

**Allosterische Modulation
der durch Acetylcholin und weitere Agonisten
ausgelösten Aktivierung von muskarinischen M₂-Rezeptoren**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Caroline Schmalenbach

aus

Lüdenscheid

Bonn 2005

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

1. Referent: Prof. Dr. med. Klaus Mohr
2. Referent: Prof. Dr. med. Eberhard Schlicker

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2006

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2003 bis Dezember 2005 in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Institutes der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr angefertigt.

1	Einleitung.....	1
1.1	Acetylcholin (ACh).....	1
1.2	Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren	2
1.3	Voll- und Partialagonismus	3
1.4	Allosterische Modulation muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren	4
1.5	Effekt allosterischer Modulatoren im funktionellen Experiment.....	6
1.6	Therapeutische Perspektiven allosterischer Modulation	8
1.7	Fragestellung	10
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Material	13
2.1.1	Muskarinische Vollagonisten	13
2.1.2	Muskarinische Partialagonisten	14
2.1.3	Muskarinische Antagonisten	16
2.1.4	Allosterische Modulatoren an Muskarinrezeptoren	17
2.1.5	Orthosterisch/allosterische Hybridsubstanzen	24
2.1.6	Radioliganden	25
2.1.7	Chemikalien und Reagenzien	26
2.1.8	Verbrauchsmaterialien	28
2.1.9	Puffer und Lösungen.....	29
2.1.10	Geräte.....	32
2.1.11	Verwendete Computerprogramme.....	33
2.2	Zellkultur.....	34
2.2.1	Kultivierung von CHO-Zellen.....	34
2.2.2	Membranpräparation.....	35
2.2.3	Einfrieren von CHO-Zellen	36
2.2.4	Auftauen von CHO-Zellen	36
2.2.5	Proteingehaltsbestimmung	36
2.3	Radioligandbindungsstudien mit [³H]NMS	36
2.3.1	Homologe Competition.....	37
2.3.1.1	Theoretische Grundlagen	38
2.3.1.2	Versuchsdurchführung.....	39

2.3.2	Heterologe allosterische Interaktion	41
2.3.2.1	Theoretische Grundlagen.....	41
2.3.2.2	Versuchsdurchführung	43
2.3.2.2.1	Heterologe allosterische Interaktionsexperimente mit [³ H]NMS als Orthoster	43
2.3.2.2.2	Heterologe allosterische Interaktionsexperimente mit [³ H]NMS und ACh bzw. Pilocarpin als Orthosteren.....	44
2.4	Funktionelle Experimente ([³⁵S]GTPγS-Assay)	46
2.4.1	Theoretische Grundlagen.....	46
2.4.2	Versuchsdurchführung	47
2.4.3	Analyse des antagonistischen Verhaltens der Testsubstanzen	50
2.4.4	Test auf Parallelverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven ...	52
2.4.5	Berechnung des prozentualen Anteils an ternären Komplexen bei gegebenen Agonist- und Alloster-Konzentrationen	52
2.5	Statistische Methoden	54
2.5.1	Vergleich von Mittelwerten	54
2.5.2	Vergleich verschiedener Modelle zur Datenanpassung	55
2.5.3	Korrelation.....	56
3	Ergebnisse.....	57
3.1	Charakterisierung der CHO-M₂-Zellhomogenate.....	57
3.1.1	[³ H]NMS-Bindungsexperimente: Homologe Competition	57
3.1.2	Beeinflussbarkeit der basalen [³⁵ S]GTPγS-Bindung	59
3.2	Voruntersuchungen für die [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente	61
3.2.1	Einfluss von Saponin auf die ACh-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	61
3.2.2	Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die ACh-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	67
3.2.3	Untersuchung einer mit ACh positiv kooperativen Substanz am M ₄ -Rezeptor	76
3.3	[³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente	78
3.3.1	Einfluss verschiedener Agonisten auf die [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	78
3.3.1.1	ACh.....	79
3.3.1.2	Carbachol.....	81

Inhaltsverzeichnis

3.3.1.3	Oxotremorin	83
3.3.1.4	Oxotremorin M	85
3.3.1.5	Pilocarpin	87
3.3.1.6	McN-A-343.....	89
3.3.1.7	<i>N</i> -Methylpilocarpin	91
3.3.1.8	DDT-5	93
3.3.1.9	MM-H5-6.....	94
3.3.2	Einfluss der Testsubstanzen auf die ACh-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	96
3.3.2.1	Atropin	96
3.3.2.2	Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen und Derivate	103
3.3.2.2.1	W84	103
3.3.2.2.2	SH28.....	107
3.3.2.2.3	Naphmethonium (MM3a).....	110
3.3.2.2.4	MM7a.....	113
3.3.2.2.5	TD2.....	116
3.3.2.3	Strychnin und Derivate	121
3.3.2.3.1	Strychnin.....	121
3.3.2.3.2	Di-Strychnin-6.....	125
3.3.2.3.3	Str6Naph	128
3.3.2.4	Alcuronium und Caracurine	131
3.3.2.4.1	Alcuronium.....	131
3.3.2.4.2	Caracurin V.....	134
3.3.2.4.3	Caracurin VII (WGA).....	137
3.3.2.5	Duo3	140
3.3.2.6	(-)-Eburnamonin.....	143
3.3.2.7	Gallamin.....	146
3.3.2.8	EHW 141	151
3.3.2.9	DDT-5	153
3.3.3	Einfluss ausgewählter Allosterie auf die [³⁵ S]GTPγS-Bindung induziert durch verschiedene Agonisten.....	155
3.3.3.1	Alcuronium.....	156
3.3.3.1.1	Einfluss auf die Carbachol-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	156

3.3.3.1.2	Einfluss auf die Oxotremorin-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	157
3.3.3.1.3	Einfluss auf die Oxotremorin M-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	159
3.3.3.1.4	Einfluss auf die McN-A-343-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	160
3.3.3.1.5	Kooperativität der Agonisten mit Alcuronium	162
3.3.3.2	W84	164
3.3.3.2.1	Einfluss auf die Carbachol-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	164
3.3.3.2.2	Einfluss auf die Oxotremorin-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	165
3.3.3.2.3	Einfluss auf die Oxotremorin M-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	167
3.3.3.2.4	Einfluss auf die McN-A-343-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	169
3.3.3.2.5	Einfluss auf die Pilocarpin-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	171
3.3.3.2.6	Kooperativität der Agonisten mit W84	172
3.3.3.3	Naphmethonium (MM3a)	174
3.3.3.3.1	Einfluss auf die Carbachol-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	174
3.3.3.3.2	Einfluss auf die Oxotremorin-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	175
3.3.3.3.3	Einfluss auf die Oxotremorin M-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	177
3.3.3.3.4	Einfluss auf die McN-A-343-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	179
3.3.3.3.5	Kooperativität der Agonisten mit Naphmethonium	181
3.3.3.4	Konzentrationsabhängige Beeinflussung des Agonist- induzierten Maximaleffektes durch Allosterie	182
3.3.3.4.1	Carbachol/W84	183
3.3.3.4.2	Oxotremorin M/Naphmethonium	184
3.3.3.4.3	McN-A-343/Naphmethonium	189
3.3.3.4.4	Pilocarpin/Naphmethonium	190
3.4	[³H]NMS-Bindungsexperimente	191

3.4.1	Einfluss von Naphmethonium auf die [³ H]NMS-Gleichgewichtsbindung	191
3.4.2	Inhibition der [³ H]NMS-Gleichgewichtsbindung durch ACh in An- und Abwesenheit von Naphmethonium	193
3.4.3	Inhibition der [³ H]NMS-Gleichgewichtsbindung durch Pilocarpin in An- und Abwesenheit von Naphmethonium	197
4	Diskussion.....	199
4.1	Einfluss allosterischer Modulatoren auf die M₂-Rezeptor-vermittelte G-Protein-Aktivierung.....	199
4.1.1	Allosterische Modulation der basalen Rezeptoraktivität.....	200
4.1.2	Intrinsische Aktivität von Agonisten.....	204
4.1.2.1	Divergente allosterische Modulation der intrinsischen Aktivität von ACh und Pilocarpin	204
4.1.2.2	Divergente allosterische Modulation der intrinsischen Aktivität verschiedener Voll- und Partialagonisten	205
4.1.3	Übereinstimmungen und Besonderheiten der Affinitäten allosterischer Modulatoren zum freien M ₂ -Rezeptor bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen.....	209
4.1.4	Einfluss der Besetzung der orthosterischen Bindungsstelle auf die Affinität von allosterischen Modulatoren	213
4.2	Molekular-mechanistische Betrachtung allosterischer Modulation.....	222
4.2.1	Topologie der Ligand-Bindung an muskarinischen Rezeptoren....	222
4.2.1.1	Topologie der Bindung orthosterischer Liganden	222
4.2.1.2	Topologie der Bindung allosterischer Liganden	223
4.2.2	Aktivierungsmechanismus G-Protein-gekoppelter Rezeptoren.....	224
4.2.2.1	Aktivierung durch Agonisten	224
4.2.2.2	Modulation der M ₂ -RezeptorAktivierung durch Allosterie.....	226
4.3	Perspektiven zur Entwicklung von Förderern der Bindung von ACh an muskarinischen Rezeptoren.....	227
4.3.1	Bisherige Forschungsergebnisse.....	227
4.3.2	Ausblick	228

5 Zusammenfassung	229
6 Literaturverzeichnis	231
7 Anhang.....	245
7.1 Steilheiten der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven im Einzelversuch und in der Versuchszusammenfassung	245
7.2 Kein Einfluss verschiedener Steilheitsmaße auf die Lage der Wendepunkte von ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven im Einzelversuch	246
7.3 Kein Einfluss verschiedener Steilheitsmaße auf die Kenngrößen von gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven.....	247
7.4 Gleiche Maßzahlen der Alloster-Wirksamkeit bei Anpassung paralleler Kurven mit verschiedenem Steilheitsmaß	248
7.4.1 Versuche mit W84	248
7.4.2 Versuche mit Naphmethonium	252
7.5 Vergleich von Schild-Auftragungen auf der Basis der Verschiebungsfaktoren aus Einzelexperimenten sowie der Verschiebungsfaktoren aus gemittelten Kurven einer Versuchsreihe	253
8 Veröffentlichungen	255

1 Einleitung

Vor der Darlegung der Fragestellung dieser Arbeit seien einführend einige grundlegende Informationen zu dem Überträgerstoff Acetylcholin, seinen Rezeptoren vom muskarinischen Typ und Wirkstoffen zur Beeinflussung dieser Rezeptoren gegeben.

1.1 Acetylcholin (ACh)

Acetylcholin (ACh) ist ein wichtiger Überträgerstoff im Gehirn, im autonomen (vegetativen) Nervensystem und an der motorischen Endplatte. Es spielt eine Rolle in der Erregungsübertragung des Darmnervensystems. Auch aus nicht-neuronalen Quellen kann ACh freigesetzt werden (Kirkpatrick et al., 2001; Wessler et al., 2001; Wessler et al., 2003; Racké und Matthiesen, 2004). ACh kommt beispielsweise in Epithel- (z. B. Luftwege, Verdauungstrakt), Mesothel- (z. B. Pleura, Perikard) und Immunzellen vor. Dabei soll es an der Regulation basaler Zellfunktionen wie z. B. Genexpression, Proliferation, Differenzierung und Aufbau von Zell-Zell-Kontakten beteiligt sein (Grando, 1997; Wessler et al., 1998; Wessler et al., 1999; Kawashima und Fujii, 2000).

Die Wirkungen von ACh werden über cholinerge Rezeptoren vermittelt. Man unterscheidet nicotinische und muskarinische ACh-Rezeptoren. Bei den nicotinischen Rezeptoren handelt es sich um Ionenkanalproteine, wohingegen die muskarinischen Rezeptoren (s. 1.2) in die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren einzuordnen sind. ACh wird mit Hilfe des Enzyms Cholin-O-Acetyltransferase aus Cholin und Acetyl-Coenzym A gebildet. Nach Ausschüttung in den extrazellulären Raum wird ACh rasch durch die spezifische ACh-Esterase und die unspezifische Butyrylcholinesterase in Cholin und Essigsäure gespalten (Darvesh et al., 2003).

1.2 Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren

Die muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren gehören wie Rhodopsin zur Klasse A der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die als gemeinsames Merkmal sieben transmembranäre Domänen aufweisen (Wess, 1996; Caulfield und Birdsall, 1998; Hulme et al., 2003). Die Sekundärstruktur des Rezeptorproteins im Bereich der transmembranären Domänen wird durch α -Helices gebildet (Baldwin et al., 1997). Es gibt verschiedene Subtypen muskarinischer Rezeptoren. Unterschiedliche Effekte der muskarinischen Agonisten McN-A-343 und Bethanechol auf den Tonus des unteren Ösophagusphinkters führten zu einer vorläufigen Einteilung in M_1 - und M_2 -Rezeptoren (Goyal und Rattan, 1978). Auch Untersuchungen mit dem M_1 -selektiven Antagonisten Pirenzepin deuteten darauf hin, dass es unterschiedliche muskarinische Rezeptoren geben musste (Hammer et al., 1980). Durch Klonierung von cDNAs, die für muskarinische Rezeptoren kodieren, wurden fünf Subtypen (M_1 - M_5) entdeckt (Kubo et al., 1986; Bonner et al., 1987, 1988). Die Subtypen unterscheiden sich bezüglich der Verteilung im Gewebe, der G-Proteine, an die sie koppeln, und der beeinflussbaren Effektorproteine. M_1 -, M_3 - und M_5 -Rezeptoren koppeln bevorzugt an G-Proteine der Klassen G_q und G_{11} , was eine Aktivierung der Phospholipase C zur Folge hat. Dadurch kommt es zur Freisetzung des sekundären Botenstoffes Inositoltriphosphat, welcher intrazelluläres Calcium mobilisiert. M_2 - und M_4 -Rezeptoren hemmen durch bevorzugte Kopplung an $G_{i/o}$ die Adenylatcyclase und führen so zu niedrigen cAMP-Spiegeln (Felder, 1995; Hulme et al., 2003). Außerdem nehmen M_2 -Rezeptoren durch Abspaltung der β/γ -Untereinheit des G-Proteins Einfluss auf Kalium- und spannungsabhängige Calcium-Kanäle (Molenaar und Polak, 1980; Krejčí und Tuček, 2002). Die Beeinflussung von Kalium-Kanälen findet vor allem im Herzen und in einigen Neuronengebieten statt. Die Blockade von Calcium-Kanälen ist an den Synapsen verantwortlich für die präsynaptische Autoinhibition der ACh-Freisetzung (Krejčí et al., 2004).

Zur Aufklärung der Gewebeverteilung der Rezeptorsubtypen wurden Radioligand-bindungsstudien mit selektiven Antagonisten (z. B. [3 H]Pirenzepin, [3 H]AF-DX 384), Immunoassays mit Subtyp-selektiven Antikörpern (Li et al., 1991; Dörje et al., 1991; Levey et al., 1993; Rouse et al., 1997) und Quantifizierungen von mRNA

(Krejčí und Tuček, 2002) durchgeführt. Demzufolge finden sich M_1 -Rezeptoren vor allem im ZNS (Cortex und Hippocampus), M_2 -Rezeptoren hauptsächlich im Herzen, aber auch in der glatten Muskulatur und im ZNS. M_3 -Rezeptoren sind in glatter Muskulatur, in sekretorischen Drüsen, aber auch im Gehirn zu finden. M_4 -Rezeptoren kommen im ZNS (Vorderhirn, Striatum) und M_5 -Rezeptoren im ZNS (Substantia nigra) und in der Peripherie vor (Caulfield und Birdsall, 1998). Da in den verschiedenen Geweben jeweils mehrere Subtypen muskarinischer Rezeptoren auftreten, ist eine genaue Zuordnung, welche physiologischen Funktionen durch welchen Subtyp vermittelt werden, erschwert. Experimente mit Knock-out-Mäusen, bei denen das Gen eines Rezeptorsubtyps ausgeschaltet wird, ermöglichen es seit einigen Jahren, die physiologische Rolle der Subtypen besser zu verstehen (Gomez et al., 1999a,b; Rouse et al., 2000; Matsui et al., 2000).

1.3 Voll- und Partialagonismus

Eine Erregung muskarinischer ACh-Rezeptoren ist durch Vollagonisten (ACh, Carbachol, Oxotremorin M, Oxotremorin) und Partialagonisten (Pilocarpin, McN-A-343) möglich. Partialagonisten lösen nach Bindung an den Rezeptor im Vergleich zu Vollagonisten einen geringeren Effekt aus. Bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bedeutet eine solche verminderte intrinsische Aktivität eine reduzierte G-Protein-Aktivierung. Für dieses unterschiedliche Verhalten von Agonisten existieren mehrere Erklärungsansätze.

Kenakin (2002, 2003) postuliert, dass es eine Vielzahl von Rezeptorkonformationen gibt, die durch eine Gauß-Verteilung dargestellt werden können und die unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen G-Protein-Untereinheiten besitzen. Vollagonisten selektieren beim Bindungsvorgang nach dem Modell der „conformational selection“ aus diesem Spektrum bevorzugt die aktiven Konformationen und verschieben das Gleichgewicht in deren Richtung, wohingegen Partialagonisten auch inaktive Rezeptorkonformationen besetzen und so stabilisieren (Spalding et al., 1998; Christopoulos und Kenakin, 2002; Traynor et al., 2002; Kenakin, 2003). Bei dem Modell der „conformational induction“ hingegen wird davon ausgegangen, dass die Liganden nach Bindung an das

Rezeptorprotein bestimmte Konformationen induzieren (Lefkowitz et al., 1993; Waelbroeck et al., 2001; Christopoulos und Kenakin, 2002), die in verschiedenem Ausmaß zur G-Protein-Aktiveringung befähigt sind.

Erwähnt sei auch, dass verschiedene Agonisten am selben Rezeptor verschiedene Signaltransduktionswege induzieren können („agonist trafficking“; Kenakin, 1995, 2002), indem Agonist-spezifische Rezeptorkonformationen gebildet werden, die mit unterschiedlichen G α -Untereinheiten interagieren. In Versuchssystemen, in denen wie in dieser Arbeit die [³⁵S]GTP γ S-Bindung an endogen exprimierte G-Proteine gemessen wird, kann jedoch nicht zwischen bestimmten G-Proteinen unterschieden werden (Harrison und Traynor, 2003). Möchte man die Kopplung an bestimmte G-Proteine experimentell bestimmen, kann der [³⁵S]GTP γ S-Assay modifiziert werden, indem z. B. Rezeptoren mit bestimmten G α -Subtypen koexprimiert werden (Barr et al., 1997; Yang und Lanier, 1999) oder Rezeptor-G α -Fusionsproteine (Guo et al., 2001; Wang et al., 2002) bzw. G α -spezifische Antikörper (Newman-Tancredi et al., 1999; Burford et al., 2000; Akam et al., 2001) eingesetzt werden.

