse geschätzten Parameter. So wird berücksichtigt, dass die Kurvenanpassung mit der größeren Anzahl an Variablen stets die kleinere Summe der Abweichungsquadrate ergibt.

$$F = \frac{(ss_1 - ss_2)/(df_1 - df_2)}{ss_2 / df_2} \quad \text{Gleichung 19}$$

ss₁: Summe der Abweichungsquadrate nach Analyse mittels des einfacheren Modells

ss₂: Summe der Abweichungsquadrate nach Analyse mittels des komplexeren Modells

df₁: Anzahl der Freiheitsgrade nach Analyse mittels des einfacheren Modells

df₂: Anzahl der Freiheitsgrade nach Analyse mittels des komplexeren Modells

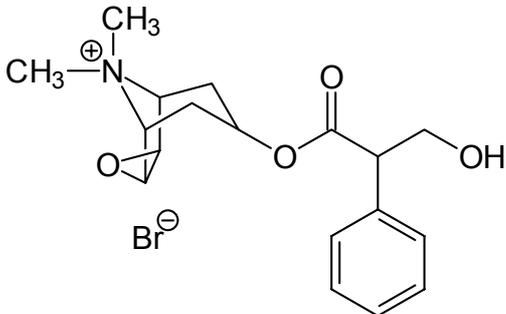
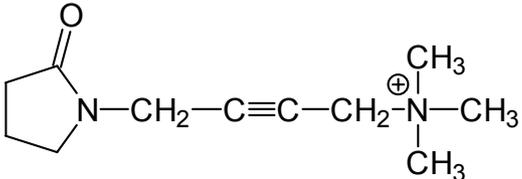
Anhand des F-Wertes kann nun geprüft werden, ob die größere Zahl der Variablen des komplexeren Modells zu einer signifikanten Abnahme der Summe der Abweichungsquadrate führt. Falls der berechnete F-Wert mindestens ebenso groß ist, wie der tabellierte Wert (z. B. in Microsoft Excel 2000 enthalten), kann für eine bestimmte Irrtumswahrscheinlichkeit angenommen werden, dass das komplexere Modell die Messdaten signifikant besser beschreibt.

Für alle durchgeführten statistischen Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau von 95% zugrunde gelegt.

2.6 Materialien

Radioliganden

Als Radioliganden fanden der Antagonist [³H]N-Methylscopolamin (Endkonzentration: 0,01nM, 0,15nM oder 1,5nM) und der Agonist [³H]OxoM (Endkonzentration: 0,1nM, 1nM oder 5nM) Verwendung. Beide wurden von der Firma NEN-Dupont, Bad Homburg bezogen. Die spezifische Konzentration der eingesetzten Chargen betrug im Falle des Antagonisten 70,0, 82,0 oder 83,5 Ci/mmol, im Falle des Agonisten hingegen 85,0, 85,8 oder 86,4 Ci/mmol. Zum Zwecke der homologen Competition kamen beide Substanzen auch in nicht-markierter Form zur Anwendung.

<p>N-Methylscopolamin (NMS)</p>	
<p>Oxotremorin M (OxoM) Der Radioligand lag als Acetat, die „kalte“ Substanz hingegen als Iodid vor.</p>	

Testsubstanzen

Die Strukturformeln der einzelnen Verbindungen sind im Ergebnisteil dieser Arbeit dem jeweiligen Substanzkapitel vorangestellt.

W84 wurde von Herrn Dr. Pfeffer (Pharmakologisches Institut der Universität Kiel) nach der Methode von Wassermann (1970) synthetisiert. TD2 wurde von Prof. Dr. Tacke (Universität Würzburg) und Mitarbeitern synthetisiert. Die verkürzten Derivate des W84 wie auch die Bispyridinium-Derivate WDuo 3 und Duo 3 wurden von Frau Prof. Dr. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg) und ihren Mitarbeitern synthetisiert und dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

Gallamintriethiodid wurde von der Firma Sigma Chemicals Co, USA bezogen. Der als antagonistisches Werkzeug eingesetzte Modulator Obidoxim wurde von der Firma Merck KGaA, Darmstadt, zur Verfügung gestellt.

Atropin wurde von der Firma Sigma Chemicals Co, USA bezogen.

Weitere Reagenzien

Die Reagenzien zur Herstellung der Membransuspension, der Puffer und der silanisierten Eppendorf-Reaktions-Gefäße sowie zur Vorbehandlung der Glasfaserfilter stammten von folgenden Herstellern:

MgHPO ₄ x 3H ₂ O	Fluka Chemie AG, Schweiz
KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O Saccharose Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KgaA, Darmstadt
Polyethylenimin (PEI) 50% [m/v] in H ₂ O Sigmacote [®] (chloriertes Organopoly-siloxan in Heptan)	Sigma Chemical Co, USA

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der Bindungseigenschaften des Agonisten [³H]OxoM und des Antagonisten [³H]NMS unter Kontroll-Bedingungen

3.1.1 Bindungseigenschaften des Agonisten [³H]OxoM und des Antagonisten [³H]NMS unter Gleichgewichts-Bedingungen

Homologe Kompetitions-Experimente

Bevor eine neu hergestellte Membransuspension für die Untersuchung der Effekte allosterischer Modulatoren verwendet werden konnte, wurden ihre Eigenschaften (Zahl der Bindungsstellen B_{max} , Affinität des Radioliganden zum Rezeptor pK_D) mittels homologer Konkurrenzexperimente (s. 2.3.1.) bestimmt. Diese Untersuchungen wurden für beide Radioliganden und zunächst, zur Analyse der Pufferabhängigkeit der Wirkung allosterischer Modulatoren auf die Agonist-Bindung (s. 3.2.), für beide Pufferbedingungen (Na,K,P_i-Puffer, Mg,P_i,Tris-Puffer, s. 2.2.3.) durchgeführt.

In Abbildung 4 sind Datensätze repräsentativer Experimente mit beiden Radioliganden unter Na,K,P_i-Bedingungen dargestellt, während Abbildung 5 in Mg,P_i,Tris-Puffer erhobene Datensätze zeigt. Die in den Abbildungen jeweils gemeinsam dargestellten Datensätze wurden unter Verwendung der gleichen Membransuspension erhoben, dies gilt jedoch nicht für die verschiedenen Pufferbedingungen. Aufgetragen ist die Gesamtbindung des jeweiligen Radioliganden in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration des Kompetitors. Die unspezifische Bindung der Radioliganden wurde in Gegenwart von 1μM Atropin bestimmt. Die nicht-lineare Regressionsanalyse der Daten erfolgte mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“ (Gl. 11, S. 12). Es wurde geprüft, ob eine Anpassung mit variablem Steigungsmaß zu einer signifikant besseren Kurvenanpassung führte als eine Anpassung mit festgesetzter Steigung von $n_H=-1$ (F-Test, $p>0,05$). Eine Kurvensteilheit von $n_H=-1$ spricht für eine Bindung des jeweiligen Radioliganden an eine einheitliche Population nicht-interagierender Rezeptorproteine.

Ergebnisse

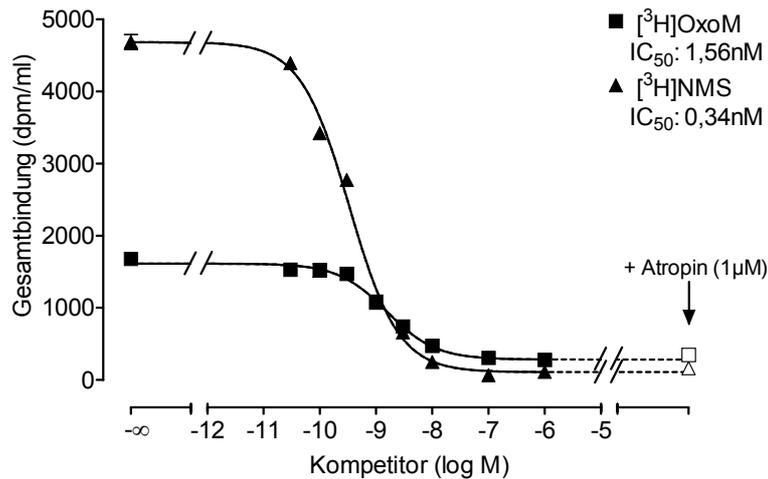


Abbildung 4: Homologe Konkurrenz zwischen dem Agonisten $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ (1nM) und nicht-markiertem OxoM, sowie zwischen dem Antagonisten $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (0,15nM) und nicht-markiertem NMS in Na,K,P_i-Puffer.

Ordinate: Gesamtbindung des jeweiligen Radioliganden in dpm/ml Reaktionsansatz.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des jeweiligen Wettbewerbers.

Die offenen Symbole kennzeichnen das Niveau der unspezifischen Bindung, das in beiden Fällen in Gegenwart von 1µM Atropin bestimmt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler eines jeweils repräsentativen Experiments. Jeder Wert wurde dabei dreifach bestimmt. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Analyse erfolgte mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“.

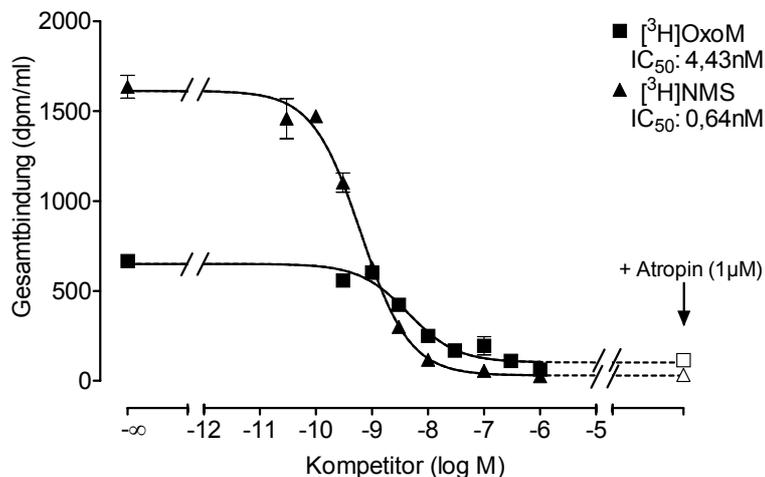


Abbildung 5: Homologe Konkurrenz zwischen dem Agonisten $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ (1nM) und nicht-markiertem OxoM, sowie zwischen dem Antagonisten $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (0,15nM) und nicht-markiertem NMS in Mg,P_i,Tris-Puffer.

Ordinate: Gesamtbindung des jeweiligen Radioliganden in dpm/ml Reaktionsansatz.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des jeweiligen Wettbewerbers.

Die offenen Symbole kennzeichnen das Niveau der unspezifischen Bindung, das in beiden Fällen in Gegenwart von 1µM Atropin bestimmt wurde. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler eines jeweils repräsentativen Experiments. Jeder Wert wurde dabei dreifach bestimmt. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Analyse erfolgte mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“.

Der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve gibt die IC_{50} -Konzentration an. Die Kurvensteigungen waren nicht verschieden von 1. Unter Verwendung der Gleichung von Cheng und Prusoff (Gl. 6, S. 7) lässt sich aus IC_{50} die Gleichgewichts-Dissoziations-Konstante K_D ableiten. Ferner kann nach De Blasi die Anzahl der Bindungsstellen (B_{max}) berechnet werden (Gl. 8, S. 8).

Neben dem oben beschriebenen Verfahren zur Bestimmung von K_D und B_{max} -Werten ist auch die Ermittlung der Größen durch eine Transformation nach Scatchard (1949) und nachfolgende lineare Regressionsanalyse möglich (s. 2.3.1).

Diese Form der Analyse ist für die in Abbildung 4 und Abbildung 5 gezeigten Datensätze nun in Abbildung 6 und Abbildung 7 dargestellt. Messpunkte, die in Gegenwart hoher Konzentrationen des Kompetitors erhoben wurden und das Niveau der unspezifischen Bindung nahezu erreicht haben, weisen methodisch bedingt eine hohe Streuung auf. Daher wurden sie in dieser wie auch in anderen Scatchard-Analysen nicht berücksichtigt.

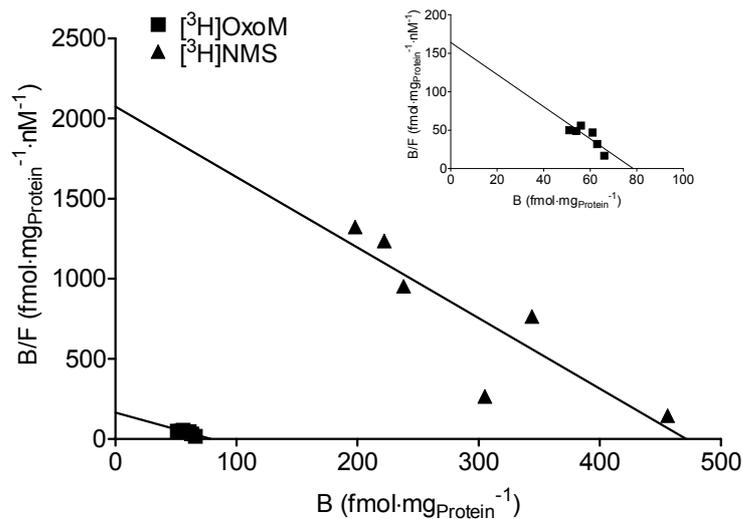


Abbildung 6: Scatchard-Auftragung der Daten aus Abbildung 4

Ordinate: Quotient des spezifisch gebundenen Radioliganden (B) in $fmol/mg_{Protein}$ und des ungebundenen (markierter + nicht-markierter) Liganden (F) in nM.

Abszisse: Konzentration des spezifisch gebundenen Radioliganden (B) in $fmol/mg_{Protein}$. Die dargestellten Geraden wurde mittels linearer Regressionsanalyse anhand der Scatchard-Gleichung erhalten. Das „Inset“ zeigt die für die OxoM-Bindung erhaltenen Datenpunkte sowie die zugehörige Regressionsanalyse vergrößert.

Der Absolutwert des Kehrwertes der Steigung der Regressionsgeraden ergibt K_D , während der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse den Wert für B_{max} angibt.

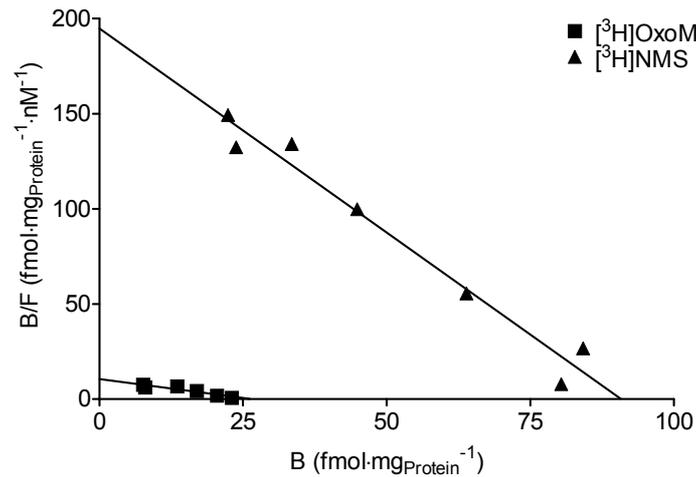


Abbildung 7: Scatchard-Auftragung der Daten aus Abbildung 5.

Ordinate: Quotient des spezifisch gebundenen Radioliganden (B) in fmol/mg_{Protein} und des ungebundenen (markierter + nicht-markierter) Liganden (F) in nM.

Abszisse: Konzentration des spezifisch gebundenen Radioliganden (B) in fmol/mg_{Protein}. Die dargestellte Gerade wurde mittels linearer Regressionsanalyse anhand der Scatchard-Gleichung erhalten.

Die Auswertung der Bindungsversuche mit beiden Analysenverfahren erfolgte für alle eingesetzten Homogenate.

An einer einzelnen Membransuspension wurden die K_D und B_{max} -Werte für beide Pufferbedingungen und für beide Radioliganden zwecks direkter Vergleichbarkeit gemessen (Tabelle 1).

		pK_D		B_{max} (fmol/mg _{Protein})		n
		Cheng & Prusoff	Scatchard	de Blasi	Scatchard	
Na,K,P _i - Puffer	OxoM	9,45 ± 0,17 ^a	9,22 ± 0,17 ^b	17 ± 4 ^d	32 ± 2 ^d	3
	NMS	9,42 ± 0,11 ^c	9,51 ± 0,09 ^c	76 ± 5 ^d	95 ± 8 ^d	3
Mg,P _i ,Tris- Puffer	OxoM	8,57 ± 0,07	8,68 ± 0,11	23 ± 1	24 ± 6	4
	NMS	9,23 ± 0,05	9,28 ± 0,03	68 ± 4	96 ± 3	3

Tabelle 1: Kenngrößen der [³H]OxoM-Bindung bzw. [³H]NMS-Bindung einer Membransuspensionen erhoben unter beiden Puffer-Bedingungen. n: Anzahl der durchgeführten Bestimmungen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler.

a: Der Wert für pK_D ist signifikant größer als im Mg,P_i,Tris- Puffer ($p < 0,001$).

b: Der Wert für pK_D ist signifikant größer als im Mg,P_i,Tris- Puffer ($p < 0,05$).

c: Der Wert für pK_D ist nicht signifikant größer als im Mg,P_i,Tris-Puffer ($p > 0,05$).

d: Der Wert für B_{max} ist nicht signifikant verschieden von dem im Mg,P_i,Tris-Puffer bestimmten Wert ($p > 0,05$).

Unter Na,K,P_i-Bedingungen konnte für den Agonisten [³H]OxoM eine Zunahme der Affinität gegenüber den Mg,P_i,Tris-Bedingungen beobachtet werden (Tabelle 1). Die Methode zur Berechnung des pK_D-Wertes hat keinen Einfluß auf das Ergebnis (pK_D nach Scatchard bestimmt ist nicht signifikant verschieden von pK_D nach Cheng und Prusoff, t-Test, p>0,05).

Unter beiden Inkubations-Bedingungen bindet der Agonist nur an 25 bis 30% der Antagonist-Bindungsstellen, welche ein homogene Fraktion (n_H=-1) hochaffiner Rezeptorproteine repräsentieren. Dieser Befund zeigt die Fähigkeit des Agonisten, zwischen verschiedenen Rezeptor-Zuständen zu differenzieren, nämlich zwischen einem hochaffinen, G-Protein-gekoppelten Zustand und einem niederaffinen, G-Protein-entkoppelten Zustand (Waelbroeck et al., 1981). Letzterer lässt sich mit [³H]OxoM unter den gegebenen Bedingungen nicht erfassen. In Tabelle 2 sind die Mittelwerte und Standardfehler der pK_D und B_{max}-Werte aller hergestellten Membransuspensionen gezeigt.

		pK _D		B _{max} (fmol/mg _{Protein})		n
		Cheng & Prusoff	Scatchard	de Blasi	Scatchard	
Na,K,P _i - Puffer	OxoM	9,38 ± 0,09 ^a	9,09 ± 0,05	35 ± 5	59 ± 8	25
	NMS	9,85 ± 0,07	9,73 ± 0,07	140 ± 22	223 ± 36	20
Mg,P _i ,Tris- Puffer	OxoM	8,55 ± 0,05	8,63 ± 0,08	21 ± 1	25 ± 4	6
	NMS	9,41 ± 0,09	9,41 ± 0,08	68 ± 2	96 ± 3	6

Tabelle 2: Kenngrößen der [³H]OxoM-Bindung bzw. [³H]NMS-Bindung an Membransuspensionen erhoben unter beiden Puffer-Bedingungen. n: Anzahl der durchgeführten Bestimmungen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler aus Bestimmungen an allen untersuchten Membransuspensionen. Einzelwerte für jede Membranpräparation sind im Anhang gegeben.

a: Die Anzahl der Bestimmungen beträgt aus methodischen Gründen hier 21 (näheres siehe Anhang).

Heterologe Kompetitions-Experimente

Zur Bestimmung der Affinität des Agonisten zum hochaffinen und zum niederaffinen Zustand wurden heterologe Konkurrenzexperimente durchgeführt. Der radioaktiv markierte orthosterische Antagonist ([³H]NMS) und der orthosterische Agonist (OxoM)

in nicht-markierter Form konkurrieren dabei um die Bindungsstellen. In Abbildung 8 ist ein repräsentatives Experiment dargestellt. Die nicht-lineare Regressionsanalyse erfolgte unter zwei verschiedenen Modellvorstellungen, die mittels eines F-Testes verglichen wurden. Zum einen wurde die „vier Parameter enthaltende logistische Gleichung“ unter Festsetzung des Steilheitsmaßes auf -1 als ein Modell für eine Interaktion an einer einheitlichen Rezeptorpopulation eingesetzt. Zum anderen erfolgte eine Regressionsanalyse unter Verwendung eines Zwei-Bindungsstellen-Modells. In allen Fällen konnten die erhobenen Datensätze signifikant besser durch das Modell für zwei Bindungsstellen beschrieben werden (F-Test, $p < 0,05$).

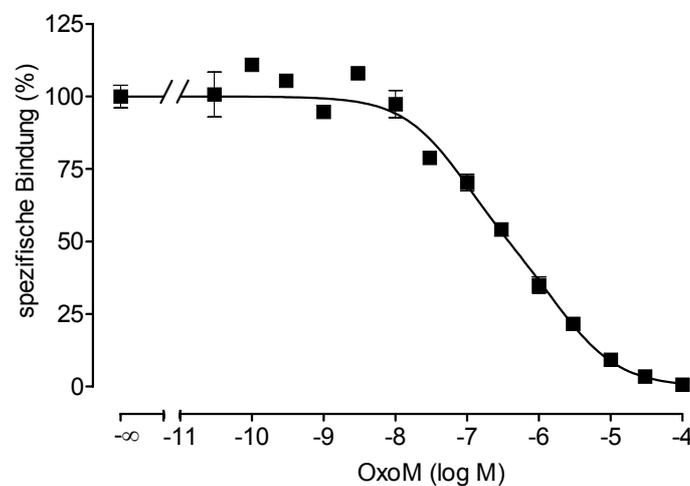


Abbildung 8: Hemmung der $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung durch OxoM im Mg, P_i , Tris-Puffer.

Ordinate: spezifische $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung in Prozent der Gesamtbindung unter Kontrollbedingungen; das 0%-Niveau entspricht der unspezifischen Bindung in Gegenwart von $1\mu\text{M}$ Atropin.

Abszisse: Logarithmus der molaren OxoM-Konzentration.

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler eines repräsentativen Experiments. Jeder Wert wurde dabei dreifach bestimmt. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Datenpunkte konnten durch eine Analyse mittels eines Modells für zwei Bindungsstellen signifikant besser beschrieben werden als mittels eines Ein-Kompartiment-Modells. Die Wendepunkte der Kurve liegen bei $\text{WP}_{(h)} = 82\text{nM}$ und $\text{WP}_{(n)} = 1309\text{nM}$, woraus nach der Gleichung von Cheng und Prusoff als Maß für die Affinität $\text{pK}_{i(h)} = 7,19$ und $\text{pK}_{i(n)} = 5,79$ gebildet wurden. Der Anteil der hochaffinen Bindungsstellen betrug 52%.

Danach lassen sich zwei Wendepunkte (IC_{50}), sowie der Anteil der Rezeptoren an der Zahl der $[^3\text{H}]$ NMS-besetzten Rezeptoren ($R_{(h)}/R_{(t)}$) bestimmen, an die OxoM hochaffin bindet (hochaffines Kompartiment, $R_{(h)}$). Mittels der Gleichung von Cheng und Prusoff (Gleichung 6) wurden pK_i -Werte für das hoch- und das niederaffine Kompartiment der

OxoM-Bindung berechnet. Die Ergebnisse dieser Analyse sind für beide Pufferbedingungen in Tabelle 3 dargestellt.

	$pK_{i(h)}$	$pK_{i(n)}$	$R_{(h)}/R_{(t)}$	n
Na,K,Pi-Puffer	$7,37 \pm 0,11$	$5,57 \pm 0,05^*$	$52 \pm 4\%$	3
Mg,Pi,Tris-Puffer	$7,36 \pm 0,09$	$5,83 \pm 0,07$	$53 \pm 2\%$	3

Tabelle 3: Ergebnisse der heterologen Konkurrenzexperimente zur Hemmung der [³H]NMS-Bindung durch OxoM für beide Pufferbedingungen. Die Indices kennzeichnen minus log-Inhibitionskonstanten für den hochaffinen (h) bzw. niederaffinen (n) Anteil der Bindungsstellen. Die Werte in der vierten Spalte geben den prozentualen Anteil der hochaffinen Bindungsstellen ($R_{(h)}$) an der Gesamtzahl der Bindungsstellen ($R_{(t)}$) an. In der letzten Spalte ist die Anzahl der durchgeführten Bestimmungen angegeben.

*: Hier besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Bestimmungen im Na,K,Pi- bzw. Mg,Pi,Tris-Puffer (t-Test, $p < 0,05$).

3.1.2 Dissoziation von [³H]OxoM und [³H]NMS unter Kontrollbedingungen

Im Gegensatz zur Kinetik der Assoziation (siehe 3.3.6.2) war die Kinetik der Dissoziation des Agonisten, anders als die des Antagonisten, teilweise biphasisch.

Die überwiegende Zahl (Na,K,Pi: 51 von 68; Mg,Pi,Tris: 2 von 5) der [³H]OxoM-Dissoziationsverläufe (Abbildung 9) unter Kontrollbedingungen konnte unter Annahme eines biphasischen Modells signifikant besser beschrieben werden als mittels einer monoexponentiellen Funktion (F-Test, $p < 0,05$). Dieses Verhalten von [³H]OxoM wurde bereits von Maaß (1995) beschrieben. Zur Charakterisierung der biphasischen Dissoziationskurven wurden die Dissoziations-Geschwindigkeits-Konstanten (k_{-1}) des schnellen und des langsamen Kompartiments sowie die Kompartimentgrößen (Anteil der markierten Rezeptor-Ligand-Komplexe in Prozent der Gesamtzahl, die mit der jeweiligen Geschwindigkeit zerfallen) verwendet.

Die Biphasizität der OxoM-Dissoziation blieb in Gegenwart einiger Testsubstanzen nicht immer erhalten (s. u.). In diesen Fällen wurde zur Erfassung der Dissoziationsgeschwindigkeit der $t_{50\%}$ -Wert verwendet. Dieser gibt die Zeit nach „Auslösen“ der Dissoziation an, zu welcher die Anfangsbindung auf 50% reduziert ist. Im Falle eines monoexponentiellen Verlaufes entspricht der $t_{50\%}$ -Wert der Halbwertszeit. In Tabelle 4 sind die kinetischen Größen zur Beschreibung der [³H]OxoM-Dissoziation unter Kontrollbedingungen zusammengefasst.

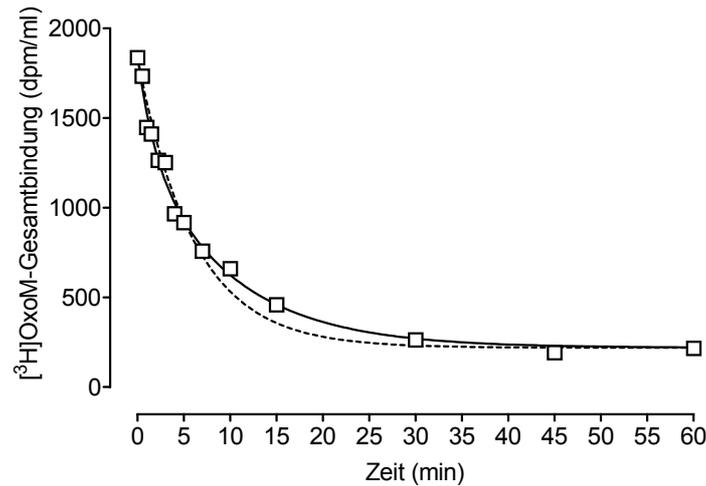


Abbildung 9: Dissoziation des Agonisten $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ unter Kontrollbedingungen unter $\text{Na}, \text{K}, \text{P}_i$ -Bedingungen.

Ordinate: $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ -Gesamtbindung in dpm/ml.

Abszisse: Zeit nach Zugabe von Atropin ($1\mu\text{M}$) in min.

Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment. Die Auswertung erfolgte mittels einer Funktion, die zwei Bindungsstellen annimmt (durchgezogene Linie). Zu Vergleichszwecken ist eine Auswertung mittels einer Funktion, die nur eine Bindungsstelle annimmt, als unterbrochene Linie dargestellt. Der Kurvenbeginn wurde auf den Startwert der Bindung bei $t=0$ festgesetzt. Die Funktion, die zwei Bindungsstellen berücksichtigt, konnte die Datenpunkte signifikant besser beschreiben (F-Test, $P < 0,05$). Aus der Gesamtzahl der $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ -besetzten Rezeptoren dissoziieren 31% schnell („schnelles“ Kompartiment) und 69% langsam („langsameres“ Kompartiment). Die Halbwertszeiten betragen $t_{1/2(s)} = 1,30\text{min}^{-1}$ und $t_{1/2(l)} = 6,71\text{min}^{-1}$.

	schnelles Kompartiment	langsameres Kompartiment
k_{-1} (min^{-1})	32 ± 16	$0,13 \pm 0,01$
$t_{1/2}$ (min)	$0,5 \pm 0,1$	$6,0 \pm 0,3$
Kompartiments-Größe	$27 \pm 2\%$	$73 \pm 2\%$
$t_{50\%}$ -Wert (min)	$3,52 \pm 0,08$	
$t_{1/2}$ -Wert (min)	$4,14 \pm 0,11^*$	

Tabelle 4: Zusammenfassung der kinetischen Größen der $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ -Dissoziation in Abwesenheit einer Testsubstanz. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler aus 51 signifikant besser biphasischen Dissoziationsverläufen unter $\text{Na}, \text{K}, \text{P}_i$ -Bedingungen. *: Mittelwerte und Standardfehler der monophasischen Analyse aller 68 Dissoziationsverläufe. Dieser Mittelwert unterschied sich signifikant ($p < 0,0001$, t-Test mit Welch-Korrektur) von dem Wert der $t_{50\%}$ -Auswertung der biphasischen Verläufe.