1.4 Allosterische Modulation muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren

Die Bindungsstelle am Rezeptor, an die körpereigene Agonisten wie z. B. ACh binden, wird als orthosterische (griechisch: „richtige Stelle“) Bindungsstelle bezeichnet (Proška und Tuček, 1994; Christopoulos, 2002). ACh ist demnach ein „orthosterischer Ligand“ (Orthoster). Viele Rezeptoren besitzen jedoch auch eine oder mehrere allosterische (griechisch: „andere Stelle“) Bindungsstellen, an die so genannte Allosterie binden (Monod et al., 1963; Christopoulos und Kenakin, 2002; Birdsall und Lazareno, 2005). Die muskarinischen Rezeptoren waren die ersten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, an denen eine allosterische Bindungsstelle entdeckt wurde (Lazareno und Birdsall, 2005). Erste Hinweise dafür ergaben sich aus Experimenten, in denen Agonisten wie ACh zusammen mit Hexamethonium bzw. Gallamin als Testsubstanzen eingesetzt wurden (Lüllmann et al., 1969; Clark und Mitchelson, 1976). Die orthosterische Bindungsstelle befindet sich im Bereich

der transmembranären Domänen (siehe Abbildung 1) und unterscheidet sich in der Aminosäuresequenz kaum innerhalb der fünf Subtypen muskarinischer Rezeptoren (Hulme et al., 1990; Wess, 1996; Caulfield und Birdsall, 1998; Hulme et al., 2003). Die als „common allosteric site“ bezeichnete allosterische Bindungsstelle liegt extrazellulär (Ellis et al., 1993; Leppik et al., 1994; Matsui et al., 1995; Voigtländer et al., 2003). Lazareno et al. (2000, 2002) berichten von Substanzen, die an eine von der „common allosteric site“ verschiedene allosterische Bindungsstelle binden. Unterschiede im molekularen Aufbau von M₁-M₅ sind im Bereich der allosterischen Bindungsstelle deutlicher ausgeprägt (Proška und Tuček, 1995; Wess, 1996; Ellis, 1997; Ellis und Seidenberg, 2000). Wenn muskarinische Allosteren an einen unbesetzten Rezeptor binden, können sie in der Regel keine weitere Signaltransduktion auslösen (Lazareno und Birdsall, 2005). Allosteren können die Bindung eines Orthosters abschwächen oder verstärken. Den Verbund aus Rezeptor, Orthoster und Alloster bezeichnet man als „ternären Komplex“. Zahn et al. (2002) zeigten erstmals, dass ein allosterischer Modulator auch die intrinsische Aktivität eines orthosterischen Liganden verändern kann.

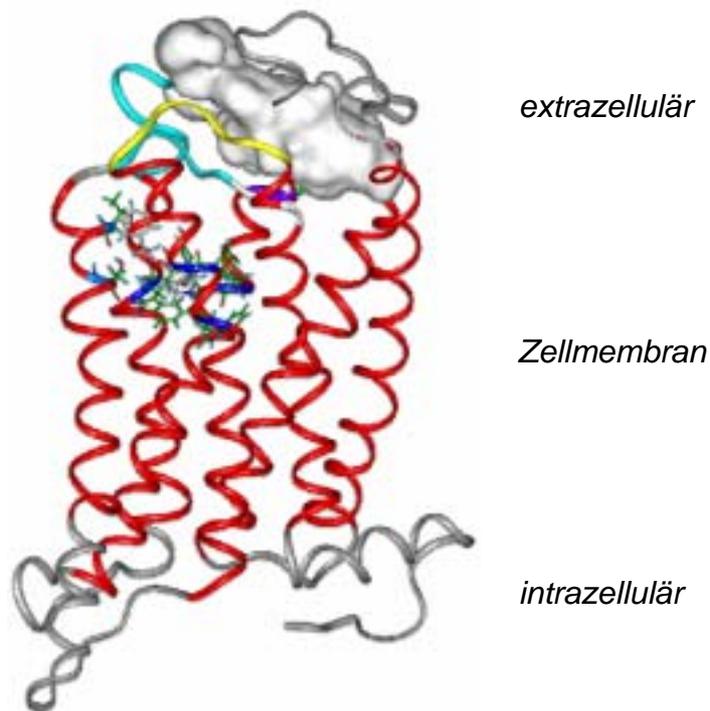


Abbildung 1: Modell des muskarinischen M₂-Rezeptors (entnommen mit freundlicher Zustimmung aus Jöhren, 2004). In der orthosterischen Bindungsstelle ist der Antagonist *N*-Methylscopolamin als Stabmolekül dargestellt. Die umschlossene dargestellte Kavität im extrazellulären Bereich beschreibt den Raum, in dem allosterische Modulatoren an den Rezeptor binden.

1.5 Effekt allosterischer Modulatoren im funktionellen Experiment

Lüllmann et al. (1969) beobachteten an isolierten Meerschweinchen-Herzvorhöfen, dass durch Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen eine parallele Rechtsverschiebung der Carbachol-Konzentrations-Effekt-Kurve hervorgerufen wurde, die bei hohen Konzentrationen der Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen sättigbar war. Die Autoren schlugen für dieses antagonistische Verhalten den Begriff „allosterischer Antagonismus“ vor, der für analoge Befunde in der Enzym-Chemie verwendet wurde (Ariëns, 1966). Clark und Mitchelson (1976) machten mit Gallamin ähnliche Beobachtungen an Meerschweinchen-Herzvorhöfen. Als Agonisten setzten sie ACh und Carbachol ein. Das Vorgehen von Lüllmann et al. (1969) und Clark und Mitchelson (1976) zur Analyse des allosterischen

Antagonismus sei hier kurz angesprochen, da es die methodische Basis der vorliegenden Arbeit darstellt:

Das Ausmaß der Rechtsverschiebung der Agonist-Kurve durch das Alloster wurde als Verschiebungsfaktor ($VF = EC_{50}(\text{mit Alloster})/EC_{50}(\text{Kontrolle})$) ausgedrückt. Der EC_{50} stellte den Wendepunkt der Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurven in An- und Abwesenheit des Allosters dar. Der Logarithmus von $VF-1$ wurde gegen den Logarithmus der Alloster-Konzentration aufgetragen (Abbildung 2). Dieses Verfahren beschrieben Arunlakshana und Schild (1959) für kompetitive Antagonisten, bei denen aus dem so genannten „Schild-Plot“ eine Gerade mit einer Steigung von 1 resultiert und der Schnittpunkt mit der X-Achse die Affinität des Antagonisten zum Rezeptor anzeigt.

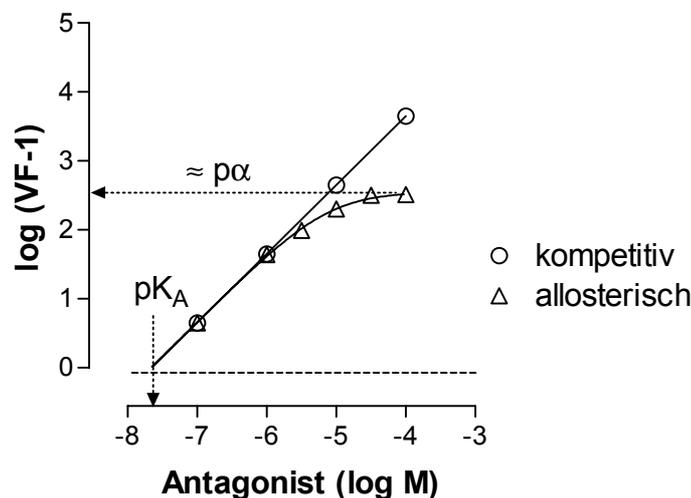


Abbildung 2: Schild-Auftragung von Verschiebungsfaktoren, die sich aus der Rechtsverschiebung einer Konzentrations-Effekt-Kurve eines Agonisten durch einen kompetitiven (Kreise) bzw. einen allosterischen Antagonisten (Dreiecke) ergeben können. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Antagonisten.

Lüllmann et al. (1969) sowie Clark und Mitchelson (1976) stellten fest, dass sich für ihre Testsubstanzen keine Gerade, sondern eine in hohen Konzentrationen abflachende Kurve ergab, und schlossen daraus, dass ihre Substanzen sich nicht wie kompetitive Antagonisten verhielten.

Lanzafame et al. (1996) modifizierten die Gleichung von Arunlakshana und Schild (1959), so dass auch für allosterische Antagonisten aus der Schild-Auftragung pharmakologische Kenngrößen für die Substanz-Bindung ermittelt werden

können. Es lassen sich die Affinität des allosterischen Antagonisten zum freien M₂-Rezeptor (pK_A) und der Kooperativitätsfaktor α bestimmen. Der α -Wert beschreibt das Ausmaß der gegenseitigen Affinitätsveränderung von Alloster und Orthoster am Rezeptor. α kann ermittelt werden, wenn es im untersuchten Konzentrationsbereich zur Bildung ternärer Komplexe aus Orthoster, Alloster und Rezeptor kommt. Der pK_A -Wert ergibt sich aus dem Schnittpunkt der Geraden bzw. Kurve mit der Abszisse. Der α -Wert ergibt sich aus dem Maximum, welchem die Verschiebungsfaktoren zustreben (Ehlert, 1988a; Lanzafame et al, 1996).

1.6 Therapeutische Perspektiven allosterischer Modulation

Aufgrund der Einheitlichkeit der orthosterischen Bindungsstelle bei allen fünf Subtypen muskarinischer Rezeptoren gelingt es nur schwer, Orthostere mit ausgeprägter Selektivität für bestimmte Subtypen muskarinischer Rezeptoren zu entwickeln. Subtyp-selektive Arzneistoffe hätten den Vorteil, dass sie bevorzugt an den Rezeptoren, die am Krankheitsgeschehen beteiligt sind, eine Wirkung entfalten und keine Nebenwirkungen durch die Aktivierung oder Blockade anderer Rezeptoren auslösen. Die Antagonisten Pirenzepin (M₁) und Darifenacin (M₃>M₂) werden als Subtyp-selektive Arzneistoffe bezeichnet. Die Subtyp-Selektivität dieser Substanzen ist jedoch relativ gering und therapeutisch kaum von Bedeutung. Allosterische Modulatoren können ihre Selektivität gegenüber einem Rezeptorsubtyp nicht nur dadurch entfalten, dass sie zu diesem Subtyp eine höhere Affinität besitzen („relative Subtyp-Selektivität“), sondern auch, indem sie an nur diesem Subtyp die Bindung und/oder Wirkung eines Orthosters verstärken oder abschwächen („absolute Subtyp-Selektivität“; Birdsall et al., 1997). Die Neigung der Allosteren, an bereits Orthoster-besetzte Rezeptoren zu binden, kann bei M₁-M₅ ebenfalls unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

Ein weiterer Vorteil von Allosteren in der Therapie könnte es sein, dass ihr Effekt aufgrund ihrer Wirkcharakteristik begrenzt ist. Allosteren können die Bindung bzw. Wirkung eines orthosterischen Agonisten oder Antagonisten nur um ein

bestimmtes Ausmaß steigern oder vermindern. Die Folgen einer Überdosierung wären daher nicht so schwerwiegend. Wenn allosterische Modulatoren keinen Einfluss auf den Grundzustand des Rezeptors ausüben, entfalten sie ihre Wirkung nur in Anwesenheit des endogenen Orthosters, was auch das Nebenwirkungspotential reduziert.

Benzodiazepine, die u. a. als Sedativa, Anxiolytika und Antikonvulsiva eingesetzt werden, sind ein Beispiel für das Prinzip der Effekt-Verstärkung einer körpereigenen Substanz durch einen allosterischen Modulator. Sie fördern die Wirkung von GABA (γ -Aminobuttersäure) am GABA_A-Rezeptor, einem Ligand-gesteuerten Ionenkanal. Cinacalcet, ein Ende 2004 in Deutschland zugelassener Arzneistoff, stellt den ersten therapeutisch eingesetzten allosterischen Modulator an einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor dar und wird zur Behandlung des sekundären Hyperparathyreoidismus eingesetzt. Er verstärkt die Wirkung von Ca²⁺-Ionen am Calcium-sensitiven Rezeptor der Nebenschilddrüsen.

Mögliche therapeutische Einsatzgebiete für allosterische Modulatoren an muskarinischen Rezeptoren sind die Behandlung von Funktionsstörungen der cholinergen Steuerung glatter Muskulatur, z. B. bei überaktiver Blase und Reizdarmsyndrom. Für diese Indikationsgebiete gibt es bereits orthosterische Arzneistoffe, die jedoch nur relative Subtyp-Selektivität aufweisen. Die zur Behandlung der Alzheimer-Demenz entwickelten M₁-selektiven Agonisten können aufgrund geringer Wirksamkeit und hohem Nebenwirkungspotential therapeutisch nicht genutzt werden (Eglen et al., 2001). Ein alternativer Ansatz zur Therapie kognitiver Störungen ist die Blockade von präsynaptischen M₂-Rezeptoren, was zu einer Steigerung der ACh-Freisetzung führen würde. Auch der Antagonismus an M₅-Rezeptoren bietet eine Möglichkeit, Arzneistoffe zur Therapie von Krankheiten wie z. B. Schizophrenie zu entwickeln (Eglen et al., 2001). Ein vielversprechendes Forschungsgebiet ergibt sich aus der Beteiligung muskarinischer Rezeptoren an der Hemmung der Schmerzempfindung (Antinozizeption). Nach bisherigem Wissensstand sind M₂- und/oder M₄-Rezeptoren in diese Vorgänge involviert (Eglen et al., 2001).

Zur Beurteilung der Nutzbarkeit allosterischer Substanzen als Modulatoren von Muskarinrezeptoren ist es notwendig, die Grundprinzipien ihrer Wirkungsweise zu verstehen. Hinsichtlich der Rezeptor-Bindungs-Vorgänge ist dies schon

weitgehend gelungen, jedoch noch nicht in Hinblick auf die Rezeptor-vermittelte G-Protein-Aktivierung.

1.7 Fragestellung

Acetylcholin ist der endogene Agonist an muskarinischen Rezeptoren. Allosterische Förderer der Bindung bzw. Wirkung dieses Neurotransmitters sind, sollten aufgrund theoretischer Überlegungen einen sicheren und effektiven Therapieansatz für Erkrankungen darstellen, die durch eine Verminderung der cholinergen Erregungsübertragung bedingt sind. Zur Zeit sind jedoch kaum Substanzen mit solchen Eigenschaften bekannt. Die meisten allosterischen Modulatoren an muskarinischen Rezeptoren wurden hauptsächlich in Radioligandbindungsstudien mit dem Antagonisten [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS) getestet. Durch verschiedene Allosterie wurde die Bindung von [³H]NMS erhöht, erniedrigt oder blieb unverändert. In funktionellen Experimenten wurden am M₂-Rezeptor für den Partialagonisten Pilocarpin ebenfalls diese drei Einflussmöglichkeiten durch allosterische Modulatoren beobachtet. Es zeigte sich jedoch, dass alle untersuchten Allosterie die intrinsische Aktivität Pilocarpins verminderten oder ganz aufhoben (Zahn et al., 2002; Klemm, 2005).

In dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob eine solche Reduktion der intrinsischen Aktivität auch bei der allosterischen Modulation der ACh-induzierten G-Protein-Aktivierung auftritt. Ein allosterischer Modulator, der zwar die Bindung des Agonisten ACh verstärken würde, aber gleichzeitig die intrinsische Aktivität aufhobe, hätte insgesamt keinen positiven Einfluss auf den ACh-induzierten Effekt. Hier sollten funktionelle Experimente durchgeführt werden, bei denen die Aktivierung des Rezeptors durch ACh anhand der Bindung des radioaktiv markierten Guanylnukleotides [³⁵S]GTPγS erfasst wird. Mithilfe dieses Experimentalmodells sollte für ACh und für weitere Voll- und Partialagonisten untersucht werden, ob durch Allosterie eine Modulation der intrinsischen Aktivität möglich ist.

Da in den funktionellen Experimenten nicht direkt die Bindung des Agonisten gemessen wird, sondern die erste Stufe der Rezeptoraktivierung, sollte in

Radioligandbindungsstudien mit [³H]NMS geprüft werden, ob die Befunde der funktionellen Experimente das Bindungsverhalten der Allosterie widerspiegeln.

Als weiterer Punkt sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen dem Verhalten der Allosterie am [³H]NMS- und am ACh-besetzten Rezeptor besteht. Es wurden Allosterie verschiedener Molekülstruktur-Klassen (u. a. Alkanbis-Ammonium-Verbindungen und Derivate, Caracurine, Strychnin und Derivate, Gallamin, Duo3) eingesetzt, von denen bekannt war, dass sie die Bindung von [³H]NMS am M₂-Rezeptor steigern, abschwächen oder unbeeinflusst lassen.

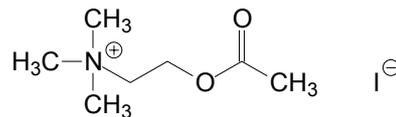
2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Muskarinische Vollagonisten

2.1.1.1 Acetylcholin (ACh)

Acetylcholin dient als Neurotransmitter an cholinergen Synapsen. Es ist der physiologische Agonist an muskarinischen und nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren.



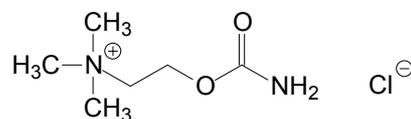
Molekulargewicht: 273,1 g/mol (Acetylcholin-Iodid)

Lieferant: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

Produktnummer: A-7000

2.1.1.2 Carbachol (Carbamoylcholin)

Carbachol wirkt gleichartig wie ACh. Im Organismus hält die Wirkung jedoch länger an, da Carbachol nicht bzw. nur sehr langsam durch die Cholinesterase abgebaut wird (Lüllmann et al., 2003).



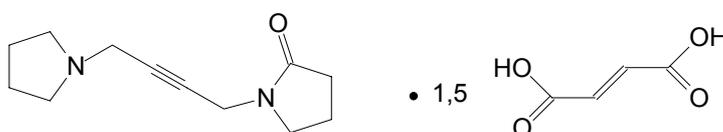
Molekulargewicht: 182,6 g/mol (Carbachol-Chlorid)

Lieferant: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

Produktnummer: C-4382

2.1.1.3 Oxotremorin

Oxotremorin ist ein Agonist an allen muskarinischen Rezeptorsubtypen (Roszkowski, 1961; Dallanoce et al., 1999). In unterschiedlichen Geweben ist der Maximaleffekt von Oxotremorin im Vergleich zu Vollagonisten wie ACh, Carbachol oder Oxotremorin M jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt (Olianas et al., 1983; Evans et al., 1985; Ringdahl, 1987; Olianas und Onali, 1991). Lazareno et al. (1993) konnten zeigen, dass sich Oxotremorin an M_2 - und M_4 -Rezeptoren als Vollagonist verhält und an M_1 - und M_3 -Rezeptoren partialagonistische Eigenschaften aufweist.



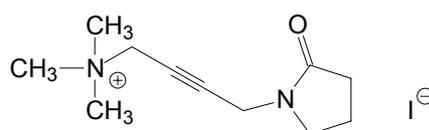
Molekulargewicht: 380,4 g/mol (Oxotremorin-Sesquifumarat)

Lieferant: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

Produktnummer: O-9126

2.1.1.4 Oxotremorin M

Bei Oxotremorin M handelt es sich um einen nicht-selektiven Agonisten an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren (Hammer et al., 1980; McKinney et al., 1991; Jakubík et al., 1997; Christopoulos et al., 2001).



Molekulargewicht: 206,3 g/mol (Oxotremorin M-Iodid)

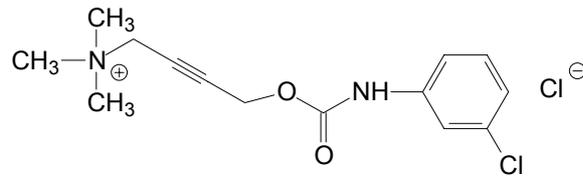
Lieferant: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

Produktnummer: O-100

2.1.2 Muskarinische Partialagonisten

2.1.2.1 McN-A-343

An M_1 - und M_4 -Rezeptoren ist McN-A-343 ein potenter Agonist. An M_2 - und M_3 -Rezeptoren wirkt es partialagonistisch (Mutschler et al., 1995).



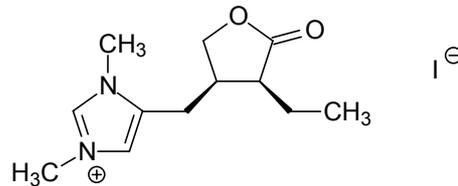
Molekulargewicht: 317,2 g/mol (McN-A-343-Chlorid)

Lieferant: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

Produktnummer: C-7041

2.1.2.2 N-Methyl-Pilocarpin

N-Methyl-Pilocarpin ist ein quaternisiertes Pilocarpin-Derivat. Diese Derivate besitzen schwache bis keine muskarinische Aktivität und antagonisieren die ACh-Wirkung (Bassat et al., 1971; Waters et al., 1973).

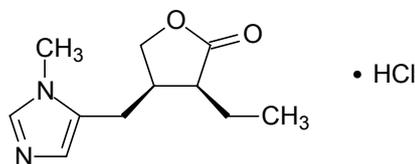


Molekulargewicht: 349,8 g/mol (N-Methyl-Pilocarpin-Iodid)

Herkunft: Dr. E. Heller (Synthese), Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe
(Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

2.1.2.3 Pilocarpin

Das Hauptalkaloid des südamerikanischen Jaborandi-Baumes (*Pilocarpus jaborandi*) Pilocarpin wirkt als Partialagonist an Muskarinrezeptoren (Tota und Schimerlik, 1990; McKinney et al., 1991; Vogel et al., 1995; Akam et al., 2001).



Molekulargewicht: 244,7 g/mol (Pilocarpin-Hydrochlorid)

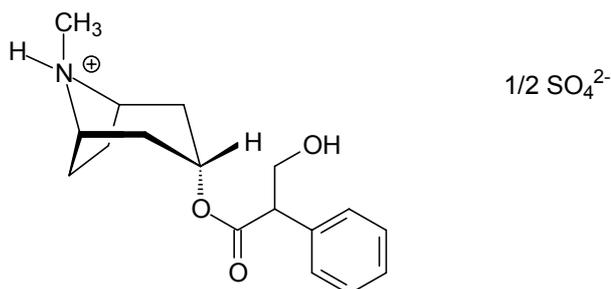
Lieferant: Fluka (Buchs SG, Schweiz)

Produktnummer: 80475

2.1.3 Muskarinische Antagonisten

2.1.3.1 Atropin

Atropin gehört wie das sehr ähnlich gebaute Scopolamin zu den Tropan-Alkaloiden. Es ist das Racemat des (+/-)Hyoscyamins und stammt aus Nachtschattengewächsen (Solanaceen-Arten) wie Tollkirsche (*Atropa belladonna*), Stechapfel (*Datura stramonium*) und Bilsenkraut-Arten (*Hyoscyamus niger*) (Römpp Online, 2005).



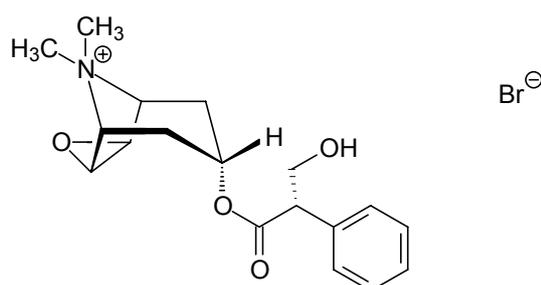
Molekulargewicht: 676,8 g/mol (Atropin-Sulfat; Razemat)

Lieferant: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

Produktnummer: A-0257

2.1.3.2 N-Methyl(-)-Scopolamin (NMS)

N-Methyl(-)-Scopolamin ist ein nicht-selektiver Antagonist an muskarinischen Rezeptoren (Ehlert et al., 1990; Tränkle et al., 1998a).



Molekulargewicht: 398,3 g/mol (N-Methylscopolamin-Bromid)

Lieferant: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

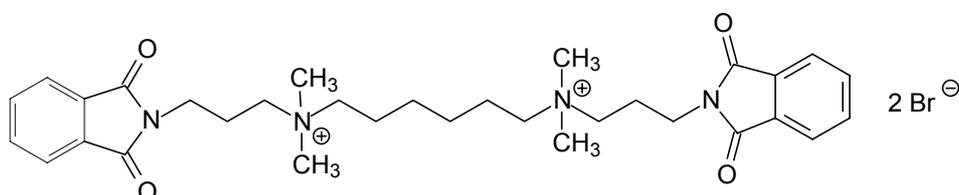
Produktnummer: S-8502

2.1.4 Allosterische Modulatoren an Muskarinrezeptoren

2.1.4.1 Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen und Derivate

Mit dem Prototyp-Modulator W84 wurden die ersten Experimente gemacht, die einen Hinweis auf die allosterische Modulierbarkeit muskarinischer Rezeptoren gaben (Lüllmann et al., 1969). W84 (Tränkle et al., 1998a; Raasch et al., 2002) und sein „halbiertes“ Derivat SH28 (Gilsbach et al., 2003) verhalten sich gegenüber dem Muskarinrezeptor-Antagonisten *N*-Methylscopolamin (NMS) negativ kooperativ (Begriffserklärung „Kooperativität“: s. 2.3.2.1). Bei Naphmethonium (MM3a) ist gegenüber W84 einer der beiden lateralen Phthalimid-Ringe gegen einen Naphthalimid-Ring ausgetauscht und es erfolgte eine Dimethylierung in der Seitenkette. MM3a ist positiv kooperativ mit NMS (Muth et al., 2003). Das „halbierte“ MM3a-Derivat MM7a zeigt neutrale Kooperativität (Matthias Sennwitz, persönliche Mitteilung). TD2 ist ein Silicium-haltiges W84-Derivat. Im Gegensatz zur Muttersubstanz erhöht es die Bindung von NMS an M₂-Rezeptoren (Daiß et al., 2002).

W84

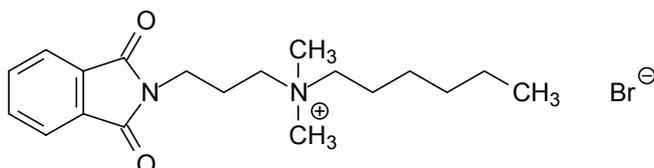


Molekulargewicht: 708,5 g/mol (W84-Dibromid)

Herkunft: Dr. J. Pfeffer (Synthese nach einer Methode von Wassermann (1970))

(Pharmakologisches Institut, Universität Kiel)

SH28

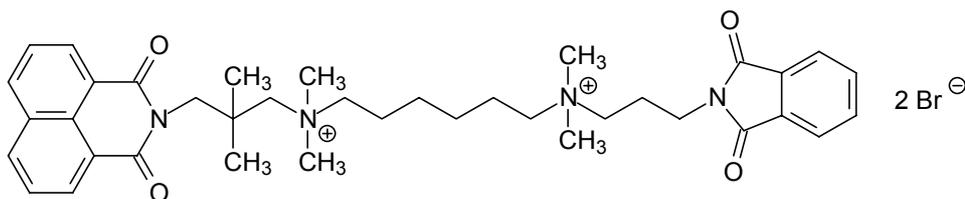


Molekulargewicht: 391,4 g/mol (SH28-Bromid)

Herkunft: Dr. M. Muth (Synthese), Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe

(Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

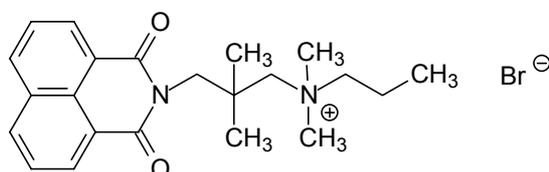
Naphmethonium (MM3a)



Molekulargewicht: 786,6 g/mol (Naphmethonium-Dibromid)

Herkunft: Dr. M. Muth (Synthese), Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe
(Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

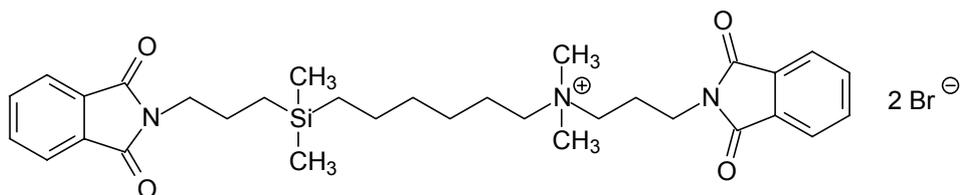
MM7a



Molekulargewicht: 433,4 g/mol (MM7a-Bromid)

Herkunft: Dr. M. Muth (Synthese), Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe
(Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

TD2



Molekulargewicht: 642,7 g/mol (TD2-Bromid)

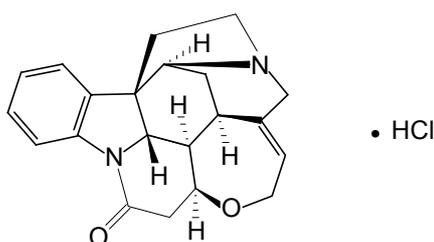
Herkunft: Dr. J. O. Daiß (Synthese), Arbeitskreis Prof. Dr. R. Tacke
(Anorganische Chemie, Universität Würzburg)

2.1.4.2 Strychnin und Derivate

Das Indol-Alkaloid Strychnin kommt in der Brechnuss (*Strychnos nux-vomica*, *Loganiaceae*) und anderen *Strychnos*-Arten vor. Durch die Blockade von post-synaptischen Glycin_A-Rezeptoren im Rückenmark wirkt es als Krampfgift (Mutschler et al., 2001). Strychnin (Proška und Tuček, 1995) und seine

synthetischen Derivate Di-Strychnin-6 (Zlotos et al., 2003) und Str6Naph (Dancila, 2003) sind positiv kooperativ mit NMS an M_2 -Rezeptoren. Str6Naph ist ein Hybrid aus einer Teilstruktur von Naphmethonium und Strychnin, bei denen die beiden quartären N-Atome durch eine Hexamethylenbrücke miteinander verbunden sind. Ebenfalls über eine Brücke aus sechs Kohlenstoffatomen verknüpft sind zwei Strychnin-Moleküle in Di-Strychnin-6.

Strychnin

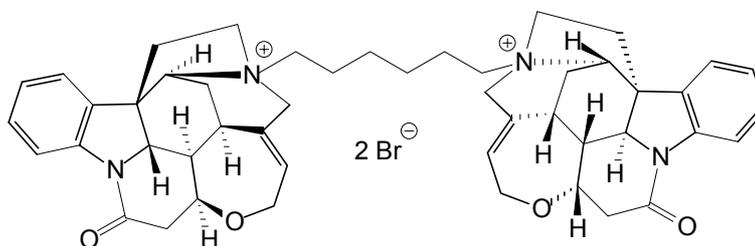


Molekulargewicht: 370,9 g/mol (Strychnin-Hydrochlorid)

Lieferant: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

Produktnummer: S-8753

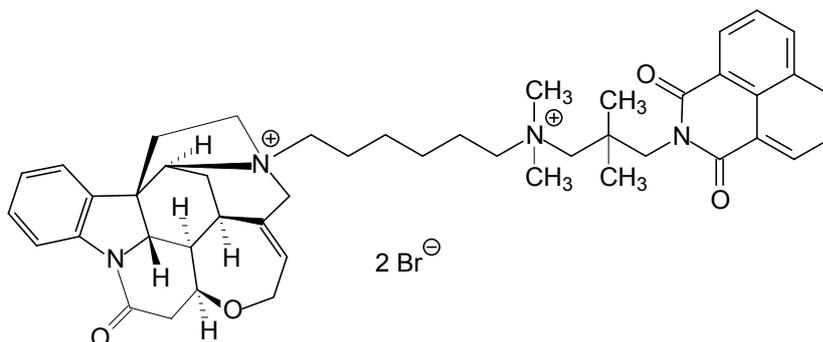
Di-Strychnin-6



Molekulargewicht: 912,8 g/mol (Di-Strychnin-6-Dibromid)

Herkunft: Dr. D. P. Zlotos (Synthese), Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe
(Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

Str6Naph



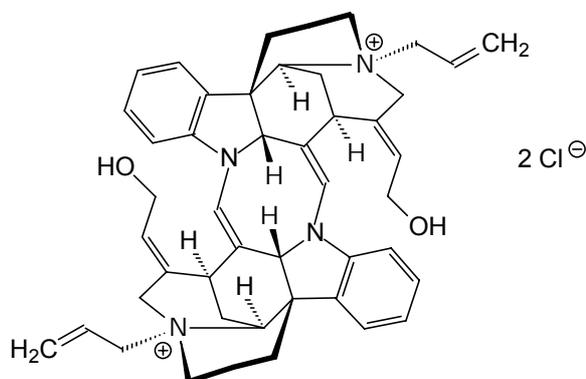
Molekulargewicht: 888,8 g/mol (Str6Naph-Dibromid)

Herkunft: Dr. D. P. Zlotos (Synthese), Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe
(Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

2.1.4.3 Alcuronium und Caracurine

Der Prototyp-Modulator Alcuronium besitzt als kompetitiver Antagonist an nicotinischen ACh-Rezeptoren muskelrelaxierende Eigenschaften. Sein Verhalten gegenüber NMS an Muskarinrezeptoren ist positiv kooperativ (Jakubík et al., 1995; Proška und Tuček, 1994). Alcuronium ist strukturell nahe verwandt mit Caracurin V, das ebenfalls muskelrelaxierende Eigenschaften hat. Es stammt genau wie Caracurin VII aus der Rinde verschiedener Strychnos-Arten (Aimi, 1989). Caracurin VII ist identisch mit dem Wieland-Gumlich-Aldehyd (WGA, Bernauer et al., 1959). Es reduziert die Bindung von NMS am M₂- und M₃-Rezeptor (Jakubík et al., 2005). Caracurin V zeigt sich neutral kooperativ (Buller, 2002).

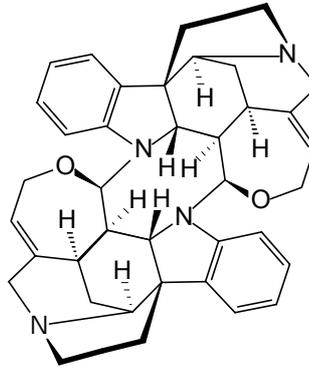
Alcuronium



Molekulargewicht: 737,8 g/mol (Alcuronium-Dichlorid)

Herkunft: Alcuronium wurde freundlicherweise von der Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Wyhlen, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

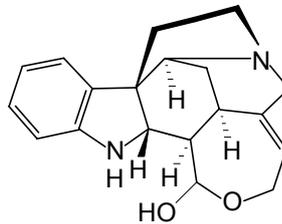
Caracurin V



Molekulargewicht: 584,8 g/mol

Herkunft: Dr. D. P. Zlotos (Synthese), Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

Caracurin VII (WGA)

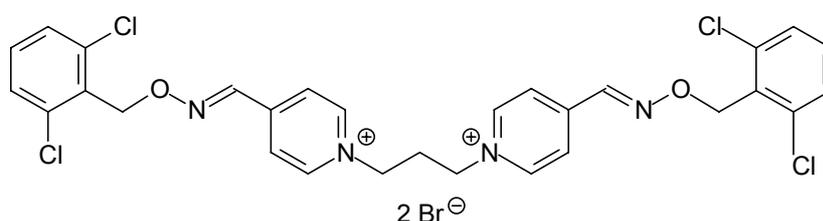


Molekulargewicht: 310,4 g/mol

Herkunft: Dr. D. P. Zlotos (Synthese), Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

2.1.4.4 Duo3

Die Bispyridinium-Verbindung Duo3 ist ein Derivat von TMB-4 (1,1'-Trimethylenbis(pyridinium-4-aldoxim)-Dibromid), welches nach Organophosphat-Vergiftungen die ACh-Esterase reaktiviert. Duo3 wird als „atypischer“ Modulator bezeichnet, da die in Radioligandbindungsstudien mit [³H]NMS aufgenommenen Konzentrations-Effekt-Kurven eine außergewöhnliche Steilheit aufweisen. Möglicherweise bindet es an andere Areale des M₂-Rezeptors als die meisten bekannten allosterischen Modulatoren (Tränkle et al., 1997). Die Kooperativität mit NMS ist negativ (Schröter et al., 2000).



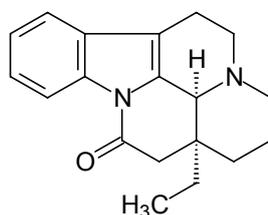
Molekulargewicht: 796,2 g/mol (Duo3-Dibromid)

Herkunft: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe

(Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

2.1.4.5 (-)-Eburnamonin

Eburnamonin ist ein Indol-Alkaloid, welches in verschiedenen Immergrünarten (z. B. *Vinca minor*, *Apocynaceae*) vorkommt. Jakubik et al. (1997) berichten von einer positiven Kooperativität von (-)-Eburnamonin mit neun Agonisten (u. a. ACh) und mit NMS an M₂-Rezeptoren.



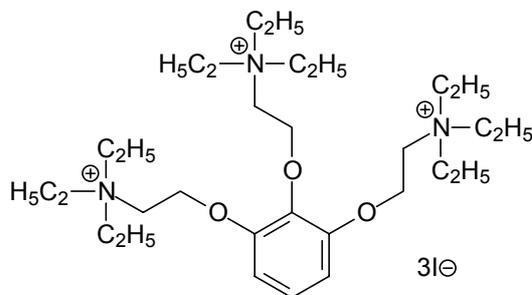
Molekulargewicht: 294,4 g/mol

Lieferant: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

Produktnummer: E-1629

2.1.4.6 Gallamin

Neben Alcuronium und W84 ist das Muskelrelaxans Gallamin ein dritter Prototyp unter den allosterischen Modulatoren (Clark and Mitchelson, 1976; Stockton et al. 1983). Gallamin zeigt eine stark ausgeprägte negative Kooperativität mit NMS (Leppik et al., 1994; Proška und Tuček, 1995).



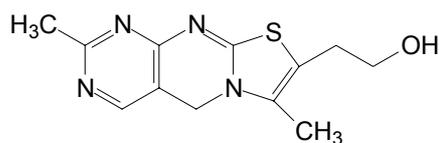
Molekulargewicht: 891,5 g/mol (Gallamin-Triiodid)

Lieferant: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

Produktnummer: G-8134

2.1.4.7 Thiochrom

Thiochrom, ein Metabolit des Thiamins (Vitamins B₁), verhält sich mit NMS an den muskarinischen Rezeptorsubtypen M₁ bis M₄ annähernd neutral bis schwach negativ kooperativ. Die Bindung von ACh bleibt an M₁ und M₃ durch Thiochrom unverändert, an M₂ wird sie verringert. An M₄-Rezeptoren ruft Thiochrom eine Erhöhung der Wirksamkeit von ACh hervor (Lazareno et al., 2004).



Molekulargewicht: 262,3 g/mol

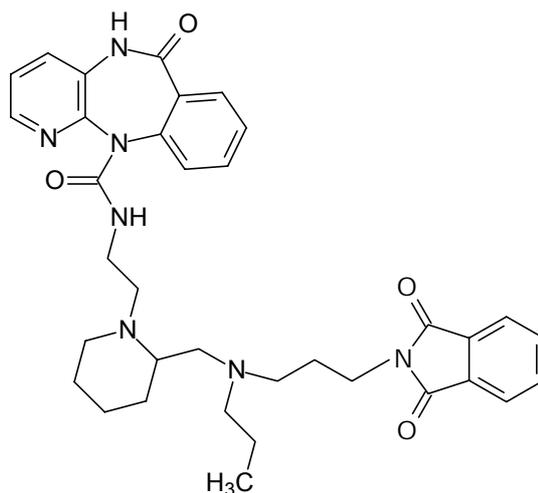
Lieferant: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

Produktnummer: T-7891

2.1.5 Orthosterisch/allosterische Hybridsubstanzen

2.1.5.1 EHW 141

Die Hybridsubstanz EHW 141 setzt sich aus dem Muskarinrezeptor-Antagonisten AF-DX 384 und einer Teilstruktur von W84 zusammen. EHW 141 verhält sich an M₂-Rezeptoren als allosterischer Modulator und ist positiv kooperativ mit NMS (Mohr, 2004).

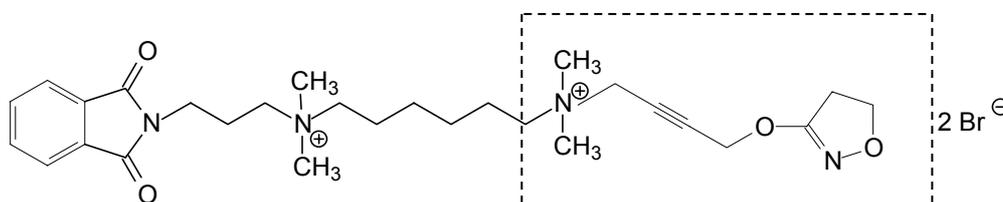


Molekulargewicht: 623,8 g/mol (Razemat)

Herkunft: Dr. E. Heller (Synthese), Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe
(Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

2.1.5.2 DDT-5

DDT-5 ist ein Hybrid aus einem agonistischen Oxotremorin M-Derivat (gestrichelte Umrandung) und einer Teilstruktur von W84.