Die Kurvenverläufe der Dissoziation des Antagonisten $[^3\text{H}]\text{NMS}$ konnten durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden. Die Halbwertszeit betrug $5,92 \pm 0,16$ Minuten (Mittelwert und Standardfehler, $n=56$).

3.1.3 Untersuchungen zum allosterischen Eigeneffekt von Oxo M

Jakubík et al. (1997) erhoben Befunde, die sich auch so deuten ließen, dass der Agonist OxoM die allosterische Bindungsstelle von muskarinischen M₂-Rezeptoren benutzen könnte. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass OxoM sich an M₂-Rezeptoren anlagern kann, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS besetzt ist. Dies könnte sich zeigen: 1. in einer Aufhebung der [³H]NMS-Dissoziation und/oder 2. in der Abschwächung des Effektes eines anderen allosterischen Modulators.

Es wurde geprüft, ob unter den hier angewendeten Versuchs-Bedingungen (Na,K,P_i-Bedingung) derartige Hinweise auf eine Besetzung der allosterischen Bindungsstelle durch OxoM zu beobachten sind. In einem gemeinsamen Versuchsansatz wurde die [³H]NMS-Dissoziation gemessen

- a) unter Kontrollbedingungen
- b) in Gegenwart einer sehr hohen, Rezeptor sättigenden Konzentration OxoM (1mM)
- c) in Gegenwart einer etwa halbmaximal wirksamen Konzentration des Modulators W84 (20nM) und
- d) in Gegenwart einer Kombination beider Substanzen in den genannten Konzentrationen.

Abbildung 9 zeigt beispielhaft das Ergebnis eines solchen gemeinsamen Versuchansatzes.

Zur weiteren Betrachtung der Befunde wurde der Kehrwert der Halbwertszeit der Dissoziation in Abwesenheit einer Testsubstanz gleich 100% gesetzt und die der Ansätze mit Testsubstanz darauf bezogen (Abb. 10). In Tabelle 5 sind Mittelwerte und Standardfehler der so erhaltenen Meßergebnisse angegeben.

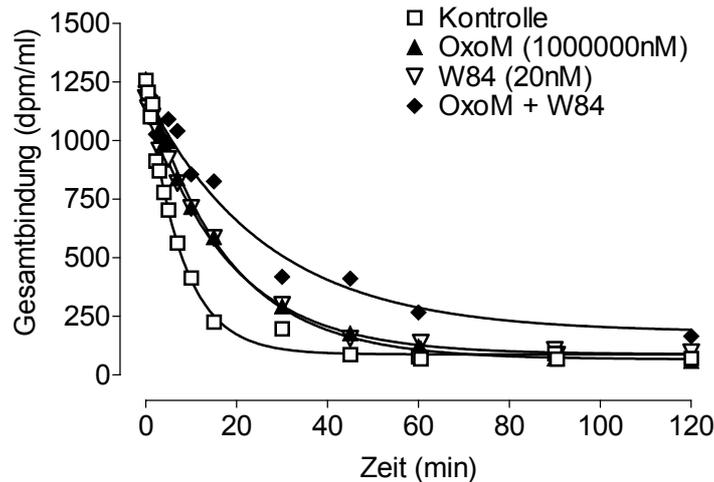


Abbildung 10: Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation durch ausgewählte Konzentrationen W84 und OxoM sowie durch die Kombination beider. Dargestellt sind die Dissoziationsverläufe eines repräsentativen Experiments, durchgeführt in Na,K,P_i-Puffer.

	OxoM (1000000nM)	W84 (20nM)	Kombination
1/ t _{50%} (%)	40,9 ± 1,0	40,8 ± 2,0	31,1 ± 1,4*

Tabelle 5: Zusammenfassung der Befunde zur Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation durch ausgewählte Konzentrationen OxoM, W84 und eine Kombination beider. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten.

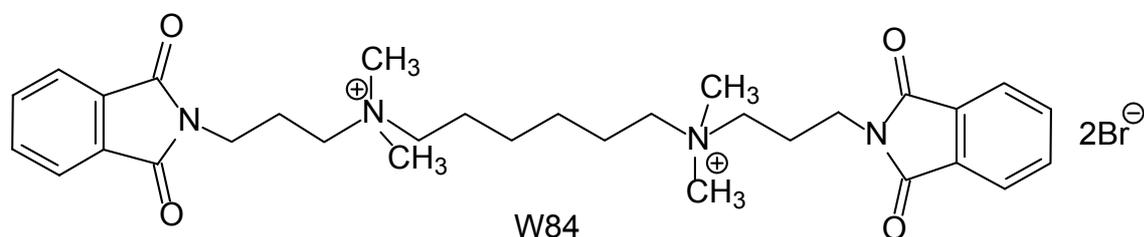
*: Wert der Kombination unterscheidet sich signifikant von dem der einzelnen Substanzen (p<0,01, t-Test).

In Gegenwart von OxoM oder W84 wurde die [³H]NMS-Dissoziation jeweils um den Faktor etwa 2 verzögert. Die sehr hohe Konzentration von OxoM (1000000nM) wurde gewählt, um mit Sicherheit alle spezifischen hoch- und niederaffinen OxoM-Bindungsstellen zu besetzen. Falls die Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation durch OxoM durch eine spezifische Interaktion des OxoM mit der allosterischen Bindungsstelle bewirkt würde, müsste OxoM, wie der „allosterische Antagonist“ Obidoxim (siehe 3.4), als partieller, allosterischer Modulator die Effekte des Modulators W84 abschwächen. Es wurde jedoch eine stärkere dissoziationsverzögernde Wirkung der Kombination von OxoM und W84 beobachtet, als in Gegenwart der jeweiligen Substanz alleine. Offenbar vermag OxoM in einer Konzentration von 1000000nM am [³H]NMS-Rezeptor-Komplex erst ca. 50% der Rezeptoren zu besetzen (Dissoziationsverzögerung auf etwa 50%).

Tränkle und Mitarbeiter (1996) konnten zeigen, dass sehr hohe Konzentrationen des orthosterischen Antagonisten Atropin in der Lage sind, die [³H]NMS-Dissoziation zu

verzögern. Dieser Effekt des Atropin ist ein unspezifischer Effekt. In Analogie dazu sind die hier beobachteten Effekte von OxoM auf die [³H]NMS-Dissoziation ebenso als unspezifischer Effekt zu deuten: zwar wird die Dissoziation um den Faktor 2 verzögert, aber erst in Gegenwart extrem hoher Konzentrationen von OxoM.

3.2 Untersuchungen zur Pufferabhängigkeit des Effektes allosterischer Modulatoren auf die Dissoziation des Agonisten [³H]OxoM am Beispiel von W84



Bisherige Untersuchungen zur dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von W84 mit dem Agonisten [³H]OxoM wurden im Mg,P_i,Tris-Puffer durchgeführt (Maaß, 1995). Abbildung 11 zeigt diese (unterbrochene Kurve) sowie unter gleichen Bedingungen orientierend erhobene eigene Befunde. Die Kennzahlen der dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Da die Dissoziation des Agonisten hier nur selten signifikant besser durch ein biphasisches Modell beschrieben werden konnte (2 von 5 in Abwesenheit von Testsubstanz, 7 von 19 Verläufen in Gegenwart von Testsubstanz), wurde der Parameter t_{50%} zur Erfassung der dissoziationsverzögernden Wirkung verwendet. Die erhaltenen t_{50%}-Werte wurden gegen die eingesetzte Konzentration des Modulators aufgetragen. Das obere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve wurde gleich 100% gesetzt und die Werte darauf bezogen. Die nicht-lineare Regressionsanalyse erfolgte mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“.

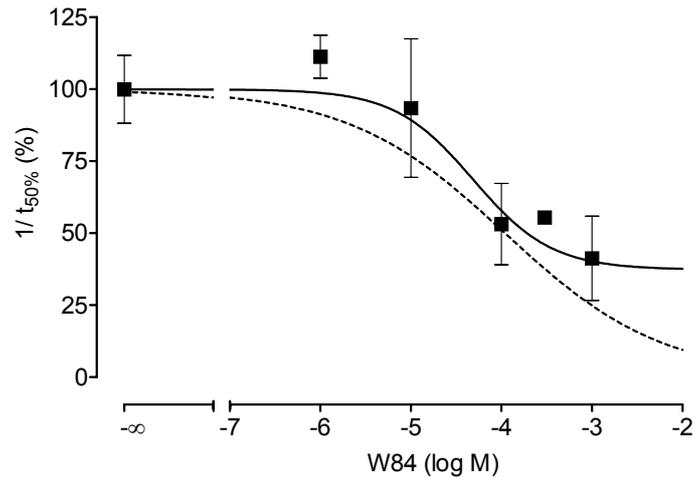


Abbildung 11: Effekt von W84 auf die [³H]OxoM-Dissoziation im Mg,Pi,Tris-Puffer.
Ordinate: Geschwindigkeit der [³H]OxoM-Dissoziation (1/ t_{50%}) in Prozent des Ausgangsplateaus.
Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators W84. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 2 bis 5 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Analyse erfolgte mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“ (durchgezogene Linie). Zu Vergleichszwecken ist die Konzentrations-Effekt-Kurve, wie sie bei Maaß (1995) beschrieben wurde, mit dargestellt (unterbrochene Linie).

Die Bestimmung der Werte für die Kurvensteilheit, pEC_{0,5,Dis} und für das untere Plateau erfolgte aus der gemeinsamen Analyse aller erhobenen Datenpunkte.

	pEC _{0,5,Dis}	unteres Plateau (Min)	Kurvensteilheit n _H
diese Arbeit	4,31 ± 0,55	37 ± 20%	-1,58 ± 0,54 ^{ns}
Maaß (1995)	3,96*	42% ^a	-0,5

Tabelle 6: Kennzahlen der in Abbildung 11 gezeigten Konzentrations-Effekt-Kurven (Mittelwerte und Standardfehler).

*: Das untere Plateau wurde von Maaß (1995) zur Bestimmung des Wertes auf null konstant gesetzt.

a: Hier ist nicht das untere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve, sondern die maximal erreichbare Dissoziationsverzögerung durch den Modulator (W84 0,3mM) angegeben.

Die genannten Werte für pEC_{0,5,Dis} und das untere Kurvenniveau unterscheiden sich jeweils nicht signifikant (t-Test, p>0,05).

ns: Die Steilheit der Kurve ist nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test, p>0,05).

Tränkle und Mitarbeiter konnten für den [³H]NMS-besetzten Rezeptor eine etwa 50fache Zunahme der Affinität von W84 bei Austausch des Mg,Pi,Tris-Puffer gegen einen Na,K,Pi-Puffer zeigen (Tränkle et al., 1996). Es wurde geprüft, ob diese Beobachtung auch für den [³H]OxoM-besetzten Rezeptor zutrifft.

Konzentrations-Effekt-Kurven für die dissoziationsverzögernde Wirkung von W84 unter beiden Pufferbedingungen sind in Abbildung 12 gezeigt. Die zugehörigen Werte sind in Tabelle 7 aufgeführt. Die Dissoziationsverläufe von [³H]OxoM unter Kontrollbedingungen waren unter Na,K,P_i-Bedingungen in 4 von 8 Fällen signifikant besser durch ein biphasisches Modell zu beschreiben, in Gegenwart von W84 nur in 7 von 29 Fällen, weshalb auch diese Auswertung mittels des 1/ t_{50%}-Wertes erfolgte.

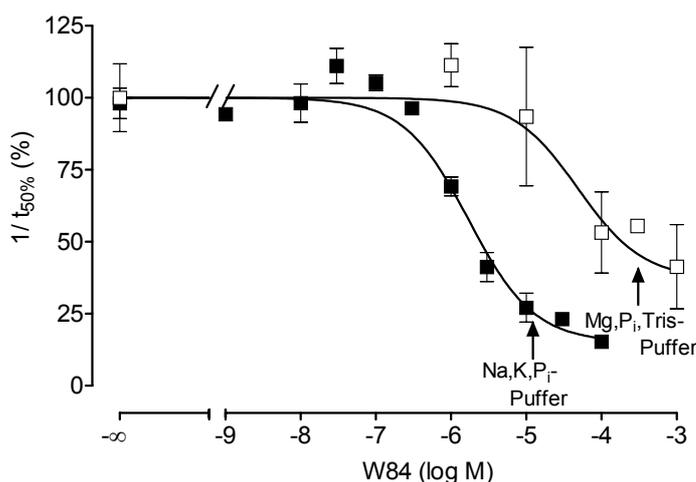


Abbildung 12: Effekt von W84 auf die [³H]OxoM-Dissoziation unter beiden Pufferbedingungen. Ordinate: Geschwindigkeit der [³H]OxoM-Dissoziation (1/ t_{50%}) in Prozent des Ausgangsplateaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators W84. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 2 bis 8 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Analyse erfolgte mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“.

	pEC _{0,5,Diss}	unteres Plateau (Min)	Kurvensteilheit n _H	n
Na,K,P _i -Puffer	5,77 ± 0,12*	15 ± 6%	-1,57 ± 0,47 ^{ns}	8
Mg,P _i ,Tris-Puffer	4,31 ± 0,55	37 ± 20%	-1,58 ± 1,58 ^{ns}	5

Tabelle 7: Kenngrößen der in Abbildung 12 gezeigten Konzentrations-Effekt-Kurven (Mittelwerte und Standardfehler).

n: Anzahl der Experimente

*: Wert unterscheidet sich nicht signifikant von dem in Mg,P_i,Tris-Puffer bestimmten Wert (p>0,05, t-Test mit Welch-Korrektur).

ns: Die Steilheit der Kurve ist nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test, p>0,05).

Es wurde geprüft, ob die sich die beiden Konzentrations-Effekt-Kurven signifikant unterscheiden. Dazu wurde eine gemeinsame nicht-lineare Regressionsanalyse beider Datensätze mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“

durchgeführt. Der Vergleich (siehe 2.5) der gemeinsamen Analyse mit den oben dargestellten einzelnen Analysen der Datensätze zeigte, dass durch die getrennte Analyse die Datenpunkte signifikant besser beschrieben werden konnten (F-Test, $p < 0,05$). Die Konzentration des Modulators, die einen halbmaximalen Effekt bewirkt, konnte durch den Wechsel der Pufferbedingungen etwa um den Faktor 30 vermindert werden. Das Ausmaß der maximalen Verzögerung erreichte unter Mg,P_i,Tris-Bedingungen Faktor 2,5 und unter Na,K,P_i-Bedingungen Faktor 6. Die Pufferabhängigkeit der dissoziationsverzögernden Wirkung von W84 konnte demnach am [³H]OxoM (Faktor 30) wie am [³H]NMS-besetzten Rezeptor (Faktor 50, Tränkle et al., 1996) beobachtet werden.

3.3 Interaktion verschiedener allosterischer Modulatoren mit dem freien, dem [³H]OxoM- und dem [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptor unter Na,K,P_i-Bedingungen

3.3.1 W84

3.3.1.1 Effekte von W84 auf die Dissoziation von [³H]OxoM und [³H]NMS

Die Effekte von W84 auf die Dissoziation des Agonisten [³H]OxoM und Antagonisten [³H]NMS wurden untersucht, wie unter 2.4.1 beschrieben. Die Effekte des Modulators auf die Dissoziation des Agonisten sind in 3.1.3 beschrieben. Die Effekte von W84 auf die Dissoziation von [³H]NMS und [³H]OxoM im Na,K,P_i-Puffer sind in Abbildung 13 gemeinsam dargestellt.

Die Dissoziations-Geschwindigkeit von [³H]NMS wurde in Anwesenheit des Modulators vermindert und in hohen Konzentrationen von W84 vollständig gehemmt (Kurvenanpassung mit bei Min=0 festgesetztem unteren Plateau ist nicht verschieden von einer Anpassung mit freiem unteren Plateau, F-Test, $p > 0,05$). Die Dissoziation von [³H]OxoM konnte nur maximal um den Faktor 7 verzögert werden, denn das untere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve des Agonisten liegt bei 15%. Die charakterisierenden Größen der Konzentrations-Effekt-Beziehungen sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

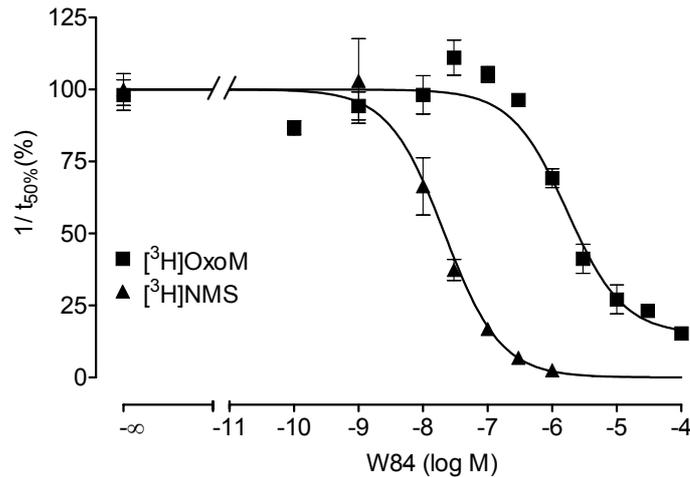


Abbildung 13: Gegenüberstellung der Effekte von W84 auf die Dissoziations-Geschwindigkeit des Agonisten $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ (Quadrate, Kurve aus Abb. 9) und des Antagonisten $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (Dreiecke).

Ordinate: Geschwindigkeit der Dissoziation ($1/t_{50\%}$) in Prozent des Ausgangsplateaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators W84. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 2 bis 8 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Analyse erfolgte mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“. Die Steilheit wurde als $n_H = -1$ und das untere Plateau bei $\text{Min} = 0$ konstant gesetzt, falls die Analyse ohne Festsetzung der Parameter keine signifikant bessere Anpassung ergab (F-Test, $p > 0,05$).

	$pEC_{0,5,\text{Diss}}$	unteres Plateau (Min)	Kurvensteilheit n_H	n
$[^3\text{H}]\text{OxoM}$	$5,77 \pm 0,12^*$	$15 \pm 6\%^a$	$-1,57 \pm 0,47^{\text{ns}}$	8
$[^3\text{H}]\text{NMS}$	$7,67 \pm 0,04$	$0,46 \pm 6,45$	$-1,17 \pm 0,43^{\text{ns}}$	5

Tabelle 8: Kenngrößen der in Abbildung 13 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für die dissoziationsverzögernde Wirkung von W84 (Mittelwerte und Standardfehler).

n: Anzahl der Experimente

*: Wert ist signifikant verschieden von dem mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bestimmten Wert (t-Test mit Welch-Korrektur, $p < 0,0001$)

a: Das untere Plateau war signifikant verschieden von Null (F-Test, $p < 0,05$).

ns: Die Steilheit der Kurve ist nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test, $p > 0,05$).

Die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit von W84 gegenüber dem Antagonisten ist größer als die gegenüber dem Agonisten: die Konzentration des Modulators, die eine halbmaximale Verzögerung der Dissoziation von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bewirkt, ist um den Faktor 100 kleiner als jene, die die Agonist-Dissoziation ebenso zu hemmen vermochte. Ferner ist W84 in der Lage, die Antagonist-Dissoziation vollständig zu hemmen, wohingegen die Agonist-Dissoziation nur maximal um einen Faktor von etwa 7 verzögert wird.

3.3.1.2 Effekte von W84 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]OxoM und [³H]NMS

Um die Affinität von W84 zum freien Rezeptor zu ermitteln und die Kooperativität mit dem Radioliganden zu bestimmen, wurden Gleichgewichts-Bindungs-Experimente durchgeführt wie in 2.3.2. beschrieben. Die notwendige Inkubationszeit wurde aus den kinetischen Daten errechnet und lag für Untersuchungen mit [³H]OxoM bei 2 Stunden, für Untersuchungen mit [³H]NMS bei 15 Stunden. Die Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung 14 dargestellt. Die mittels dieser Versuche bestimmten Werte für pK_A und pα sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

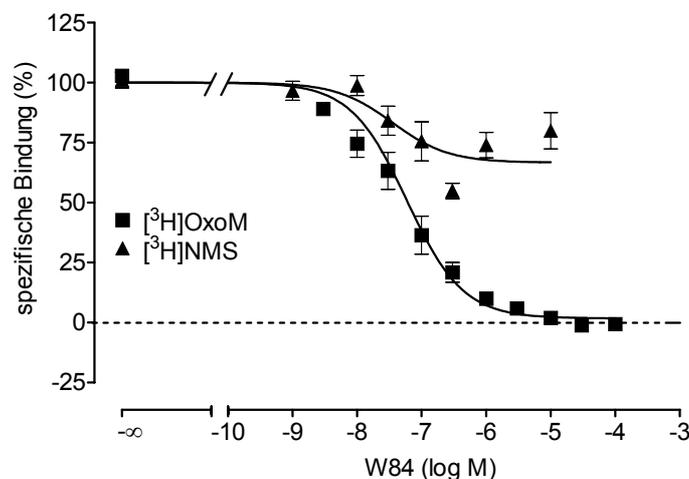


Abbildung 14: Einfluss von W84 auf die Gleichgewichtsbindung des Agonisten [³H]OxoM (1nM, Quadrate) sowie des Antagonisten [³H]NMS (0,15nM, Dreiecke).

Ordinate: spezifische Bindung des jeweiligen Radioliganden in Prozent des Ausgangsplateaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators W84.

Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 4 bis 5 Experimenten. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Symbolgröße hinausgehen. Die dargestellten Kurvenzüge wurden mit Hilfe der Kenngrößen pK_A und pα (Tab. 9) erhalten.

	pK _A	pα	p(αK _A)	n
[³ H]OxoM	7,49 ± 0,17 ^{ns}	-1,96 ± 0,14	5,53 ± 0,28	4
[³ H]NMS	7,54 ± 0,26	-0,24 ± 0,06	7,30 ± 0,19	5

Tabelle 9: Kenngrößen der in Abbildung 14 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für den Effekt von W84 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]OxoM bzw. [³H]NMS (Mittelwerte und Standardfehler).

pK_A: Affinität des allosterischen Modulators zum freien Rezeptor; pα: Maß für die Kooperativität zwischen dem jeweiligen Radioliganden und W84, n: Anzahl der durchgeführten Bestimmungen.

ns: Der Wert für pK_A unterscheidet sich nicht signifikant von dem mit [³H]NMS bestimmten (t-Test, p>0,05).

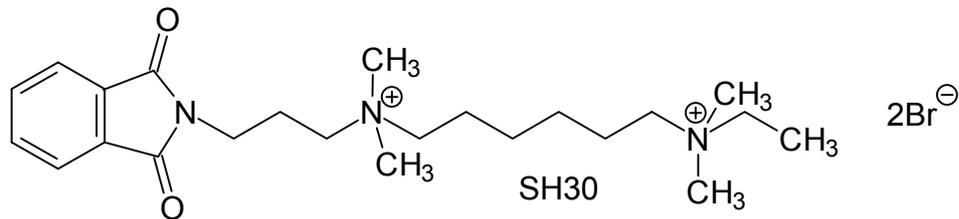
Die Bindungshemmung durch den Modulator war im Falle von [³H]OxoM vollständig. Dies wurde durch nicht-lineare Regressionsanalyse mittels der „vier Parameter enthaltenden, logistischen Gleichung“ bestimmt: die Steilheit der Kurve war nicht signifikant verschieden von -1 und das untere Plateau der Bindungskurve war nicht signifikant verschieden von min=0 (F-Test, $p > 0,05$). Die Berechnung des pK_i -Wertes nach Cheng und Prusoff ergab $pK_i = 7,52 \pm 0,16$; dieser unterscheidet sich nicht signifikant vom pK_A -Wert (t-Test, $p > 0,05$). Diese Befunde entsprechen einer formal kompetitiven Interaktion, die dissoziationsverzögernde Wirkung von W84 deutet jedoch auf eine allosterische Interaktion hin.

Die Analyse der Datenpunkte mittels der Gleichung von Ehlert (dargestellt in Abbildung 13) ist im Falle der [³H]OxoM-Befunde problematisch, weil das untere Plateau der Kurve zur Bestimmung des Wertes für α dient. Dieses untere Plateau ist hier aber nicht verschieden von Null und daher keine gute Basis zur Bestimmung von α . Der Wert für α hat deshalb eher eine qualitative Bedeutung: α ist sehr klein und zeigt eine stark negative Interaktion an.

Gemäß dem Modell von Ehlert (1988) lässt sich die Affinität des Allosters zum orthoster-besetzten Rezeptor als Produkt aus α und K_A berechnen: $p(\alpha K_A)$. Aus der Bindung des Allosters zum Orthoster-Rezeptor-Komplex ergibt sich die Verzögerung der Dissoziation des orthosterischen Liganden. Daher wurde mittels eines t-Testes geprüft, ob $p(\alpha K_A)$ signifikant verschieden von $pEC_{0,5,Diss}$ war. Zwischen diesen Größen ($pEC_{0,5,Diss}$: $7,67 \pm 0,04$; $p(\alpha K_A)$: $7,30 \pm 0,19$) aus den Experimenten mit [³H]NMS konnte kein Unterschied festgestellt werden (t-Test, $p > 0,05$). Ein derartiger Vergleich ist wegen der oben genannten Probleme bei der Bestimmung von α für die mit [³H]OxoM erhobenen Befunde kaum sinnvoll.

3.3.2 SH30

SH30 ist ein Derivat des Prototyp-Modulators W84, welches unilateral um eine Phthalimidomethyl-Gruppe verkürzt wurde.



3.3.2.1 Effekte von SH30 auf die Dissoziation von [³H]OxoM und [³H]NMS

Die Testsubstanz vermochte die Dissoziation beider Radioliganden zu verzögern (Abbildung 15). Zur Erfassung der dissoziationsverzögernden Wirkung wurde auch hier der $1/t_{50\%}$ -Wert verwendet, da nur 2 von 5 Kontrollen und 6 von 18 Verläufen in Gegenwart von SH30 signifikant besser durch ein biphasisches Modell beschrieben werden konnten.

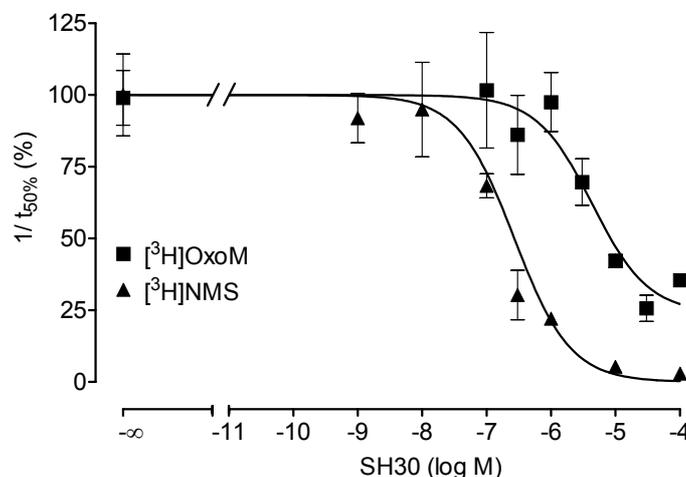


Abbildung 15: Gegenüberstellung der Effekte von SH30 auf die Dissoziations-Geschwindigkeit des Agonisten [³H]OxoM (Quadrate) und Antagonisten [³H]NMS (Dreiecke).

Ordinate: Geschwindigkeit der Dissoziation ($1/t_{50\%}$) in Prozent des Ausgangsplateaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators W84. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 2 bis 5 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Analyse erfolgte mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“.

Die aus diesen Versuchen abgeleiteten Kenngrößen sind in Tabelle 10 angegeben.

	$pEC_{0,5,Diss}$	unteres Plateau (Min)	Kurvensteilheit n_H	n
[³ H]OxoM	$5,36 \pm 0,27^*$	$24 \pm 9\%^a$	$-1,38 \pm 0,67^{ns}$	5
[³ H]NMS	$6,57 \pm 0,09$	$3 \pm 10\%$	$-1,40 \pm 0,15^{ns}$	5

Tabelle 10: Kenngrößen der in Abbildung 15 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für die dissoziationsverzögernde Wirkung von SH30 (Mittelwerte und Standardfehler).

n: Anzahl der Experimente

*: Wert ist signifikant verschieden von dem für [³H]NMS-bestimmten Wert (t-Test mit Welch-Korrektur, $p < 0,05$)

a: Das untere Plateau war signifikant verschieden von Null (F-Test, $p < 0,05$).

ns: Die Steilheit der Kurve ist nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test, $p > 0,05$).

Wie bei W84 ist auch die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit von SH30 gegenüber dem Antagonisten größer als gegenüber dem Agonisten. Allerdings ist die Modulatorkonzentration, die eine halbmaximale Verzögerung der Dissoziation von [³H]NMS bewirkte, hier nur um den Faktor 16 kleiner als jene, die die [³H]OxoM-Dissoziation ebenso zu hemmen vermochte. SH30 ist wie W84 in der Lage, die [³H]NMS-Dissoziation vollständig zu hemmen. Die Agonist-Dissoziation wurde von SH30 maximal um den Faktor 4 verzögert.

3.3.2.2 Effekte von SH30 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]OxoM und [³H]NMS

Die aus den kinetischen Experimenten mit SH30 ermittelte notwendige Zeit bis zum Erreichen des Bindungs-Gleichgewichts betrug für die Versuche mit [³H]NMS 16 Stunden, für den Einsatz von [³H]OxoM 2 Stunden. Abbildung 16 zeigt die erhobenen Daten für die Untersuchungen mit beiden Radioliganden.

SH30 verhielt sich wie die Muttersubstanz W84 gegenüber beiden Radioliganden negativ kooperativ. Die [³H]OxoM-Bindung konnte von SH30, wie auch von W84, vollständig gehemmt werden. Die der nicht-linearen Regressionsanalyse mittels der Ehlert-Gleichung entnommenen Werte sind in Tabelle 11 dargestellt.