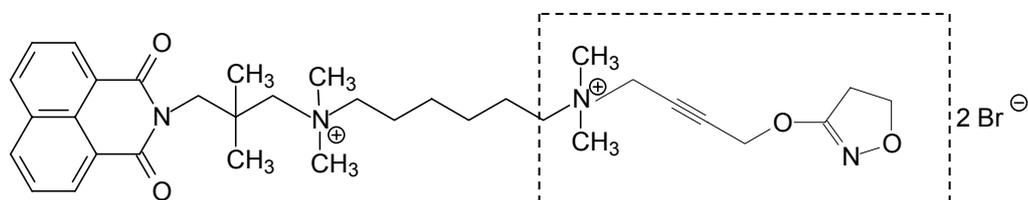


Molekulargewicht: 658,5 g/mol (DDT-5-Dibromid)

Herkunft: Arbeitskreis Prof. Dr. M. De Amici
(Pharmakologie und Toxikologie, Universität Mailand)

2.1.5.3 MM-H5-6

Die Hybridsubstanz MM-H5-6 setzt sich aus einem agonistischen Oxotremorin M-Derivat (gestrichelte Umrandung) und einer Teilstruktur von Naphmethonium zusammen.

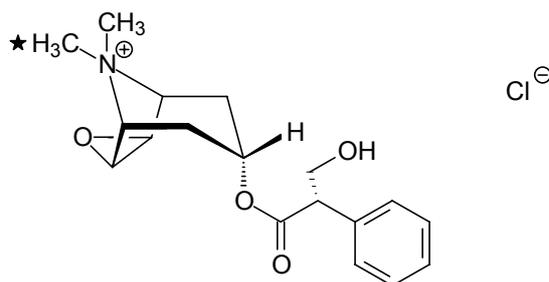


Molekulargewicht: 736,6 g/mol (MM-H5-6-Dibromid)

Herkunft: Dr. M. Muth (Synthese), Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe
(Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

2.1.6 Radioliganden

2.1.6.1 [³H]N-Methyl-(-)-Scopolamin ([³H]NMS)



Molekulargewicht: 353,8 g/mol ([³H]NMS-Chlorid)

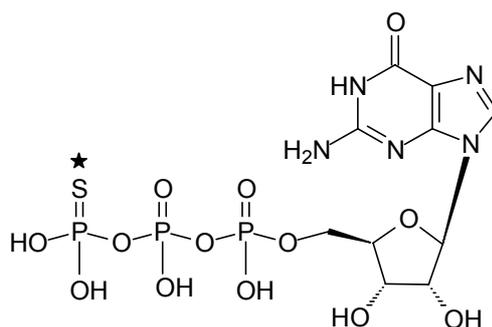
Lieferant: PerkinElmer Life Sciences (Boston, USA)

gelöst in Ethanol

★: Position der radioaktiven Markierung

spezifische Aktivität: 81 bis 84 Ci/mmol (je nach Charge)

2.1.6.2 [³⁵S]Guanosin-5'-[γ-thio]triphosphat ([³⁵S]GTPγS)



Molekulargewicht: 539,2 g/mol

Lieferant: PerkinElmer Life Sciences (Boston, USA)

gelöst in Tricin/DDT-Puffer (10 mM Tricin; 10 mM DTT; pH 7,6)

★: Position der radioaktiven Markierung

spezifische Aktivität: 1250 Ci/mmol

2.1.7 Chemikalien und Reagenzien

In der nachfolgenden Auflistung der verwendeten Chemikalien und Reagenzien ist in der rechten Spalte die Produktnummer des jeweiligen Herstellers angegeben.

Acros Organics (Geel, Belgien)

Natriumbutyrat (MG: 110,1 g/mol)

26319

Natriumchlorid (NaCl; MG: 58,4 g/mol)

207790010

Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)

Ready Protein+™

586604

Fluka (Buchs SG, Schweiz)

Saponin

84510

Grüssing GmbH (Filsum, Deutschland)

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Dinatrium-Salz

(Na₂EDTA; Maßlösung 0,1 mol/l)

20271

Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Folin-Ciocalteus Phenolreagenz

1.09001.0500

Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat (MG: 249,7 g/mol)

1.02790.0250

Natriumcarbonat (Na₂CO₃; MG: 106,0 g/mol)

1.06392.0500

Merck Biosciences GmbH (Schwalbach, Deutschland)

G 418-Sulfat (MG: 692,7 g/mol) 345810

Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland)

Natronlauge (0,1 mol/l) 35263

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

Dimethylsulfoxid (DMSO; MG: 78,1 g/mol) D-5879

Dithiothreitol (DTT; MG: 154,3) D-0632

Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)
(9,6 g Pulver zur Herstellung von 1 l Lösung) D-5652

Fetales Rinder-Serum F-7524

Guanosin-5'-diphosphat, Natriumsalz (GDP; MG: 443,2) G-7127

Guanosin-5'-[γ-thio]triphosphat, Tetralithiumsalz
(GTPγS; MG: 563,0) G-8634

HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]),
Natriumsalz (MG: 260,3 g/mol) H-7006

HEPES, freie Säure (MG: 238,3 g/mol) H-3375

Humanes Serumalbumin, Fraktion V, 96-99% Albumin A-1653

L-Glutamin-Lösung 200 mM G-7513

Magnesiumchlorid(MgCl₂)-Hexahydrat (MG: 302,3 g/mol) M-2670

Nutrient Mixture F-12 Ham N-4888

Penicillin-Streptomycin-Lösung
(Penicillin: 10.000 U/ml; Streptomycin: 10 mg/ml) P-0781

Polyethylenimin-Lösung (PEI) 50 % (g/ml),
wässrige Lösung P-3143

Tricin (N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin;
MG: 179,2 g/mol) T-0377

Trypsin-EDTA(Ethylendiamintetraessigsäure)-Lösung
(0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l Na₄EDTA) T-3924

Aqua destillata wurde mithilfe des Elix[®] Wasseraufbereitungssystem (s. 2.1.10) hergestellt. Die Herstellung von *Aqua pro analysi* erfolgte durch das Milli-Q[®] Reinstwassersystem (s. 2.1.10).

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Abgene House (Epsom, UK)

1,2 ml Storage Plate
(96-well-Mikrotiterplatten aus Polypropylen) AB-0564

Greiner Bio-One GmbH (Solingen, Deutschland)

Cellstar[®] Zellkulturschale (mit Nocken, 145 x 20 mm, steril) 639160
 Einfrierröhrchen (Cryo.s; 1 ml) 123263
 Polypropylen (PP)-Reaktionsgefäße (1,5 ml) 616201
 Zentrifugenröhrchen aus Polypropylen (50 ml; steril) 227261

Merck Labor und Chemie Vertrieb GmbH (Bruchsal, Deutschland)

Qualilab[®] Spitzenvorsatzfilter (0,22 µM CM-Membran; steril) 5122110

Nalge Nunc International (Rochester, USA)

Oak Ridge Centrifuge Tubes
 with Sealing Cap (Polycarbonat(PC)-Zentrifugenröhrchen) 3138-0050

Pechiney Plastic Packaging (Menasha, USA)

Parafilm[®] M laboratory film PM-996

PerkinElmer Life Sciences GmbH (Rodgau-Jügesheim, Deutschland)

MultiLex[™] A 1450-441
 Printed Filtermat A 1450-421
 Sample Bag 1450-432
 Plate Cassette 1450-105

Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)

Zellschaber (2-Positionen-Klinge; 25 cm) 83.1830

2.1.9 Puffer und Lösungen

2.1.9.1 Zur Verwendung bei Radioligandbindungsstudien

Tricin/DTT-Puffer (10 mM Tricin; 10 mM DTT; pH 7,6¹)

Festsubstanzen: 0,0896 g Tricin; 0,0771 g Dithiothreitol (DTT)

Lösungsmittel: 50,0 ml Aqua pro analysi

Die Pufferlösung wurde bei -20°C gelagert. DTT dient als Antioxidans z. B. zur Konservierung von Disulfid-Brücken. Tricin stabilisiert als Puffersubstanz den pH-Wert.

[³⁵S]GTPγS (0,7 nM) in Tricin/DDT-Puffer (10 mM Tricin; 10 mM DTT; pH 7,6¹)

Stammlösung: 20 μl [³⁵S]GTPγS-Lösung in Tricin/DTT-Puffer von PerkinElmer (s. 2.1.7)

Lösungsmittel: 180 μl Tricin/DTT-Puffer

Die entstandene [³⁵S]GTPγS-Lösung wurde zu je 5 μl in Polypropylen-Reaktionsgefäße (1,5 ml) aliquotiert und bei -20°C gelagert. Für jedes [³⁵S]GTPγS-Experiment wurde ein Aliquot aufgetaut und mit ca. 5 ml Inkubationspuffer verdünnt. 50 μl dieser Verdünnung wurden mit 5 ml Ready Protein+™ versetzt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mithilfe eines Szintillationszähler (Beckman Counter LS-6000 SC). Unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität von [³⁵S]GTPγS (1250 Ci/mmol) wurde die Lösung anschließend soweit mit Inkubationspuffer verdünnt, dass eine ca. 0,7 nM [³⁵S]GTPγS-Lösung entstand. Im Versuchsansatz resultierte daraus eine [³⁵S]GTPγS-Konzentration von ca. 0,07 nM.

¹ Alle pH-Werte wurden bei 25°C eingestellt.

Inkubationspuffer (12,5 mM HEPES; 12,5 mM MgCl₂; 125 mM NaCl; pH 7,4¹)

Festsubstanzen: 9,9 g HEPES-Säure; 5,4 g HEPES-Natrium; 12,7 g MgCl₂; 36,5 g NaCl

Lösungsmittel: 5 l Aqua destillata

Die Konzentrationen der Substanzen im Inkubationspuffer wurden so gewählt, dass nach Zugabe weiterer Lösungen im Versuchsansatz in allen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten folgende Endkonzentrationen resultierten: 10 mM HEPES; 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl.

Saponin-haltiger Inkubationspuffer (Saponin: 20 bzw. 100 µg/ml; pH 7,4¹)

Festsubstanz: 0,0200 g bzw. 0,1000 g Saponin

Lösungsmittel: 1 l Inkubationspuffer

GDP-Stammlösung (10 mM)

Festsubstanz: 0,0047 g GDP

Lösungsmittel: 1,0 ml Aqua pro analysi

Es wurden Aliquote von je 50 µl in PP-Reaktionsgefäße (1,5 ml) gegeben und bei -20°C gelagert.

Polyethylenimin (PEI)-Lösung 0,1 %

Stammlösung: 1,0 g PEI-Lösung 50% (g/ml)

Lösungsmittel: ad 500 g Aqua destillata

2.1.9.2 Zur Verwendung bei der Kultivierung von CHO-Zellen

Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS-Puffer; pH 7,3¹; steril; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄)

Festsubstanzen: 9,6 g Pulver für Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung

Lösungsmittel: 1 l Aqua destillata

Die Lösung wurde 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

HEPES-Stammlösung (200 mM; pH 7,4¹)

Festsubstanzen: 8,68 g HEPES-Natrium; 15,89 HEPES-Säure

Lösungsmittel: 500 ml Aqua destillata

¹ Alle pH-Werte wurden bei 25°C eingestellt.

Homogenisationspuffer (20 mM HEPES; 10 mM Na₂EDTA; pH 7,4¹)

Stammlösungen: 50 ml HEPES-Stammlösung (200mM); 50 ml Na₂EDTA-Maßlösung (100 mM)

Lösungsmittel: ad 500 ml Aqua destillata

Zentrifugationspuffer (20 mM HEPES; 0,1 mM Na₂EDTA; pH 7,4¹)

Stammlösungen: 50 ml HEPES-Stammlösung (200mM); 0,5 ml Na₂EDTA-Maßlösung (100 mM)

Lösungsmittel: ad 500 ml Aqua destillata

Butyrat-Stammlösung (100 mM)

Festsubstanz: Natriumbutyrat 5,55 g

Lösungsmittel: 500 ml Aqua destillata

G 418-Stammlösung (Wirkstärke:100 mg/ml)

Da die Wirkstärke (angegeben in: µg/mg) des Antibiotikums G 418 chargenabhängig war, musste die Einwaage zur Herstellung einer Stammlösung bei jeder Charge neu berechnet werden. Es wurde jeweils die gesamte Liefermenge (5 g) G 418 in ein PP-Zentrifugenröhrchen (50 ml) genau eingewogen und mit dem entsprechenden Volumen an Aqua destillata versetzt, so dass eine Lösung mit der Wirkstärke 100 mg/ml resultierte. Die Lösung wurde in ein weiteres PP-Zentrifugenröhrchen steril filtriert und anschließend unter aseptischen Bedingungen in PP-Reaktionsgefäße (1,5 ml) zu je 1,0 ml aliquotiert. Die Aliquote wurden bei -20°C gelagert.

¹ Alle pH-Werte wurden bei 25°C eingestellt.

Nährmedium zur Kultivierung von CHO-Zellen

Das zur Kultivierung von CHO-Zellen verwendete Nährmedium setzt sich wie folgt zusammen:

500 ml Nutrient Mixture F-12 Ham

50 ml Fetales Rinder-Serum

5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (Pen.: 10.000 U/ml; Strep.: 10 mg/ml)

3 ml L-Glutamin-Lösung 200 mM

1 ml G 418-Stammlösung (Wirkstärke: 100 mg/ml)

Als Endkonzentrationen enthält das Nährmedium 9% fetales Rinder-Serum, ca. 90 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin, 1 mM L-Glutamin und 0,2 mg/ml G 418.

2.1.10 Geräte

Beckman Coulter, Inc. (Fullerton, USA)

Beckman Counter LS-6000 SC

Ultrazentrifuge Avanti™ J-20 XP, Rotortypen: JS 4.3 bzw. JA 25.50

Biochrom, Ltd. (Cambridge, UK)

Ultrospec 3300 pro

Carl Zeiss Jena GmbH (Jena, Deutschland)

Mikroskop Axiovert 25

Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, Deutschland)

GFL 1083 Schüttelwasserbad

Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim, Deutschland)

Präzisionsküvetten 100-QS

Heraeus (Hilden, Deutschland)

Herasafe Werkbank HS 15, Klasse II

IKA® Works, Inc. (Wilmington, USA)

MS 1 Minishaker (Kleinschüttler)

Kinematica AG (Littau, Schweiz)

PCU 8S/EUD Drehzahlregler

Polytron-Homogenisator PT 10-35

Mettler-Toledo AG (Greifensee, Schweiz)

Analysenwaage AG204

Präzisionswaage PB403-S

Millipore GmbH (Schwalbach, Deutschland)

Elix[®] Wasseraufbereitungssystem

(zur Herstellung von Aqua destillata)

Milli-Q[®] Reinstwassersystem

(zur Herstellung von Aqua pro analysi)

PerkinElmer Life Sciences GmbH (Rodgau-Jügesheim, Deutschland)

1450 Microbeta[®] Trilux Liquid Scintillation & Luminescence counter

Harvesters 96[®] (Mach III M, Tomtec; Produktnr. 990607010)

Harvesters 96[®] (Mach III M, Tomtec; Produktnr. 963-589)

Sharp Electronics GmbH (Hamburg, Deutschland)

Mikrowelle R-611

Techne (Duxford, Cambridge, UK)

Dri-Block[®] DB-2A

Thermo Labsystems Oy (Helsinki, Finnland)

Finnpipette Digital (diverse Größen)

Finnpipette Stepper

ThermoForma Scientific (Marietta, USA)

ThermoForma Series II Water Jacketed CO₂ Incubator

2.1.11 Verwendete Computerprogramme

GraphPad Prism[®] Version 3.02 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)

GraphPad Prism[®] Version 4.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)

GraphPad Instat[®] Version 3.05 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)

ChemWindow[®] Version 6.0 (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, USA)

Microsoft[®] Word Version 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)

Microsoft[®] Excel Version 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, USA)

2.2 Zellkultur

Die meisten der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden an Membransuspensionen aus Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) durchgeführt, die mit dem humanen Gen für den muskarinischen M₂-Rezeptor stabil transfiziert wurden. Diese Zellen werden im Folgenden als CHO-M₂-Zellen bezeichnet. Nur ein Experiment in der vorliegenden Arbeit wurde mit Membransuspensionen aus CHO-M₄-Zellen durchgeführt, welche freundlicherweise von Dr. Dorothea Klemt (Pharmakologie und Toxikologie, Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn) überlassen wurden. Die Zelllinien wurden dankenswerterweise von Prof. Dr. G. Lambrecht (Abteilung Pharmakologie, Biozentrum Niederursel, Universität Frankfurt/Main) zur Verfügung gestellt. Da CHO-Wildtyp-Zellen keine muskarinischen Rezeptoren besitzen (Buckley et al., 1989; Eckstein, 2004), sind die in dieser Arbeit dargestellten Effekte nur auf den jeweils eingesetzten Muskarinrezeptor-Subtyp zurückzuführen. Außerdem weisen CHO-Zellen keine Cholinesterase-Aktivität auf (Lazareno und Birdsall, 1993; Gnagey und Ellis, 1996), so dass die Versuche mit ACh ohne Zugabe von Cholinesterase-Inhibitoren durchgeführt werden konnten.

2.2.1 Kultivierung von CHO-Zellen

Die Zellen wurden in Cellstar[®] Zellkulturschalen mit je 20 ml Nährmedium (s. 2.1.9.2) bei 37°C, 96% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ in einem Inkubator gezüchtet. Das Anzüchten und die Vermehrung von CHO-Zellen erfolgte unter aseptischen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom (Herasafe Werkbank HS 15, Klasse II). Nach 2-3 Tagen waren die Zellen jeweils bis zur Konfluenz (ca. 80-90% der Schale bewachsen) zusammengewachsen. Dann erfolgte eine Aufteilung der Zellen von je einer auf 4-5 Zellkulturschalen. Dabei wurde zunächst das Nährmedium abgesaugt und die noch adhärennten Zellen mit 10 ml PBS-Puffer gespült. Durch Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung lösten

sich die Zellen nach einer Inkubationszeit von ca. 5 min bei 37°C vom Boden der Schale und konnten mit 10 ml Nährmedium fast vollständig abgespült werden. Die erhaltene Zellsuspension wurde in PP-Zentrifugenröhrchen (50 ml) 4 min bei 4°C mit 900 rpm (entspricht 185 RCF: „relative centrifugal force“) in einer Ultrazentrifuge (Rotor JS 4.3) zentrifugiert. Das Pellet wurde in Nährmedium resuspendiert und gleichmäßig auf Zellkulturschalen, in denen bereits ausreichend Nährmedium vorgelegt war, verteilt. Da für eine Membranpräparation jeweils 20 Zellkulturschalen mit konfluent gewachsenen Zellen benötigt wurden, wurden die Zellen nach folgendem Schema gesplittet: 1 → 5, 5 → 21, so dass nach dem Verbrauch von 20 Schalen für die Membranpräparation wieder eine Schale für einen neuen Vermehrungszyklus bereitstand.

2.2.2 Membranpräparation

18-24 Stunden vor einer Membranpräparation wurde das Nährmedium durch ein mit Butyrat versetztes Nährmedium ausgetauscht, um den Expressionsgrad des muskarinischen M₂-Rezeptors zu erhöhen (Kruh, 1982). Dafür wurde aus Butyrat-Stammlösung (100 mM) und Nährmedium ein 5 mM Butyrat enthaltendes Nährmedium frisch hergestellt. Nach der Inkubationszeit wurde das Nährmedium abgesaugt und durch 2,4 ml Homogenisationspuffer pro Zellkulturschale ersetzt. Die Zellen wurden mithilfe eines Zellschabers von der Oberfläche gelöst und die Suspension in ein auf Eis gelagertes Polycarbonat(PC)-Zentrifugenröhrchen überführt. Jede Zellkulturschale wurde mit weiteren 1,5 ml Homogenisationspuffer gespült, die ebenfalls in das PC-Zentrifugenröhrchen überführt wurden. Es wurden jeweils 5 Zellkulturschalen gleichzeitig bearbeitet. Anschließend wurden die Zellsuspensionen in den PC-Zentrifugenröhrchen jeweils zweimal in einem Abstand von 2 min für 10 sec mithilfe des Polytron-Homogenisators (Stufe 6) homogenisiert. Es folgte eine Zentrifugation mit der Ultrazentrifuge (Rotor: JA 25.50 / 40.000 RCF/ 10 min / 2°C). Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in 10 ml Zentrifugationspuffer resuspendiert und unter den oben genannten Bedingungen erneut zentrifugiert. Der letzte Arbeitsschritt wurde wiederholt. Nach der dritten Zentrifugation wurden die Pellets in 9 ml Inkubationspuffer aufgenommen. Das erhaltene CHO-M₂-Zellhomogenat wurde zu je 500-1000 ml aliquotiert und in PP-Reaktionsgefäßen (1,5 ml) bei -80°C gelagert.

2.2.3 Einfrieren von CHO-Zellen

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Zellen für spätere Vermehrungszyklen wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dazu wurde bei einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale wie beim Split-Vorgang (s. 2.2.1) zunächst das Nährmedium abgesaugt, dann mit PBS-Puffer gespült, Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben, mit Nährmedium gespült und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 900 µl Nährmedium resuspendiert und in ein zum Gefrierschutz mit 100 µl DMSO bestücktes Einfrierröhrchen pipettiert. Um eine Schädigung der Zellen durch DMSO bei Raumtemperatur zu vermeiden, wurde das Einfrierröhrchen zügig in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.4 Auftauen von CHO-Zellen

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde das Einfrierröhrchen aufgetaut, die Zellsuspension möglichst schnell in ein PP-Zentrifugenröhrchen (50 ml) mit 10 ml Nährmedium überführt und 4 min bei 4°C mit 900 rpm (entspricht 185 RCF) in einer Ultrazentrifuge (Rotor JS 4.3) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Nährmedium resuspendiert und in eine Zellkulturschale mit 18 ml Nährmedium pipettiert. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.2.1 beschrieben kultiviert.

2.2.5 Proteingehaltsbestimmung

Der Proteingehalt der hergestellten Membransuspensionen aus CHO-Zellen wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Als Standard wurde humanes Serumalbumin verwendet. Der mittlere Proteingehalt der hergestellten CHO-M₂-Membransuspensionen betrug $2,40 \pm 0,07$ mg Protein/ml Membransuspension (Mittelwert \pm Standardfehler, n = 50).

2.3 Radioligandbindungsstudien mit [³H]NMS

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Radioligandbindungsexperimente mit [³H]NMS wurden unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt. Da die eingesetzten Liganden jeweils reversible Bindungen mit dem Rezeptor eingingen,

folgte die Bildung von Ligand-Rezeptor-Komplexen [RL] aus Ligand [L] und Rezeptor [R] dem Massenwirkungsgesetz (Bennett und Yamamura, 1985):



k_{+1} : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation

k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation

Die Geschwindigkeiten der Assoziation v_{hin} bzw. der Dissoziation $v_{\text{rück}}$ berechnen sich folgendermaßen:

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

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

Laufen Assoziation und Dissoziation mit der gleichen Geschwindigkeit ab, ändern sich die Konzentrationen der gebildeten Ligand-Rezeptor-Komplexe bzw. die des freien Liganden und Rezeptors nicht mehr. Die Reaktion befindet sich im dynamischen Gleichgewicht:

$$k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] = k_{-1} \cdot [RL] \quad (4)$$

Bildet man den Quotienten aus der Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation k_{-1} und der Geschwindigkeitskonstante der Assoziation k_{+1} , erhält man die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D :

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

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D (Einheit: mol/l) entspricht der Ligand-Konzentration, bei der die Hälfte aller Rezeptoren in Ligand-Rezeptor-Komplexen vorliegt. Je kleiner der K_D -Wert eines Liganden ist, desto höher ist seine Affinität zum Rezeptor.

2.3.1 Homologe Konkurrenz

Vor Verwendung der CHO-M₂-Zellhomogenate in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten oder weiteren [³H]NMS-Bindungsstudien wurden die Bindungseigenschaften der Homogenate mittels homologer Konkurrenzexperimente

charakterisiert. Dadurch konnte die Zahl spezifischer Bindungsstellen (B_{\max} ; entspricht der Rezeptorkonzentration) für den Muskarinrezeptor-Antagonisten [^3H]N-Methylscopolamin ($[^3\text{H}]\text{NMS}$) und dessen Affinität K_D zu diesen Bindungsstellen bestimmt werden.

2.3.1.1 Theoretische Grundlagen

Bei homologen Kompetitionsexperimenten werden Rezeptorsuspensionen mit einer konstanten Konzentration des Radioliganden und steigenden Konzentrationen eines strukturidentischen Inhibitors inkubiert, der sich nur durch die fehlende radioaktive Markierung vom Radioliganden unterscheidet. Nach Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes wird jeweils die Bindung des Radioliganden an den Rezeptor bestimmt. Die Gesamtbindung wird in Abwesenheit des Inhibitors ermittelt. Die unspezifische Bindung des Radioliganden lässt sich durch einen strukturverschiedenen, im Überschuss zugegebenen Inhibitor bestimmen, der eine Affinität zur gleichen Bindungsstelle besitzt und somit den Radioliganden aus diesen spezifischen Bindungsstellen „verdrängt“. Trägt man die gemessene Bindung des Radioliganden gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration des Inhibitors auf, resultiert eine Kurve mit sigmoidem Verlauf, die durch die „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Barlow und Blake, 1989) beschrieben wird:

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

B_{ges} :	Gesamtbindung des Radioliganden
Min:	Gesamtbindung des Radioliganden in Anwesenheit hoher Konzentrationen des Inhibitors (unteres Kurvenplateau)
Max:	Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit des Inhibitors (oberes Kurvenplateau)
IC_{50} :	Konzentration des Inhibitors, die die Bindung des Radioliganden um 50% reduziert (Wendepunkt des Sigmoids)
[X]:	Konzentration des Inhibitors
n_H :	Hill-Koeffizient (Maß für die Kurvensteilheit)

Das Steilheitsmaß dieser Gleichung entspricht dem Hill-Koeffizienten n_H in der Hill-Gleichung (Hill, 1910). Weicht der Betrag des Hill-Koeffizienten n_H nicht signifikant

von dem Wert 1 ab, deutet dies auf eine homogene Rezeptorpopulation und eine Interaktion von einem Rezeptor mit genau einem Liganden hin (Monod et al., 1965). Ist die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D des Radioliganden und die Konzentration des Radioliganden bekannt, lässt sich mit Hilfe des IC_{50} -Wertes die Affinität des Inhibitors zum unbesetzten Rezeptor bestimmen (Cheng und Prusoff, 1973):

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

K_i : Affinität des Inhibitors zum Rezeptor
 $[L]$: Konzentration des Radioliganden

Da bei der homologen Competition Radioligand und Inhibitor strukturidentisch sind und somit die gleiche Affinität zum Rezeptor besitzen, vereinfacht sich die Gleichung zu:

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

Demnach kann der K_D -Wert aus dem Wendepunkt der erhaltenen Kurve bestimmt werden. Der zweite für die Charakterisierung der Zellhomogenate wichtige Parameter, die maximale Anzahl an Bindungsstellen B_{max} , lässt sich unter Berücksichtigung der spezifischen Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Inhibitors ebenfalls mithilfe des Wendepunktes IC_{50} ermitteln (DeBlasi et al., 1989):

$$B_{max} = \frac{B_0 \cdot IC_{50}}{[L]} \quad (9)$$

B_0 : spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Inhibitors

2.3.1.2 Versuchsdurchführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in homologen Competitionsexperimenten $[^3H]NMS$ als Radioligand und unmarkiertes NMS als Kompetitor eingesetzt. Atropin diente als strukturverschiedener Inhibitor zur Bestimmung der unspezifischen Bindung von $[^3H]NMS$. Die Versuchsdurchführung erfolgte in 96-well-Mikrotiterplatten aus Polypropylen in Dreifachbestimmung. Da die Experimente zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Zellhomogenate möglichst unter den gleichen Bedingungen wie die funktionellen

[³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente ablaufen sollten, wurde dem Versuchsansatz GDP (10 μM) hinzugefügt. Der Proteingehalt der CHO-M₂-Zellhomogenate, die für die Verwendung in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten bestimmt waren, wurde wie in den funktionellen Experimenten auf 50 μg/ml eingestellt. Da in heterologen Interaktionsstudien mit [³H]NMS (s. 2.3.2) ein Förderer der [³H]NMS-Bindung eingesetzt wurde, musste der Proteingehalt der Zellhomogenate für diese Experimente auf 10 μg/ml erniedrigt werden, damit nicht eine Bindung von mehr als 10% des Radioliganden an die Membransuspension resultierte. Um in einer Versuchsreihe immer mit dem gleichen Proteingehalt zu arbeiten, wurde auch bei der Charakterisierung ein Proteingehalt von 10 μg/ml eingestellt. Es erfolgte die Zugabe der Lösungen und der Zellmembransuspension nach dem in Tabelle 1 dargestellten Schema:

zugegebene Lösung bzw. Suspension (Endkonzentration)	Lösungsmittel	Ansatz für die Gesamtbindung von [³ H]NMS	Ansatz für die [³ H]NMS-Bindung in Anwesenheit von NMS	Ansatz für die unspezifische Bindung
Aqua pro analysi	-	100 μl	50 μl	50 μl
Atropin (1 μM)	Aqua pro analysi	-	-	50 μl
NMS (div. Verdünnungen)	Aqua pro analysi	-	50 μl	-
GDP (10 μM)	Inkubationspuffer	50 μl	50 μl	50 μl
Inkubationspuffer	-	250 μl	250 μl	250 μl
[³ H]NMS (0,2 nM)	Inkubationspuffer	50 μl	50 μl	50 μl
CHO-M ₂ -Zellhomogenat (10 bzw. 50 μg Protein/ml)	Inkubationspuffer	50 μl	50 μl	50 μl

Tabelle 1: Schema für einen Versuchsansatz zur Durchführung eines homologen Wettbewerbs-experimentes. Es resultierte jeweils ein Gesamtvolumen von 500 μl. NMS wurde in den für das Experiment notwendigen Verdünnungen zugegeben. Die Endkonzentrationen im Inkubationspuffer betragen: 10 mM HEPES; 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl (pH 7,4 bei 25°C).

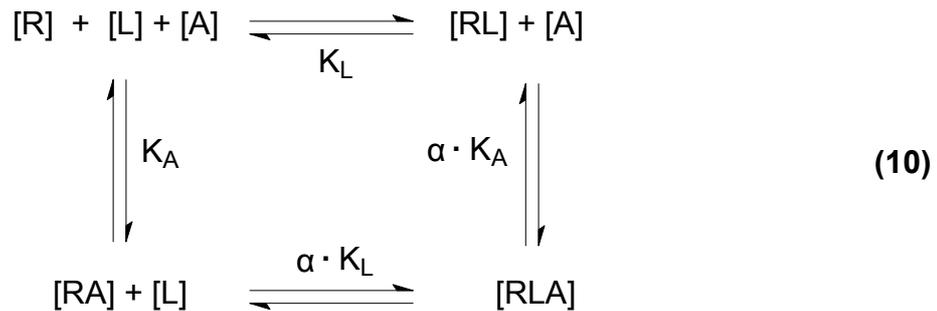
Anschließend erfolgte auf einem Kleinschüttler die Durchmischung der Ansätze in den einzelnen Bohrungen der Mikrotiterplatte, die durch Parafilm[®] M abgedichtet

war. Das Endvolumen in jeder Bohrung betrug jeweils 500 μl . Nach einer Inkubationszeit von 120 min bei 30°C im Wasserbad, wurde die Reaktion durch Filtration mit einem Harvesters 96[®] durch eine bedruckte Filtermatte beendet. Es folgten zwei Spülungen mit Aqua destillata (4°C). Die Filtermatte wurde eine halbe Stunde vor der Filtration zur Verminderung der unspezifischen Bindung in 0,1%iger Polyethylenimin(PEI)-Lösung eingelegt. Nach der Filtration erfolgte die Trocknung des Filters, zunächst auf einem Heizblock und anschließend für 3 min bei 400 W in der Mikrowelle. Mithilfe des Heizblockes wurde nachfolgend ein Szintillationswachs auf die Filtermatte aufgeschmolzen. Nach Erstarren des Wachses wurde die Filtermatte erst in eine Klarsichthülle und dann in eine Zählkassette überführt. Die Messung des gebundenen [³H]NMS erfolgte durch Zählung der radioaktiven Zerfälle im Microbeta[®] Szintillationszähler. Die Zähldauer pro Probe betrug 3 min. Die Ergebnisse wurden wie unter 2.3.1.1 beschrieben ausgewertet und K_D und B_{max} ermittelt.

2.3.2 Heterologe allosterische Interaktion

2.3.2.1 Theoretische Grundlagen

Die in dieser Arbeit untersuchte Frage nach dem Einfluss allosterisch bindender Liganden auf die Bindung von Orthosteren lässt sich mittels heterologer Interaktionsexperimente bestimmen. Die Grundlage für diese Untersuchungen bildet das ternäre Modell allosterischer Interaktionen (Ehlert, 1988a), das die Interaktion zwischen Rezeptor sowie orthosterischem und allosterischem Liganden beschreibt:



- [L]: Konzentration des ungebundenen orthosterischen Liganden
- [A]: Konzentration des ungebundenen allosterischen Liganden
- [R]: Konzentration der freien Rezeptoren
- K_L : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des orthosterischen Liganden
- K_A : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des allosterischen Liganden
- α : Kooperativitätsfaktor
- [RL], [RA], [RLA]: Konzentrationen der jeweiligen Ligand-Rezeptor-Komplexe

Bindet das Alloster an den Orthoster-besetzten Rezeptor, kann es die Affinität des Orthosters erhöhen, verringern oder unbeeinflusst lassen. Quantifiziert wird diese Affinitätsdifferenz durch den Kooperativitätsfaktor α . Die Affinität des Allosters wird dabei durch das Orthoster in dem gleichen Ausmaß beeinflusst wie die Affinität des Orthosters durch das Alloster. Bei einem Wert von $\alpha = 1$ verändert sich die Affinität nicht. Man spricht von neutraler Kooperativität. Ist $\alpha > 1$, wird zur halbmaximalen Besetzung der Rezeptoren eine höhere Ligand-Konzentration benötigt. Ein solcher Affinitätsverlust bedeutet negative Kooperativität. Eine entsprechende Affinitätszunahme wird als positive Kooperativität bezeichnet ($0 < \alpha < 1$). Auf dem ternären Modell allosterischer Interaktion beruht eine nichtlineare Regressionsanalyse, aufgrund derer sich der Kooperativitätsfaktor α und die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Allosters K_A berechnen lassen. Die entsprechende Gleichung nach Ehlert (1988a) lautet:

$$B_A = B_0 \cdot \frac{[L] + K_L}{[L] + K_L \cdot \frac{K_A + \alpha}{K_A + [A]/\alpha}} \tag{11}$$

- B_A : spezifische Bindung des orthosterischen Radioliganden in Anwesenheit des allosterischen Liganden
- B_0 : spezifische Bindung des orthosterischen Radioliganden in Abwesenheit des allosterischen Liganden

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_L entspricht der in homologen Konkurrenzexperimenten ermittelten Konstante K_D . Das Produkt aus dem Kooperativitätsfaktor α und der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_A (Affinität zum freien Rezeptor) des Allosters ergibt die Affinität des Allosters zum besetzten Rezeptor (Ellis, 1997). Bei den Experimenten muss sichergestellt sein, dass sich die Reaktion zum Zeitpunkt der Messung im Gleichgewicht befindet. Dazu wird die Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung anhand folgender Gleichung näherungsweise bestimmt (Lazareno und Birdsall, 1995):

$$t_{1/2\text{obs}} = t_{1/2\text{off}} \cdot \left(1 + \frac{[A]}{EC_{50,\text{Diss}}}\right) \quad (12)$$

- $t_{1/2\text{obs}}$: Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung
- $t_{1/2\text{off}}$: Halbwertszeit der Dissoziation des orthosterischen Liganden in Abwesenheit des Allosters (Kontrollbedingungen)
- [A]: Konzentration des allosterischen Liganden
- $EC_{50,\text{Diss}}$: Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der Dissoziation des orthosterischen Liganden führt

Für die Inkubationszeit im Versuch wurde die fünffache Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung $t_{1/2\text{obs}}$ gewählt, da angenommen wurde, dass sich die Reaktion nach dieser Zeit im Gleichgewicht befand.

2.3.2.2 Versuchsdurchführung

2.3.2.2.1 Heterologe allosterische Interaktionsexperimente mit [³H]NMS als Orthoster

In dieser Arbeit wurde in [³H]NMS-Bindungsexperimenten nur der Einfluss des allosterischen Modulators Naphmethonium (MM3a) getestet. Die Inkubationszeit berechnete sich wie in 2.3.2.1 beschrieben. Die höchste eingesetzte Naphmethonium-Konzentration war 0,3 μM . Die Dissoziationshalbwertszeit von [³H]NMS unter Kontrollbedingungen betrug 1,96 min (Valérie Strassmann, persönliche Mitteilung). Die Naphmethonium-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS führte ($EC_{50,\text{Diss}}$), lag bei 9,3 nM (Matthias Sennwitz, persönliche Mitteilung; 3 mM MgHPO_4 / 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,3, 37°C). Als fünffache Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung errechnete sich eine Inkubationszeit von 330 min. Das Schema zum Ansetzen des

Versuches entsprach dem aus Tabelle 1. Anstelle des homologen Kompetitors NMS wurden verschiedene Konzentrationen des allosterischen Modulators Naphmethonium zugegeben. Der Proteingehalt der Zellhomogenate betrug 10 µg/ml im Ansatz. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 2.3.1.2 beschrieben. Die Ergebnisse wurden nach Gleichung 11 ausgewertet und K_A und α ermittelt.

2.3.2.2.2 Heterologe allosterische Interaktionsexperimente mit [³H]NMS und ACh bzw. Pilocarpin als Orthosteren

Es sollte untersucht werden, inwieweit die in den funktionellen Experimenten erhobenen Befunde bezüglich des allosterischen Einflusses von Naphmethonium auf die ACh- bzw. Pilocarpin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung übereinstimmen mit Ergebnissen aus Radioligandbindungsstudien. Es wurden die Affinitäten von ACh und Pilocarpin in An- und Abwesenheit von Naphmethonium ermittelt. Zu einer konstanten [³H]NMS-Konzentration wurden steigende Konzentrationen an Agonist hinzugefügt und die Affinität des Agonisten indirekt über die Inhibition der [³H]NMS-Bindung bestimmt. Das Ansatzschema für die Versuche ist in Tabelle 2 abgebildet. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in 2.3.1.2 beschrieben. Die Inkubationszeit betrug 330 min (Berechnung: siehe 2.3.2.2.1). Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte zunächst mithilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 6). Anhand eines F-Tests (s. 2.5.2) wurde überprüft, ob eine biphasische Kurvenanpassung nach folgender Gleichung den Kurvenverlauf signifikant besser beschrieb:

$$B_{\text{ges}} = \text{Min} + \frac{(\text{Max} - \text{Min}) \cdot \text{Frak}_1}{(1 + 10^{[X - \log EC_{50_1}]})} + \frac{(\text{Max} - \text{Min}) \cdot (1 - \text{Frak}_1)}{(1 + 10^{[X - \log EC_{50_2}])}} \quad (13)$$

- B_{ges} : Gesamtbindung des Radioliganden
- Min: Gesamtbindung des Radioliganden in Anwesenheit hoher Konzentrationen des Agonisten (unteres Kurvenplateau)
- Max: Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit des Agonisten (oberes Kurvenplateau)
- Frak_1 : Anteil der hochaffinen Rezeptorfraktion ($0 < \text{Frak}_1 < 1$)
- EC_{50_1} : Konzentration des Agonisten, die die Bindung des Radioliganden an der hochaffinen Rezeptorfraktion um 50% reduziert (1. Wendepunkt)

Material und Methoden

EC_{50_2}: Konzentration des Agonisten, die die Bindung des Radioliganden an der niedrigaffinen Rezeptorfraktion um 50% reduziert (2. Wendepunkt)

X: dekadischer Logarithmus der Konzentration des Inhibitors

zugegebene Lösung bzw. Suspension (Endkonzentration)	Lösungsmittel	Ansatz für die Gesamtbindung von [³ H]NMS	Ansatz für die Gesamtbindung von [³ H]NMS (mit Alloster)	Ansatz für die [³ H]NMS-Bindung (mit Orthoster)	Ansatz für die [³ H]NMS-Bindung (mit Orthoster u. Alloster)	Ansatz für die unspezifische Bindung
Aqua pro analysi	-	100 µl	50 µl	50 µl	-	50 µl
Atropin (1µM)	Aqua	-	-	-	-	50 µl
Agonist (div. Verdünnungen)	Aqua	-	-	50 µl	50 µl	-
Naphmethonium (0,3 µM)	Aqua	-	50 µl	-	50 µl	-
GDP (10 µM)	IP	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Inkubationspuffer	-	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
[³ H]NMS (0,2 nM)	IP	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
CHO-M ₂ -Zellhomogenat (10 bzw. 50 µg Protein/ml)	IP	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Tabelle 2: Schema für einen Versuchsansatz zur Durchführung eines heterologen Kompetitions-experimentes mit [³H]NMS und ACh bzw. Pilocarpin in An- und Abwesenheit des allosterischen Modulators Naphmethonium. Es resultierte jeweils ein Gesamtvolumen von 500 µl. Die Agonisten wurden in den für das Experiment notwendigen Verdünnungen zugegeben. Die Endkonzentrationen im Inkubationspuffer betragen: 10 mM HEPES; 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl (pH 7,4 bei 25°C). Aqua: Aqua pro analysi; IP: Inkubationspuffer.