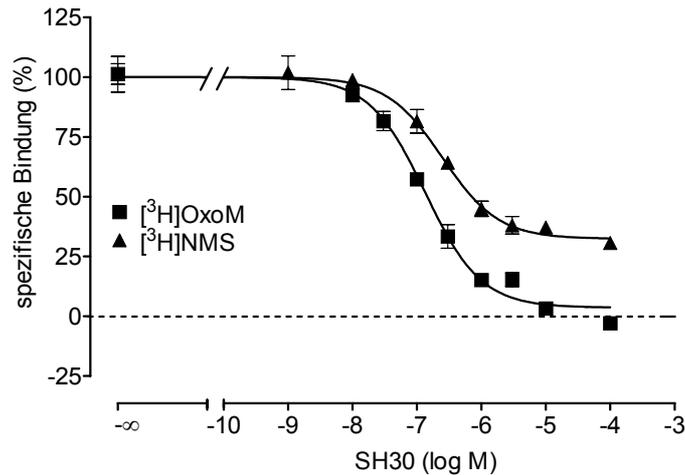


Abbildung 16: Einfluss von SH30 auf die Gleichgewichtsbindung des Agonisten [³H]OxoM (1nM, Quadrate) sowie des Antagonisten [³H]NMS (0,15nM, Dreiecke).

Ordinate: spezifische Bindung des jeweiligen Radioliganden in Prozent des Ausgangsplateaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators SH30.

Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 Experimenten. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Symbolgröße hinausgehen. Die dargestellten Kurvenzüge wurden mit Hilfe der Kenngrößen pK_A und $p\alpha$ (Tab. 11) erhalten.

	pK_A	$p\alpha$	$p(\alpha K_A)$	n
[³ H]OxoM	$7,09 \pm 0,02^{ns}$	$-3,05 \pm 1,42$	$4,04 \pm 1,41$	3
[³ H]NMS	$6,78 \pm 0,09$	$-0,67 \pm 0,02$	$6,11 \pm 0,07$	3

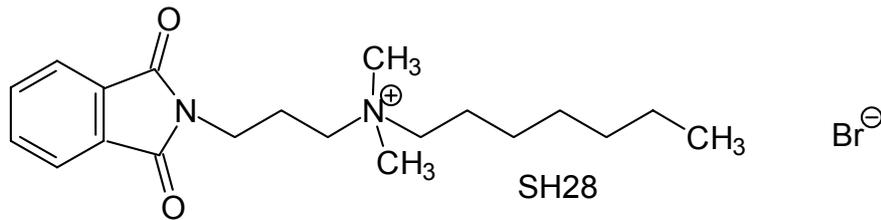
Tabelle 11: Kenngrößen der in Abbildung 16 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für den Effekt von SH30 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]OxoM bzw. [³H]NMS (Mittelwerte und Standardfehler). pK_A : Affinität des allosterischen Modulators zum freien Rezeptor; $p\alpha$: Maß für die Kooperativität zwischen dem jeweiligen Radioliganden und SH30, n: Anzahl der durchgeführten Bestimmungen.

ns: Der Wert für pK_A unterscheidet sich nicht signifikant von dem mit [³H]NMS bestimmten (t-Test, $p > 0,05$).

Eine Analyse der [³H]OxoM-Befunde mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“ zeigte, dass die [³H]OxoM-Bindung durch den Modulator vollständig gehemmt wurde (das untere Plateau der Bindungskurve war nicht signifikant verschieden von $\min=0$, die Steilheit war nicht signifikant verschieden von -1 , F-Test, $p > 0,05$). Die Berechnung des pK_i -Wertes nach Cheng und Prusoff ergab $pK_i = 7,09 \pm 0,17$, dieser unterscheidet sich nicht signifikant vom pK_A -Wert (t-Test, $p > 0,05$). Aus den unter 3.3.1.2 dargelegten Gründen ist in diesem Falle die Bestimmung des Wertes für α schwierig und kann nur als Schätzung betrachtet werden.

3.3.3 SH28

Die weitergehende einseitige Verkürzung von W84, die einen der beiden quartären Stickstoffe einschließt, führt zu SH28. Kostenis und Mitarbeiter (1994) konnten zeigen, dass diese Verkürzung einen deutlichen Affinitätsverlust der Substanz, zumindest im Falle des [³H]NMS-besetzten Rezeptors, bewirkt. Es wurde untersucht, ob im Falle des [³H]OxoM besetzten Rezeptor ein ähnlicher Effekt auftritt.



3.3.3.1 Effekte von SH28 auf die Dissoziation von [³H]OxoM und [³H]NMS

SH28 verzögerte die Dissoziation beider Radioliganden in einem ähnlichen Konzentrationsbereich (Abbildung 17). Die Dissoziation von [³H]OxoM war in Abwesenheit von SH28 in einem von vier Fällen signifikant besser durch ein biphasisches Modell zu beschreiben, in Gegenwart von SH28 in einem von 13 Fällen. Daher wurde der dissoziationsverzögernde Effekt mittels der Auswertung des $1/t_{50\%}$ -Wertes bestimmt (siehe 3.1.2).

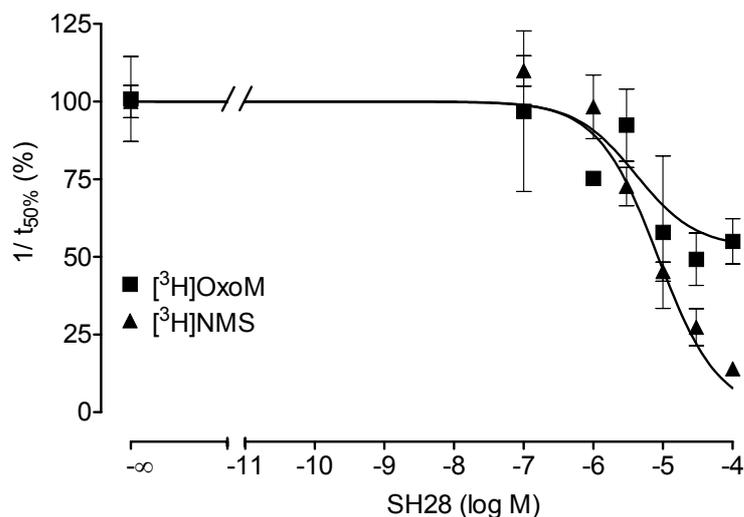


Abbildung 17: Gegenüberstellung der Effekte von SH28 auf die Dissoziations-Geschwindigkeit des Agonisten [³H]OxoM (Quadrate) und Antagonisten [³H]NMS (Dreiecke).

Ordinate: Geschwindigkeit der Dissoziation ($1/t_{50\%}$) in Prozent des Ausgangsplateaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators SH28. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 2 bis 5 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streubalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Analyse erfolgte mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“.

Die mittels nicht-linearer Regressionsanalyse bestimmten Kenngrößen der in Abbildung 17 gezeigten Konzentrations-Effekt-Beziehungen sind in Tabelle 12 zusammengestellt.

	pEC _{0,5,Diss}	unteres Plateau (Min)	Kurvensteilheit η_H	n
[³ H]OxoM	5,39 ± 0,43*	51 ± 11% ^a	-11 ± 36670 ^{ns}	4
[³ H]NMS	4,98 ± 0,04	6,7 ± 8,4%	-1,23 ± 0,14 ^{ns}	5

Tabelle 12: Kenngrößen der in Abbildung 17 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für die dissoziationsverzögernde Wirkung von SH28 (Mittelwerte und Standardfehler).

n: Anzahl der Experimente.

*: Wert ist nicht signifikant verschieden von dem für [³H]NMS-bestimmten Wert (t-Test mit Welch-Korrektur, p>0,05)

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

ns: Die Steilheit der Kurve ist nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test, p>0,05).

Die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit von SH28 trat gegenüber beiden Radioliganden im gleichen Konzentrationsbereich ein, allerdings vermochte auch SH28 die Dissoziation des Agonisten nicht vollständig zu hemmen.

3.3.3.2 Effekte von SH28 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]OxoM und [³H]NMS

Die Inkubationszeit betrug im Falle von SH28 für beide Radioliganden 2 Stunden. Die erhobenen Datenpunkte sind in Abbildung 17 dargestellt.

Die Bindung beider Radioliganden wurde von SH28 deutlich gehemmt. Die Kenngrößen zu den in Abbildung 18 dargestellten Kurven sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

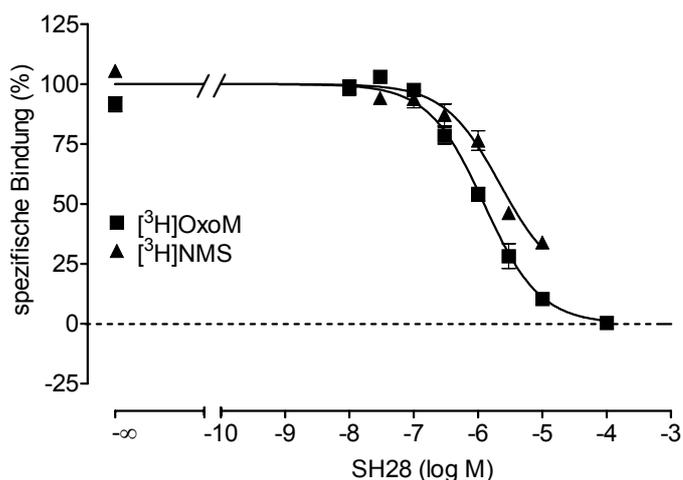


Abbildung 18: Einfluss von SH28 auf die Gleichgewichtsbindung des Agonisten [³H]OxoM (Quadrate) sowie des Antagonisten [³H]NMS (Dreiecke).

Ordinate: spezifische Bindung des jeweiligen Radioliganden in Prozent des Ausgangsplateaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators SH28.

Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 bis 4 Experimenten. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Symbolgröße hinausgehen. Die dargestellten Kurvenzüge wurden mit Hilfe der Kenngrößen pK_A und $p\alpha$ (Tab. 13) erhalten.

	pK_A	$p\alpha$	$p(\alpha K_A)$	n
[³ H]OxoM	$6,10 \pm 0,05^{ns}$	$-5,26 \pm 0,55$	$0,84 \pm 0,57$	4
[³ H]NMS	$5,87 \pm 0,17$	$-0,97 \pm 0,11$	$4,90 \pm 0,27$	3

Tabelle 13: Kenngrößen der in Abbildung 18 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für den Effekt von SH28 auf die Gleichgewichtsbindung (Mittelwerte und Standardfehler). pK_A : Affinität des allosterischen Modulators zum freien Rezeptor; $p\alpha$: Maß für die Kooperativität zwischen dem jeweiligen Radioliganden und SH28, n: Anzahl der durchgeführten Bestimmungen.

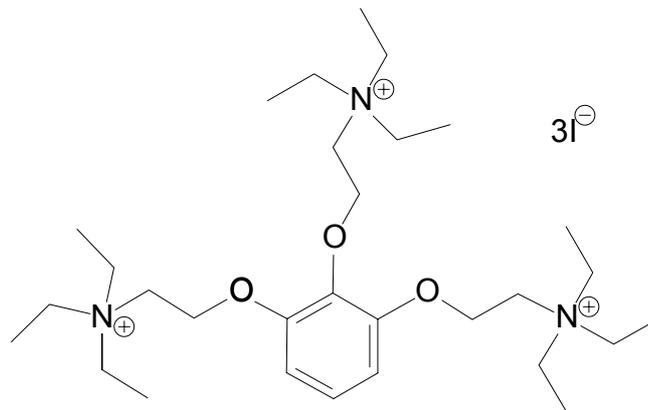
ns: Der Wert für pK_A unterscheidet sich nicht signifikant von dem mit [³H]NMS bestimmten (t-Test, $p > 0,05$).

Die Bindung von [³H]OxoM wurde durch den Modulator vollständig gehemmt (das untere Plateau der Bindungskurve war nicht signifikant verschieden von $Min=0$; F-Test, $p > 0,05$). Die Berechnung des pK_i -Wertes nach Cheng und Prusoff ergab $pK_i = 6,10 \pm 0,71$. Der Wert für α kann aus den unter 3.3.1.2 genannten Gründen nur als Schätzwert betrachtet werden.

Die Werte aus den Gleichgewichts-Bindungs-Experimenten mit [³H]NMS stimmten mit den Befunden aus Dissoziationsexperimenten überein: der aus dem Produkt von α und K_A errechnete Wert ($p(\alpha K_A)$: $4,90 \pm 0,27$) unterschied sich nicht signifikant von dem Wert für $EC_{0,5, Diss}$ ($pEC_{0,5, Diss}$: $4,98 \pm 0,04$).

3.3.4 Gallamin

Gallamin ist einer der am längsten bekannten allosterischen Modulatoren und wurde sowohl zur Prüfung allosterischer Prinzipien (Stockton et al., 1983, Tränkle et al., 1999), als auch bei Untersuchungen zur Lage und Struktur der allosterischen Bindungsstelle im Rezeptorprotein (Gnagey et al., 1999) eingesetzt. Gnagey und Ellis (1996) beobachteten eine höhere Affinität des Modulators zum [³H]Acetylcholin-besetzten als zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor. Es wurde geprüft, ob Gleiches für den Agonisten [³H]OxoM gilt.



Gallamin

3.3.4.1 Effekte von Gallamin auf die Dissoziation von [³H]OxoM und [³H]NMS

Die Versuchsreihe, die zur Bestimmung der dissoziationsverzögernden Wirkung des Modulators Gallamin durchgeführt wurde, wies mit [³H]OxoM stets Dissoziationsverläufe auf, die durch ein Modell für zwei Bindungsstellen signifikant besser beschrieben werden konnten. Derartige Kurvenverläufe sind in Abbildung 19 exemplarisch dargestellt.

Ergebnisse

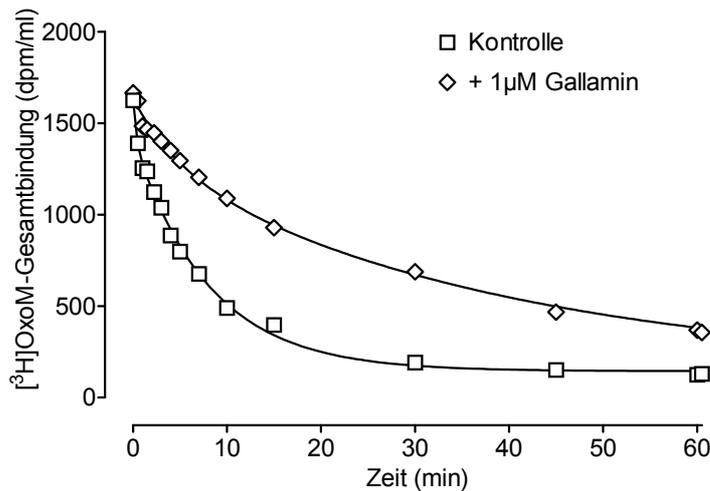


Abbildung 19: [³H]OxoM-Dissoziation unter Kontrollbedingungen und in Gegenwart von Gallamin.

Ordinate: [³H]OxoM-Gesamtbindung in dpm/ml Inkubationsmedium.

Abszisse: Zeit nach Zugabe von Atropin und Gallamin in Minuten.

Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. Die Datensätze konnten signifikant besser durch eine biphasische Anpassung beschrieben werden (F-Test, $p < 0,05$). Die Halbwertszeit der Kontrolle betrug in der schnellen Phase 0,22min und in der langsamen Phase 5,57min. Der Anteil der langsamen Phase betrug im Falle der Kontrolle 86%, in Gegenwart von 1 μM Gallamin 78%.

Da in diesem Falle ausschließlich Datensätze vorlagen, für die zwei Dissoziations-Geschwindigkeits-Konstanten, $k_{-1\text{schnell}}$ und $k_{-1\text{langsam}}$, bestimmt werden konnten, wurden zur Bestimmung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung beide k_{-1} -Werte gegen die eingesetzte Modulator-Konzentration aufgetragen. Zuvor wurde geprüft, ob der Anteil der mit einer bestimmten Geschwindigkeit dissoziierenden Rezeptor-Ligand-Komplexe in Gegenwart der jeweiligen Konzentrationen des Modulators unverändert blieb. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt.

Es konnte keine signifikante Veränderung der Kompartiment-Größen gezeigt werden (t-Test, $p < 0,05$). Die Konzentrations-Effekt-Beziehungen für den Effekt auf die [³H]OxoM Dissoziation sowie für den Effekt auf die [³H]NMS Dissoziation sind in Abbildung 20 gezeigt.

Ergebnisse

	Größe des „langsamen“ Kompartiments	Anzahl der Versuche
Kontrolle	82 ± 3%	5
Gallamin (1nM)	84%, 87%	2
Gallamin (10nM)	87%, 88%	2
Gallamin (100nM)	85 ± 7%	3
Gallamin (300nM)	72%, 85%	2
Gallamin (1000nM)	80 ± 3%	3
Gallamin (10000nM)	79 ± 7%	4
Gallamin (30000nM)	77%, 78%	2

Tabelle 14: Zusammenstellung der bei der biphasischen Analyse der [³H]OxoM-Dissoziationen erhaltenen Größen für den Anteil der Rezeptor-Ligand-Komplexe mit „langsamer“ Dissoziations-Geschwindigkeit („langsames“ Kompartiment) unter Kontroll-Bedingungen und in Gegenwart steigender Konzentrationen des Modulators Gallamin. Angegeben sind Mittelwerte und, falls 3 oder mehr Punkte bestimmt wurden, der Standardfehler.

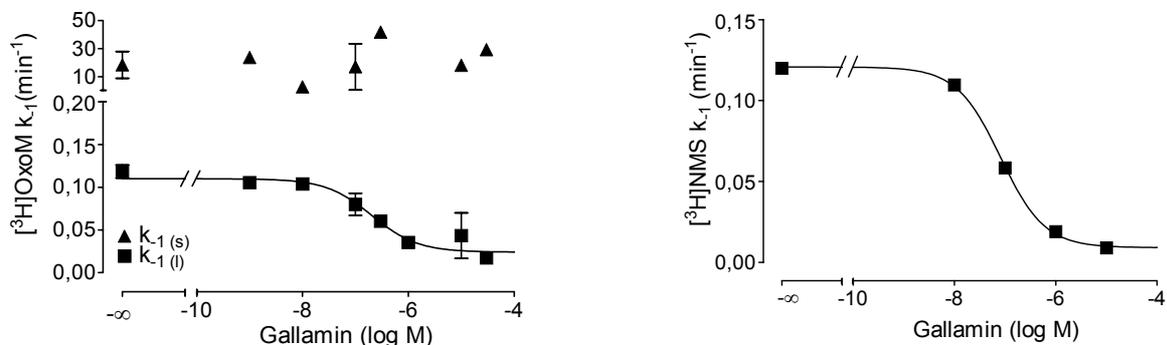


Abbildung 10: Effekte von Gallamin auf die Dissoziations-Geschwindigkeit des Agonisten [³H]OxoM (links) und des Antagonisten [³H]NMS (rechts).

Ordinate: Apparente Dissoziations-Geschwindigkeits-Konstante k_{-1} (min^{-1}).

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators Gallamin.

Die Geschwindigkeits-Konstanten der [³H]OxoM-Dissoziation sind für das „langsame“ Kompartiments durch Quadrate und für das „schnelle“ Kompartiment durch Dreiecke gekennzeichnet.

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 2 bis 6 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streubalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Analyse erfolgte mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“.

Die Geschwindigkeit der [³H]OxoM-Dissoziation des „schnellen“ Kompartiments blieb bei steigenden Konzentrationen des Modulators unverändert, während die Dissoziation der Rezeptor-Ligand-Komplexe des „langsamen“ Kompartiments Konzentrationsabhängig verzögert wurde. Die Werte, die mittels nicht-linearer Regressionsanalyse für die dissoziationsverzögernde Wirkung im langsamen Kompartiment abgeleitet werden konnten, sind in Tabelle 15 dargestellt.

	pEC _{0,5,Diss}	unteres Plateau (Min)	Kurvensteilheit n _H	n
[³ H]OxoM	6,69 ± 0,16*	22 ± 5% ^{a,b}	-0,80 ± 0,23 ^{ns}	6
[³ H]NMS	7,09 ± 0,03	8 ± 1% ^a	-1,02 ± 0,15 ^{ns}	2

Tabelle 15: Kenngrößen der in Abbildung 20 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für die dissoziationsverzögernde Wirkung von Gallamin (Mittelwerte und Standardfehler).

n: Anzahl der Experimente.

*: Wert ist nicht signifikant verschieden von dem für [³H]NMS-bestimmten Wert (t-Test, p>0,05)

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

b: Der Wert unterscheidet sich nicht signifikant von dem für [³H]NMS bestimmten Wert (t-Test, p>0,05)

ns: Die Steilheit der Kurve ist nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test, p>0,05).

Der pEC_{0,5Diss}-Wert des allosterischen Modulators Gallamin für [³H]NMS unterscheidet sich nicht signifikant (t-Test, p>0,05) von den Werten, die von Schröter et al. (2000) und Tränkle et al. (1996) erhoben wurden. Das untere Kurvenniveau lag bei 8%, was mit den oben genannten Arbeiten übereinstimmt.

Die Dissoziation von [³H]OxoM konnte durch ähnliche Konzentrationen des Modulators verzögert, aber ebenfalls nicht vollständig gehemmt werden. Das Ausmaß der maximalen, dissoziationsverzögernden Wirkung, erkennbar an der Lage des unteren Plateaus war unabhängig vom untersuchten Radioliganden.

3.3.4.2 Effekte von Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]OxoM und [³H]NMS

Im folgenden wurde der Einfluss von Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung beider Radioliganden untersucht (Abbildung 21). Die Inkubationszeit betrug jeweils zwei Stunden.

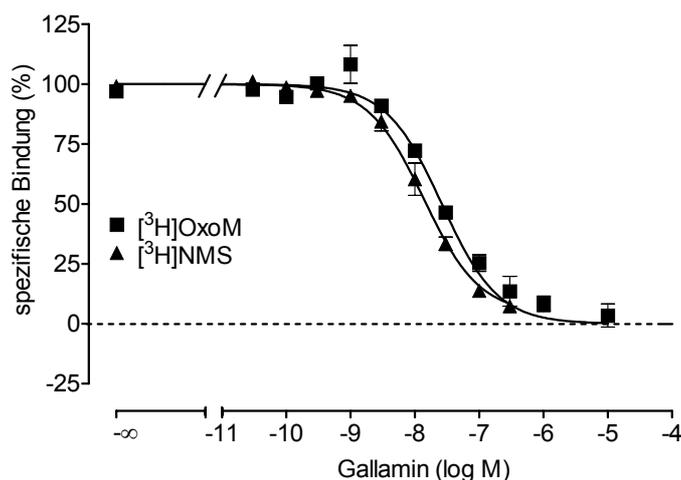


Abbildung 21: Einfluss von Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung des Agonisten [³H]OxoM (Quadrate) sowie des Antagonisten [³H]NMS (Dreiecke).

Ordinate: Spezifische Bindung des jeweiligen Radioliganden in Prozent des Ausgangsplateaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators Gallamin.

Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 bis 4 Experimenten. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Symbolgröße hinausgehen. Die dargestellten Kurvenzüge wurden mit Hilfe der Kenngrößen pK_A und $p\alpha$ (Tab. 16) erhalten.

Die Testsubstanz verhielt sich gegenüber beiden orthosterischen Liganden negativ kooperativ. Die aus der nicht-linearen Regressionsanalyse abgeleiteten Größen sind in Tabelle 16 zusammengestellt: pK_A und $p\alpha$ nach der Ehlert-Gleichung sowie pK_i mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“ mit anschließender Berechnung des pK_i -Wertes nach Cheng und Prusoff (1973).

	pK_A	$p\alpha$	pK_i	n
[³ H]OxoM	$7,97 \pm 0,04^a$	$-1,76 \pm 0,20$	$7,95 \pm 0,05^{b,c}$	4
[³ H]NMS	$8,39 \pm 0,10^a$	$-1,90 \pm 0,04$	$8,36 \pm 0,05^{b,c}$	3

Tabelle 16: Kenngrößen der in Abbildung 21 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für den Effekt von Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung (Mittelwerte und Standardfehler). pK_A : Affinität des allosterischen Modulators zum freien Rezeptor; $p\alpha$: Maß für die Kooperativität zwischen dem jeweiligen Radioliganden und Gallamin, pK_i : Inhibitionskonstante berechnet nach Cheng und Prusoff nach nicht-linearer Regressionsanalyse mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“. n: Anzahl der durchgeführten Bestimmungen.

a: Die Werte für pK_A unterscheiden sich signifikant (t-Test, $p < 0,05$).

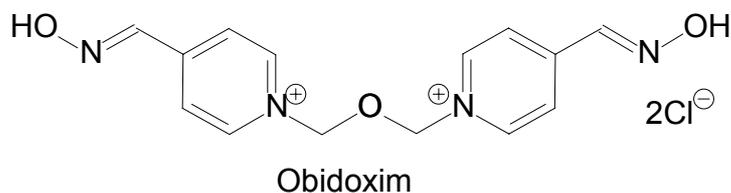
b: Die Werte für pK_i unterscheiden sich signifikant (t-Test, $p < 0,05$).

c: Der pK_i -Wert unterscheidet sich nicht signifikant von pK_A (t-Test, $p > 0,05$).

Für beide Radioliganden unterschied sich der pK_A -Wert nicht signifikant von dem für pK_i berechneten Wert (t-Test, $p > 0,05$). Entgegen den Erwartungen unterschieden sich jedoch pK_A - und pK_i -Werte in Abhängigkeit von dem zur Bestimmung verwendeten Radioliganden. Die Inkubationszeit war für beide Radioliganden gleich (2 Stunden), ebenso die eingesetzte Membransuspension. Die eingesetzte Konzentration des Radioliganden war in beiden Fällen so gewählt, dass die fraktionelle Rezeptorbesetzung etwa 70% betrug. Da die Konzentration des Gallamins, welche die Dissoziation halb-maximal verzögert, für beide Radioliganden gleich ist (siehe Tabelle 15), sollte die hohe Rezeptorbesetzung auf die pK_A -Werte beider Radioliganden den gleichen Effekt haben. Der Grund des Unterschiedes der pK_A -Werte in Abhängigkeit vom eingesetzten Radioliganden konnte nicht ermittelt werden.

3.3.5 Obidoxim

Obidoxim ist als allosterischer Modulator bekannt, der an der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle mit Gallamin kompetitiv interagiert (Ellis und Seidenberg, 1992). Seine dissoziationsverzögernde Wirkung ist auch in hohen Konzentrationen submaximal. In einem gemeinsamen Versuchsansatz kann er daher gegenüber anderen allosterischen Modulatoren, die über die gemeinsame Bindungsstelle interagieren, als allosterischer Antagonist wirken. Daher kann er verwendet werden, um zu prüfen ob eine Testsubstanz an die gemeinsame allosterische Bindungsstellen bindet.



3.3.5.1 Effekte von Obidoxim auf die Dissoziation von [^3H]OxoM und [^3H]NMS

Der dissoziationsverzögernde Effekt von Obidoxim war im Falle der [^3H]NMS-Dissoziation sehr schwach (Abbildung 22).

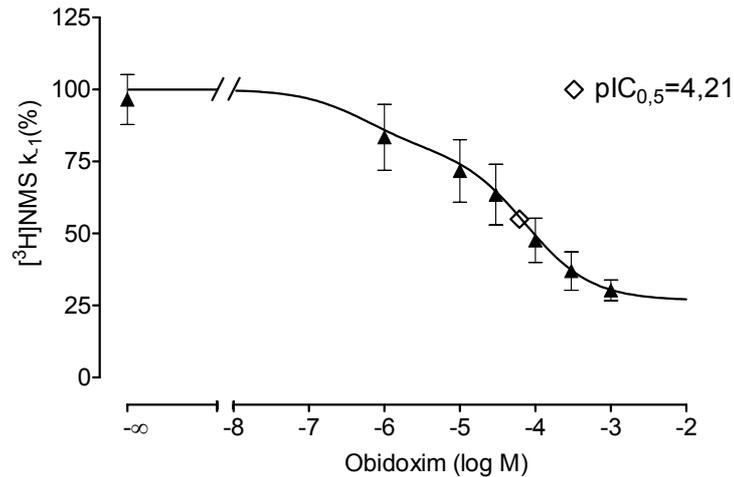


Abbildung 22: Effekt von Obidoxim auf die Dissoziations-Geschwindigkeit des Antagonisten [³H]NMS.

Ordinate: Apparente Dissoziation-Geschwindigkeits-Konstante k_{-1} (%).

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators. Obidoxim.

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 2 bis 5 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Datenpunkte konnten signifikant besser durch ein Modell für zwei Bindungsstellen beschrieben werden (F-Test, $p < 0,05$). Diejenige Konzentration des Obidoxim, die die Dissoziation halbmaximal verzögert, ist als offene Raute dargestellt ($IC_{0,5}$).

Die Konzentrations-Effekt-Beziehung für die Effekte von Obidoxim auf die Dissoziation von [³H]NMS konnte besser durch ein Modell für zwei Bindungsstellen beschrieben werden (F-Test, $p < 0,05$). Die Wendepunkte (WP) der beiden Bindungsstellen betragen: $WP_{(h)} = 0,6 \mu M$ und $WP_{(n)} = 75,2 \mu M$. Das Ausgangsniveau wurde gleich 100% gesetzt, die maximale Verzögerung der Dissoziation erreichte 27% des Ausgangswertes. Der Anteil der Rezeptor-Ligand-Komplexe, die Obidoxim hochaffin banden, betrug 29%. Diese Beobachtungen entsprachen qualitativ den Befunden von Schulz (1998). Eine halbmaximale Hemmung der [³H]NMS-Dissoziation wurde durch $62 \mu M$ ($pIC_{0,5} = 4,21$) Obidoxim erreicht.

Da die Dissoziationsverläufe von [³H]OxoM in dieser Versuchsreihe überwiegend (24 von 27 Verläufen unter Kontrollbedingungen, 42 von 48 Verläufen in Gegenwart von Obidoxim) durch ein biphasisches Modell besser beschrieben werden konnten, wurden die Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für „schnelles“ und „langsameres“ Kompartiment getrennt betrachtet. Die Größe des „langsamen“ Kompartiments änderte sich bei steigenden Konzentrationen des Modulators nicht (Tabelle 17, Vergleich des Wertes der Kontrolle mit den Werten der einzelnen Konzentrationen mittels t-Test, $p > 0,05$).