2.4 Funktionelle Experimente ($[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Assay)

2.4.1 Theoretische Grundlagen

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt auf Untersuchungen in $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimenten. Hierbei wird die Interaktion des Liganden mit dem G-Protein-gekoppelten M_2 -Rezeptor nicht auf der Bindungsebene (vgl. 2.3, Radioligandbindungsstudien mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$), sondern auf der ersten Stufe der funktionellen Ebene betrachtet. Durch Bindung eines Agonisten an den Rezeptor kommt es zur Bildung eines Rezeptor-G-Protein-Komplexes, woraufhin ein Austausch von GDP durch GTP (Guanosin-5'-triphosphat) erfolgt. Dadurch wird das G-Protein in den aktiven Zustand überführt und dissoziiert in eine α - und eine $\beta\gamma$ -Untereinheit, durch welche die weitere Signaltransduktion erfolgt. Durch die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit wird GTP wieder in GDP umgewandelt, was eine Reassoziierung und somit eine Deaktivierung des G-Proteins zur Folge hat (Hepler und Gilman, 1992). In dem angewandten $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Assay wurde die Agonist-induzierte Bindung des radioaktiv markierten GTP-Analogons $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ an den Rezeptor gemessen. Der Austausch eines Sauerstoffatoms des GTP am γ -ständigen Phosphatrest der Ribose durch ein Schwefelatom führt zur Stabilität des Moleküls gegenüber der GTPase-Aktivität der α -Untereinheit (Milligan, 2003). $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ bindet demnach irreversibel an die α -Untereinheit und verhindert eine Reassoziierung der Untereinheiten des G-Proteins. Um ein optimales Verhältnis von Agonist-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung und basaler Bindung zu erzielen, wurden dem Versuchsansatz GDP, Magnesium- und Natrium-Ionen zugefügt. GDP füllt leere Nukleotid-Bindungsstellen an der α -Untereinheit auf und reduziert so die basale Bindung von $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$. Außerdem vermindert GDP die Agonist-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung durch Konkurrenz mit $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$. Da GDP eine höhere Affinität zu inaktiven G-Proteinen besitzt, überwiegt der Effekt der Reduktion der basalen Bindung (Harrison und Traynor, 2003). Magnesium-Ionen erhöhen sowohl die basale als auch die Agonist-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. Hier dominiert die Steigerung der Agonist-induzierten $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (Harrison und Traynor, 2003). Natrium-Ionen binden wahrscheinlich an ein konserviertes Aspartat in der zweiten transmembranären Domäne (Horstman et

al., 1990), wodurch eine Entkopplung des G-Proteins vom Rezeptor hervorgerufen wird. Dies bedeutet eine Abnahme der basalen Bindung. Die Konzentrationen der Puffer-Zusätze sind jeweils so gewählt, dass die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung möglichst gering und die Agonist-induzierte Bindung hoch ist. Die maximale Bindung von [³⁵S]GTPγS an die G-Proteine nähert sich nach mehreren Stunden asymptotisch einem Maximum. In einigen Studien unterscheiden sich die basale und die Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Assoziation nur hinsichtlich ihrer Kinetik (Munshi et al., 1991; Negishi et al., 1993; Senogles et al., 1990), so dass der Effekt des Agonisten katalytischer Art ist. Zum Endzeitpunkt erreichen die basale und die Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung das gleiche Maximum. In anderen Studien nähert sich die [³⁵S]GTPγS-Bindung in An- und Abwesenheit eines Agonisten asymptotisch verschiedenen Maxima an (Gierschik et al., 1991; Chidiac und Wells, 1992). Onaran et al. (1993) interpretieren den Unterschied der maximalen Bindung mit einer positiven Kooperativität zwischen GTPγS und dem Rezeptor bezüglich ihrer Bindung an die α-Untereinheit. Durch Agonist-Aktivierung bindet der Rezeptor an die α-Untereinheit und erhöht so die Affinität von GTPγS für diese. Als optimaler Zeitpunkt für die Beendigung der Assoziation unter den Versuchsbedingungen dieser Arbeit hat sich eine Filtration nach 60-minütiger Inkubationszeit erwiesen (Klemt, 2005). Die Kurvenanpassung der Daten erfolgt anhand der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 6). Um Einzelexperimente zusammenzufassen und vergleichen zu können, wurde das obere Plateau der Kontrollkurve (maximale durch Agonist induzierbare [³⁵S]GTPγS-Bindung) auf 100% und das untere Plateau (basale [³⁵S]GTPγS-Bindung) auf 0% festgesetzt. Mittels eines F-Tests (s. 2.5.2) wurde bei jeder Kurve überprüft, ob eine Anpassung mit freilaufender Hill-Steigung n_H signifikant besser war als eine Anpassung mit auf 1 bzw. -1 festgesetzter Hill-Steigung.

2.4.2 Versuchsdurchführung

[³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente dienten zur Untersuchung des Einflusses verschiedener allosterischer Modulatoren auf die von Agonisten induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung. Die Versuchsdurchführung erfolgte in 96-well-Mikrotiterplatten aus Polypropylen wie unter 2.3.1.2 beschrieben. Die Filter wurden jedoch vor der Filtration in Wasser statt in PEI eingelegt, da sonst fälschlicherweise hohe Messwerte für die Blindproben entstanden wären

(Lazareno, 1999). Die Inkubationszeit betrug 60 min. Tabelle 3 zeigt das Schema, nach dem die verschiedenen Reagenzien dem Versuchsansatz hinzugefügt wurden. Der [³⁵S]GTPγS-Assay diente zur Durchführung unterschiedlicher Versuchsarten:

Beeinflussbarkeit der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung:

Abgesehen von der Bestimmung von K_D und B_{max} wurden die CHO-Zellhomogenate vor der Verwendung in weiteren Experimenten bezüglich ihrer Beeinflussbarkeit der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung getestet. Als Testliganden dienten 100 nM Oxotremorin M (Vollagonist), 1 μM Pilocarpin (Partialagonist), 1 μM Atropin (Antagonist) bzw. 100 μM Alcuronium (Alloster). Innerhalb eines Experimentes wurde jeder Wert achtfach bestimmt.

Einfluss einer Alloster-Konzentration auf die Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurve:

Es wurden jeweils Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurven in An- und Abwesenheit einer konstanten Alloster-Konzentration aufgenommen (Vierfachbestimmung).

Einfluss eines Allosters auf die maximale Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung:

Zeigte sich, dass das Alloster den Maximaleffekt des Agonisten beeinflusste, folgten zusätzliche Experimente, bei denen eine Agonist-Konzentration, die die maximale durch den Agonisten induzierbare [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorrief, mit steigenden Konzentrationen an Alloster versetzt wurde (Sechsfachbestimmung).

Inhibition des Alloster-Effektes auf die Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung durch ein weiteres Alloster:

Dieser Versuch wurde mit einer konstanten Oxotremorin M- und Naphmethonium-Konzentration und steigenden Konzentrationen an W84 durchgeführt. Um die Pufferbedingungen und das Endvolumen wie in den anderen Experimenten beizubehalten, wurde der Agonist Oxotremorin M in Inkubationspuffer gelöst und es wurden dem Versuchsansatz nur 200 μl Inkubationspuffer hinzugefügt.

Einfluss von Saponin auf die ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung:

Zur Testung des Effektes von Saponin (Endkonzentration: 10 bzw. 50 µg/ml) auf die ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung, wurde Saponin-haltiger Inkubationspuffer (s. 2.1.9.1) verwendet.

Zur Bestimmung der unspezifischen [³⁵S]GTPγS-Bindung wurden zum Ansatz für die basale Bindung 50 µl unmarkiertes GTPγS (Endkonzentration: 10 µM) hinzugefügt. Die unspezifische Bindung betrug ca. 23% der basalen Bindung. Da CHO-Zellen keine Cholinesterase-Aktivität besitzen (Lazareno und Birdsall, 1993; Gnagey und Ellis, 1996), konnten Experimente mit ACh ohne Zugabe von Cholinesterase-Inhibitoren durchgeführt werden.

zugegebene Lösung bzw. Suspension (Endkonzentration)	Lösungsmittel	Ansatz für die basale [³⁵ S]GTPγS-Bindung	Ansatz für die basale [³⁵ S]GTPγS-Bindung in Anwesenheit von Alloster	Ansatz für die Agonist-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	Ansatz für die Agonist-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung moduliert durch Alloster
Aqua pro analysi	-	100 µl	50 µl	50 µl	-
Agonist	Aqua	-	-	50 µl	50 µl
Alloster	Aqua	-	50 µl	-	50 µl
GDP (10 µM)	IP	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Inkubationspuffer	IP	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
[³⁵ S]GTPγS (0,07 nM)	IP	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
CHO-M ₂ -Zellhomogenat (50 µg Protein/ml)	IP	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Tabelle 3: Schema für einen Versuchsansatz zur Durchführung eines [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimentes. Es resultierte jeweils ein Gesamtvolumen von 500 µl. Der Agonist wurde in den für das Experiment notwendigen Verdünnungen zugegeben. Die Endkonzentrationen im Inkubationspuffer betragen: 10 mM HEPES; 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl (pH 7,4 bei 25°C). Aqua: Aqua pro analysi; IP: Inkubationspuffer.

2.4.3 Analyse des antagonistischen Verhaltens der Testsubstanzen

Wenn die eingesetzten Testsubstanzen die Konzentrations-Effekt-Kurven der Agonist-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung nach rechts verschoben, wurde das antagonistische Verhalten der Testsubstanz näher klassifiziert. Dazu erfolgte eine Transformierung der Daten der Konzentrations-Effekt-Kurven, die eine Auswertung anhand einer Schild-Auftragung ermöglichte. Es wurde jeweils aus dem Wendepunkt der Agonist-Kontrollkurve (in Abwesenheit von Testsubstanz; EC_{50_Kontrolle}) und dem Wendepunkt einer mit einer Konzentration der Testsubstanz versetzten Konzentrations-Effekt-Kurve (EC_{50_Testsubstanz}) ein sogenannter Verschiebungsfaktor (VF) berechnet:

$$VF = \frac{EC_{50_Testsubstanz}}{EC_{50_Kontrolle}} \quad (14)$$

Der dekadische Logarithmus aus der Differenz VF-1 wurde gegen den dekadischen Logarithmus der Testsubstanz aufgetragen. Die Kurvenanpassung für kompetitiven Antagonismus erfolgte mittels einer Gleichung von Arunlakshana und Schild (1959):

$$\log (VF - 1) = pK_A + s \cdot \log [A] \quad (15)$$

- pK_A: negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die zu einer 50%-igen Besetzung freier Rezeptoren führt (Affinität zum freien Rezeptor; in der Literatur häufig auch als pK_B bezeichnet)
- s: Steigung der Regressionsgeraden (Schild-Steigung)
- [A]: Konzentration der Testsubstanz

Der Schnittpunkt mit der X-Achse (pA₂) stellt den negativen dekadischen Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz dar, die zu einer Verschiebung des Wendepunktes der Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurve um den Faktor 2 (VF = 2) führt. Sind die Konzentrations-Effekt-Kurven parallel verschoben (s. 2.4.4) und hat die Schild-Gerade eine Steigung von s = 1, ist die Interaktion zwischen Agonist und Testsubstanz kompetitiver Art und es gilt:

$$pA_2 = pK_A \quad (16)$$

Bei kompetitivem Antagonismus lässt sich also die Affinität der Testsubstanz zum freien Rezeptor pK_A (in der Literatur häufig auch als pK_B bezeichnet) durch den Schnittpunkt der Schild-Geraden mit der x-Achse bestimmen. Da von den meisten in dieser Arbeit untersuchten Testsubstanzen bekannt ist, dass sie die Dissoziation des Antagonisten NMS vom M_2 -Rezeptor verzögern und dies als ein deutliches Zeichen für die allosterische Wirksamkeit der jeweiligen Substanz an dem untersuchten Rezeptor gilt (Lazareno et al., 2000), wurden die Werte in der Schild-Auftragung in der Regel nach einer Gleichung für allosterischen Antagonismus (Lanzafame et al., 1996; Gleichung 17) ausgewertet, die auf dem ternären Modell allosterischer Interaktionen von Ehlert (Gleichung 10) basiert:

$$VF - 1 = \frac{\alpha - 1}{(\alpha \cdot K_A/[A] + 1)} \quad (17)$$

α : Kooperativitätsfaktor

Mithilfe dieser Gleichung ließ sich sowohl der pK_A -Wert als auch der Kooperativitätsfaktor α (vgl. 2.3.2.1) bestimmen. Graphisch lässt sich der pK_A -Wert durch den Schnittpunkt der Kurve mit der Abszisse darstellen. Der negative Logarithmus des Kooperativitätsfaktors für die Interaktion zwischen orthosterischem und allosterischem Liganden ($p\alpha$) kann durch den maximalen Verschiebungsfaktor (genauer: $\log(VF - 1)$) abgeschätzt werden (Ehlert, 1988a). Die Summe aus $p\alpha$ und pK_A stellt die Bindungsaffinität der Testsubstanz zum Agonist-besetzten Rezeptor dar (Ellis, 1997). Kam es zur Bildung ternärer Komplexe, zeigte sich dies bei den Konzentrations-Effekt-Kurven durch eine in hohen Konzentration sättigbare Rechtsverschiebung und möglicherweise durch eine Modulation des Agonist-induzierten Maximaleffektes in Anwesenheit von Testsubstanz. In der Schild-Auftragung wurde der allosterische Antagonismus dadurch deutlich, dass eine Kurve resultierte, die anfänglich eine lineare Steigung von 1 aufwies und in hohen Konzentrationen abflachte (Kenakin, 1997b; Lanzafame et al., 1996). Als Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Gleichungen von Arunlakshana und Schild (1959) und von Lanzafame et al. (1996) muss der Effekt des Agonisten in An- und Abwesenheit des Antagonisten proportional zur Rezeptorbesetzung sein. Dies ist gegeben, wenn die Kurven parallel (mit der gleichen Kurvensteigung) nach rechts verschoben sind (s. 2.4.4)

und der Maximaleffekt des Agonisten durch den Antagonisten nicht beeinflusst wird. Kann eine Rezeptorreserve ausgeschlossen werden, verändert sich auch bei einer Beeinflussung des Maximaleffektes die Anzahl der besetzten Rezeptoren nicht. Der Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve spiegelt dann jeweils die halbmaximale Rezeptorbesetzung wieder. Eine Rezeptorreserve bedeutet, dass bei einer großen Rezeptordichte schon die Besetzung eines Teils der Rezeptoren durch einen Agonisten zu einer maximalen G-Protein-Aktivierung führt.

2.4.4 Test auf Parallelverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven

Eine Parallelverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven, d. h. eine Verschiebung der Kurven ohne Beeinflussung des Steigungsmaßes, ist sowohl eine Voraussetzung für die Auswertung nach Arunlakshana und Schild (1959, Gleichung 15) als auch für die Auswertung nach Lanzafame et al. (1996, Gleichung 17). Der Test auf Parallelverschiebung erfolgte nach einer von Lew and Angus beschriebenen Methode (1995). Es wurde ein gemeinsamer F-Test (s. 2.5.2) für alle durch eine Testsubstanz verschobenen Konzentrations-Effekt-Kurven (incl. Kontrollkurve) durchgeführt, bei dem überprüft wurde, ob für die Gesamtheit der Kurven eine Anpassung mit auf $n_H = 1$ festgesetzter Hill-Steigung möglich war. War eine Anpassung mit freilaufenden, individuellen Steigungen für jede Kurve signifikant besser, wurde der Mittelwert aus den Werten der freilaufenden Steigungen aller Kurven gebildet, und alle Kurven mit diesem mittleren Steigungswert angepasst. Anschließend wurde mittels eines F-Tests (wie oben beschrieben) erneut überprüft, ob mit diesem Hill-Koeffizienten eine Parallelverschiebung gegeben war.

2.4.5 Berechnung des prozentualen Anteils an ternären Komplexen bei gegebenen Agonist- und Alloster-Konzentrationen

Um einschätzen zu können inwieweit eine Modulation der maximalen Agonist-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung auf der Bildung ternärer Komplexe beruht, wurde der Anteil ternärer Komplexe an der im Versuchsansatz vorliegenden Gesamtheit an M₂-Rezeptoren R_T nach einer Gleichung von Ehlert (1988a) berechnet:

$$\frac{[XRA]}{[R_T]} = \frac{[X]}{[X] + \alpha K_X + \alpha [X]K_A/[A] + \alpha K_A K_X/[A]} \quad (18)$$

[XRA]: Konzentration ternärer Komplexes aus Agonist, Rezeptor und Alloster

[X]: Konzentration des Agonisten

[A]: Konzentration des Allostere

K_X : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Agonisten

K_A : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Allostere

Der Quotient $[XRA]/[R_T]$ lässt sich auch aus einem anderen Zusammenhang, den Ehlert (1988a) darstellt, ableiten. Allgemein gilt für [XRA]:

$$[XRA] = \frac{[XR][A]}{\alpha K_A} \quad (19)$$

R_T setzt sich zusammen aus:

$$[R_T] = [R] + [XR] + [RA] + [XRA] \quad (20)$$

Unter der Annahme, dass die Konzentration des Agonisten [X] sehr groß ist, können die freien Rezeptoren [R] und die nur mit Alloster besetzten Rezeptoren [RA] vernachlässigt werden, so dass sich Gleichung 20 vereinfacht zu:

$$[R_T] = [XR] + [XRA] \quad (21)$$

Der Anteil ternärer Komplexe an der Gesamtrezeptorzahl lässt sich also darstellen durch:

$$\frac{[XRA]}{[R_T]} = \frac{[XRA]}{[XR] + [XRA]} \quad (22)$$

Durch Einsetzen von Gleichung 19 in Gleichung 22 ergibt sich:

$$\frac{[XRA]}{[R_T]} = \frac{[A]}{\alpha K_A + [A]} \quad (23)$$

2.5 Statistische Methoden

2.5.1 Vergleich von Mittelwerten

Die in dieser Arbeit angegebenen Mittelwerte wurden als arithmetisches Mittel \bar{x} berechnet:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (24)$$

n: Anzahl der Messwerte

x_i : Einzelmesswert

Die Streuung der Daten wird jeweils als Standardfehler des Mittelwertes (SEM, engl.: standard error of the mean) angegeben:

$$\text{SEM} = \frac{\text{SD}}{\sqrt{n}} \quad (25)$$

Dabei bezeichnet SD die Standardabweichung (engl.: standard deviation):

$$\text{SD} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (26)$$

Der Vergleich zweier Mittelwerte \bar{x}_1 und \bar{x}_2 wurde anhand eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests mithilfe des Computerprogramms GraphPad InStat® durchgeführt (Signifikanzniveau: $p < 0,05$). Dabei wurde zunächst per F-Test (s. 2.5.2) überprüft, ob sich die Standardabweichungen der Mittelwerte signifikant unterschieden. War dies der Fall, wurde eine Modifikation des t-Tests nach Welch durchgeführt. Wurden mehrere Mittelwerte jeweils mit einer Kontrolle verglichen, wurde der Dunnett t-Test angewendet, um einen durch Mehrfachtestung der Kontrolle entstehenden Fehler auszugleichen. Denn bei der Durchführung mehrerer Vergleiche ist die Wahrscheinlichkeit, einen Fehler 1. Art zu machen (etwas fälschlicherweise als signifikant anzusehen), insgesamt größer als 5% (Dunnett, 1955; Ludbrook, 1991; Motulsky, 1995).