Ergebnisse

	Größe des „langsamen“ Kompartiments	Anzahl der Versuche
Kontrolle	71,6 ± 4,3%	24
Obidoxim (0,1µM)	83,3 ± 1,4%	3
Obidoxim (1,0µM)	86,0%, 83,4%	2
Obidoxim (10µM)	83,7 ± 4,4%	3
Obidoxim (100µM)	69,5 ± 11,4%	3
Obidoxim (300µM)	68,9 ± 4,8%	11
Obidoxim (1000µM)	78,4 ± 2,5%	13
Obidoxim (3000µM)	80,5 ± 1,9%	5
Obidoxim (10000µM)	66,7 ± 2,9%	3

Tabelle 17: Zusammenstellung der bei der biphasischen Analyse der [³H]OxoM-Dissoziationen erhaltenen Größen für den Anteil der Rezeptor-Ligand-Komplexe mit „langsamer“ Dissoziations-Geschwindigkeit („langsames“ Kompartiment) unter Kontroll-Bedingungen und in Gegenwart steigender Konzentrationen des Modulators Obidoxim. Angegeben sind Mittelwerte und, falls 3 oder mehr Punkte bestimmt wurden, der Standardfehler.

Abbildung 23 zeigt den Effekt von Obidoxim auf die Dissoziation des Agonisten [³H]OxoM. Die Dissoziation des Agonisten im „schnellen Kompartiment“ wurde von Obidoxim nicht verzögert. Die aus nicht-linearer Regressionsanalyse nach der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“ berechneten Vergleichsgrößen für die in Abbildung 23 gezeigte Konzentrations-Effekt-Kurve sind in Tabelle 18 dargestellt.

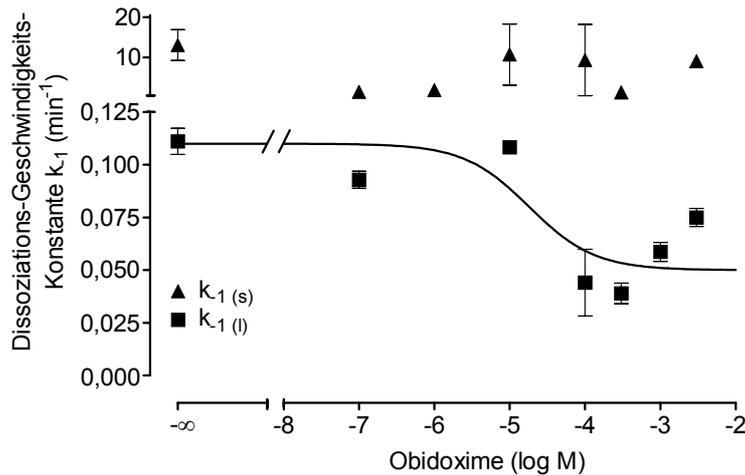


Abbildung 23: Effekt von Obidoxim auf die Dissoziations-Geschwindigkeit des Agonisten [³H]OxoM.

Ordinate: apparente Dissoziations-Geschwindigkeits-Konstante k_{-1} (min^{-1}).

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators Obidoxim.

Die Werte für Dissoziations-Geschwindigkeits-Konstanten des „langsamen“ Kompartiments sind durch Quadrate, die für das „schnelle“ Kompartiment durch Dreiecke gekennzeichnet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 2 bis 7 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Analyse erfolgte mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“.

	$\text{pEC}_{0,5,\text{Diss}}$	unteres Plateau (Min)	Kurvensteilheit n_H	n
[³ H]OxoM	$4,74 \pm 0,76^a$	$54 \pm 11\%^b$	$-1,35 \pm 1,20^{\text{ns}}$	7
[³ H]NMS	$4,21 \pm 0,31^*$	$27\% \pm 1\%^b$	$-0,48 \pm 0,12$	5

Tabelle 18: Kenngrößen der in Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für die dissoziationsverzögernde Wirkung von Obidoxim (Mittelwerte und Standardfehler).

n: Anzahl der Experimente;

*: Angegeben ist hier der pIC_{50} -Wert.

a: Wert ist nicht signifikant verschieden von dem mit [³H]NMS bestimmten (t-Test mit Welch-Korrektur, $p > 0,05$).

b: Das untere Plateau ist signifikant verschieden von Null (F-Test, $p < 0,05$).

ns: Die Steilheit der Kurve ist nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test, $p > 0,05$).

Der Vergleich der für die verschiedenen Radioliganden erhobenen Werte zeigt, dass die halbmaximale Verzögerung der Dissoziation beider Radioliganden im gleichen Konzentrationsbereich von Obidoxim erreicht wurde. Der maximale dissoziationsverzögernde Effekt mit [³H]OxoM war jedoch etwa um den Faktor 2 geringer als mit [³H]NMS.

3.3.5.2 Effekte von Obidoxim auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]OxoM und [³H]NMS

Der allosterische Modulator Obidoxim vermochte die [³H]NMS-Bindung (0,15nM) vollständig zu hemmen (Abbildung 24, gefüllte Symbole). Die Steilheit des Kurvenverlaufs war stets signifikant verschieden von -1 (F-Test, $p < 0,05$). Daher wurde in einem zweiten Schritt geprüft, ob eine Analyse mittels eines Modells für zwei Bindungsstellen zu einer besseren Beschreibung der Datenpunkte führt (F-Test, $p < 0,05$). Dabei wurde das obere Plateau bei 100%, das untere Plateau bei 0% konstant gesetzt.

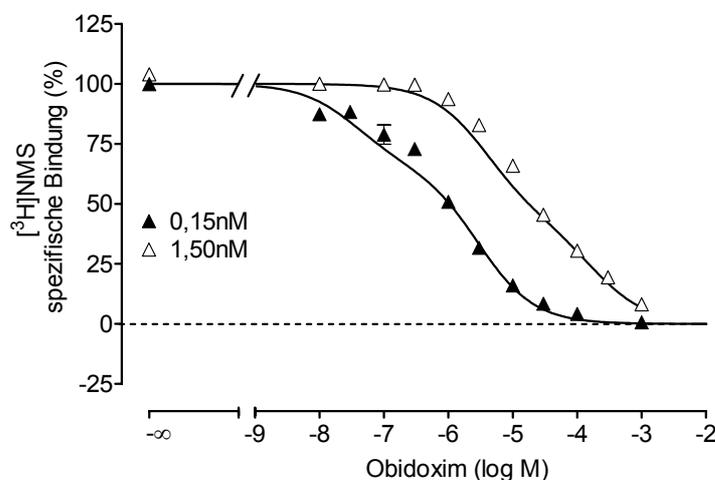


Abbildung 24: Effekt von Obidoxim auf die Bindung verschiedener Konzentrationen von [³H]NMS.

Ordinate: Spezifische Bindung des Radioliganden [³H]NMS in Prozent des Ausgangsniveaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators Obidoxim.

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 bis 5 Versuchen. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe der Symbole hinausgehen. Datenpunkte, die mit einer [³H]NMS-Konzentration von $[L]=0,15\text{nM}$ bestimmt wurden, sind als geschlossene Dreiecke dargestellt, die mit $[L]=1,5\text{nM}$ [³H]NMS ermittelten als offene Dreiecke. Die nicht-lineare Regressionsanalyse erfolgte mittels eines Modells für zwei Bindungsstellen für jeden einzelnen Datensatz. Die dargestellten Kurvenzüge wurden mit Hilfe der Kenngrößen $pI_{C_{50,1/2}}$ und $R_{(1)}/R_{(t)}$ (Tab. 19) erhalten.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Radioligand-Konzentration um den Faktor 10 erhöht (Abbildung 24, offene Symbole). In dieser Reihe konnte nach wie vor eine vollständige Hemmung der Radioligand-Bindung erreicht werden (unteres Plateau nicht signifikant verschieden von Null, F-Test, $p > 0,05$). Auch diese Experimente wurden mittels eines Modells für zwei Bindungsstellen ausgewertet. Die für beide Versuchsreihen erhaltenen Werte sind in Tabelle 19 gezeigt.

Ergebnisse

$[^3\text{H}]\text{NMS}$	$\text{pIC}_{50,1}$	$\text{pIC}_{50,2}$	$R_{(1)}/R_{(t)}$	n
0,15nM	$7,44 \pm 0,40$	$5,53 \pm 0,13$	$0,34 \pm 0,10^*$	5
1,50nM	$5,41 \pm 0,06$	$3,76 \pm 0,08$	$0,56 \pm 0,03^*$	3

Tabelle 19: Kenngrößen der in Abbildung 24 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für den Effekt von Obidoxim auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (Mittelwerte und Standardfehler). $\text{pIC}_{50,1}$ bzw. 2 : Wendepunkt der Inhibitionskurve als Maß für die Affinität des Modulators zur jeweiligen Bindungsstelle. $R_{(1)}/R_{(t)}$: Anteil der Bindungsstellen mit der Affinität $\text{pIC}_{50,(1)}$ bezogen auf die Gesamtzahl der Bindungsstellen. n: Anzahl der durchgeführten Bestimmungen.

*: Die Werte für $R_{(1)}/R_{(t)}$ unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$).

Die Untersuchung der Effekte von Obidoxim auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ erfolgte zunächst mit der üblicherweise eingesetzten Radioligand-Konzentration von 1nM $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ (Abbildung 25, geschlossene Symbole).

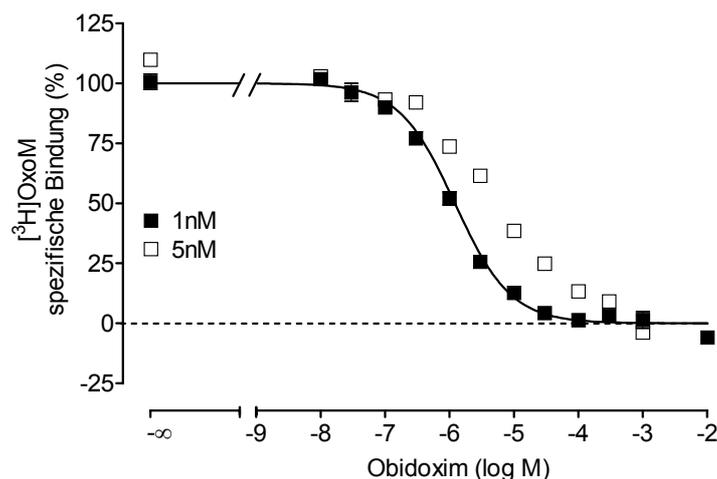


Abbildung 25: Effekt von Obidoxim auf die Bindung von $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ in zwei verschiedenen Konzentrationen.

Ordinate: Spezifische Bindung des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ in Prozent des Ausgangsniveaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators Obidoxim.

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 bis 5 Experimenten. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe der Symbole hinausgehen. Datenpunkte, die mit einer $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ -Konzentration von $[L]=1\text{nM}$ bestimmt wurden, sind als geschlossene Symbole, die mit $[L]=5\text{nM}$ $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ ermittelten, als offene Symbole dargestellt. Die dargestellte Kurve wurde mit Hilfe der Kenngrößen pK_A (6,24) und $\text{p}\alpha$ (-3,11) erhalten.

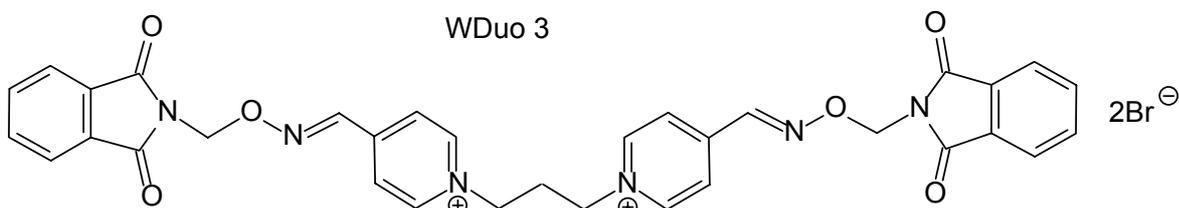
Die Analyse erfolgte mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“. Die Steilheit der Kurve war in keinem Versuch verschieden von -1 (F-Test, $p > 0,05$) und das untere Plateaus der Inhibitions-Kurve nicht signifikant verschieden von 0 (F-Test, $p > 0,05$). Da die Art der Interaktion (allosterisch oder kompetitiv) nicht klar einzuordnen

war, wurde hier sowohl nach der Gleichung von Ehlert ein pK_A -Wert als auch aus der Analyse nach Cheng-Prusoff ein pK_i -Wert ermittelt. Für pK_A ergab sich ein Wert von $6,32 \pm 0,10$, für pK_i ein Wert von $6,24 \pm 0,06$. Diese Werte unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$). Da in dieser Versuchsreihe die Radioligand-Bindung vollständig gehemmt werden konnte, weist $p\alpha$ eine große Streuung auf: $-3,11 \pm 0,59$ und kann nur als Schätzwert dienen.

Anschließend wurden auch mit [3H]OxoM Experimente mit einer erhöhten Radioligand-Konzentration (5nM) durchgeführt (Abbildung 25, offene Symbole). Die so erhobenen Datensätze wiesen eine Steilheit auf, die signifikant kleiner war als -1 ($-0,66 \pm 0,01$). Auch in dieser Versuchsreihe waren hohe Konzentrationen des Modulators in der Lage, die Bindung des in seiner Konzentration um den Faktor 5 erhöhten Radioliganden vollständig zu hemmen. Für zwei der drei Versuche konnten die Datenpunkte signifikant besser durch ein Modell für zwei Bindungsstellen beschrieben werden.

3.3.6 WDuo 3

Die Substanz WDuo 3 gehört zur Gruppe der Bispyridinium-Verbindungen. Am Antagonist-besetzten Rezeptor konnte für WDuo 3 sowohl im Na,K,Pi-Puffer als auch im Mg,Pi,Tris- Puffer eine höhere Affinität gezeigt werden als für W84 (Tränkle et al., 1996). Es wurde geprüft, ob WDuo 3 zum Agonist-besetzten Rezeptor ebenfalls eine höhere Affinität aufweist als W84.



3.3.6.1 Effekte von WDuo 3 auf die Dissoziation von [³H]OxoM und [³H]NMS

Wie nach den Daten von Tränkle erwartet, verzögerte WDuo 3 die Dissoziation von [³H]NMS schon in niedrigen Konzentrationen deutlich (Abbildung 26, rechts). Die aus der Analyse mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“ erhaltenen beschreibenden Größen der Konzentrations-Effekt-Beziehung sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

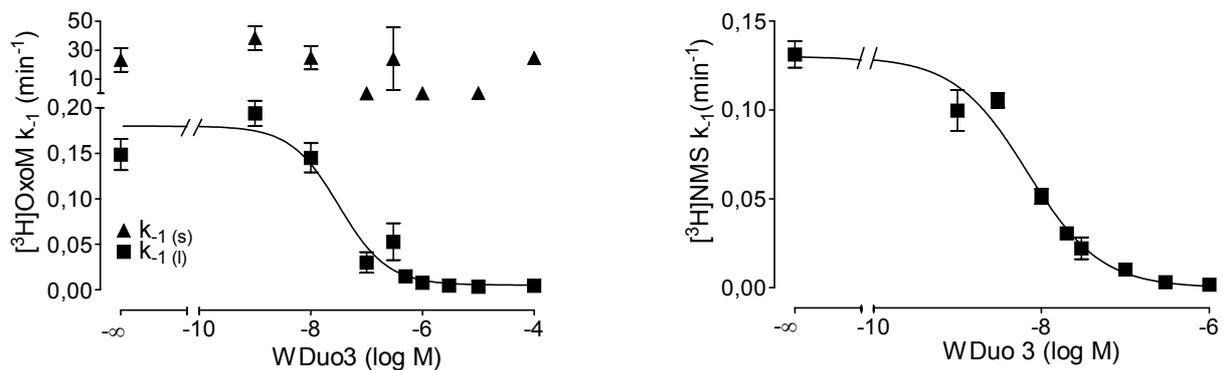


Abbildung 26: Effekt von WDuo 3 auf die Dissoziations-Geschwindigkeit des Agonisten [³H]OxoM (links) und des Antagonisten [³H]NMS (rechts).

Ordinate: Apparente Dissoziations-Geschwindigkeits-Konstante k_{-1} (min⁻¹).

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators WDuo 3.

Die Geschwindigkeits-Konstanten der [³H]OxoM-Dissoziation sind für das „langsame“ Kompartiments durch Quadrate, die für das „schnelle“ Kompartiment durch Dreiecke gekennzeichnet.

Dargestellt sind Mittelwerte und, wo möglich, Standardfehler aus 2 bis 12 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Analyse erfolgte mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“, die Steilheit war nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test, $p > 0,05$).

WDuo 3 verursachte ebenfalls eine starke Verzögerung der [³H]OxoM-Dissoziation (Abbildung 26). Sowohl unter Kontroll-Bedingungen als auch in Gegenwart des Modulators konnte der Verlauf der [³H]OxoM-Dissoziation signifikant besser durch ein Modell mit zwei Bindungsstellen beschrieben werden (F-Test, $p < 0,05$). Die Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde daher für beide Kompartimente getrennt betrachtet. Die Größe des „langsamen“ Kompartiments änderte sich in Gegenwart steigender Konzentrationen des Modulators nicht (t-Test, $p > 0,05$), wie in Tabelle 20 dargestellt ist.

Ergebnisse

	Größe des „langsamen“ Kompartiments	Anzahl der Versuche
Kontrolle	74,2 ± 2,9%	10
WDuo 3 (1nM)	77,4 ± 1,4%	5
WDuo 3 (10nM)	76,7 ± 0,0%	4
WDuo 3 (100nM)	81,8 ± 5,6%	3
WDuo 3 (300nM)	74,0 ± 4,3%	3
WDuo 3 (500nM)	52,0%, 65,1%	2
WDuo 3 (1000nM)	67,9 ± 9,6%	4
WDuo 3 (3000µM)	65,7%	1
WDuo 3 (10000µM)	68,4%, 72,1%	2
WDuo 3 (100000µM)	94,4%, 56,6%	2

Tabelle 20: Zusammenstellung der bei der biphasischen Analyse der [³H]OxoM-Dissoziationen erhaltenen Größen für den Anteil der Rezeptor-Ligand-Komplexe mit „langsamer“ Dissoziations-Geschwindigkeit („langsames“ Kompartiment) unter Kontroll-Bedingungen und in Gegenwart steigender Konzentrationen des Modulators WDuo 3. Angegeben sind Mittelwerte und, falls 3 oder mehr Punkte bestimmt wurden, der Standardfehler.

Die Dissoziation von [³H]OxoM wurde von WDuo 3 nur im „langsamen“ Kompartiment verzögert. In Gegenwart hoher Konzentrationen der Substanz wurde die [³H]OxoM-Dissoziation vollständig gehemmt (Anpassung unter Festsetzung des unteren Plateaus auf Null ist nicht verschieden von der Analyse mit einem weiteren Freiheitsgrad; F-Test, $p > 0,05$). Eine Zusammenstellung der ermittelten Werte ist in Tabelle 21 gegeben.

	$pEC_{0,5,Diss}$	unteres Plateau (Min)	Kurvensteilheit n_H	n
[³ H]OxoM	7,50 ± 0,20*	14 ± 12% ^a	-1,17 ± 0,60 ^{ns}	10
[³ H]NMS	8,17 ± 0,10	4 ± 11% ^a	-0,85 ± 0,43 ^{ns}	5

Tabelle 21: Kenngrößen der in Abbildung 26 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirkung von WDuo 3 (Mittelwerte und Standardfehler).

n: Anzahl der Experimente.

*: Wert ist signifikant verschieden von dem für [³H]NMS-bestimmten Wert (t-Test mit Welch-Korrektur, $p < 0,05$).

a: Das untere Plateau ist nicht signifikant verschieden von Null (F-Test, $p > 0,05$).

ns: Die Steilheit der Kurve ist nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test, $p > 0,05$).

WDuo 3 vermochte die Dissoziation beider Radioliganden schon in geringen Konzentrationen zu verzögern. Ferner wurde die [³H]OxoM-Dissoziation durch WDuo 3 vollständig gehemmt.

3.3.6.2 Effekte von WDuo 3 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]OxoM und [³H]NMS

Messung der Effekte von WDuo 3 mittels Gleichgewichts-Bindungs-Experimenten

Die Interaktion der Testsubstanz mit freien Rezeptoren wurde durch Betrachtung der Gleichgewichtsbindung des jeweiligen Radioliganden in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration von WDuo 3 ermittelt. Für die Einstellung des Gleichgewichts wurde im Falle des Antagonisten 5 Stunden, im Falle des Agonisten 10 Stunden inkubiert.

Die Datensätze (Abbildung 27) wurden unter Verwendung der Gleichung von Ehlert analysiert, die erhaltenen Kenngrößen sind in Tabelle 22 angegeben.

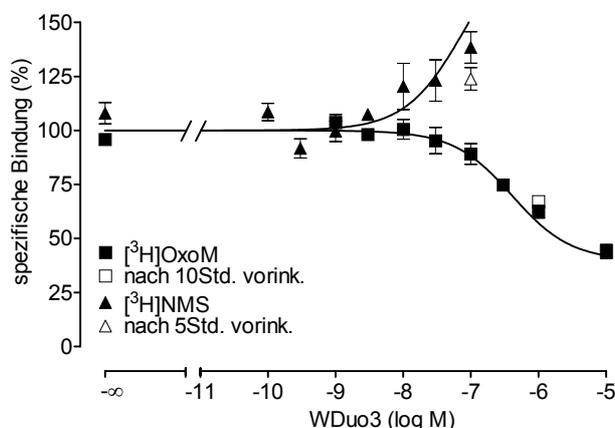


Abbildung 27: Einfluss von WDuo 3 auf die Gleichgewichtsbindung des Agonisten [³H]OxoM (Quadrate) sowie des Antagonisten [³H]NMS (Dreiecke).

Ordinate: Spezifische Bindung des jeweiligen Radioliganden in Prozent des Ausgangsplateaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators WDuo 3.

Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 bis 5 Experimenten. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Symbolgröße hinausgehen. Offene Symbole zeigen Datenpunkte, die als Ausgangswerte einem Dissoziations-Ansatz entnommen wurden, der 5 bzw. 10 Stunden vorinkubiert wurde. Die dargestellten Kurvenzüge wurden mit Hilfe der Kenngrößen pK_A und $p\alpha$ (Tab. 22) erhalten.

Ergebnisse

	pK_A	$p\alpha$	$p(\alpha K_A)$	n
[³ H]OxoM	$6,55 \pm 0,97^*$	$-0,54 \pm 0,07$	$6,01 \pm 0,13$	5
[³ H]NMS	$6,79 \pm 0,69^*$	$1,17 \pm 0,44$	$7,95 \pm 0,31$	5

Tabelle 22: Kenngrößen der in Abbildung 27 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für den Effekt von WDuo 3 auf die Gleichgewichtsbindung.

pK_A : Affinität des allosterischen Modulators zum freien Rezeptor; $p\alpha$: Maß für die Kooperativität zwischen dem jeweiligen Radioliganden und W84, n: Anzahl der durchgeführten Bestimmungen.

*: Die Werte für pK_A unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test mit Welch-Korrektur, $p > 0,05$).

Die für [³H]NMS ermittelten Werte für den Einfluss von WDuo 3 auf die Gleichgewichtsbindung stehen im Einklang mit den Befunden aus den Dissoziationsexperimenten: Das Produkt aus α und K_A stimmt mit dem $EC_{0,5,Diss}$ -Wert überein ($pEC_{0,5,Diss}$: $8,17 \pm 0,10$; t-Test, $p > 0,05$).

Der Vergleich des Wertes (αK_A) mit $EC_{0,5,Diss}$ aus den Experimenten mit [³H]OxoM zeigt einen Unterschied von Faktor 10: Die Dissoziation wird bei zehnfach kleineren Konzentrationen gehemmt, als die Gleichgewichtsbindung. Demnach müsste eine Zunahme der Radioligand-Bindung beobachtet werden. Abbildung 27 zeigt aber eine Bindungshemmung.

Eine Ursache könnte die Zersetzung der Substanz während der Inkubationszeit von 10 Stunden sein. Die Experimente mit [³H]NMS bedurften nur einer Inkubationszeit von 5 Stunden.

Untersuchungen zum möglichen Zerfall von WDuo 3 während der Inkubationszeit

Die Hypothese wurde durch Dissoziations-Experimente mit einer 10 stündigen Vorinkubationszeit geprüft. Der Ansatz wurde zunächst nur mit [³H]OxoM, Puffer und Membransuspension beschickt. Nach 30 Minuten, wenn Radioligand und Rezeptoren ihr Gleichgewicht erreicht hatten, wurde WDuo 3 in einer gut wirksamen Konzentration (1 μ M) zugegeben und 10 Stunden inkubiert. Im Anschluß wurden drei Proben für die [³H]OxoM-Gesamtbindung entnommen, die auch als Kontroll-Punkte gegenüber den Untersuchungen im Gleichgewicht dienten (offene Symbole in Abbildung 27). Dann erst wurde die Dissoziation durch Zugabe von 1 μ M Atropin sichtbar gemacht. Die Konzentration WDuo 3 wurde so gewählt, dass eine Abschwächung des dissoziationsverzögernden Effektes gut zu erkennen sein sollte (großes Messfenster).

Die spezifische Bindung des Agonisten nach Vorinkubation mit WDuo 3 (1 μ M) über 10 Stunden entsprach den Befunden aus den Experimenten im Gleichgewicht (offene Symbole in Abbildung 27). Der dissoziationsverzögernde Effekt von WDuo 3 nach 10 Stunden Inkubation war reduziert. Unter Verwendung der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“ wurde eine Kurve durch den erhaltenen Datenpunkt konstruiert. Dabei wurden die Parameter der in Abbildung 26 gezeigten Konzentrations-Effekt-Kurve von WDuo 3 zugrunde gelegt (Ausgangsplateau von 100%, unteres Plateau der Kurve von 0%, $n_H=-1$). Da die Dissoziationsverläufe nach langer Vorinkubationsphase nicht mehr durchgängig biphasisch waren, wurden für diesen Vergleich $t_{50\%}$ -Werte herangezogen (Abbildung 28).

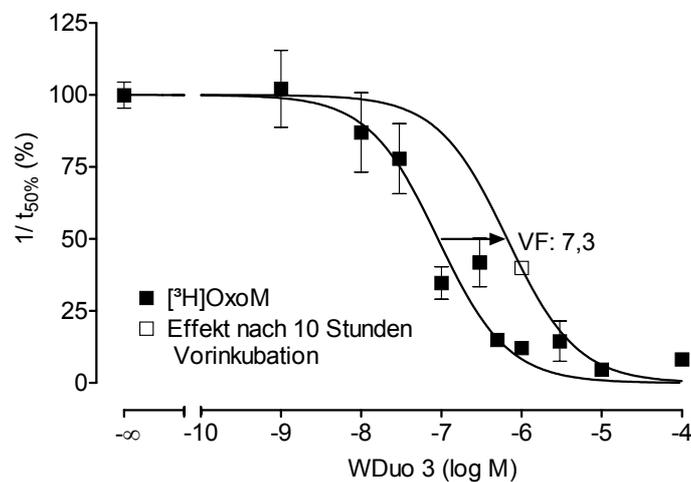


Abbildung 28: Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Verzögerung der [³H]OxoM-Dissoziation durch WDuo 3 mit und ohne 10 Stunden Vorinkubation.

Ordinate: Geschwindigkeit der [³H]OxoM-Dissoziation (1/ $t_{50\%}$) in Prozent des Ausgangsniveaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators WDuo 3.

VF: Verschiebefaktor (Quotient aus $EC_{0,5Diss}$ - Werten).

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 2 bis 9 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

Der Quotient der $EC_{0,5Diss}$ -Werte mit und ohne Vorinkubation über 10 Stunden ergab einen Verschiebefaktor von etwa 7. Wenn der Effekt der Substanz über einen Zeitraum von 10 Stunden um den Faktor 7 vermindert wird, lässt sich daraus eine Halbwertszeit für die Stabilität von WDuo 3 von etwa 2,7 Stunden schätzen. Innerhalb von 2,7 Stunden wird demnach die Konzentration der Substanz um den Faktor 2 reduziert.

Da die Inkubationszeit der Gleichgewichts-Bindungs-Untersuchungen mit dem Antagonisten [³H]NMS mit 5 Stunden diese geschätzte Halbwertszeit ebenfalls

überschritt, wurden analoge Dissoziations-Experimente mit [³H]NMS durchgeführt. Die als Kontroll-Punkte gewerteten triplizierten Proben der Gesamtbindung am Ende der Vorinkubations-Phase stimmten gut mit den Datenpunkten aus den Gleichgewichts-Experimenten überein (offenes Symbol in Abbildung 27). Die Verzögerung der Dissoziation von [³H]NMS durch WDuo 3 war nach 5 Stunden Vorinkubation weniger ausgeprägt als in den ursprünglichen Dissoziations-Experimenten unter Kontroll-Bedingungen. Die Berechnung eines Verschiebefaktors erfolgte wiederum durch eine Simulation unter Verwendung der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“ und der Kenngrößen der Dosis-Wirkungs-Beziehung unter Kontroll-Bedingungen. Der Verschiebefaktor beträgt etwa 4 und die geschätzte Halbwertszeit somit 2,4 Stunden (Abbildung 29).

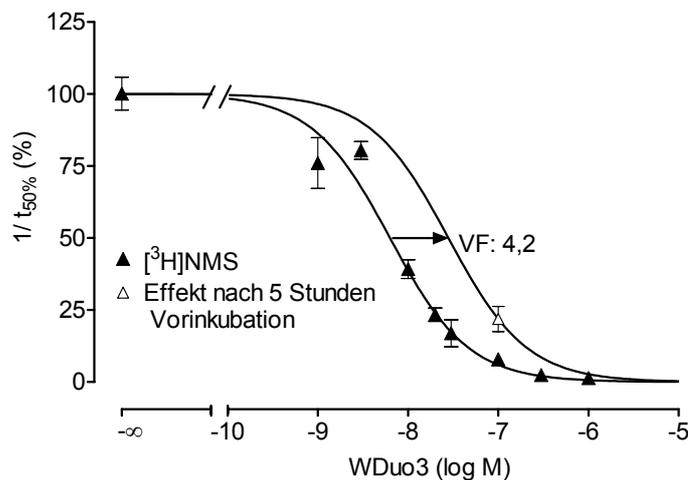


Abbildung 29: Dosis-Wirkungs-Beziehungen für die Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation durch WDuo 3 mit und ohne 5 Stunden Vorinkubation.

Ordinate: Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation ($1/t_{50\%}$) in Prozent des Ausgangsplateaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators WDuo 3.

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus je 5 Experimenten. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen. VF: Verschiebefaktor (Quotient aus $EC_{0,5Diss}$ -Werten).

Der Effekt-Verlust der Substanz WDuo 3 in Kombination mit [³H]NMS war nur durch ein derartiges Experiment zu beobachten. Wie unter 3.3.1.2 beschrieben, kann der Effekt einer Testsubstanz auf die Dissoziation eines Liganden aus den in Gleichgewichts-Bindungs-Experimenten erhobenen Größen (pK_A und $p\alpha$) als Produkt $p(\alpha K_A)$ abgeleitet werden. Dieses Produkt sollte demnach dem $pEC_{0,5Diss}$ -Wert entsprechen. In Tabelle 22 sind diese Werte zusammengestellt: Im Falle der Experimente mit [³H]NMS

unterscheidet sich $p(\alpha K_A)$ nicht signifikant von $pEC_{0,5Dis}$ (t-Test, $p > 0,05$), so dass zunächst kein Anlass gegeben war, die Güte der Werte aus den Gleichgewichts-Bindungs-Experimenten anzuzweifeln.

Für beide Radioliganden bleibt festzuhalten, dass die Ermittlung der Affinität von WDuo 3 zum freien Rezeptor, sowie die Bestimmung von α mit Hilfe von Gleichgewichts-Bindungs-Experimenten zu verfälschten Befunden führte, da die Testsubstanz offensichtlich nicht über die notwendige Inkubationszeit bis zum Erreichen des Bindungs-Gleichgewichts stabil war.

Zur Bestimmung der Affinität von WDuo 3 zum freien Rezeptor konnten deshalb nur Assoziations-Experimente herangezogen werden.

Messung der Effekte von WDuo 3 mit Hilfe von Assoziationsexperimenten

Die Effekte von WDuo 3 auf die Assoziation von $[^3H]OxoM$ und $[^3H]NMS$ erfolgte wie unter 2.4.2 beschrieben. Abbildung 30 zeigt repräsentative Experimente mit dem Agonisten $[^3H]OxoM$ und dem Antagonisten $[^3H]NMS$.

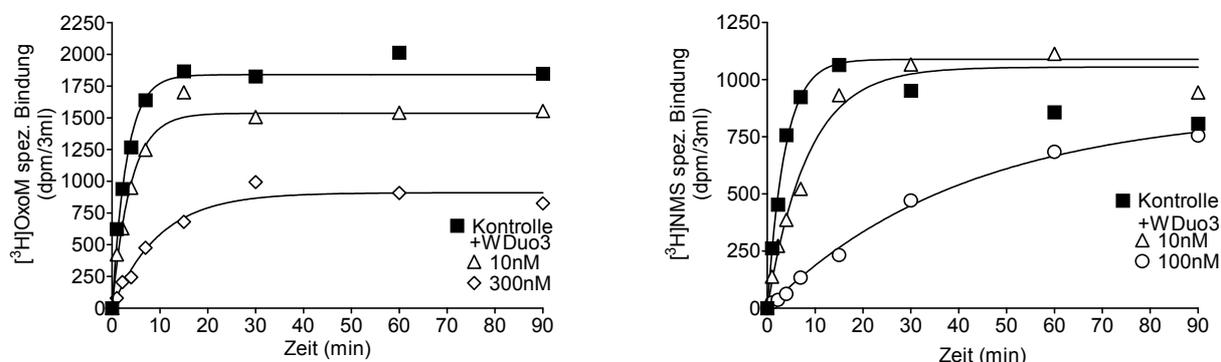


Abbildung 30: Zeitverlauf der $[^3H]OxoM$ - (links) und der $[^3H]NMS$ -Assoziation (rechts) unter Einfluss verschiedener Konzentrationen von WDuo 3.

Ordinate: Spezifische Radioligand-Bindung in dpm/3ml Inkubationsmedium.

Abszisse: Zeit nach Zugabe von Radioligand in Minuten.

Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment. Die Konzentration des Radioliganden $[^3H]OxoM$ betrug $0,1nM$, die $[^3H]NMS$ -Konzentration betrug $0,01nM$. Zur Bestimmung der initialen Assoziationsgeschwindigkeit im Falle der $[^3H]NMS$ -Assoziation in Abwesenheit von Testsubstanz wurden nur die Messpunkte der ersten 15 Minuten einbezogen, so dass der Abfall der Gleichgewichtsbindung bei der Kurvenanalyse nicht berücksichtigt wurde.

Aus diesen Kurvenverläufen wird, wie in 2.4.2.2 beschrieben, die apparente Assoziations-Geschwindigkeits-Konstante für die Kontrolle und die einzelnen Substanz-Konzentrationen abgeleitet. Diese Assoziations-Geschwindigkeits-Konstanten werden

zur Erfassung der Dosis-Wirkungs-Beziehung gegen den Logarithmus der jeweiligen Konzentration der Testsubstanz aufgetragen und unter Verwendung der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“ analysiert (Abbildung 31).

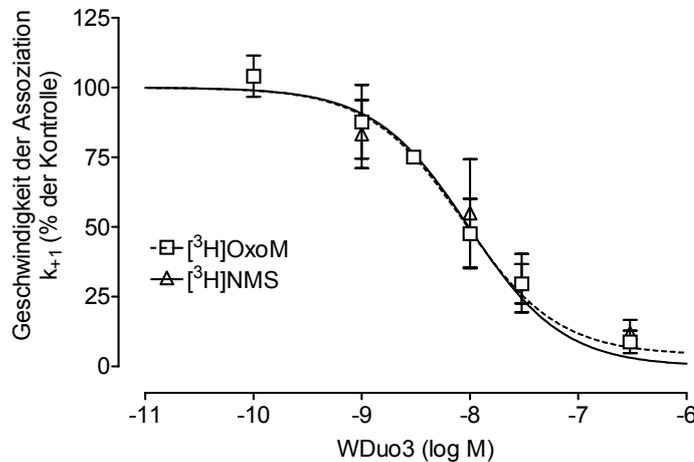


Abbildung 31: Gegenüberstellung der Effekte von WDuo 3 auf die Assoziation von [³H]OxoM (0,1nM) und [³H]NMS (0,01nM).

Ordinate: Assoziations-Geschwindigkeits-Konstante k_{+1} in Prozent der Kontrolle.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators WDuo 3. Die Daten für den Agonisten sind durch Quadrate und einen unterbrochenen Kurvenverlauf, die für den Antagonisten durch Dreiecke und eine durchgezogene Linie wiedergegeben. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus jeweils 3 bis 6 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

Die Affinität von WDuo 3 zum freien Rezeptor, ausgedrückt als $pEC_{0,5Ass}$ -Wert, war nicht abhängig vom verwendeten Radioliganden, wie Tabelle 23 zeigt.

	$pEC_{0,5,Ass}$	unteres Plateau (Min)	Kurvensteilheit n_H	n
[³ H]OxoM	$8,06 \pm 0,07^*$	$4,1 \pm 1,1^a$	$-0,77 \pm 0,26^{ns}$	7
[³ H]NMS	$8,01 \pm 0,05$	$1,4 \pm 2,6$	$-0,91 \pm 0,12^{ns}$	6

Tabelle 23: Kenngrößen der in Abbildung 31 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der Effekte von WDuo 3 auf die Assoziation beider Radioliganden (Mittelwerte und Standardfehler). n: Anzahl der Experimente.

*: Der Wert für $pEC_{0,5,Ass}$ unterscheidet sich nicht signifikant von dem für [³H]NMS bestimmten (t-Test, $p > 0,05$).

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

ns: Die Steilheit ist nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test, $p > 0,05$).

Neben der Verminderung der Assoziations-Geschwindigkeit lassen sich auch Effekte auf die Höhe des Bindungs-Gleichgewichts durch Assoziations-Experimente erfassen. Die Betrachtung der Substanz-Effekte auf die Einstellung des Bindungs-Gleichgewichts erfolgte durch Gegenüberstellung des erreichten Bindungs-Niveaus (Plateau der Assoziations-Kinetik) und der eingesetzten Konzentration der Testsubstanz (Abbildung 32). Dies ermöglichte eine Analyse nach Ehlert und die Bestimmung von α_{Ass} und $K_{A,Ass}$. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 24 angegeben.

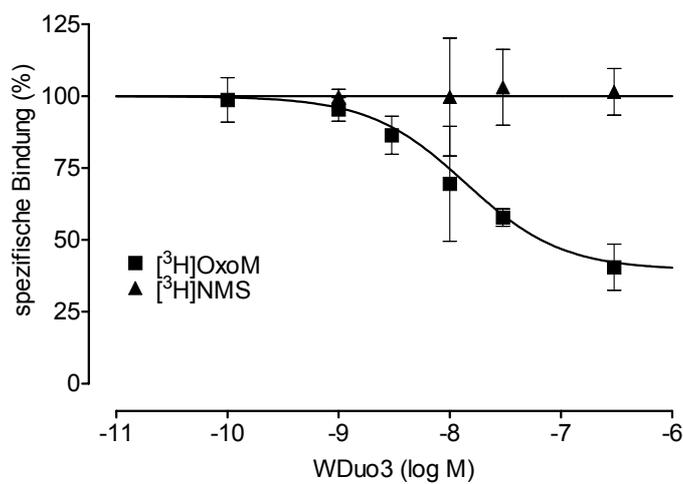


Abbildung 32: Einfluss von W Duo 3 auf die Gleichgewichtsbindung des Agonisten [³H]OxoM (Quadrat) sowie des Antagonisten [³H]NMS (Dreiecke) erhoben mit Hilfe von Assoziations-Experimenten.

Ordinate: Spezifische Bindung des jeweiligen Radioliganden in Prozent des Ausgangsplateaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators W Duo 3.

Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus jeweils 3 bis 6 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Symbolgröße hinausgehen. Die dargestellten Datensätze sind aus Assoziations-Experimenten abgeleitet und wurden mit Hilfe der Gleichung von Ehlert analysiert.

Im Falle des Antagonisten resultierte eine Parallele zur Abszisse. Dieser Befund steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die Assoziation und die Dissoziation von [³H]NMS von der gleichen Konzentration W Duo 3 halbmaximal verzögert werden (Tabelle 24: $pEC_{0,5,Diss}$ unterscheidet sich nicht signifikant von $pEC_{0,5,Ass}$, t-Test, $p > 0,05$).

Die Assoziation von [³H]OxoM wird von einer um den Faktor 3 kleineren Konzentration des Modulators gehemmt, als die Dissoziation. Dieser „kinetische“ Wert für α stimmt sowohl mit dem α aus Gleichgewichts-Bindungs-Experimenten als auch mit dem α_{Ass} aus Assoziations-Experimenten überein.

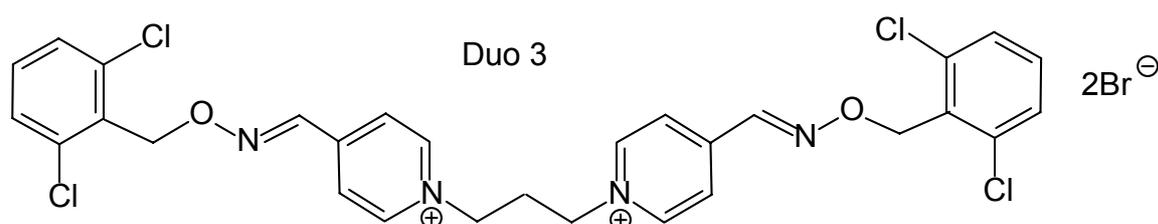
Abschließend bleibt festzuhalten, dass WDuo 3 auch zum [³H]OxoM-besetzten Rezeptor eine höhere Affinität hat als W84.

	pK _{A,Ass}	pα _{Ass}	pEC _{0,5,Ass}	pEC _{0,5,Diss}	pα _{kin}
[³ H]OxoM	7,90 ± 0,16	-0,45	8,06 ± 0,07	7,50 ± 0,20	-0,60
[³ H]NMS	n. b.	0	8,01 ± 0,05	8,17 ± 0,10	0,16

Tabelle 24: Kenngrößen der in Abbildung 32 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für den Effekt von WDuo 3 auf die Gleichgewichtsbindung bestimmt aus Assoziationsexperimenten (Mittelwerte und Standardfehler). pK_{A,Ass} als Maß für die Affinität des allosterischen Modulators zum freien Rezeptor und pα_{ASS} als Maß für die Kooperativität wurden aus der Ehlert-Analyse der Bindungsdaten der Assoziations-Experimente abgeleitet. pEC_{0,5,Ass}: Konzentration des WDuo 3 die eine halbmaximale Verzögerung der Assoziation bewirkt (entnommen aus Tabelle 23). pEC_{0,5,Diss}: Konzentration des WDuo 3, die eine halbmaximale Verzögerung der Dissoziation bewirkt (entnommen aus Tabelle 21). pα_{kin}: Maß für die Kooperativität berechnet aus den kinetischen Befunden (Quotient aus EC_{0,5,Diss} und EC_{0,5,Ass}). n. b.: Wert war nicht bestimmbar, da eine Parallele zur Abszisse vorlag.

3.3.7 Duo 3

Die Substanz Duo 3 gehört wie auch WDuo 3 zur Gruppe der Bispyridinium-Verbindungen. Hinsichtlich der Pufferabhängigkeit seiner dissoziationsverzögernden Wirkung und der außergewöhnlichen Steilheit der Dosis-Wirkungs-Kurve (Tränkle et al., 1996) wirkt es andersartig als WDuo 3 und weitere „klassische“ allosterische Modulatoren. Daher wird diese Substanz als „atypischer“ Modulator bezeichnet. Tränkle und Mohr postulierten 1997, dass Duo 3 einen anderen Haftpunkt am [³H]NMS-besetzten Rezeptor-Protein nutzt, als die Modulatoren WDuo 3 und Obidoxim. Hier sollte geprüft werden, ob dieses „atypische“ Verhalten des Modulators gegenüber dem Agonisten [³H]OxoM in ähnlicher Form zu beobachten ist, wie gegenüber dem Antagonisten [³H]NMS.



3.3.7.1 Effekte von Duo 3 auf die Dissoziation von [³H]OxoM und [³H]NMS

In Abbildung 33 sind die Konzentrations-Effekt-Beziehungen von Duo 3 für beide Radioliganden dargestellt. Die Betrachtung der Konzentrations-Effekt-Beziehung erfolgte für die verschiedenen Kompartimente getrennt, da überwiegend biphasische Dissoziationsverläufe (4 von 5 Verläufen in Abwesenheit von Testsubstanz und 13 von 18 in Gegenwart von Substanz) beobachtet wurden.

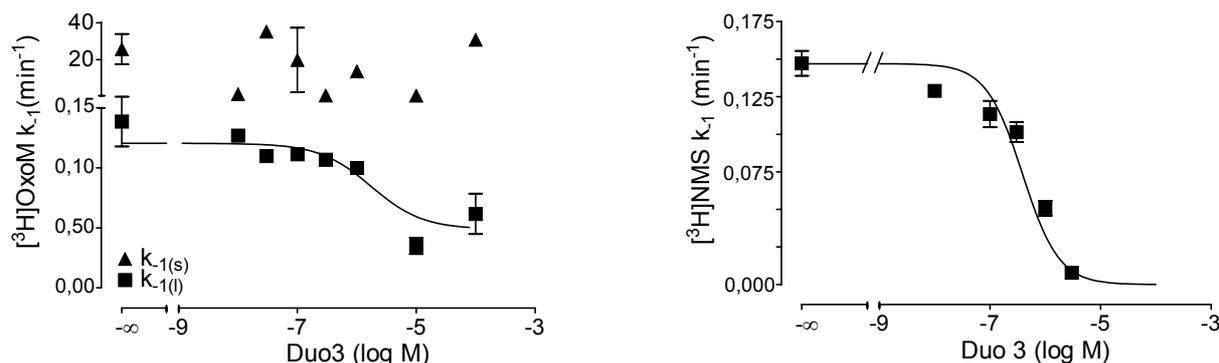


Abbildung 33: Effekt von Duo 3 auf die Dissoziations-Geschwindigkeit des Agonisten [³H]OxoM (links) und des Antagonisten [³H]NMS (rechts).

Ordinate: Apparente Dissoziations-Geschwindigkeits-Konstante (k_{-1}) in min^{-1} .

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators Duo 3.

Die Geschwindigkeits-Konstanten der [³H]OxoM-Dissoziation sind für das „langsame“ Kompartiment durch Quadrate, die für das „schnelle“ Kompartiment durch Dreiecke gekennzeichnet.

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus je 5 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streubalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Analyse erfolgte mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“. Im Falle der Konzentrations-Effekt-Kurve für die Effekte auf die [³H]NMS-Dissoziation wurde das untere Plateau auf 0% konstant gesetzt.

Die Geschwindigkeit der Dissoziation des „schnellen“ Kompartiments wurde nicht beeinflusst, wohingegen eine schwach dissoziationsverzögernde Wirkung von Duo 3 auf das „langsame“ Kompartiment beobachtet werden konnte. Die aus der nicht-linearen Regressionsanalyse ermittelten Kenngrößen sind in Tabelle 25 zusammengestellt.

Die Befunde zeigen, dass die Affinität von Duo 3 im Gegensatz zu W Duo 3 nicht abhängig ist von der Rezeptorbesetzung durch [³H]OxoM oder [³H]NMS, die Dissoziation beider Radioliganden wird durch etwa 1 μM Duo 3 halbmaximal verzögert. Die [³H]OxoM-Dissoziation wurde von Duo 3 nur maximal um den Faktor 2,5 verzögert, während die [³H]NMS-Dissoziation vollständig gehemmt wurde. Die Werte für die

Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation stimmen mit den Befunden von Schröter et al. (2000) überein.

	pEC _{0,5,Diss}	unteres Plateau (Min)	Kurvensteilheit n _H	n
[³ H]OxoM	5,76 ± 0,32*	41 ± 13% ^a	-1,49 ± 1,86	4
[³ H]NMS	6,41 ± 0,07*	0% konstant gesetzt	-1,32 ± 0,14 ^b	4

Tabelle 25: Kenngrößen der in Abbildung 33 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirkung von Duo 3 (Mittelwerte und Standardfehler).

*: Die ermittelten Werte für pEC_{0,5,Diss} unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test mit Welch-Korrektur, p>0,05).

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

b: Das Steilheitsmaß ist signifikant verschieden von -1 (F-Test, p<0,05).

3.3.7.2 Effekte von Duo 3 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]OxoM und [³H]NMS

Die Interaktion von Duo 3 mit dem freien Rezeptor wurde mittels Gleichgewichts-Bindungs-Experimenten untersucht, wie unter 2.3.3. beschrieben. Die Inkubationszeit betrug für die Untersuchungen mit beiden Radioliganden jeweils zwei Stunden. Die erhobenen Datensätze, sowie die nicht-lineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung sind in Abbildung 34 dargestellt. Die daraus erhobenen, charakterisierenden Werte sind in Tabelle 26 wiedergegeben.

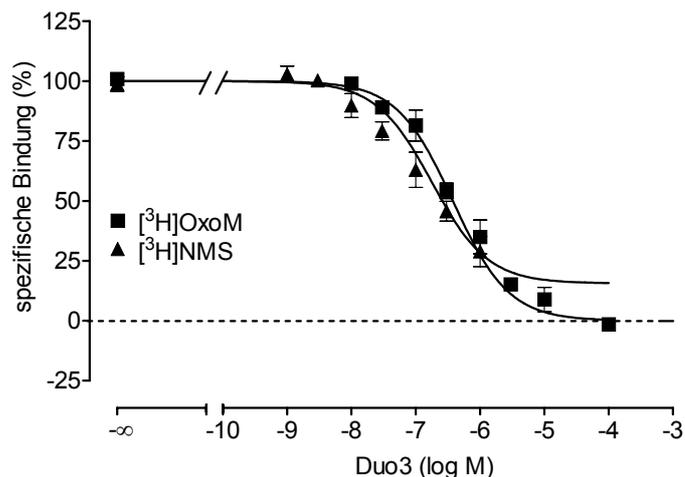


Abbildung 34: Einfluss von Duo 3 auf die Gleichgewichtsbindung des Agonisten [³H]OxoM (Quadrate) sowie des Antagonisten [³H]NMS (Dreiecke).

Ordinate: Spezifische Bindung des jeweiligen Radioliganden in Prozent des Ausgangsplateaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators Duo 3.

Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 4 bis 5 Experimente. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Symbolgröße hinausgehen. Die dargestellten Kurvenzüge wurden mit Hilfe der Kenngrößen pK_A und pα (Tab. 26) erhalten.

Ergebnisse

	pK_A	$p\alpha$	$p(\alpha K_A)$	n
$[^3\text{H}]\text{OxoM}$	$6,66 \pm 0,07^{\text{ns}}$	$-2,9 \pm 1,0$	$4,58 \pm 0,72$	5
$[^3\text{H}]\text{NMS}$	$6,87 \pm 0,06$	$-0,70 \pm 0,14$	$6,02 \pm 0,18$	4

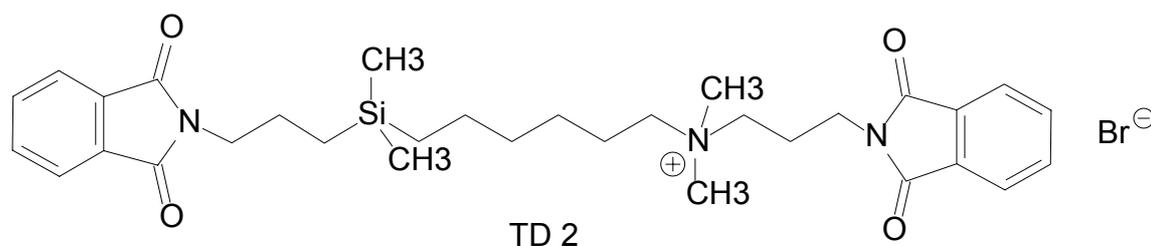
Tabelle 26: Kenngrößen der in Abbildung 34 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für den Effekt von Duo 3 auf die Gleichgewichtsbindung (Mittelwerte und Standardfehler). pK_A : Affinität des allosterischen Modulators zum freien Rezeptor; $p\alpha$: Maß für die Kooperativität, n: Anzahl der durchgeführten Bestimmungen.

ns: Der Wert für pK_A unterscheidet sich nicht signifikant von dem für $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bestimmten Wert (t-Test, $p > 0,05$).

Die Bestimmung des pK_A -Wertes von Duo 3 ist nicht abhängig vom zur Bestimmung verwendeten Radioliganden.

3.3.8 TD 2

Der allosterische Modulator TD 2 ist der erste Vertreter einer Gruppe, die sich von W84 ableitet, aber einseitig ein Silizium-Atom statt eines quartären Stickstoffs enthält. Im Gegensatz zur Muttersubstanz W84 zeigt diese Verbindung ein positiv-kooperatives Verhalten mit dem Antagonisten $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (Daiss et al., 2002). Es wurde geprüft, ob dieses Verhalten auch gegenüber $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ zu beobachten ist.



3.3.8.1 Effekte von TD 2 auf die Dissoziation von $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ und $[^3\text{H}]\text{NMS}$

Die Dissoziation von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ konnte vollständig gehemmt werden (Abbildung 35, rechts). Die Analyse der Datenpunkte erfolgte mittels der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“. Das obere Plateau wurde bei 100%, das untere bei 0 konstant gesetzt. Die Kurvensteilheit war nicht signifikant verschieden von -1 . Es ergab sich ein $pEC_{0,5,\text{Diss}}$ -Wert von $7,23 \pm 0,06$.

Der Verlauf der [³H]OxoM-Dissoziation konnte in dieser Versuchsreihe überwiegend besser durch ein Modell, das zwei Bindungsstellen annimmt, beschrieben werden (3 von 4 Verläufen in Abwesenheit von Testsubstanz und 12 von 16 in Gegenwart von Substanz). Die Betrachtung der Konzentrations-Effekt-Beziehung erfolgte deshalb für beide Kompartimente getrennt. Hierbei war zu berücksichtigen, dass die Größe des „langsamen“ Kompartimentes in Gegenwart einer TD 2-Konzentration von 0,1mM signifikant kleiner war, als bei der nächst kleineren Konzentration von 0,01mM (Tabelle 27):

	Anzahl d. Versuche	Kompartiment-Größe (%)
Kontrolle	4	82 ± 3%
TD 2 (0,01mM)	4	76 ± 4%
TD 2 (0,10mM)	5	55 ± 5%*

Tabelle 27: Zusammenstellung der bei der biphasischen Analyse der [³H]OxoM-Dissoziationen erhaltenen Größen für den Anteil der Rezeptor-Ligand-Komplexe mit „langsamer“ Dissoziations-Geschwindigkeit („langsames“ Kompartiment) unter Kontroll-Bedingungen und in Gegenwart bestimmter Konzentrationen des Modulators TD 2.

*: Kompartimentgröße signifikant kleiner als bei den geringeren Konzentrationen von TD 2 (t-Test, p<0,05).

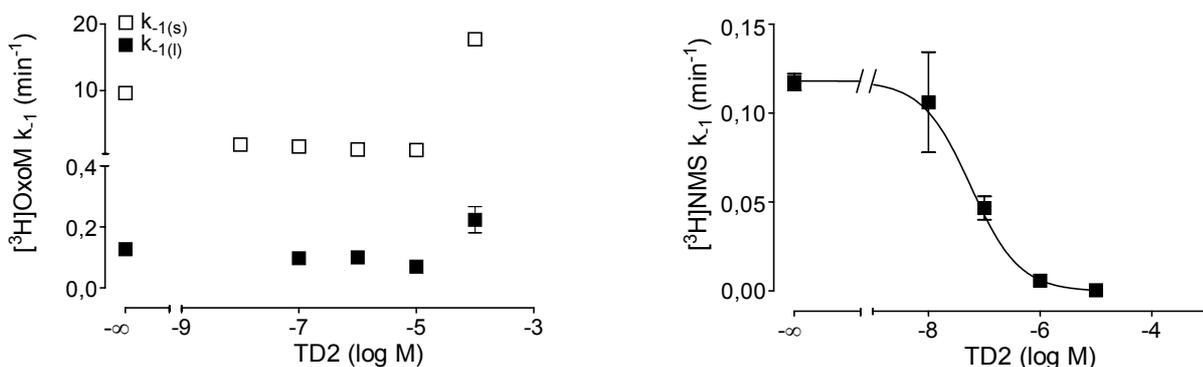


Abbildung 35: Effekt von TD 2 auf die Dissoziations-Geschwindigkeit des Agonisten [³H]OxoM (links) und des Antagonisten [³H]NMS (rechts).

Ordinate: Apparente Dissoziations-Geschwindigkeits-Konstante k_{-1} in 1/min.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators TD 2.

Die Geschwindigkeits-Konstanten der [³H]OxoM-Dissoziation sind für das „langsame“ Kompartiment durch gefüllte für das „schnelle“ Kompartiment durch offene Quadrate, gekennzeichnet.

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 2 bis 4 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

Die Datenpunkte aus Untersuchungen mit dem Agonisten [³H]OxoM zeigen, dass in beiden Kompartimenten innerhalb des groß gewählten Bereiches der eingesetzten Konzentrationen keine Verzögerung der Dissoziation durch den Modulator bewirkt werden konnte. In Gegenwart einer TD 2-Konzentration von 0,1mM scheint eine Beeinflussung im Sinne einer Beschleunigung der Agonist-Dissoziation möglich, allerdings unter Veränderung der Kompartiment-Größen.

Anschließend wurden Kombinations-Experimente durchgeführt, um eine mögliche Bindung von TD 2 an den [³H]OxoM-besetzten Rezeptor zu prüfen, die sich nicht in einer Verzögerung der [³H]OxoM-Dissoziation bemerkbar macht, aber zu einer Abschwächung des Effektes der Substanz WDuo 3 führen könnte. Dazu wurde die dissoziationsverzögernde Wirkung einer gut wirksamen Konzentration WDuo 3 (0,5µM) unter Zusatz einer hohen Konzentration von TD 2 (10µM) mit der Wirkung von WDuo 3 allein verglichen (Tabelle 28):

	Kontrolle (n=3)	TD 2 (10µM) (n=2)	WDuo 3 (0,5µM) (n=2)	Kombination (n=6)
$k_{-1(0)}$ [min ⁻¹]	0,151 ± 0,025	0,110; 0,099	0,012; 0,015	0,029 ± 0,0018 ^{ns}

Tabelle 28: Gegenüberstellung der Dissoziations-Geschwindigkeits-Konstanten ($k_{-1(0)}$) des langsamen Kompartiments für die genannten Konzentrationen von TD 2 und WDuo 3 sowie deren Kombination. Angegeben sind wo möglich Mittelwerte und Standardfehler.
 ns: Die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante des langsamen Kompartiments der Kombination von WDuo 3 und TD 2 unterscheidet sich nicht signifikant von der in der alleinigen Gegenwart von WDuo 3 (t-Test, $p > 0,05$).

Der Vergleich der Messwerte unter dem Einfluß von WDuo 3 (0,5µM) allein und in Kombination mit TD 2 (10µM) mit Hilfe eines zweiseitigen, ungepaarten t-Testes zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$). Demnach ist eine Bindung von TD 2 am [³H]OxoM-besetzten Rezeptor eher unwahrscheinlich.