2.5.2 Vergleich verschiedener Modelle zur Datenanpassung

Der Auswertung der Daten liegen verschiedene Modelle zur Kurvenanpassung zugrunde, die durch mathematische Gleichungen beschrieben werden. Mittels eines F-Test kann statistisch geprüft werden, welches Modell die Daten am besten beschreibt (Motulsky und Christopoulos, 2003). Dafür müssen zunächst die Anzahl der Freiheitsgrade und die Summe der Fehlerquadrate für beide Kurvenanpassungen ermittelt werden. Die Anzahl der Freiheitsgrade FG wird durch die Anzahl der Variablen V einer Gleichung sowie die Anzahl der Messpunkte N bestimmt:

$$FG = N - V \quad (27)$$

Die Summe der Fehlerquadrate SS wird wie folgt berechnet:

$$SS = \sum_{i=1}^n (Y_i - R_i)^2 \quad (28)$$

Y_i : Messwert für die Zielvariable

R_i : durch Regressionsanalyse errechneter Wert für die Zielvariable

Bei gleicher Anzahl an Variablen werden die mathematischen Modelle nicht durch einen F-Test miteinander verglichen. Die bessere Kurvenanpassung liefert das Modell mit der kleineren Summe der Fehlerquadrate. Haben die beiden Gleichungen jedoch eine unterschiedliche Variablenzahl, wird per F-Test überprüft, ob die Einführung einer zusätzlichen Variablen (z. B. freilaufende Hill-Steigung n_H) die Summe der Fehlerquadrate überproportional reduzieren kann. Durch den F-Test werden die Summe der Fehlerquadrate sowie die Anzahl der Freiheitsgrade des einfacheren Modells in ein Verhältnis zum komplexeren Modell gesetzt:

$$F = \frac{(SS_1 - SS_2)/(FG_1 - FG_2)}{SS_2/FG_2} \quad (29)$$

SS_1/DF_1 : Summe der Abstandsquadrate/Freiheitsgrade des einfacheren Modells
(weniger Variablen)

SS_2/DF_2 : Summe der Abstandsquadrate/Freiheitsgrade des komplexeren Modells
(mehr Variablen)

Liegt der errechnete F-Wert oberhalb eines tabellierten Wertes oder ist er mit diesem identisch, so ergibt die Gleichung mit zusätzlichen Variablen eine signifikant bessere Kurvenanpassung. Ansonsten wird das einfachere Modell gewählt. Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ festgelegt.

2.5.3 Korrelation

Mittels Korrelationsanalyse (GraphPad Prism[®] Version 3.02) wurde überprüft, ob es einen linearen Zusammenhang zwischen der Kooperativität ($p\alpha$) der Allosteren mit den verschiedenen Orthosteren gibt. Die Kooperativität stellt den Affinitätsunterschied zwischen der Affinität des Allostere zum freien (pK_A) bzw. Orthosterbesetzten ($p(\alpha \cdot K_A)$) Rezeptor dar. Vergleicht man die $p\alpha$ -Werte eines Allostere aus der Interaktion mit unterschiedlichen Orthosteren, lässt sich erkennen, inwieweit jedes Orthoster die Affinität des Allostere beeinflusst. Da nicht davon ausgegangen werden kann, dass die $p\alpha$ -Werte der untersuchten Allosteren einer Gauß-Verteilung unterliegen, wurde eine Korrelations-Analyse nach Spearman durchgeführt. Der Spearman-Korrelationskoeffizient r gibt an, in welchem Ausmaß die eine Variable die Werte der anderen Variable bestimmt (Motulsky, 1995). r kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Ist r genau 1 bzw. -1, liegt eine perfekte positive bzw. negative Korrelation vor. Bei $r = 0$ korrelieren die Variablen überhaupt nicht miteinander. Der Korrelationskoeffizient liefert jedoch keine Aussage über die Kausalität der Korrelation. Im Rahmen der Korrelationsanalyse wird außerdem ein P-Wert bestimmt. Nimmt der P-Wert einen Wert kleiner als 0,05 an, ist es wahrscheinlich, dass die Korrelation der Daten nicht zufällig ist.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der CHO-M₂-Zellhomogenate

3.1.1 [³H]NMS-Bindungsexperimente: Homologe Konkurrenz

Bevor die Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen in [³⁵S]GTP γ S-Experimenten bzw. in weiteren [³H]NMS-Bindungsexperimenten eingesetzt wurden, erfolgte mittels homologer Konkurrenzexperimente mit dem muskarinischen Antagonisten *N*-Methylscopolamin (NMS) und dem radioaktiv markierten Analogon [³H]NMS eine Charakterisierung der Bindungseigenschaften. Die Analyse der Daten (vgl. 2.3.1) lieferte die Rezeptorkonzentration (Gesamtzahl der NMS-Bindungsstellen: B_{max}) und die Affinität von NMS zum muskarinischen M₂-Rezeptor (K_D). In Abbildung 3 ist eine repräsentative Kurve einer homologen Konkurrenz dargestellt.

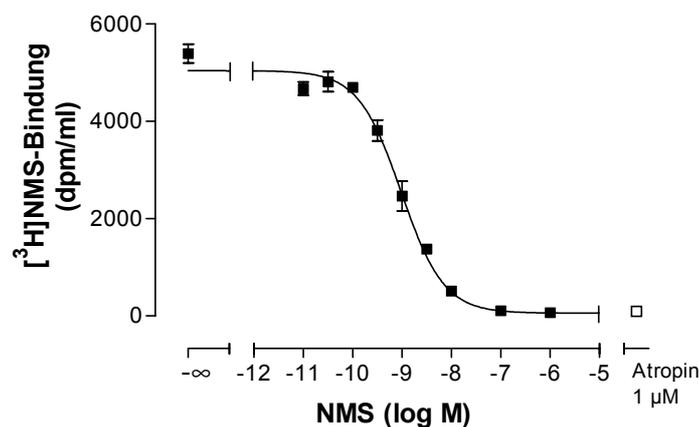


Abbildung 3: Repräsentatives Experiment einer homologen Konkurrenz von [³H]NMS (0,2 nM) mit steigenden Konzentrationen nicht radioaktiv-markiertem NMS. **Ordinate:** [³H]NMS-Bindung in dpm/ml. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von NMS. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = -1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler eines Experimentes in Dreifachbestimmung. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 1 μ M Atropin bestimmt (offenes Symbol).

Die Versuchsdurchführung erfolgte wie unter 2.3.1.2 beschrieben. Die Daten wurden mithilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ ausgewertet. Ergab ein F-Test (s. 2.5.2), dass das Steigungsmaß nicht signifikant verschieden von $n_H = -1$ war, konnte davon ausgegangen werden, dass jeweils ein Ligand- mit einem Rezeptormolekül interagiert (Monod et al., 1965). Somit konnte anhand der Menge an gebundenem Radioligand die Zahl an Rezeptoren im Versuchsansatz berechnet werden. Die Hill-Steigung der in Abbildung 3 dargestellten Kompetitionskurve eines repräsentativen Experimentes war mit $n_H = -1,03 \pm 0,06$ nicht signifikant unterschiedlich von $n_H = -1$. Die in diesem Experiment ermittelte M_2 -Rezeptorkonzentration B_{max} betrug 2437 fmol/mg Protein. Die Affinität von NMS zu den Rezeptoren lag bei $pK_D = 9,1$. Die unspezifische Bindung (bestimmt in Anwesenheit von 1 μM Atropin) machte 1,9 % der Gesamtbindung aus.

Tabelle 4 zeigt die Mittelwerte für pK_D und B_{max} aller in dieser Arbeit eingesetzten CHO- M_2 -Zellmembransuspensionen.

Zellhomogenat	pK_D	B_{max} (fmol/mg Protein)	Anzahl untersuchter Homogenate
CHO M_2	$9,03 \pm 0,04$	5101 ± 449	50

Tabelle 4: Charakteristische Bindungsparameter der eingesetzten CHO- M_2 -Zellmembransuspensionen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus allen verwendeten Zellhomogenaten \pm Standardfehler.

pK_D : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von NMS (Affinität von NMS zum muskarinischen M_2 -Rezeptor).

B_{max} : maximale Anzahl spezifischer Bindungsstellen für NMS.

Der Mittelwert aller eingesetzten CHO- M_2 -Membransuspensionen für die Affinität von NMS zum M_2 -Rezeptor betrug $pK_D = 9,03 \pm 0,04$ ($n = 50$). Ebenfalls an CHO- M_2 -Zellhomogenaten fanden Tränkle et al. (2003) einen pK_D von 9,54, Jakubík et al. (1995) einen pK_D von 9,74. Diese wichen vermutlich aufgrund unterschiedlicher Puffer- und Temperaturbedingungen signifikant von dem Wert dieser Arbeit ab (t-Test, $p < 0,05$). An anderen Präparaten, die den M_2 -Rezeptor enthielten, wurden u. a. noch folgende pK_D -Werte bestimmt: 9,38 (Proška und Tuček, 1995; Homogenate aus Rattenherz-Vorhöfen) sowie 9,32 (Membranen von Meer-

schweinchenherzen; Mohr et al., 2004) und 9,46 (Schweineherz-Homogenate; Mohr et al., 2004).

3.1.2 Beeinflussbarkeit der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung

Eine weitere Charakterisierung der CHO-M₂-Zellhomogenate erfolgte in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten. Es wurde überprüft, inwieweit die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung, d. h. die spontane Bindung von [³⁵S]GTPγS an das G-Protein in Abwesenheit von Testsubstanz durch verschiedene muskarinische Liganden beeinflussbar war. Als Testsubstanzen wurden eingesetzt Oxotremorin M als Vollagonist, Pilocarpin als Partialagonist, Alcuronium als allosterischer Modulator und Atropin als Antagonist an muskarinischen M₂-Rezeptoren. Die Konzentrationen der Testsubstanzen wurden jeweils so gewählt, dass im Versuchsansatz eine Rezeptorsättigung vorlag, d. h. dass der maximale Effekt der Testsubstanz im [³⁵S]GTPγS-Experiment erreichbar war. Die Versuchsdurchführung ist in 2.4.2 beschrieben. In Abbildung 4 sind die Effekte der Testsubstanzen als Prozentsatz der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung dargestellt. Die Mittelwerte resultierten aus den Ergebnissen aller in dieser Arbeit eingesetzten Zellhomogenate. Die absoluten Werte für die basale Bindung lagen vorwiegend im Bereich von 1000 bis 2000 cpm.

Ergebnisse

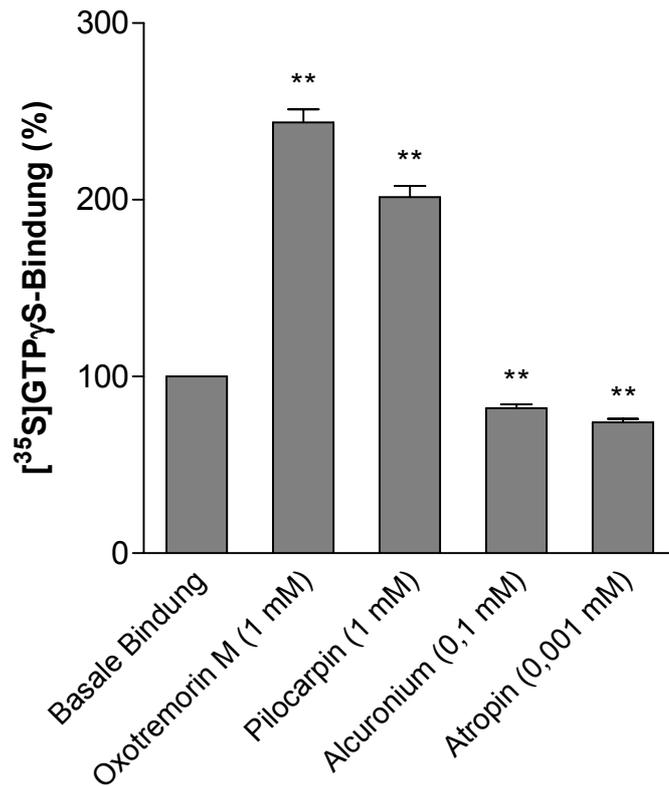


Abbildung 4: Einfluss muskarinischer Liganden in rezeptorsättigenden Konzentrationen auf die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung (Zahlenwerte s. Tabelle 5). **Ordinate:** [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent; basale [³⁵S]GTPγS-Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz = 100%. **Abszisse:** Testsubstanzen. Dargestellt sind Mittelwerte aller in dieser Arbeit eingesetzten CHO-M₂-Zellhomogenate ± Standardfehler (n = 50; jeweils Achtfach-Bestimmung).

** signifikanter Unterschied zum Wert der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung (100 %; t-Test, p < 0,01).

Zell-homogenat	Basale Bindung (%)	Effekt von Oxotremorin M 1 mM (%)	Effekt von Pilocarpin 1 mM (%)	Effekt von Alcuronium 0,1 mM (%)	Effekt von Atropin 0,001 mM (%)
CHO M ₂	100	244 ± 8**	202 ± 6**	82 ± 2**	74 ± 2**

Tabelle 5: Einfluss muskarinischer Liganden in rezeptorsättigenden Konzentrationen auf die spontane [³⁵S]GTPγS-Bindung. Die Effekte der Testsubstanzen sind dargestellt als Prozentsatz der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz. Angegeben sind Mittelwerte aller in dieser Arbeit eingesetzten CHO-M₂-Zellhomogenate ± Standardfehler (n = 50; jeweils Achtfach-Bestimmung).

** signifikante Abweichung vom Wert der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung (100 %; t-Test, p < 0,01).

Alle vier eingesetzten Liganden übten einen signifikanten Effekt auf die spontane [³⁵S]GTPγS-Bindung aus (t-Test, p < 0,01). Der durch Pilocarpin erreichte Maximaleffekt war signifikant geringer als der von Oxotremorin M (t-Test, p < 0,01). Pilocarpin war bereits als Partialagonist und Oxotremorin M als Vollagonist am M₂-Rezeptor bekannt (McKinney et al., 1991; Vogel et al., 1997; Zahn et al., 2002). Die Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit erlaubten es also, zwischen Partial- und Vollagonisten zu differenzieren. Durch den allosterischen Modulator Alcuronium und den orthosterischen Antagonisten Atropin wurde die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung signifikant gesenkt (t-Test, p < 0,01). Von Zahn et al. (2002) und Jakubík et al. (1996) wurden sie dementsprechend als inverse Agonisten bezeichnet.

Wie in Abbildung 4 ersichtlich ist, unterlag das „Messfenster“, welches die Agonisten durch ihren Maximaleffekt aufspannten, gewissen Streuungen, die u. a. durch kleine Abweichungen im Waschvorgang während der Filtration oder in der Inkubationszeit verursacht sein könnten (Lazareno, 1999). Um Experimente, die unabhängig voneinander durchgeführt wurden, miteinander vergleichen und zusammenfassen zu können, wurde daher bei Untersuchungen von Konzentrations-Effekt-Kurven das untere Plateau der Kontrollkurve (entspricht der basalen Bindung) auf 0% festgelegt und das obere Plateau (entspricht dem Maximaleffekt des jeweils untersuchten Agonisten) auf 100%. Das Messfenster, welches die inversen Agonisten nach unten öffneten, war mit ca. 20 % zu klein, um konzentrationsabhängige Untersuchungen dieses Effektes durchzuführen.

3.2 Voruntersuchungen für die [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente

3.2.1 Einfluss von Saponin auf die ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Für die Messung des Effektes von Testsubstanzen auf die Konzentrations-Effekt-Kurven von Agonisten im [³⁵S]GTPγS-Experiment war ein möglichst großer Unterschied zwischen basaler und Agonist-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung von Vorteil. Ein großes Messfenster führte zu kleineren Streuungen und somit zu

eindeutigeren Ergebnissen. Lazareno (1999) beschrieb, dass die Zugabe des permeabilisierenden Agens Saponin (10 µg/ml bzw. ~1:1 Saponin/Membranprotein) das Signal-Rausch-Verhältnis vergrößerte, ohne die pharmakologischen Eigenschaften einer Membranpräparation wesentlich zu beeinflussen. Die pharmakologischen Parameter selbst könnten jedoch verändert sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, inwieweit sich die Zugabe von 10 µg/ml bzw. 50 µg/ml Saponin (Konzentration im Reaktionsansatz) auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von ACh auswirkte (Abbildung 5; Versuchsdurchführung: s. 2.4.2). Die Daten wurden mithilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 6) ausgewertet.

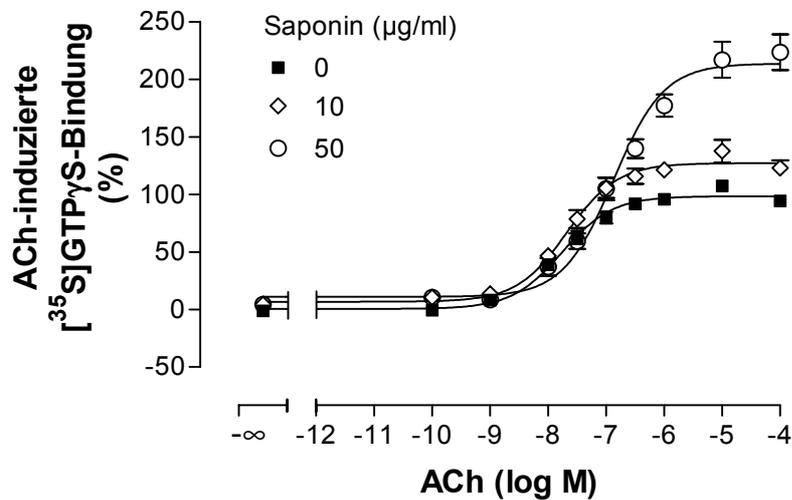


Abbildung 5: Einfluss von Saponin auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4-5 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: n = 9) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Saponin- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	Saponin 10 µg/ml	Saponin 50 µg/ml
pEC ₅₀	7,76 ± 0,07	7,67 ± 0,06	6,87 ± 0,08**
Max (%)	98 ± 2	127 ± 3**	214 ± 7**
Min (%)	0 ± 3	7 ± 3	11 ± 5
n _H (frei- laufend)	0,79 ± 0,11	0,87 ± 0,12	0,67 ± 0,03 [#]
n	9	5	4

Tabelle 6: Kenngrößen (± Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 5 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss von Saponin (10 bzw. 50 µg/ml). pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,01).

[#] signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05).

Durch den Zusatz von 10 µg/ml Saponin zum Versuchsansatz fand zwar eine signifikante Steigerung der maximalen ACh-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung auf 127 ± 3% statt, diese Steigerung brachte jedoch keinen experimentellen Vorteil hinsichtlich der Verkleinerung der Streuung des Mittelwertes. Der Wendepunkt der Kurve blieb durch diese Saponin-Konzentration unbeeinflusst. Eine Konzentration von 50 µg/ml Saponin rief eine Erhöhung des ACh-induzierten Maximums auf 214 ± 7% hervor und verschob die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve signifikant um etwa eine Dekade nach rechts.

Zur Überprüfung, ob allosterische Modulatoren in Anwesenheit von Saponin den gleichen Effekt auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve zeigten wie unter Versuchsbedingungen ohne Saponin, wurden Experimente mit dem Alloster Naphmethonium (MM3a) in Konzentrationen von 1 bzw. 100 µM durchgeführt (Abbildung 6).