3.3.8.2 Effekte von TD 2 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]OxoM und [³H]NMS

Die zum Erreichen des Bindungsgleichgewicht notwendige Inkubationszeit belief sich für Untersuchungen mit [³H]NMS auf 10 Stunden. Da TD 2 die Dissoziation von [³H]OxoM nicht verzögerte, wurde die Inkubationszeit wie bei homologen Wettbewerbsversuchen mit [³H]OxoM auf 2 Stunden angesetzt.

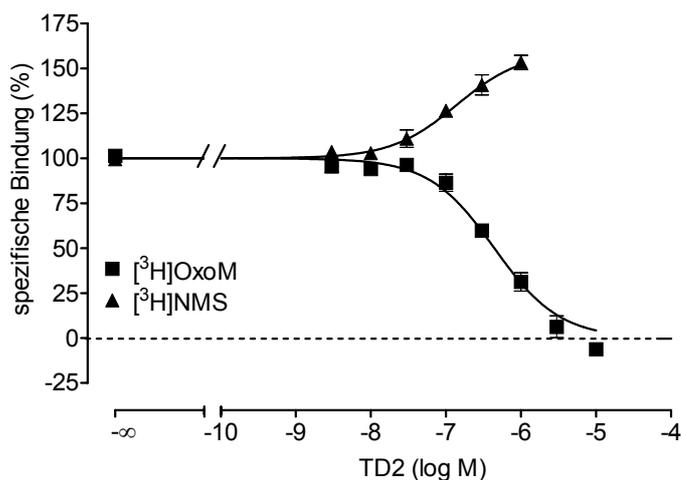


Abbildung 36: Einfluss von TD 2 auf die Gleichgewichtsbindung des Agonisten [³H]OxoM (Quadrate) sowie des Antagonisten [³H]NMS (Dreiecke).

Ordinate: Spezifische Bindung des jeweiligen Radioliganden in Prozent des Ausgangsplateaus.

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators TD 2.

Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus je 4 Experimenten. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Symbolgröße hinausgehen. Die dargestellten Kurvenzüge wurden mit Hilfe der Kenngrößen pK_A und pα (Tab. 29) erhalten.

Die Bindung des Antagonisten wurde gefördert. Die Bindung des Agonisten wurde hingegen vollständig gehemmt. Die ermittelten Werte für die Interaktion von TD 2 mit beiden Radioliganden sind in Tabelle 29 wiedergegeben.

	pK _A	pα	p(αK _A)	n
[³ H]OxoM	6,54 ± 0,07*	-9,42 ± 1,39	-2,88 ± 1,44	4
[³ H]NMS	6,66 ± 0,09*	0,47 ± 0,02	7,07 ± 0,10	4

Tabelle 29: Kenngrößen der in Abbildung 36 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für den Effekt von TD 2 auf die Gleichgewichtsbindung (Mittelwerte und Standardfehler).

pK_A: Affinität des allosterischen Modulators zum freien Rezeptor; pα: Maß für die Kooperativität zwischen dem jeweiligen Radioliganden und TD 2; n: Anzahl der durchgeführten Bestimmungen.

*: Die Werte für pK_A unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test, p>0,05).

Die Affinität von TD 2 zum freien Rezeptor war unabhängig von dem zur Bestimmung eingesetzten orthosterischen Liganden (t-Test, $p > 0,05$). Die Befunde aus Untersuchungen mit [^3H]NMS stimmten mit den von Daiss und Mitarbeitern (2002) erhobenen Daten überein, obwohl dort im Mg,Pi,Tris-Puffer gearbeitet wurde ($pK_A: 6,46 \pm 0,14$, $\alpha: 0,36 \pm 0,03$ (dies entspricht einem $p\alpha$ von 0,44)). Diese Substanz scheint keine Pufferabhängigkeit aufzuweisen.

Für die Interaktion von TD 2 und [^3H]OxoM unter Gleichgewichts-Bedingungen wurde zusätzlich ein Wert für pK_i bestimmt, da eine vollständige Hemmung der [^3H]OxoM-Bindung beobachtet werden konnte. Dieser betrug $6,58 \pm 0,06$ und war nicht signifikant verschieden von pK_A (t-Test, $p > 0,05$). Wie unter 3.3.1.2 beschrieben, ist die Güte der Bestimmung des Wertes für α abhängig von der Bestimmung des unteren Plateaus. Da TD 2 die [^3H]OxoM-Bindung vollständig hemmte, kann α hier nur als Schätzwert dienen. Daher ist auch der Wert für $p(\alpha K_A)$ nur der Vollständigkeit halber angegeben und kann nicht interpretiert werden.

3.4 Analyse der antagonistischen Interaktion zwischen Obidoxim und WDuo 3

Durch Kombinations-Experimente mit dem allosterischen Antagonisten Obidoxim sollte untersucht werden, ob WDuo 3 seine Effekte über die gemeinsame allosterische Bindungsstelle vermittelt, wie dies für den Antagonist-besetzten Rezeptor beschrieben worden ist (Tränkle & Mohr, 1997).

3.4.1 Interaktion am [^3H]NMS-besetzten Rezeptor

Die Ergebnisse der Untersuchungen am [^3H]NMS-besetzten Rezeptor stimmten gut mit den Befunden von Tränkle und Mohr (1997) überein. Die Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von WDuo 3 durch steigende Konzentrationen Obidoxim ist in Abbildung 37 dargestellt.

Die im oberen Teil von Abbildung 37 dargestellten nicht-transformierten Werte für $t_{50\%}$ lassen den Eigeneffekt der allosterischen Antagonisten Obidoxim als Senkung des Ausgangsplateaus erkennen. Im unteren Teil der Abbildung sind die gleichen Daten nach Normalisierung auf das jeweilige Ausgangsniveau gezeigt. Mittels der Bildung von Quotienten der Wendepunkte in An- und Abwesenheit der untersuchten Antagonist-Konzentrationen wurden „Verschiebefaktoren“ berechnet (Tabelle 30), die zur weiteren Analyse der Art der Interaktion benötigt wurden (siehe 3.4.3).

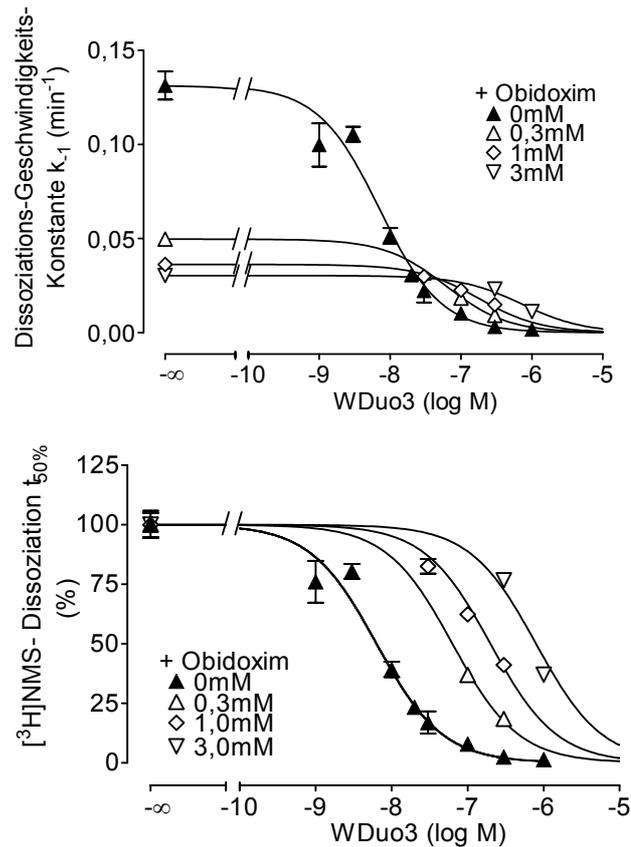


Abbildung 37: Effekt von Obidoxim und von W Duo 3, sowie ihrer Kombination auf die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation (oben) und Darstellung der gleichen Befunde normiert auf den Eigeneffekt des Obidoxim zur Untersuchung seiner antagonistischen Eigenschaften gegenüber W Duo 3 (unten). *Ordinate*: Geschwindigkeit der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation k_{-1} (min^{-1}) (oben) bzw. in Prozent des Ausgangsplateaus (unten).

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators W Duo 3. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus je 2 bis 5 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Kurvenanpassung erfolgte unter Verwendung der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“, wobei die Steigung mit $n_H=-1$, das obere Plateau mit $\text{max}=100\%$ und das untere Plateau mit $\text{Min}=0\%$ festgesetzt wurden.

	$\text{EC}_{0,5,\text{Diss}}$ (nM)	Verschiebefaktor
ohne Obidoxim	7,1	
0,3mM Obidoxim	61,5	8,7
1,0mM Obidoxim	180,3	25,4
3,0mM Obidoxim	725,8	102,2

Tabelle 30: Effekt von Obidoxim auf den dissoziationsverzögernden Effekt von W Duo 3 am $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptor.

Angegeben sind $\text{EC}_{0,5,\text{Diss}}$ -Werte, d. h. diejenigen Konzentrationen des Modulators W Duo 3, die die Dissoziation von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ um den Faktor 2 verzögerten. Der Verschiebefaktor gibt den Quotient der $\text{EC}_{0,5,\text{Diss}}$ -Werte in Gegenwart einer bestimmten Konzentration Obidoxim und unter Kontroll-Bedingungen an.

3.4.2 Interaktion am [³H]OxoM-besetzten Rezeptor

Die Untersuchung der Wechselwirkung von Obidoxim und WDuo 3 am Agonist-besetzten Rezeptor zeigte ebenfalls eine Verschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve des WDuo 3 durch den Antagonisten Obidoxim.

Die quantitative Erfassung dieser Wechselwirkung war schwieriger als am Antagonist-besetzten Rezeptor. Die überwiegende Zahl der Dissoziationsverläufe (18 von 19 Verläufen in Abwesenheit von Testsubstanz, 35 von 44 in Gegenwart von Substanz) konnte signifikant besser durch ein Modell für zwei Bindungsstellen beschrieben werden (F-Test, $p < 0,05$). Voraussetzung für die vergleichende Analyse ist deshalb, dass die Anteile der mit einer bestimmten Geschwindigkeit dissoziierenden Rezeptor-Ligand-Komplexe in Gegenwart steigender Konzentrationen der Modulatoren unverändert bleiben.

Tabelle 31 zeigt den Anteil der Komplexe, die „langsam“ dissoziieren, bezogen auf die Gesamtzahl. Es konnte keine signifikante Änderung der Größe bei steigenden Modulator-Konzentrationen beobachtet werden (t-Test jeweils bezogen auf die Kontrolle, $p > 0,05$).

	+ Obidoxim (0,3mM)		+ Obidoxim (1mM)	
	Größe d. langsamen Komp.	n	Größe d. langsamen Komp.	n
Kontrolle	68,9 ± 4,8%	9	78,4 ± 2,5%	10
WDuo 3 (0,01µM)	46,0%, 59,6%	2		
WDuo 3 (0,1µM)	71,0 ± 10,9%	3	68,1 ± 7,1%	4
WDuo 3 (0,3µM)	72,3 ± 1,6%	3		
WDuo 3 (1µM)	82,3 ± 2,4%	3	83,0 ± 3,1%	3
WDuo 3 (3µM)	68,6 ± 6,6%	3	80,1 ± 4,8%	4
WDuo 3 (10µM)	87,4%, 47,1%	2	69,4%, 76,0%	2
WDuo 3 (30µM)			79,7 ± 8,5%	3
WDuo 3 (100µM)			75,6 ± 1,9%	3

Tabelle 31: Zusammenstellung der bei der biphasischen Analyse der [³H]OxoM-Dissoziationen erhaltenen Größen für den Anteil der Rezeptor-Ligand-Komplexe mit „langsamer“ Dissoziations-Geschwindigkeit („langsame“ Kompartiment) in Gegenwart der angegebenen Obidoxim-Konzentration alleine und in Gegenwart steigender Konzentrationen des Modulators WDuo 3. Angegeben sind Mittelwerte und, falls 3 oder mehr Punkte bestimmt wurden, der Standardfehler.

Der Einfluss von Obidoxim auf die Fähigkeit von WDuo 3, die [³H]OxoM-Dissoziation zu verzögern, wurde für das „schnelle“ und das „langsame“ Kompartiment getrennt betrachtet (Abbildung 38). Im „schnellen“ Kompartiment ist kein dissoziationsverzögernder Effekt zu beobachten. Im „langsamen“ Kompartiment war die konzentrationsabhängige Verzögerung der [³H]OxoM-Dissoziation durch den Modulator WDuo 3 in Gegenwart von Obidoxim abgeschwächt.

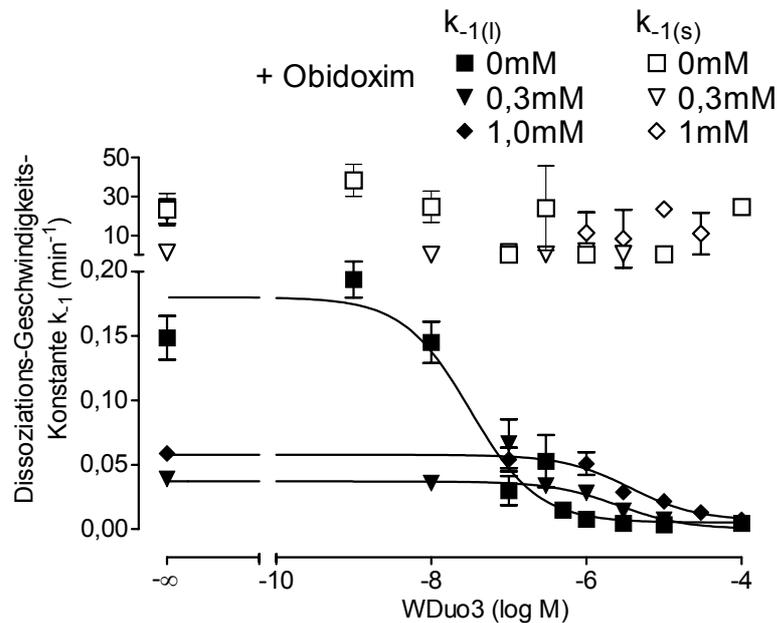


Abbildung 38: Effekt von Obidoxim auf den dissoziationsverzögernden Effekt von WDuo 3 am [³H]OxoM-besetzten Rezeptor.

Ordinate: Apparente Dissoziations-Geschwindigkeits-Konstante k_{-1} von [³H]OxoM (min^{-1}).

Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des allosterischen Modulators WDuo 3. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus je 2 bis 13 Bestimmungen je eingesetzter Konzentration. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wo sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

Die Kurvenanpassung erfolgte unter Verwendung von der „vier Parameter enthaltenden logistischen Gleichung“, wobei die Steilheit bei $n_H = -1$ und das untere Plateau bei $\text{min} = 0\%$ festgesetzt wurden (jeweils nicht signifikant verschieden von einer Anpassung mit freier Steigung bzw. freiem unterem Plateau, F-Test, $p > 0,05$).

Die ermittelten Werte für $EC_{0,5\text{Diss}}$ und die daraus berechneten Verschiebungsfaktoren sind in Tabelle 32 zusammengestellt.

	EC _{0,5,Dis} (nM)	Verschiebefaktor
ohne Obidoxim	31,9	
0,3mM Obidoxim	2548	80
1,0mM Obidoxim	3651	115

Tabelle 32: Effekt von Obidoxim auf den dissoziationsverzögernden Effekt von WDuo 3 am [³H]OxoM-besetzten Rezeptor.

Angegeben sind EC_{0,5,Dis}-Werte, diejenige Konzentration des Modulators WDuo 3, die die Dissoziation von [³H]OxoM um den Faktor 2 verzögert. Der Verschiebefaktor gibt den Quotient der EC_{0,5,Dis}-Werte in Gegenwart einer bestimmten Konzentration Obidoxim und unter Kontroll-Bedingungen an.

Der allosterische Antagonist Obidoxim war auch am Agonist-besetzten Rezeptor in der Lage, die dissoziationsverzögernde Wirkung von WDuo 3 abzuschwächen.

3.4.3 Analyse der antagonistischen Wirkung von Obidoxim gegenüber dem dissoziationsverzögernden Effekt von WDuo 3 am [³H]OxoM- und [³H]NMS-besetzten Rezeptor

Nach Auftragung der erhaltenen Verschiebefaktoren gegen die eingesetzte Obidoxim-Konzentration konnte eine Analyse nach Arunlakshana und Schild (1959) erfolgen. Diese ermöglicht die Bestimmung des pK_B-Wertes, der in Form des negativen dekadischen Logarithmus die Gleichgewichts-Dissoziations-Konstante der Antagonist-Bindung angibt, hier also die des Obidoxims. Im Falle einer kompetitiven Interaktion entspricht der pK_B-Wert dem pA₂-Wert des Antagonisten. Dieser steht für diejenige Konzentration des Antagonisten, die eine Rechtsverschiebung der Kontrollkurve um den Faktor 2 bewirkt. Eine kompetitive Interaktion liegt dann vor, wenn die Steigung der Schild-Regression nicht verschieden von 1 ist.

In Abbildung 39 ist die Schild-Analyse der eigenen Befunde mit [³H]NMS den Befunden von Tränkle (Tränkle und Mohr, 1997) gegenübergestellt. Die Steigung betrug 1,12 ± 0,07 und war nicht signifikant verschieden von 1 (t-Test, p>0,05). Der pK_B-Wert

beträgt 4,27, während bei Tränkle ein pK_B -Wert von $4,16 \pm 0,07$ angegeben wird. Beide Werte unterscheiden sich nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$).

Die Interaktion mit $[^3H]OxoM$ wurde nur für zwei Konzentrationen von Obidoxim untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Obidoxim auch am $[^3H]OxoM$ -besetzten Rezeptor einen antagonistischen Effekt gegenüber W Duo 3 hat. Die Abhängigkeit dieser Interaktion von der eingesetzten Konzentration von Obidoxim ist anhand der hier untersuchten Konzentrationen schwierig zu beurteilen. Jedenfalls ist deutlich, dass die Empfindlichkeit von W Duo 3 gegenüber Obidoxim am $[^3H]OxoM$ -besetzten Rezeptor nicht geringer ist als am $[^3H]NMS$ -besetzten Rezeptor.

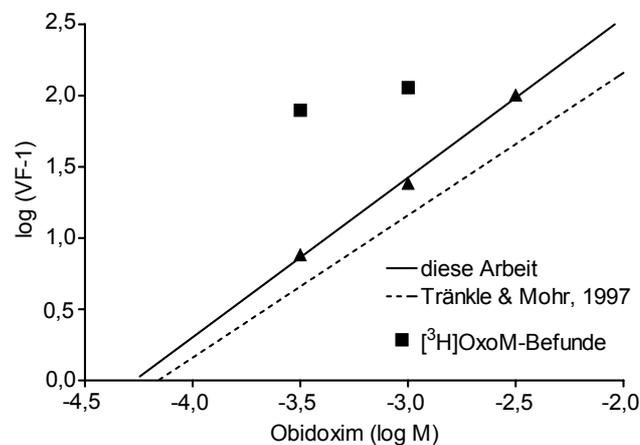


Abbildung 39: Vergleich der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde für die Wechselwirkung des Modulator W Duo 3 mit Obidoxim am $[^3H]NMS$ -besetzten und am $[^3H]OxoM$ -besetzten Rezeptor mit den Befunden von Tränkle und Mohr (1997) anhand der Schild-Auftragung.

Ordinate: Logarithmus des Verschiebungsfaktors -1 .

Abszisse: Logarithmus der Obidoxim-Konzentration.

4 DISKUSSION

4.1 Erörterung der Befunde aus den Radioligand-Bindungsstudien

4.1.1 Bindungsverhalten des Agonisten [³H]OxoM

Agonist-Bindung unter Kontrollbedingungen

Die Agonist-Bindung wurde mittels homologer und heterologer Kompetitions-Experimente charakterisiert. Die in homologen Kompetitions-Experimenten ermittelte Gleichgewichts-Dissoziationskonstante als Maß für die Affinität des Agonisten zu seiner Bindungsstelle betrug unter Na,K,P_i-Bedingungen im Mittel 0,8nM und unter Mg,P_i,Tris-Bedingungen 2,8nM. Die Affinität des Antagonisten [³H]NMS änderte sich beim Wechsel des Puffers nicht signifikant. Für beide Radioliganden konnte eine einheitliche Rezeptorpopulation festgestellt werden. Die Anzahl der Bindungsstellen war für den Agonisten jedoch um den Faktor 3 bis 4 kleiner als für den Antagonisten. Diese Beobachtung, wie auch die für den Mg,P_i,Tris-Puffer erhobenen Werte entsprechen den Befunden von Maaß (1995). Die geringere Anzahl der durch den Agonisten [³H]OxoM erkannten Bindungsstellen wird auf das Vorhandensein hoch- und niederaffin-bindender Rezeptoren zurückgeführt (Potter et al., 1991), von denen der tritiierte Agonist nur die hochaffinen in messbarer Weise besetzt.

Mittels heterologer Kompetitions-Experimente sollten diese mit unterschiedlicher Affinität bindenden Rezeptoren näher charakterisiert werden. Die Rezeptoren wurden mit [³H]NMS markiert und steigenden Konzentrationen OxoM ausgesetzt. Es wurden jeweils zwei Inhibitionskonstanten ermittelt: $K_{i, \text{hochaffin}}$ und $K_{i, \text{niederaffin}}$. Für die Mg,P_i,Tris-Bedingung ergaben $K_{i, \text{hochaffin}} \sim 41\text{nM}$ und $K_{i, \text{niederaffin}} \sim 1500\text{nM}$, für die Na,K,P_i-Bedingung: $K_{i, \text{hochaffin}} \sim 43\text{nM}$ und $K_{i, \text{niederaffin}} \sim 2700\text{nM}$. Die im Mg,P_i,Tris-Puffer erhobenen Befunde entsprechen denen von Maaß (1995), wie auch die Beobachtung, dass $K_{i, \text{hochaffin}}$ nicht dem aus homologen Kompetitions-Experimenten erhaltenen K_D -Wert der OxoM-Bindung entspricht, sondern größer ist. Wie bei Maaß ausführlich beschrieben, lässt sich dies anhand des Modells von Lefkowitz und Mitarbeitern (1993) erklären: Man nimmt an, dass im Gleichgewicht zwei verschiedene Rezeptorzustände vorliegen, nämlich ein aktiver (R*) und ein inaktiver (R). Die Affinität eines Agonisten zum aktiven Rezeptor ist vermutlich viel größer als zum inaktiven, während ein Antagonist mit negativer intrinsischer Aktivität („inverser Agonist“) bevorzugt an den inaktiven Rezeptor

bindet. Die Markierung der Rezeptoren mittels eines Agonisten verschiebt demnach das Gleichgewicht in Richtung R^* , während der inverse Agonist das Gleichgewicht in Richtung R verlagert. Daher ist die Gleichgewichtslage $R:R^*$ bei homologen (Markierung durch den Agonisten, $R^*>R$) und heterologen (Markierung durch den inversen Agonisten, $R>R^*$) Kompetitions-Experimenten nicht gleich. Entsprechend wird die „apparente“ Gleichgewichts-Dissoziationskonstante $K_{A,App}$ in unterschiedlichem Ausmaß von K_A^* oder K_A bestimmt.

Die Bestimmung von $K_{i,hochoffin}$ und $K_{i,niederaffin}$ zeigte nur für letztere einen signifikanten, aber geringen Unterschied zwischen den beiden Pufferbedingungen. Dies könnte ebenfalls auf die Markierung der Rezeptoren mit [3H]NMS und der damit verbundenen Prägung der Messwerte zurückzuführen sein. Die mittels homologer Kompetitionen bestimmten K_D -Werte zeigten für [3H]NMS ebenfalls keine signifikante Pufferabhängigkeit, während für den pK_D -Wert von [3H]OxoM eine signifikante Änderung um etwa den Faktor 3 beobachtet wurde.

Pufferabhängigkeit der Affinität von [3H]OxoM und der allosterischer Modulatoren

Erste Beobachtungen von Maaß (1995) deuteten auf eine größere Zahl spezifischer [3H]OxoM-Bindungsstellen unter Na,K,P_i-Bedingungen hin. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Affinität von [3H]OxoM zunahm, während die Zahl der Bindungsstellen unbeeinflusst blieb. Die Effekte diverser allosterischer Modulatoren wurden von Tränkle et al. (1996) unter verschiedenen Inkubationsbedingungen untersucht. Sämtliche Testsubstanzen zeigten im Na,K,P_i-Puffer eine stärker verzögernde Wirkung auf die Dissoziation von [3H]NMS als im Mg,P_i,Tris-Puffer. In der vorliegenden Arbeit ergab sich, dass die Affinität des Prototyp-Modulators W84 auch zum [3H]OxoM-besetzten M₂-Rezeptor durch den Wechsel zum Na,K,P_i-Puffer zunahm. Diese Erhöhung der Affinität schuf eine gute Voraussetzung für die Untersuchung verkürzter Derivate des W84 mit geringerer Wirksamkeit zur Erhebung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen (siehe 4.1.4).

Pufferabhängigkeit der Dissoziationskinetik von [3H]OxoM

Maaß (1995) beschrieb für die Mg,P_i,Tris-Bedingung, dass die Dissoziation des Agonisten [3H]OxoM unter Kontrollbedingungen biphasisch verläuft. Die Biphasizität blieb auch in Gegenwart steigender Konzentrationen der Modulatoren W84 und WDuo 3 erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden auch im Na,K,P_i-Puffer biphasische Dissoziationsverläufe gefunden. Sie traten in den verschiedenen Versuchsserien unterschiedlich häufig auf. So wurden in den Versuchen mit den Modulatoren vom Alkan-bis-ammonium-Typ monophasische Dissoziationsverläufe beobachtet. In anderen Serien waren biphasische Verläufe die Regel. Hier war die schnelle Phase sehr rasch und von der Anwesenheit allosterischer Modulatoren unbeeinflusst.

Die Bedeutung des schnellen Kompartiments der [³H]OxoM-Dissoziation ist unklar. Da die Zerfallsgeschwindigkeit dieser Komplexe außerordentlich hoch war, kam den Werten, die vor dem Start der Dissoziationsmessung zum Zeitpunkt t=0sec und zum ersten Messpunkt danach bei t=30sec erhoben wurden, eine sehr hohe Bedeutung für die ermittelte Halbwertszeit der schnellen Phase zu. Der Wert zum Zeitpunkt t=0 wird unter leicht veränderten Konzentrationsbedingungen ermittelt, da die Testsubstanz und Atropin noch nicht zugegeben sind. Dieser „Konzentrationsfehler“ wurde bei der Auswertung durch einen Verdünnungsfaktor korrigiert.

Wird bei der Kurvenanpassung an die Dissoziationsdaten der Wert bei t=0 nicht als Ausgangswert festgesetzt, ergibt sich „zwanglos“ eine monophasische Dissoziationskurve. Wird der Effekt der allosterischen Modulatoren so ausgewertet, fallen die Konzentrations-Effekt-Kurven nicht verschieden von denjenigen aus, die bei der biphasischen Analyse mit Betrachtung der 2. Kompartimente resultieren.

4.1.2 Bindungsverhalten des allosterischen Modulators Gallamin

Gallamin ist einer der am meisten untersuchten allosterischen Modulatoren an muskarinischen Rezeptoren. Die Substanz wurde zur Etablierung der ersten Modelle zur Beschreibung allosterischer Phänomene (Stockton, 1983) ebenso herangezogen, wie zur Validierung des Kooperativitätsmodells mittels des radioaktiv markierten allosterischen Liganden [³H]DMW durch Tränkle et al. (1999). Gallamin wurde ferner vielfach als Prototyp-Modulator für die Suche nach den für die Bindung der allosterischen Modulatoren entscheidenden Epitopen des Rezeptorproteins eingesetzt. Insbesondere ein Cluster negativ geladener Aminosäuren in der 2. extrazellulären Schleife, die sogenannte „EDGE-Sequenz“, sowie ein Asparagin-Rest am Ende der 3. extrazellulären Schleife (M₂⁴¹⁹ Asparagin), wiesen eine große Bedeutung für die Affinität des Modulators zum M₂-Rezeptor auf (Leppik et al., 1994; Gnagey et al., 1999).

Die Dissoziation des Agonisten [^3H]OxoM wurde durch gleiche Konzentrationen von Gallamin halbmaximal verzögert, wie die des Antagonisten [^3H]NMS. Die maximale Dissoziationsverzögerung war nicht signifikant verschieden. Die allosterische Bindungsstelle scheint für Gallamin am Agonist- wie am Antagonist-besetzten Rezeptor gleichermaßen zugänglich zu sein. Die Gleichgewichtsbindung beider Radioliganden konnte vollständig gehemmt werden, daher ist die Hemmung der Assoziation beider Radioliganden durch Gallamin vermutlich deutlich stärker als die Hemmung der Dissoziation.

4.1.3 Bindungsverhalten des allosterischen Modulators Obidoxim

Effekte von Obidoxim am Ligand-besetzten Rezeptor

Obidoxim ist ein Bispyridinium-Derivat, das als Antidot bei Vergiftungen mit Organophosphat-Verbindungen eingesetzt werden kann. Allosterische Effekte der Substanz konnten sowohl am isolierten, schlagenden Herzvorhof (Jepsen et al., 1988), als auch durch Radioligand-Bindungsstudien gezeigt werden (Ellis und Seidenberg, 1992; Gnagey und Ellis, 1996; Tränkle et al., 1996; Tränkle und Mohr, 1997). Obidoxim wird auf Grund der von Ellis und Mitarbeitern gezeigten kompetitiven Interaktion mit dem Modulator Gallamin an [^3H]NMS-besetzten muskarinischen Rezeptoren und seines gegenüber Gallamin schwächeren Eigeneffektes vielfach in Antagonismus-Untersuchungen eingesetzt (siehe 4.1.6).

Tränkle und Mitarbeiter (1996) fanden für die Dissoziation des Antagonisten [^3H]NMS in Gegenwart von Obidoxim einen $\text{pEC}_{0,5\text{Diss}}$ -Wert von 4,38, von diesem unterscheidet sich der hier gefundene Wert für pIC_{50} von 4,21 nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$). Die Auswertung mittels des Modells für zwei Bindungsstellen ergab ein hochaffines Kompartiment von $29 \pm 2\%$ mit einem Wendepunkt bei $0,6\mu\text{M}$ ($\text{pIC}_{50(\text{h})}$ $6,25 \pm 0,11$) und ein niederaffines Kompartiment mit einem Wendepunkt bei $75\mu\text{M}$ ($\text{pIC}_{50(\text{n})}$ $4,12 \pm 0,04$). Ebenso berichteten Tränkle und Mohr (1997) sowie Schulz (1998), dass diese Konzentrations-Effekt-Beziehung unter Verwendung eines Zwei-Bindungsstellen-Modells signifikant besser beschrieben werden konnte. Die Affinität des Modulators Obidoxim für das hochaffine Kompartiment betrug dort $\text{pIC}_{50(\text{h})}=4,64$ bzw. $5,52$ und für das niederaffine Kompartiment $\text{pIC}_{50(\text{n})}=3,02$ bzw. $3,93$. Untersuchungen von Ellis und Seidenberg (1992) legten nur eine Bindungsstelle für Obidoxim nahe, jedoch wurde in diesen Experimenten als niedrigste Konzentration $10\mu\text{M}$ des

Modulators eingesetzt, so dass die hochaffine Bindungsstelle nicht als solche erkannt werden konnte.

Die Affinität von Obidoxim zum [³H]OxoM-besetzten Rezeptor ($pEC_{0,5,Diss}$) entspricht der zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor (pIC_{50}). Daher wird vermutet, dass die von Obidoxim besetzte Bindungsstelle am Agonist-besetzten Rezeptor identisch ist mit der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“, wie sie für den [³H]NMS-besetzten Rezeptor beschrieben worden ist (Ellis und Seidenberg, 1992).

Effekte von Obidoxim am freien Rezeptor

Die Interaktion von Obidoxim mit dem freien Rezeptor zeigte in den Untersuchungen mit [³H]NMS ein komplexes Bild. Im Effektmaximum hob Obidoxim die [³H]NMS-Bindung auf, selbst in Gegenwart der 10fachen Radioligand-Konzentration konnte dessen Bindung vollständig unterbunden werden. Die Datenpunkte konnten signifikant besser durch ein Modell für zwei Bindungsstellen beschrieben werden.

Die Biphasizität des Hemmeffektes auf die Gleichgewichtsbindung des Antagonisten wird vermutlich durch eine biphasische Hemmung der Assoziation hervorgerufen; die Biphasizität der Verzögerung der Dissoziation erfolgte erst bei höheren Konzentrationen des Modulators und war auch nur submaximal (maximale Verzögerung um Faktor 3). Eine Erklärung für dieses Phänomen wäre das Vorliegen zweier Obidoxim-Bindungsstellen am Rezeptorprotein, was bereits von Tränkle und Mohr (1997) als Hypothese formuliert wurde. Die Autoren vermuten ferner, dass die hochaffine Obidoxim-Bindungsstelle am [³H]NMS-besetzten Rezeptor der allosterischen Bindungsstelle entspricht, mit der die Modulatoren W84, WDuo 3 und Gallamin interagieren. Denn die Affinität von Obidoxim zu dieser Bindungsstelle liegt im gleichen Konzentrationsbereich, wie die pA_2 -Werte für die antagonistische Wirkung von Obidoxim gegenüber den genannten Modulatoren. Demgegenüber entspricht die Affinität von Obidoxim zur niederaffinen Bindungsstelle am [³H]NMS-besetzten Rezeptor in etwa dem pA_2 -Wert von Obidoxim gegenüber Duo 3, für das eine nicht-kompetitive Interaktion mit Obidoxim gezeigt werden konnte.

Da die Affinität von Obidoxim und Gallamin zum Rezeptorprotein am [³H]OxoM- und am [³H]NMS-besetzten Rezeptor gleich war, scheint sich die allosterische Bindungsstelle für diese Modulatoren am Agonist- und Antagonist-besetzten Rezeptor gleichartig darzustellen. Gnagey und Ellis (1996) berichteten ebenfalls, dass keine signifikanten Unterschiede für die Affinität von Obidoxim und von Gallamin zum [³H]Acetylcholin-

oder [³H]NMS-besetzten Rezeptor festzustellen seien. Darüber hinaus wurde dort ebenfalls eine unvollständige Hemmung der Agonist-Dissoziation durch die beiden Testsubstanzen beobachtet. Ein Grund für diese Eigenschaft könnte ihre verhältnismäßig geringe Größe sein. Auch das stark verkürzte W84-Derivat SH28, vermag bezüglich der Bindungsaffinität zwischen Agonist- und Antagonist-besetztem Rezeptor nicht zu unterscheiden (siehe 4.1.4).

4.1.4 Bindungsverhalten der allosterischen Modulatoren vom Alkan-bis-ammonium-Typ

Kostenis und Mitarbeiter konnten für den [³H]NMS-besetzten Rezeptor unter Mg, P_i, Tris-Bedingungen zeigen, dass für die dissoziationsverzögernde Wirkung des Modulators W84 die gesamte Länge des Moleküls erforderlich ist. Schon das einseitige Fehlen des Phthalimid-Rings führte zu einem Affinitäts-Verlust von einer Zehnerpotenz (Kostenis et al., 1994). Aus der Reihe der von Kostenis untersuchten Derivate wurden zwei strukturell besonders markante Vertreter ausgewählt, um die Struktur-Wirkungs-Beziehungen am [³H]OxoM-besetzten Rezeptor zu prüfen. Dies ist erstens das Derivat SH30, das einseitig um den Phthalimid-Ring verkürzt wurde, und zweitens das Derivat SH28, dessen Verkürzung auch eine quartäre Stickstoff-Gruppe einschloss. Ferner wurde die Substanz TD 2 untersucht, weil diese Substanz, bei der ein quartärer Stickstoff von W84 durch ein Siliziumatom ersetzt ist, eine deutlich positiv-kooperative Wechselwirkung mit dem Antagonisten [³H]NMS zeigte (Daiss et al., 2002).

Effekte von W84, SH30 und SH28 am Ligand-besetzten Rezeptor

Die Dissoziation des Antagonisten [³H]NMS wurde durch alle drei Modulatoren vollständig gehemmt. Die Affinität zum Ligand-besetzten Rezeptor nahm bei Verkürzung um den Phthalimid-Ring um den Faktor 10, bei weiterer Verkürzung nochmals um den Faktor 50 ab.

Die am Antagonist-besetzten Rezeptor erhobenen Ergebnisse bestätigen im wesentlichen die Befunde von Kostenis (1994). Allerdings führte die Veränderung des Puffers und der Temperatur (Kostenis: Mg/ P_i/ Tris-Puffer, 37°C, diese Arbeit: Na/ K/ P_i-Puffer, 23°C) zu einer stärkeren Abnahme der Affinität bei Fehlen der zweiten quartären Gruppe. Die Abnahme der Affinität von SH30 zu SH28 erreichte bei Kostenis nur Faktor 5. Zusammengefasst wird deutlich, dass W84 am Antagonist-besetzten Rezeptor nur als vollständiges Molekül eine hohe Affinität aufweist. Jede Verkürzung des Moleküls

führt zu einem Affinitätsverlust, der besonders ausgeprägt erscheint, wenn die Verkürzung eine quartäre Gruppe einschließt.

Die Affinität von W84 zum [³H]OxoM-besetzten Rezeptor war etwa 100fach kleiner als zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor. Die Verkürzung der Substanzen führte am Agonist-besetzten Rezeptor jedoch nicht zu einer weiteren Abnahme der Affinität. Weder die Verkürzung um den Phthalimid-Ring, noch die starke Verkürzung, die eine positiv geladene Struktur einschloss, führten zu einem Verlust der beeinflussten die Affinität zum Agonist-besetzten Rezeptor. Für die Affinität von allosterischen Modulatoren diesen Typs zum Agonist-besetzten Rezeptor sind offenbar andere Strukturelemente verantwortlich, als zum Antagonist-besetzten Rezeptor. Die am stärksten verkürzte Substanz stellt etwa die Hälfte der Ausgangsverbindung dar. Offensichtlich beinhaltet dieses „halbe W84“ alle für die Bindung an den Agonist-besetzten Rezeptor erforderlichen Strukturmerkmale. Keine der Substanzen vermochte die Dissoziation des Agonisten [³H]OxoM vollständig zu hemmen. Die Modulatoren W84 und SH30 vermochten eine maximale Verzögerung etwa um den Faktor 5 zu erreichen, während SH28 die Dissoziation des Agonisten maximal um den Faktor zwei verzögerte.

Der große Unterschied der Affinität der Modulatoren zum Agonist- oder Antagonist-besetzten Rezeptor (W84: Faktor 100) geht bei Verkürzung verloren. Die Affinität des Modulators SH28 zum Agonist- und Antagonist-besetzten Rezeptor war nicht signifikant verschieden (t-Test mit Welch-Korrektur, $p > 0,05$). Mit den „kleinen“ Modulatoren Gallamin und Obidoxim (siehe 4.1.2 und 4.1.3) konnten ebenfalls keine Unterschiede in der Affinität zum Agonist- oder Antagonist-besetzten Rezeptor detektiert werden.

Effekte von W84, SH30 und SH28 am freien Rezeptor

Die Untersuchung der Effekte auf die Gleichgewichtsbindung der Radioliganden ergab für Experimente mit dem Agonisten und dem Antagonisten jeweils nicht signifikant verschiedene pK_A -Werte. Die Affinität der Modulatoren zum freien Rezeptor war demnach nicht abhängig vom Radioliganden, was den gegenwärtigen Modellvorstellungen entspricht. Die Beobachtung steht ferner im Einklang mit Befunden von Ataie (2000), die dies für eine Reihe verkürzter W84-Derivate in Untersuchungen mit den beiden Antagonisten [³H]NMS und [³H]AFDX-384 zeigen konnte.

Die Gleichgewichtsbindung von [³H]OxoM wurde im Gegensatz zu der von [³H]NMS von allen drei Modulatoren vollständig gehemmt. Die Affinität zum freien Rezeptor (pK_A) war im Falle von W84 und SH30 um den Faktor 50 größer als zum [³H]OxoM-besetzten

Rezeptor ($pEC_{0,5Diss}$), im Falle des SH28 noch um den Faktor 5. Die Hemmung der Assoziation war daher in allen Fällen größer als die Hemmung der Dissoziation.

Die Affinität der Modulatoren zum [3H]NMS-besetzten Rezeptor war ebenfalls kleiner als zum freien Rezeptor. Da also auch hier die Assoziation stärker gehemmt wurde als die Dissoziation, resultierte ebenfalls eine negativ kooperative Interaktion. Das Effektmaximum der Bindungshemmung nahm bei Verkürzung der Substanzen zu.

Die Affinität der Substanzen zum freien Rezeptor nahm mit der Verkürzung ab. Die Verkürzung um den Phthalimidomethyl-Rest (SH30) bewirkte einen Affinitätsverlust um den Faktor 3, während die Verkürzung zu SH28, die einseitig eine Ammoniumgruppe einschloss, eine zusätzliche Abnahme der Affinität um den Faktor 9 bewirkte. Die Bedeutung der beiden Strukturelemente (Phthalimidomethyl-Rest bzw. Ammonium-Gruppe) scheint demnach für die Affinität zum freien Rezeptor und zum [3H]NMS-besetzten Rezeptor ähnlich zu sein, während am [3H]OxoM-besetzten Rezeptor keine Abhängigkeit der Affinität von diesen Strukturelementen gezeigt werden konnte.

Effekte von TD 2 am freien und Ligand-besetzten Rezeptor

Die einseitige Einführung eines Silizium-Atoms anstelle eines quartären Stickstoffs in die Muttersubstanz W84 führte zu positiv-kooperativem Verhalten mit dem Antagonisten [3H]NMS (Daiss et al., 2002). Veränderungen der Länge der Zwischenkette sowie das einseitige Austauschen des Phthalimid-Restes gegen Naphthalimid verstärkten den Effekt (Duda-Johner et al., 2002). Diese Substanz lässt sich daher, was die Interaktion mit dem Antagonisten betrifft, als eine neue Leitstruktur positiv-kooperativer Substanzen auffassen.

Die Dissoziation von [3H]NMS konnte durch relativ niedrige Konzentrationen des Modulators vollständig gehemmt werden. Hingegen konnte keine Verzögerung der Dissoziation von [3H]OxoM beobachtet werden. Auch die Testung von TD 2 als möglicher Antagonist gegenüber der Verzögerung der Agonist-Dissoziation durch den Modulator WDuo 3 ergab keine Hinweise auf eine Interaktion von TD 2 mit dem [3H]OxoM-besetzten Rezeptor.

Die Gleichgewichtsbindung von [3H]OxoM wurde von TD 2 vollständig gehemmt. Die aus dieser Interaktion abgeleitete Affinität von TD 2 zum freien Rezeptor entsprach dem aus Untersuchungen mit dem Antagonisten ermittelten Wert. Da die Dissoziation des Agonisten nicht verzögert wurde, könnte der Effekt auf die Gleichgewichtsbindung des Agonisten eine rein kompetitive Interaktion darstellen. Die Interaktion mit dem

Antagonisten war positiv-kooperativ. Die hier unter Na,K,P_i-Bedingungen erhobenen Werte für die Affinität von TD 2 zum [³H]NMS-besetzten und zum freien M₂-Rezeptor sind nicht signifikant verschieden von den Werten, die Daiss et al. im Mg,P_i,Tris-Puffer erhoben. Die Pufferabhängigkeit der Effekte von TD 2 ist im Vergleich zu den meisten anderen allosterischen Modulatoren (Tränkle et al., 1996) somit außergewöhnlich gering (Faktor: 1,6 für pK_A, 2,4 für pEC_{0,5,Dis}) oder überhaupt nicht vorhanden. Eine geringe Pufferabhängigkeit ist auch für einige Modulatoren beschrieben worden, für die ein andersartiger Bindungsmodus postuliert wird (Tränkle und Mohr, 1997). So liegt dem Effekt von TD 2 möglicherweise ein anderer Bindungsmodus oder eine Interaktion mit einer anderen Bindungsstelle zugrunde.

4.1.5 Bindungsverhalten der allosterischen Modulatoren vom Bispyridinium-Typ Effekte von WDuo 3 am freien und am Ligand-besetzten Rezeptor

Am [³H]NMS-besetzten Rezeptor konnte für WDuo 3 sowohl im Na,K,P_i-Puffer als auch im Mg,P_i,Tris-Puffer eine höhere Affinität gezeigt werden als für W84 (Tränkle et al., 1996).

Die Interaktion des Modulators mit dem Agonisten [³H]OxoM wurde bereits im Mg,P_i,Tris-Puffer untersucht (Maaß, 1995). Es zeigte sich eine für diese Untersuchungsbedingung hohe Affinität zum [³H]OxoM-besetzten Rezeptor (pEC_{0,5Dis} = 5,62), wobei die Dissoziation des Agonisten vollständig gehemmt werden konnte. Die Steigung der Dosis-Wirkungs-Kurve betrug n_H = -0,6.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Werte zur Interaktion von WDuo 3 mit dem Antagonisten [³H]NMS stimmen mit den Befunden von Tränkle et al. (1996), Schröter et al. (2000) und Gilsbach (2001) überein.

Unter Na,K,P_i-Bedingungen konnte für WDuo 3 ebenfalls eine hohe Affinität zum [³H]OxoM-besetzten Rezeptor festgestellt werden (pEC_{0,5Dis} = 7,50). Die Untersuchungen zur Affinität von WDuo 3 zum freien Rezeptor mit Hilfe von [³H]OxoM zeigten eine auffällig geringe Affinität. Es konnte gezeigt werden, dass dies auf eine Zersetzung der Substanz während der notwendigen Inkubationszeit zurückzuführen war. Die Affinität von WDuo 3 zum freien Rezeptor konnte aber durch Assoziationsexperimente gut bestimmt werden.

Die Bewertung der Interaktion zwischen orthosterischem Radioliganden und allosterischem Modulator WDuo 3 gemäß dem ternären Modell allosterischer Interaktion (Stockton et al., 1983, Ehlert 1988) führte in beiden Fällen zu einem schlüssigen Ergebnis:

- WDuo 3 hemmt die Assoziation und die Dissoziation von [³H]NMS in gleichen Konzentrationen. Daher liegt von eine neutral-kooperativen Interaktion vor.
- Die Interaktion des Agonisten [³H]OxoM mit WDuo 3 ist negativ-kooperativ, da die Assoziation um den Faktor 4 stärker gehemmt wird als die Dissoziation.

Effekte von Duo 3 am freien und Ligand-besetzten Rezeptor

Bisherige Befunde zur Hemmung der [³H]NMS-Dissoziation durch Duo 3 weisen auf eine eher schwache allosterische Wirksamkeit der Substanz hin. Dabei wurde eine auffällige Steilheit der Konzentrations-Effekt-Beziehung beobachtet (Tränkle et al., 1996), die von Schröter et al. (2000) ebenfalls für den Effekt der Substanz auf die Assoziation von [³H]NMS beschrieben wurde. Die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit ist dabei weit weniger abhängig vom verwendeten Puffersystem als bei der strukturell verwandten Substanz WDuo 3 (Tränkle et al., 1996). Ferner ist von Tränkle und Mohr (1997) beschrieben worden, dass sich Duo 3 am [³H]NMS-besetzten Rezeptor gegenüber dem allosterischen Antagonisten Obidoxim nicht kompetitiv verhält, was auf die Bindung von Duo 3 an eine andere Bindungsstelle als der Obidoxim-Bindungsstelle hindeutet. Am [³H]NMS-besetzten Rezeptor sind bereits Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen von Bispyridinium-Verbindungen durchgeführt worden (Botero Cid et al., 1994). Diese zeigten ein andersartiges Muster der für die Affinität bedeutenden Strukturmerkmale als bei den Alkan-bis-ammonium-Derivaten, was auf einen anderen Anlagerungsmodus am Rezeptor-Protein hindeutet. Die Hemmung der [³H]OxoM-Dissoziation durch Duo 3 erfolgte im gleichen Konzentrationsbereich wie die Hemmung der [³H]NMS-Dissoziation, allerdings war die maximale Verzögerung der [³H]OxoM-Dissoziation wesentlich geringer. Das Steilheitsmaß der Konzentrations-Effekt-Beziehung ließ auch im Falle des Agonisten [³H]OxoM eine Tendenz zu einer höheren Steilheit erkennen ($n_H = -1,49$). Die für die Affinität von Duo 3 zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor wesentlichen Strukturen des Rezeptorproteins scheinen am [³H]OxoM-besetzten Rezeptor in gleicher Weise vorhanden und zugänglich zu sein.

4.1.6 Bindungsverhalten der allosterischen Modulatoren in Antagonismus-Untersuchungen

Die Untersuchung der Effekte strukturell verschiedenartiger Modulatoren am [³H]OxoM-besetzten Rezeptor zeigt, dass die stärkste Verzögerung der Dissoziation des Agonisten durch die Substanz WDuo 3 bewirkt werden konnte. Sowohl die Affinität der Testsubstanz zum Agonist-besetzten Rezeptor, als auch das Ausmaß der Dissoziationsverzögerung war größer als bei den anderen untersuchten Substanzen. Daher wurde dieser Modulator zu weitergehenden Untersuchungen am Agonist-besetzten Rezeptor ausgewählt. Es wurde geprüft, ob am Agonist-besetzten Rezeptor eine Obidoxim-empfindliche Bindungsstelle vorhanden ist, wie dies für den [³H]NMS-besetzten Rezeptor beschrieben wurde: Ellis und Seidenberg (1992) konnten für den Acetylcholinesterase-Hemmstoff Obidoxim nachweisen, dass er die allosterische Wirkung des Prototyp-Modulators Gallamin am [³H]NMS-besetzten Rezeptor zu hemmen vermag. Diese Hemmung konnte durch ein kompetitives Modell beschrieben werden. Auf diese Befunde gründet sich die Vorstellung einer gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle für beide Modulatoren an muskarinischen Rezeptoren, die durch weitere Befunde gestützt wurde (Waelbroeck, 1994; Proška und Tuček, 1995). Da die maximale dissoziationsverzögernde Wirkung des Obidoxims gegenüber orthosterischen Antagonisten schwächer ist als die des Gallamins (Tränkle et al., 1996), findet bevorzugt Obidoxim Verwendung als „Werkzeug“ bei Untersuchungen zur Interaktion verschiedener allosterischer Modulatoren an der gemeinsamen Bindungsstelle (Tränkle und Mohr, 1997).

Die für den [³H]NMS-besetzten Rezeptor bekannten Befunde für die antagonistische Wirkung von Obidoxim gegenüber WDuo 3 (Tränkle und Mohr, 1997) konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die Art der Interaktion von WDuo 3 und Obidoxim war am [³H]NMS-besetzten Rezeptor kompetitiv.

Am [³H]OxoM-besetzten Rezeptor konnte ebenfalls eine dosisabhängige Verminderung des dissoziationsverzögernden Effektes von WDuo 3 durch Obidoxim gezeigt werden. Daher wird angenommen, dass WDuo 3 und Obidoxim auch am [³H]OxoM-besetzten Rezeptor zumindest teilweise über die gleiche Bindungsstelle interagieren.

4.2 Modellvorstellungen zur Interaktion zwischen Rezeptor, G-Protein, orthosterischem und allosterischem Modulator

Das in der Einleitung genannte „ternäre Modell“ (Stockton et al., 1983) gibt eine Möglichkeit zur vereinfachten Darstellung a) der Agonist-Bindung an verschiedene Konformationszustände G-Protein gekoppelter Rezeptoren und b) der Bildung ternärer Komplexe aus Rezeptor, orthosterischem und allosterischem Liganden (Abbildung 40). Mittels der von Ehlert (1988) erstellten Gleichung zu diesem Modell können experimentelle Daten direkt entsprechend analysiert werden.

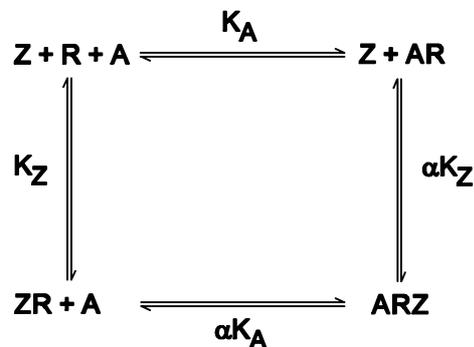


Abbildung 40: Ternäres Modell nach Stockton et al. (1983).

R steht für einen bestimmten Rezeptor, A gibt den orthosterischen Liganden an, Z steht für den allosterischen Modulator. K_A und K_Z sind die Affinitäts-Konstanten des jeweiligen Liganden. α ist der Kooperativitätsfaktor.

Die verschiedenen Komplexe stehen im Gleichgewicht miteinander. So kann im Wechselspiel zwischen Rezeptor, orthosterischem und allosterischem Liganden ein allosterischer Ligand die Bildung ternärer Komplexe (ARZ) fördern.

Neuere Befunde deuten darauf hin, dass ein Rezeptorprotein eine Vielzahl verschiedener Konformationen annehmen kann (Seifert et al., 1999; Watson, 2000).

Die Vorstellungen zur Bindungsart eines Liganden an einen bestimmten Rezeptorzustand sind unterschiedlich: es ist umstritten, ob der Ligand (z. B. Agonist) einen Rezeptorzustand unter vielen anderen bevorzugt bindet, also selektiert (Watson, 2000), oder ob durch die Bindung des Liganden ein bestimmter Rezeptorzustand induziert wird (Spalding et al., 1998; Waelbroeck, 2001 (b)). Möglicherweise sind beide Mechanismen nur als die Endpunkte eines Kontinuums von Interaktionsmöglichkeiten zu betrachten (Kenakin, 1995 a und b; Kenakin, 1996).

4.3 Schlussbetrachtung

Die hier erhobenen Befunde sollen mit Hilfe einer Modellvorstellung gedeutet werden. Dazu sollen vor allem die am [³H]OxoM- und [³H]NMS-besetzten Rezeptor erhobenen Befunde betrachtet werden.

Durch die Verwendung eines Agonisten und eines Antagonisten werden vermutlich zwei unterschiedliche Konformationszustände des Rezeptorproteins stabilisiert (Abbildung 41). Die Effekte der Modulatoren auf die Radioligand-Dissoziation resultieren somit aus der Interaktion mit verschiedenen Rezeptorkonformationen.

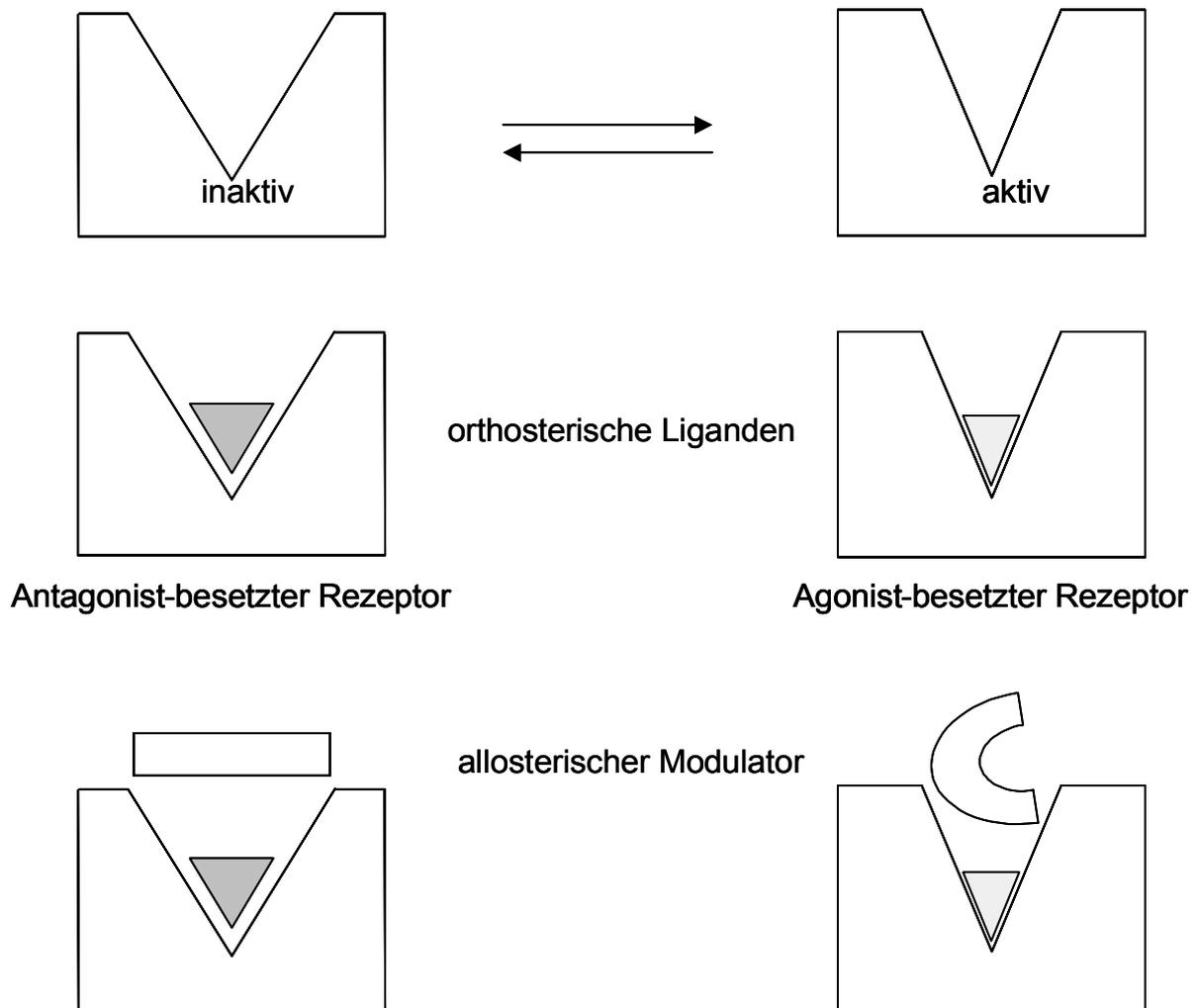


Abbildung 41: Modellvorstellung zur Stabilisierung verschiedener Rezeptor-Konformationen durch den orthosterischen Agonisten oder Antagonisten und der daraus folgenden Veränderung der allosterischen Bindungsstelle.

In Abbildung 42 sind die $pEC_{0,5,Disso}$ -Werte als Maß für die Affinität der Modulatoren zum [³H]OxoM- und [³H]NMS-besetzten Rezeptor sowie die pK_A -Werte als Maß für die Affinität zum freien Rezeptor dargestellt.

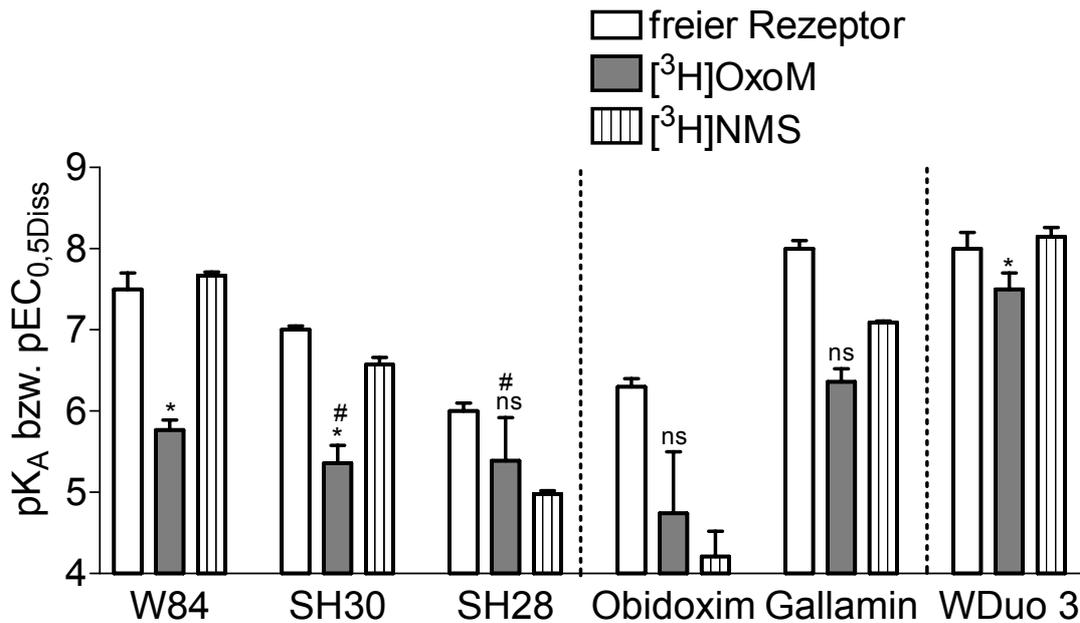


Abbildung 42: Gegenüberstellung der pK_A -Werte für die Affinität der Modulatoren zum freien Rezeptor sowie der $pEC_{0,5Diss}$ -Werte für die Affinität zum Agonist- und Antagonist-besetzten Rezeptor.

Abszisse: untersuchte Substanzen

Ordinate: pK_A -Werte bzw. $pEC_{0,5Diss}$ -Werte

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler.

*: Wert ist signifikant verschieden von dem für [³H]NMS bestimmten Wert (t-Test mit Welch-Korrektur, $p < 0,05$).

ns: Wert ist nicht signifikant verschieden von dem für [³H]NMS bestimmten Wert (t-Test, $p > 0,05$).

#: Wert ist nicht signifikant verschieden von dem mit W84 bestimmten Wert (t-Test, $p > 0,05$).

Für die Substanzen W84 und SH30 ergaben sich große Affinitäts-Unterschiede zwischen Agonist- und Antagonist-besetztem Rezeptor, wobei die Verkürzung des W84 nur die Affinität zum Antagonist-besetzten Rezeptor und zum freien Rezeptor beeinflusste. Dies setzt sich bei weiterer Verkürzung zu SH28 fort, während die Affinität zum Agonist-besetzten Rezeptor von der Verkürzung nicht beeinflusst wird. Die Affinität von SH28 zum Agonist- und Antagonist-besetzten Rezeptor ist nicht verschieden. Die, wie SH28 relativ kleinen Modulatoren Obidoxim und Gallamin wiesen ebenfalls keine signifikanten Affinitätsunterschiede zwischen Agonist- und Antagonist-besetztem Rezeptor auf, wobei Gallamin aber eine deutlich größere Affinität zu beiden Konformationen aufweist. Diese drei „kleinen“ Substanzen vermochten darüber hinaus die Antagonist-Dissoziation nicht vollständig zu hemmen. Im Gegensatz dazu war W Duo 3 in der Lage, die Dissoziation beider Liganden vollständig zu hemmen und an beiden Rezeptorkonformationen mit hoher Affinität zu binden. Der Affinitätsunterschied

von WDuo 3 zum [³H]OxoM- und [³H]NMS-besetzten Rezeptor betrug etwa Faktor 10 und war signifikant.

Die Befunde der Untersuchungen mit TD 2 und Duo 3 sind in Abbildung 41 nicht dargestellt, da die Substanzen TD 2 und Duo 3 wahrscheinlich einem andersartigen Bindungsmodus unterliegen (siehe S. 86 und S. 88).

Die „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ liegt wahrscheinlich im extrazellulären Bereich des Rezeptorproteins (Matsui et al., 1995; Buller et al., 2002). Tuček und Proška (1995) nehmen für die Wirkung der allosterischen Modulatoren eine sterische Hinderung der Dissoziation des orthosterischen Liganden an. Dies bedeutet, dass eine bestimmte Bindungsreihenfolge bei der Bildung ternärer Komplexe eingehalten werden müsste: zunächst muss der orthosterische Ligand in der Tiefe der Ligand-Bindungstasche binden, bevor der allosterische Modulator diese von extrazellulär verschließt.

In der vorliegenden Arbeit wurde für einige Modulatoren eine unvollständige Hemmung der Dissoziation des Antagonisten [³H]NMS und für fast alle eine unvollständige Hemmung der Dissoziation des Agonisten [³H]OxoM beobachtet. Dies kann bedeuten, dass der allosterische Modulator bei seiner Bindung oberhalb der orthosterischen Bindungsstelle eine „Lücke“ offen lässt, welche die Dissoziation des orthosterischen Liganden erlaubt. Basierend auf dieser Vorstellung sind die oben beschriebenen Befunde zum Maximaleffekt bezüglich der Hemmung der Dissoziation am Beispiel von W84 graphisch wie folgt interpretiert (Abbildung 43).

Dargestellt ist stark schematisch die Rezeptoraufsicht von der extrazellulären Seite. Für die Modulatoren W84 und WDuo 3 schlagen Holzgrabe und Mohr (1998) auf der Basis von „molecular modelling“-Studien eine S-förmige Anordnung vor. Die großräumige Überspannung der Rezeptoröffnung erklärt eine vollständige Unterdrückung der [³H]NMS-Dissoziation, während die Lage von W84 am [³H]OxoM-besetzten Rezeptor die Dissoziation des orthosterischen Liganden in bestimmtem Maße zulässt.

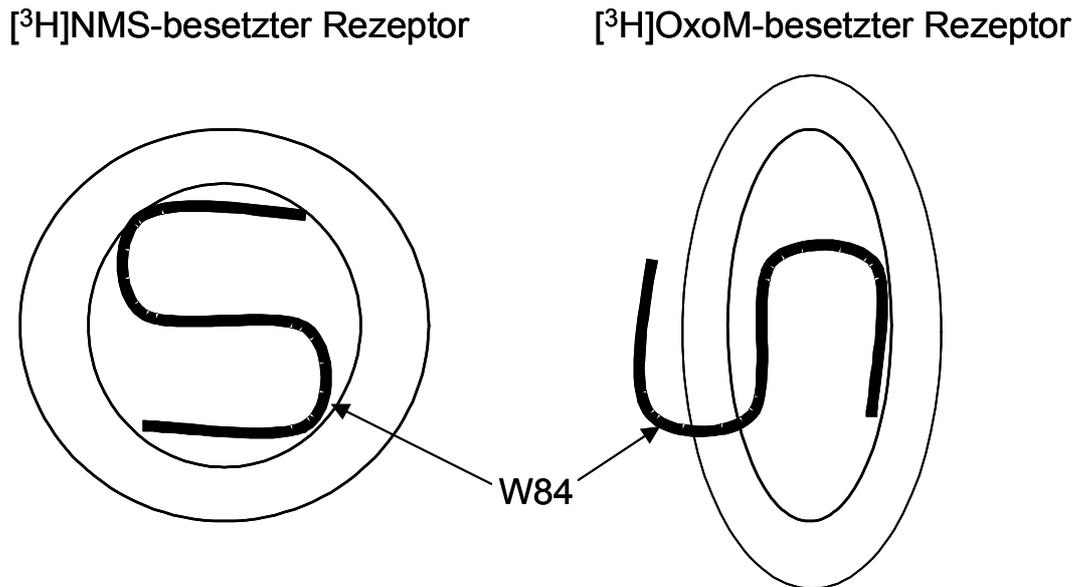


Abbildung 43: Modellvorstellung zur Bindung von W84 an den $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ - oder $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptor. Dargestellt ist die Aufsicht auf das Rezeptorprotein von der extrazellulären Seite.

Die gemeinsame Betrachtung dieser Befunde macht deutlich, dass am $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptor erhobene Struktur-Wirkungs-Beziehungen nicht grundsätzlich auf den $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ -besetzten Rezeptor übertragen werden können. Im Zusammenhang mit den Befunden aus Antagonismus-Untersuchungen (siehe 4.1.6) scheint das Konzept der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle jedoch auch für den $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ -besetzten Rezeptor zu gelten. Um die Anzahl und die Lage der bindungsrelevanten Epitope am $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ -besetzten Rezeptor verifizieren, könnten nun Untersuchungen mit Rezeptor-Mutanten hilfreich sein. Die hier dargestellten Befunde am $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ -besetzten Rezeptor sind allerdings nicht unmittelbar auf andere Agonisten übertragbar. Lanzafame und Mitarbeiter (1996) untersuchten den Einfluss des allosterischen Modulators $\text{C}_7/3'$ -pht auf die Wirkung verschiedener muskarinischer Agonisten am schlagenden Meerschweinchen-Herzvorhof und berichteten von signifikanten Unterschieden beispielsweise zwischen den Befunden mit Oxotremorin M und Acetylcholin.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren vom Subtyp M_2 weisen neben der orthosterischen Bindungsstelle, an die der physiologische Ligand Acetylcholin bindet, eine zweite in extrazellulären Domänen des Rezeptorproteins lokalisierte allosterische Bindungsstelle auf. Die Effekte, die Testsubstanzen über diese allosterische Bindungsstelle auf die Bindung des orthosterischen Antagonisten [^3H]N-Methylscopolamin ([^3H]NMS) ausüben, sind vielfach beschrieben. Mit Hilfe von Kombinationsexperimenten mit zwei allosterischen Modulatoren konnte für eine Reihe strukturverschiedener Substanzen eine Interaktion an ein und derselben Bindungsstelle gezeigt werden. Diese wurde als „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ bezeichnet. Erste Befunde zur Beeinflussbarkeit der Agonist-Bindung (z. B. [^3H]Oxotremorin M ([^3H]OxoM)) durch solche allosterische Modulatoren ließen es fraglich erscheinen, dass die „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ an Agonist-besetzten Rezeptoren noch zur Bindung der Modulatoren zur Verfügung steht.

In der vorliegenden Arbeit wurden die als Liganden der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ bekannten Modulatoren W84, Gallamin, Obidoxim und WDuo 3 eingesetzt. Für jede dieser Testsubstanzen wurde die Interaktion mit dem [^3H]OxoM-besetzten und dem [^3H]NMS-besetzten Rezeptor sowie mit dem freien Rezeptor betrachtet. Darüber hinaus wurden verkürzte Derivate des W84 als Sonden verwendet, um die Ausprägung der allosterischen Bindungsstelle am [^3H]OxoM-besetzten Rezeptor genauer zu erfassen. Alle Experimente wurden in einem Na,K, P_i -Puffer bei 23°C an M_2 -Rezeptoren in Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikeln durchgeführt.

Die hier mit [^3H]NMS erhobenen Beobachtungen entsprachen in allen Fällen den aus der Literatur bekannten Befunden. Die Affinität der Testsubstanzen zum freien Rezeptor war nicht abhängig vom im Versuchsansatz verwendeten Radioliganden und für alle untersuchten Substanzen mit Ausnahme von WDuo 3 immer größer als die Affinität zum Radioligand-besetzten Rezeptor. Der Vergleich der Haftneigung der Modulatoren zum [^3H]OxoM-besetzten oder [^3H]NMS-besetzten Rezeptor ergab immer eine geringere Affinität zum [^3H]OxoM-besetzten Rezeptor. Im Falle der Modulatoren Gallamin und Obidoxim waren die Unterschiede zwischen [^3H]OxoM-besetztem und [^3H]NMS-besetztem Rezeptor nicht signifikant. Die verkürzten Derivate des W84, die im ersten Fall einseitig um eine Phthalimid-Gruppe und im zweiten weiterhin um eine

Ammonium-Gruppe verkürzt wurden, zeigten ebenfalls eine geringere Affinität zum [³H]OxoM-besetzten Rezeptor als zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor. Der Affinitätsunterschied wurde um so kleiner, je stärker die Testsubstanz verkürzt war, da am [³H]NMS-besetzten Rezeptor deutliche Affinitätsverluste mit zunehmender Verkürzung auftraten, während durch die Verkürzung keine Abnahme der Affinität zum [³H]OxoM-besetzten Rezeptor bewirkt wurde.

Die größte Affinität zum [³H]OxoM-besetzten Rezeptor zeigte WDuo 3, daher wurde diese Substanz zur Durchführung von Kombinations-Untersuchungen mit Obidoxim ausgewählt. Durch diese Experimente sollte geprüft werden, ob WDuo 3 am [³H]OxoM-besetzten Rezeptor mit der „gemeinsamen, allosterischen Bindungsstelle“ interagiert. Es konnte eine Abschwächung des WDuo 3-Effektes durch Obidoxim sowohl am [³H]NMS-besetzten als auch am [³H]OxoM-besetzten Rezeptor beobachtet werden. Für den [³H]NMS-besetzten Rezeptor konnte dieser Effekt gemäß einer Analyse nach Arunlakshana und Schild als kompetitiver Antagonismus zwischen WDuo 3 und Obidoxim bewertet werden. Die Befunde am [³H]OxoM-besetzten Rezeptor zeigen, dass die Effekte von WDuo 3 auch hier Obidoxim-empfindlich sind.

Abschließend wurden die Interaktion der Modulatoren Duo 3 und TD 2 mit dem [³H]OxoM-besetzten Rezeptor untersucht. Duo 3 ist als atypischer, allosterischer Modulator am [³H]NMS-besetzten Rezeptor bekannt. Die Untersuchungsergebnisse am [³H]OxoM-besetzten Rezeptor waren schwierig zu deuten, zeigen aber ebenfalls ein atypisches Verhalten an. TD 2 ist ein Derivat des W84, das als neue Leitstruktur positiv kooperativer Modulatoren betrachtet wird. Diese Testsubstanz, deren quartärer Stickstoff einseitig durch ein Silizium-Atom ersetzt wurde, zeigte keine Effekte am [³H]OxoM-besetzten Rezeptor und beeinflusste die Gleichgewichtsbindung des [³H]OxoM in kompetitiver Weise.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Vorstellung einer „gemeinsamen, allosterischen Bindungsstelle“ auch für den [³H]OxoM-besetzten Rezeptor anwendbar ist. Allerdings zeigen die Befunde auch, dass Struktur-Wirkungs-Beziehungen allosterischer Modulatoren nicht vom [³H]NMS-besetzten auf den [³H]OxoM-besetzten Rezeptor übertragbar sind. Die Bindung des [³H]OxoM an das Rezeptorprotein führt offenbar zu einer Veränderung der Konformation der allosterischen Bindungsstelle.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Arunlakshana, O. und H.O. Schild:

Some quantitative uses of drug antagonists
Brit. J. Chemother. 14:48-58 (1959)

Ataie, A.:

Sondierung der Überlappung des Haftareals des M₂-Prävealenten Antagonisten AFDX 384 mit der allosterischen Bindungsstelle von M₂-Acetylcholinrezeptoren unter Verwendung einseitig verkürzter Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen.
Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn (2000)

Barlow, R. und J.F. Blake:

Hill coefficients and the logistic equation.
Trends in Pharmacol. Sci. 10:440-441 (1989)

Bennett, J.P. und H.I. Yamamura:

Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding methods.
Yamamura, H.I. editor: Neurotransmitter Receptor Binding; 2nd.; 61-89; Raven Press (1985)

Botero Cid, M.H., U. Holzgrabe, E. Kostenis, K. Mohr und C. Tränkle:

Search for the pharmacophore of bispyridinium-typ allosteric modulators of muscarinic receptors.
J. Med. Chem. 10: 1439-1445 (1994)

Cheng, Y.C. und W.H. Prusoff:

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

Daiss, J.O., S. Duda-Johner, C. Burschka, U. Holzgrabe, K. Mohr und R. Tacke:

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 (2002)

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

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

Duda-Johner, S., J. Daiss, U. Holzgrabe, R. Tacke und K. Mohr:

Stronger allosteric increase of Ligand binding at muscarinic M₂ receptors by introduction of naphthalimido moieties in silicon-containing W84-type agents.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 365: R25 (poster 86) (2002)

Ehlert, F.J.:

Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods.

Mol.Pharmacol. 33: 187-194 (1988)

Ellis, J., J. Huyler und M.R. Brann

Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes.

Biochem. Pharmacol. 42:1927-1932 (1991)

Ellis, J. und M. Seidenberg:

Two allosteric modulators interact at a common site on cardiac muscarinic receptors.

Mol.Pharmacol. 42: 638-641 (1992)

Ellis, J.:

Allosteric binding sites on muscarinic receptors.

Drug Dev. Res. 40:193-204 (1997)

Gilsbach, R., M. Großmüller, V. Alptüzün, E. Erciyas, C. Tränkle, U. Holzgrabe und K. Mohr:

Cooperative interactions at M₂ muscarinic acetylcholine receptors: Structure/activity-relationships in stepwise shortened bispyridinium- and bis(ammonio)alkane-Type allosteric modulators.

Neurochemical Research (angenommen)

Gilsbach, R.:

Allosterische Wirksamkeit unilateral modifizierter phthalimidsubstituierter

Bispyridiniumverbindungen am muskarinischen M₂-Rezeptor.

Diplomarbeit, Math-Nat. Fakultät, Universität Bonn (2001)

Gnagey, A. und J. Ellis

Allosteric regulation of the binding of [³H]Acetylcholine to m₂ Muscarinic Receptors.

Biochem. Pharmacol. 52: 1767-1775 (1996)

Gnagey, A.L., M. Seidenberg und J. Ellis:

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 (1999)

Holzgrabe, U. und K. Mohr:

Allosteric modulators of ligand binding to muscarinic acetylcholin receptors.

Drug Discovery Today 3: 214-222 (1998)

Hulme, E.C., N.J.M. Birdsall und N.J. Buckley

Muscarinic receptor subtypes

Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30: 633-673 (1990)

Jakubík, J., L. Bacáková, V. E. El-Fakahany, und S. Tuček:

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

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

Jakubík, J., L. Bacáková, E.E. El-Fakahany, und S. Tuček:

Positive Cooperativity of Acetylcholine and Other Agonists with Allosteric Ligands on Muscarinic Acetylcholine Receptors.

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

Jepsen, K., H. Lüllmann, K. Mohr und J. Pfeffer:

Allosteric stabilisation of [³H]N-Methylscopolamin binding in guinea pig myocardium by antidote against organophosphate intoxication.

Pharmacol.Toxicol. 63: 163-168 (1988)

T. Kenakin:

Agonist-receptor efficacy II: agonist trafficking of receptor signals.

Trends Pharmacol. Sci. 16, 232-238 (1995)

T. Kenakin:

Agonist-receptor efficacy I: mechanism of efficacy and receptor promiscuity.

Trends Pharmacol. Sci. 16, 188-192 (1995)

T. Kenakin:

Receptor conformational induction versus selection: all part of the same energy landscape.

Trends Pharmacol. Sci. 17, 190-191 (1996)

Kostenis, E., U. Holzgrabe und K. Mohr:

Allosteric effect on muscarinic M₂-receptors of derivatives of the alkan-bis-ammonium compound W84. Comparison with bispyridium-allosteric modulators.

Eur.J.Med.Chem. 29: 947-953 (1994)

Kostenis, E. und K. Mohr

Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation.

Trends Pharmacol. Sci. 17: 280-283 (1996)

Lanzafame, A., A. Christopoulos und F. Mitchelson

Interactions of agonists with an allosteric antagonist at muscarinic acetylcholine M₂ receptors.

Eur. J. Pharm. 316: 27-32 (1996)

Lanzafame, A., A. Christopoulos und F. Mitchelson

Three allosteric modulators act at a common site, distinct from that of competitive antagonists at muscarinic acetylcholine M₂ receptors.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 282: 278-285 (1997)

Lazereno, S., P. Gharagozloo, D. Kuonen, A. Popham und N.J.M Birdsall:

Subtype-Selective Positive Cooperative Interactions between Brucine Analogues and Acetylcholine at Muscarinic Receptors: Radioligand Binding Studies.

Mol. Pharmacol. 53: 573-589 (1998)

Leff, P.:

The two state model of receptor activation.

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

Lefkowitz, R.J., S. Cotecchia, P. Samama, T. Costa:

Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins.
Trends Pharmacol. Sci. 14: 303-307 (1993)

Leppik, R.A., R.C. Miller, M. Eck und J.L. Paquet:

Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m2 muscarinic acetylcholine receptor.
Mol. Pharmacol. 45: 983-990 (1994)

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

Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)

Maaß, A.:

Vergleich der allosterischen Beeinflussbarkeit der Agonist- und Antagonist-Bindung an Muscarin-Rezeptoren des Hausschwein-Myokards.
Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn (1995)

Matsui, H., S. Lazareno, und N.J.M. Birdsall:

Probing of the location of the allosteric site on m₁ muscarinic receptors by site-directed mutagenesis.
Mol. Pharmacol. 47: 88-98 (1995)

Nedoma, J., N.A. Dorofeeva, S. Tuček, S.A. Shelkownikov und A.F. Danilov

Interaction of the neuromuscular blocking drugs alcuronium, decamethonium, gallamine, pancuronium, ritebronium, tercuronium, and d-tubocurarine with muscarinic acetylcholine receptors in the heart and ileum.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 329: 176-181 (1985)

Potter, L.T., L.A. Ballesteros, L.H. Bichajian, C.A. Ferrendelli, A. Fisher, H.H. Hanchett und R. Zhang:

Evidence of paired M2 muscarinic receptors.
Mol. Pharmacol. 39: 211-221 (1991)

Proška, J. und S. Tuček

Competition between positive and negative allosteric effectors on muscarinic receptors.
Mol. Pharmacol. 48: 696-702 (1995)

Scatchard, G.:

The attraction of proteins for small molecules and ions.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660-666 (1949)

Schröter, A., C. Tränkle und K. Mohr:

Modes of allosteric interactions with free and [³H]N-methylscopolamine-occupied muscarinic M2 receptors as deduced from buffer-dependent potency shifts.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 362 (6): 512-519 (2000)

Schulz, U.:

Antagonismus-Untersuchungen zur Topographie der Bindung allosterischer Modulatoren an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren des Subtyps M₂.
Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn (1998)

Schwarz, R.D., C.J. Spencer, J.C. Jaen, T. Mirzadegan, D. Moreland, H. Tecle und A.J. Thomas

Mutations of aspartate 103 in the hm₂ receptor and alterations in receptor binding properties of muscarinic agonists.
Life Sci. 56: 923-929 (1995)

Seifert, R., U. Gether, K. Wenzel-Seifert und B.K. Kobilka:

Effects of Guanosine, Inosine and Xanthine Nucleotides on β_2 -Adrenergic Receptor/
G_S-Interactions: Evidence for Multiple Receptor-Conformations.
Mol Pharm. 56 (2): 348-358 (1999)

Spalding, T.A., E.S. Burstein, S.C. Henderson, K.R. Ducotes und M.R. Brann:

Identification of a Ligand-dependent Switch within a Muscarinic Receptor.
J.Biol.Chem. 273 (34): 21563-21568 (1998)

Stockton, J.M., N.J.M. Birdsall, A.S.V. Burgen und E.C. Hulme:

Modification of the Binding Properties of Muscarinic Receptors by Gallamin.
Mol Pharm. 23; 551-557 (1983)

Tränkle, C., E. Kostenis, U. Burgmer und K. Mohr:

Search for lead structures to develop new allosteric modulators of muscarinic receptors.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 279: 926-933 (1996)

Tränkle, C. und K. Mohr:

Divergent modes of action among cationic allosteric modulators of muscarinic M₂
receptors.
Mol.Pharmacol. 51: 674-682 (1997)

Tränkle, C., O. Weyand, A. Schröter und K. Mohr:

Using a Radioalloster to Test Predictions of the Cooperativity Model for Gallamin
Binding to the Allosteric Site of Muscarinic Acetylcholine M₂ Receptors.
Mol. Pharmacol. 56: 962-965 (1999)

Tränkle, C., A. Dittmann, S. Buller, J. Ellis und K. Mohr:

Atypical versus typical bispyridinium type muscarinic allosteric agents: studies in mutant
M₂/M₅ receptors
Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 335 (Suppl. 1) P:P35 (2002)

Tuček, S. und J. Proška:

Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors.
Trends Pharmacol. Sci. 16: 205-212 (1995)

Waelbroeck, M., P. Robbebrecht, P. Chatelain und J. Christophe:

Rat cardiac muscarinic receptors: I Effects of guanin nucleotides on High- and Low-
Affinity binding sites
Mol. Pharmacol. 21: 581-588 (1981)

Waelbroeck, M.:

Identification of drugs competing with d-tubocurarine for an allosteric site on cardiac
muscarinic receptors.
Mol.Pharmacol. 46: 685-692 (1994)

Waelbroeck, M.:

Activation of Guanosine 5'-[γ -³⁵S]thio-triphosphate Binding through M₁ Muscarinic Receptors in Transfected Chinese Hamster Ovary Cell Membranes: 2. Testing the "two-States" Model of Receptor Activation
Mol. Pharmacol. 59: 886-893 (2001)

Watson, C., G. Chen, P. Irving, J. Way, W. Chen und T. Kenakin

The use of Stimulus-Biased Assay Systems to Detect Agonist-Specific Receptor Active States: Implications for the Trafficking of Receptor Stimulus by Agonists.
Mol. Pharmacol. 58: 1230-1238 (2000)

Wess, J.

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

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

Allosteric Modulation of Muscarinic Receptor Signaling: Alcuronium-Induced Conversion of Pilocarpine from an Agonist into an Antagonist.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 301: 1-9 (2002)

7 ANHANG

Dargestellt sind die für jede hergestellte Membransuspension mittels zweier Methoden bestimmten Werte für K_D und B_{max} . In den ersten beiden Tabellen sind die im Na,K,P_i-Puffer, in den letzten beiden die im Mg,P_i,Tris-Puffer erhobenen Befunde angegeben.

Homogenat vom	pK _D		B _{max} (fmol/mg _{Protein})		Anzahl der Versuche
	Cheng & Prussof	Scatchard	de Blasi	Scatchard	
05. 1998	9,40	9,51	76	94	3
08. 1998	9,32	9,22	117	163	1
03. 1999	9,96	9,80	61	94	1
07. 1999	10,00	9,69	93	157	2
09. 1999	9,60	9,55	351	562	2
10. 1999	9,80	9,60	181	298	2
12. 1999	9,77	9,67	247	409	2
11. 2000	10,08	9,92	103	163	3
01. 2001	10,04	9,85	92	223	3
02. 2001	10,35	10,26	68	104	2
Gesamt	9,85 ± 0,07	9,73 ± 0,07	140 ± 22	223 ± 36	20

Tabelle 2a: Kenngrößen der [³H]NMS-Bindung an Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe erhoben in Na,K,P_i-Puffer. In der letzten Zeile sind Mittelwerte und Standardfehler für alle Membransuspensionen angegeben.

Anhang

Homogenat vom	pK _D		B _{max} (fmol/mg _{Protein})		Anzahl der Versuche
	Cheng & Prussof	Scatchard	de Blasi	Scatchard	
05. 1998	9,45	9,22	21	32	3
08. 1998		8,91	9	48	1
03. 1999	9,13	8,89	19	32	4
07. 1999	(9,80)	8,84	18	43	2
09. 1999	(9,24)	9,43	40	67	2
10. 1999	(9,70)	9,18	22	47	2
12. 1999	8,99	8,86	109	187	2
11. 2000	9,08	9,15	38	47	3
01. 2001	9,48	9,21	35	57	3
02. 2001	9,34	9,16	39	63	3
Gesamt	(9,38 ± 0,09) n = 21	9,09 ± 0,05	35 ± 5	59 ± 8	25

Tabelle 2b: Kenngrößen der [³H]OxoM-Bindung an Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe erhoben in Na,K,P_i-Puffer. In der letzten Zeile sind Mittelwerte und Standardfehler für alle Membransuspensionen angegeben. Werte in Klammern konnten nicht aus allen durchgeführten Versuchen berechnet werden. Näheres siehe Text.

Die Bestimmung des K_D-Wertes mittels der Gleichung $K_D = IC_{50} - L$ (Cheng und Prussof) führte für die homologen Konkurrenzexperimente mit [³H]OxoM im Na,K,P_i-Puffer nicht in allen Fällen zu sinnvollen Ergebnissen. Die eingesetzte Konzentration des Radioliganden betrug 1nM und lag daher nahe beim K_D-Wert. Die mittels der Scatchard-Gleichung bestimmten Werte für K_D lagen bei 0,8nM. Demnach müsste IC₅₀ der Summe aus K_D und [L] entsprechen, in diesem konkreten Fall also etwa 1,8nM. Infolge der experimentellen Streuung dieser Experimente wurden jedoch in einigen Fällen IC₅₀-Werte erhalten, die kleiner waren als L. Die Analyse nach Scatchard beruht nicht auf dieser Differenzbildung und liefert in Fällen, wo IC₅₀ < L, verwertbare Ergebnisse. Die Scatchard-Transformation birgt jedoch andere Probleme, auf die hier jedoch nicht eingegangen werden braucht.

Anhang

Homogenat vom	pK _D		B _{max} (fmol/mg _{Protein})		Anzahl der Versuche
	Cheng & Prussof	Scatchard	de Blasi	Scatchard	
05. 1998	9,23	9,28	68	95	3
08. 1998	9,48	9,33	71	86	1
10. 1998	9,65	9,64	67	102	2
Gesamt	9,41 ± 0,09	9,41 ± 0,08	68 ± 2	96 ± 3	6

Tabelle 2c: Kenngrößen der [³H]NMS-Bindung an Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe erhoben in Mg,P_i,Tris-Puffer. In der letzten Zeile sind Mittelwerte und Standardfehler für alle Membransuspensionen angegeben.

Homogenat vom	pK _D		B _{max} (fmol/mg _{Protein})		Anzahl der Versuche
	Cheng & Prussof	Scatchard	de Blasi	Scatchard	
05. 1998	8,57	8,68	23	23	4
08. 1998	8,50	8,52	18	28	2
Gesamt	8,55 ± 0,05	8,63 ± 0,08	21 ± 1	25 ± 4	6

Tabelle 2d: Kenngrößen der [³H]OxoM-Bindung an Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe erhoben in Mg,P_i,Tris-Puffer. In der letzten Zeile sind Mittelwerte und Standardfehler für alle Membransuspensionen angegeben

Ein statistischer Vergleich der Mittelwerte für K_D der [³H]NMS-Bindung zeigte für beide Inkubationsbedingungen keinen signifikanten Unterschied zwischen der nach Scatchard oder nach de Blasi bestimmten Größe (t-Test, p>0,05). Auch für die unter Mg/ P_i/ Tris-Bedingungen erhobenen Daten des Agonisten [³H]OxoM konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Analysen-Methoden gefunden werden.