Ergebnisse

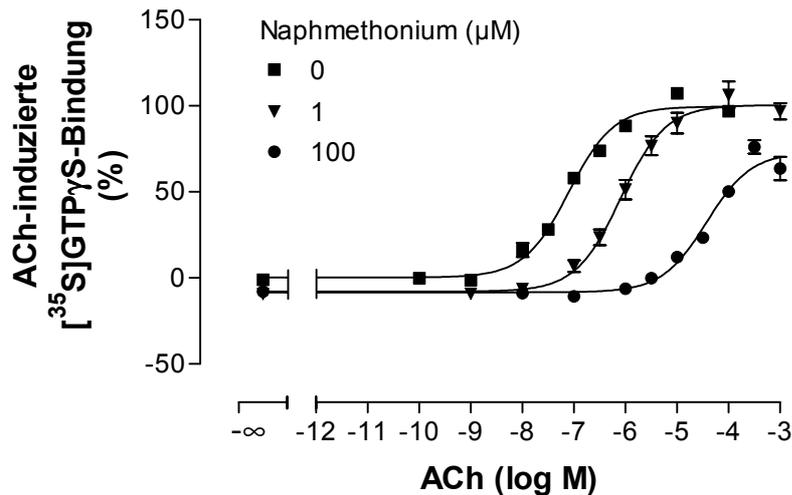


Abbildung 6: Einfluss von Naphmethonium auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve in Anwesenheit von 50 $\mu\text{g/ml}$ Saponin. **Ordinate:** ACh-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 5$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Naphmethonium- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	Kontrolle	Naphmethonium 1 μM	Naphmethonium 100 μM
pEC_{50}	7,10 $\pm 0,08$	6,09 $\pm 0,05^{**}$	4,43 $\pm 0,12^{**}$
Max (%)	100 ± 3	101 ± 2	$73 \pm 5^{**}$
Min (%)	0 ± 3	-8 ± 2	-8 ± 3
n_H (frei- laufend)	0,81 $\pm 0,11$	0,89 $\pm 0,08$	1,02 $\pm 0,27$
n	5	3	2

Tabelle 7: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 6 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von Naphmethonium. pEC_{50} , Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (**freilaufernd**): freilaufender Hill-Koeffizient.

n : Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, $p < 0,01$).

In Anwesenheit von 50 $\mu\text{g/ml}$ Saponin führte Naphmethonium in Konzentrationen von 1 bzw. 100 μM genau wie in Versuchen ohne Saponin (Ergebnisse zu Naphmethonium in Abwesenheit von Saponin: s. 3.3.2.2.3) zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve (Abbildung 6). Alle Kurven konnten mit einer Hill-Steigung von $n_H = 1$ ausreichend beschrieben werden (F-Test, $p > 0,05$; s. 2.5.2). In Tabelle 7 sind zusätzlich die freilaufenden Hill-Steigungen angegeben. Während die basale [^{35}S]GTP γ S-Bindung durch Naphmethonium in den eingesetzten Konzentrationen nicht signifikant beeinflusst wurde (Dunnett t-Test, $p > 0,05$), senkte Naphmethonium (100 μM) die maximale ACh-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung signifikant auf $73 \pm 5\%$. Da die Kurven zwar mit der gleichen Steigung rechtsverschoben waren, der Maximaleffekt jedoch verändert wurde, handelte es sich nicht um einen kompetitiven Antagonismus. Eine orientierende Auswertung der Daten erfolgte in der Schild-Auftragung (Abbildung 7) nach der Gleichung von Lanzafame et al. (1996 ; Gleichung 17). Die Kooperativitätsfaktoren zwischen Naphmethonium und ACh waren in Anwesenheit ($p\alpha = -2,86 \pm 0,56$) und Abwesenheit ($p\alpha = -2,61 \pm 0,16$) von 50 $\mu\text{g/ml}$ Saponin nicht signifikant voneinander verschieden (t-Test, $p > 0,05$), wohingegen die Affinität von Naphmethonium zum freien M_2 -Rezeptor in Anwesenheit von 50 $\mu\text{g/ml}$ Saponin signifikant abnahm (t-Test, $p < 0,05$; $pK_{A(\text{Naphmethonium_ohne_Saponin})} = 7,66 \pm 0,13$; $pK_{A(\text{Naphmethonium_mit_Saponin})} = 6,99 \pm 0,25$). Da sich der Wert für $p\alpha$ nicht signifikant änderte, wurde durch Saponin ebenso die Affinität von Naphmethonium zum ACh-besetzten M_2 -Rezeptor reduziert.

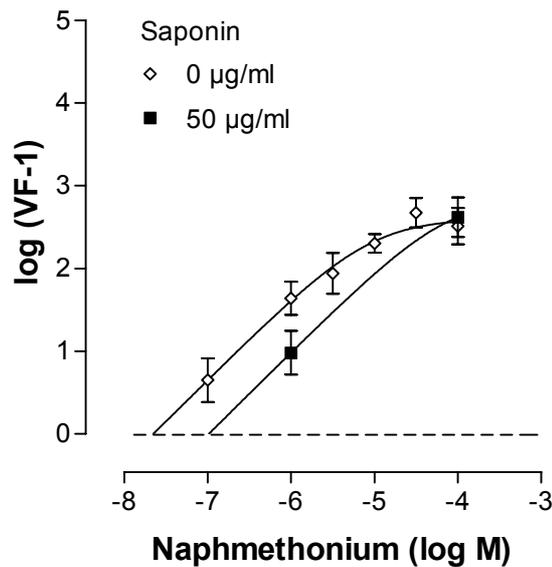


Abbildung 7: Schild-Auftragung der Naphmethonium-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve aus Abbildung 6 bzw. Abbildung 31 in An- und Abwesenheit von 50 µg/ml Saponin. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Naphmethonium. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Cohen et al. (1996) untersuchten den Effekt von Saponin auf den G-Proteingekoppelten Adenosin-A₁-Rezeptor. Sie führten u. a. [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente mit Cyclohexyladenosin als Agonisten an CHO-A₁-Zellen durch. 10 bzw. 25 µg/ml Saponin im Versuchsansatz resultierten in einer Steigerung des Maximaleffektes auf ca. 160% bzw. 180% im Vergleich zum Kontrollexperiment, das in Abwesenheit von Saponin durchgeführt wurde. Der Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurven wurde nicht signifikant beeinflusst. Eine höhere Saponin-Konzentration von 100 µg/ml verschob die Konzentrations-Effekt-Kurve signifikant nach rechts, bewirkte jedoch keine Erhöhung des Maximaleffektes. Die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung wurde in diesen Experimenten durch Saponin nicht signifikant verändert. In Versuchen, in denen das Saponin nicht dem Versuchsansatz zugefügt wurde, sondern die CHO-Zellen während der Membranpräparation mit Saponin vorbehandelt wurden, kam es durch Saponin zur Anhebung der basalen Bindung. Die Ergebnisse von Cohen et al. (1996) stimmen überein mit der Steigerung der [³⁵S]GTPγS-Bindung, die Hilf und Jakobs

(1992) in Experimenten mit dem porenbildenden Antibiotikum Alamethacin beobachteten. Eine Interpretation von Cohen et al. (1996) war, dass Saponin eine Barriere entfernt, welche die Bindung von GTP (bzw. [³⁵S]GTPγS) an einige G-Proteine verhindert. In Anwesenheit von Saponin können dann alle G-Proteine durch GTP vom Rezeptor entkoppelt werden. Dies führt zu einem Anstieg sowohl der basalen als auch der Agonist-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung. Die unter den Versuchsbedingungen dieser Arbeit gefundene Steigerung des Maximaleffektes eines Agonisten durch Saponin, welche in hohen Konzentrationen mit einer Rechtsverschiebung des Wendepunktes einherging, spiegelte also bereits dokumentierte Befunde an anderen Rezeptoren wider (Cohen et al., 1996). Um eine endgültige Aussage darüber treffen zu können, inwieweit die Effekte von allosterischen Modulatoren in An- und Abwesenheit von Saponin zu vergleichen und übertragbar sind, müssten noch weitere Experimente (mehr Konzentrationen eines Allosters, andere allosterische Modulatoren) durchgeführt werden. Pharmakologische Parameter, die aus Versuchen mit bzw. ohne Saponin hervorgehen, sind in jedem Fall nicht direkt miteinander vergleichbar. Daher wurde in den Versuchsreihen dieser Arbeit auf den Einsatz von Saponin verzichtet.

3.2.2 Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Für einige Testsubstanzen (Caracurin V, DDT-5, Di-Strychnin-6, Duo3, Eburnamonin, EHW 141, MM-H5-6, Str6Naph, Strychnin, TD2, WGA) war die Löslichkeit in Wasser so gering, dass DMSO als Lösungsmittel zur Herstellung der Stammlösung eingesetzt werden musste. Daher wurden Vorversuche zur Charakterisierung des DMSO-Effektes durchgeführt, um festzustellen, welche DMSO-Konzentrationen im Versuch einsetzbar waren, ohne dass die ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung wesentlich beeinflusst wurde.

Im Folgenden sei zunächst die Konzentrationsabhängigkeit des Effektes von DMSO auf die ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Abwesenheit von allosterischen Modulatoren betrachtet. Dafür wurden zwei ACh-Konzentrationen ausgewählt: eine Konzentration, die sich in der Nähe des Wendepunktes der Konzentrations-Effekt-Kurve befand (ACh 0,03 μM; Abbildung 9A) und eine Konzentration, die einen Maximaleffekt auslöste (ACh 1 mM; Abbildung 9B). Dies

soll anhand von Abbildung 8 verdeutlicht werden: Angenommen, DMSO antagonisiere den Effekt von ACh ohne Reduktion des Maximaleffektes und führe so zu einer Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve, dann wäre bei der ACh-Konzentration 0,1 mM (A in Abbildung 8) sowohl in der Kontrollkurve als auch in der durch DMSO verschobenen Kurve das obere Plateau erreicht, so dass der DMSO-Effekt bei einer Untersuchung dieser ACh-Konzentration nicht detektiert würde. Bei Betrachtung einer ACh-Konzentration im Wendepunkt der Kontrollkurve (B in Abbildung 8) würde ein antagonisierender Effekt von DMSO in Form einer Absenkung der [³⁵S]GTPγS-Bindung sichtbar werden.

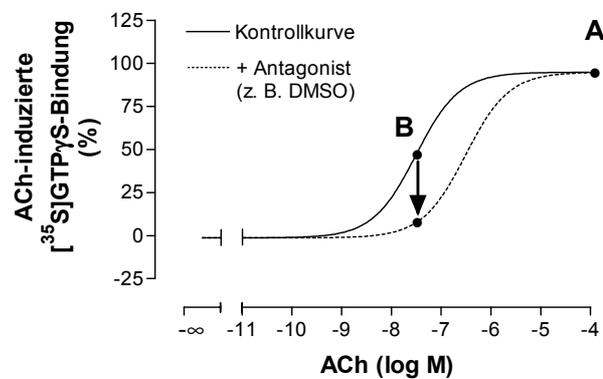


Abbildung 8: Denkbare Verschiebung einer ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve in An- und Abwesenheit eines Antagonisten (z. B. DMSO). Näheres siehe Text.

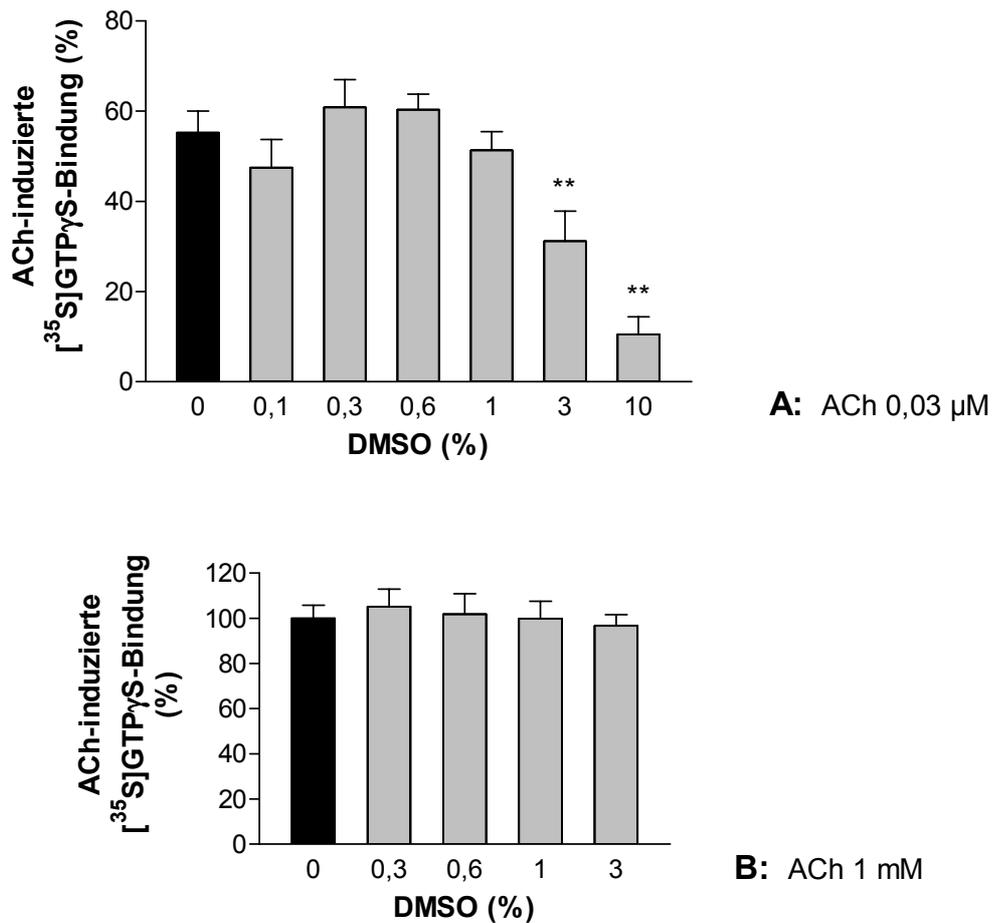


Abbildung 9: Einfluss von DMSO auf den halbmaximalen (**A:** ACh: 0,03 μM) und maximalen ACh-Effekt (**B:** ACh: 1 mM). **Ordinate:** ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent (Basalaktivität = 0%, ACh-Maximaleffekt in Abwesenheit von DMSO = 100%). **Abszisse:** Konzentration von DMSO in Prozent. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten in Achtfachbestimmung (A) bzw. Vierfachbestimmung (B).

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,01).

Die durch 0,03 μM ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung wurde ab einer DMSO-Konzentration von 3% signifikant gesenkt (Abbildung 9A). Der ACh-Maximaleffekt wurde in diesen Experimenten nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 9B). In Tabelle 8 finden sich die Zahlenwerte zu Abbildung 9. DMSO in hohen Konzentrationen verminderte also die Wirksamkeit von ACh.

Ergebnisse

		Kontrolle	DMSO 0,1%	DMSO 0,3%	DMSO 0,6%	DMSO 1%	DMSO 3%	DMSO 10%
A	$E_{max/2}$ (%)	55 ± 5	47 ± 6	61 ± 6	60 ± 3	51 ± 4	31 ± 7**	11 ± 4**
	n	4	4	4	4	4	4	4
B	E_{max} (%)	100 ± 6	-	105 ± 8	102 ± 9	100 ± 8	97 ± 5	-
	n	3	-	3	3	3	3	-

Tabelle 8: Einfluss von DMSO auf den halbmaximalen (**A**: ACh: 0,03 µM) und maximalen ACh-Effekt (**B**: ACh: 1 mM). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten in Achtfachbestimmung (A) bzw. Vierfachbestimmung (B).

$E_{max/2}$: annähernd halbmaximale [35 S]GTPγS-Bindung induziert durch 0,03 µM ACh in Prozent (Basalaktivität = 0%, ACh-Maximaleffekt in Abwesenheit von DMSO = 100%).

E_{max} : maximale [35 S]GTPγS-Bindung induziert durch 1 mM ACh in Prozent (Basalaktivität = 0%, ACh-Maximaleffekt in Abwesenheit von DMSO = 100%).

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, $p < 0,01$).

Da 1% DMSO in den obigen Versuchen keinen signifikanten Einfluss auf die ACh-induzierte [35 S]GTPγS-Bindung ausübte, sollte in Versuchen mit allosterischen Modulatoren maximal diese Konzentration eingesetzt werden. Deshalb wurde der Einfluss von 1% DMSO noch einmal an einer vollständigen ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve untersucht (Abbildung 10). Die Experimente wurden durchgeführt und ausgewertet wie unter 2.4 beschrieben.

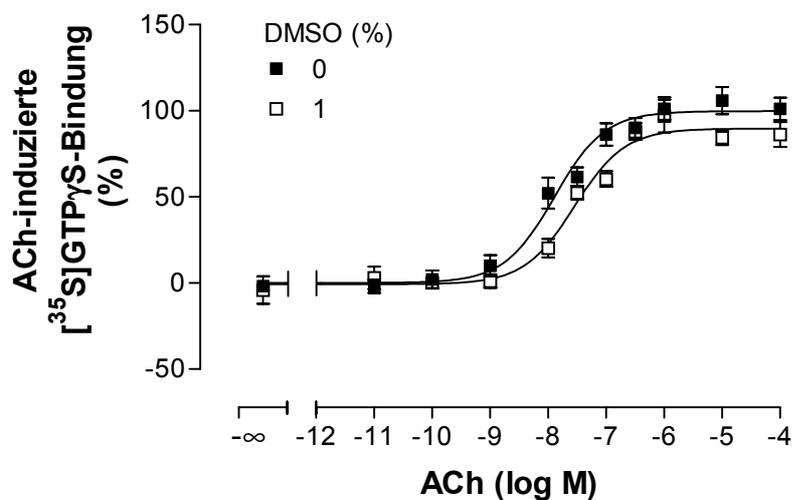


Abbildung 10: Einfluss von DMSO 1% auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [35 S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%,

Ergebnisse

ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Durch 1% DMSO wurden weder der Wendepunkt noch das obere oder untere Plateau der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve signifikant beeinflusst. Die Daten zu den in Abbildung 10 dargestellten Kurven finden sich in Tabelle 9. Während die Kurve in Anwesenheit von 1% DMSO mit einer Hill-Steigung von $n_H = 1$ ausreichend beschrieben wurde, wurde bei der Kontrollkurve eine signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Steigungsmaß erhalten ($n_H = 0,69 \pm 0,08$; F-Test; $p < 0,05$).

	Kontrolle	DMSO 1%
pEC ₅₀	7,89 $\pm 0,09$	7,54 $\pm 0,10$
Max (%)	100 \pm 3	90 \pm 3
Min (%)	0 \pm 3	-1 \pm 3
n _H (freilaufend)	0,69 $\pm 0,08^{\#}$	1,05 $\pm 0,25$
n	3	3

Tabelle 9: Kenngrößen (\pm Standardfehler) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 10 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss von 1% DMSO. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

[#] signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$).

Zur Überprüfung des Einflusses von DMSO auf die durch ein Alloster modulierte ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung wurde das gleiche Versuchsschema angewendet wie in den Versuchen aus Abbildung 9/Tabelle 8. Gallamin in einer

Konzentration von 3 mM wurde als allosterischer Modulator eingesetzt. Als ACh-Konzentration, die sich näherungsweise im Wendepunkt der durch 3 mM Gallamin modulierten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve befand, wurde 10 μ M ACh bestimmt (vgl. 3.3.2.7). Die durch diese Konzentration hervorgerufene [35 S]GTP γ S-Bindung wurde durch DMSO nicht beeinflusst (Abbildung 11). Der ACh-induzierte Maximaleffekt in Anwesenheit von 3 mM Gallamin wurde in den DMSO-Konzentrationen von 0,6 bis 3% signifikant erhöht (Abbildung 11). Diese Effektsteigernde Wirkung von DMSO nahm jedoch nicht konzentrationsabhängig zu und war bei 10% DMSO gar nicht mehr zu beobachten. In den später in Abbildung 12 gezeigten Versuchen hatte DMSO eher einen abschwächenden Effekt auf die ACh-stimulierte [35 S]GTP γ S-Bindung in Anwesenheit von allosterischen Modulatoren. Deshalb wurde die Steigerung des ACh-Maximaleffektes durch DMSO in Abbildung 11 als zufällig angesehen.

Ergebnisse

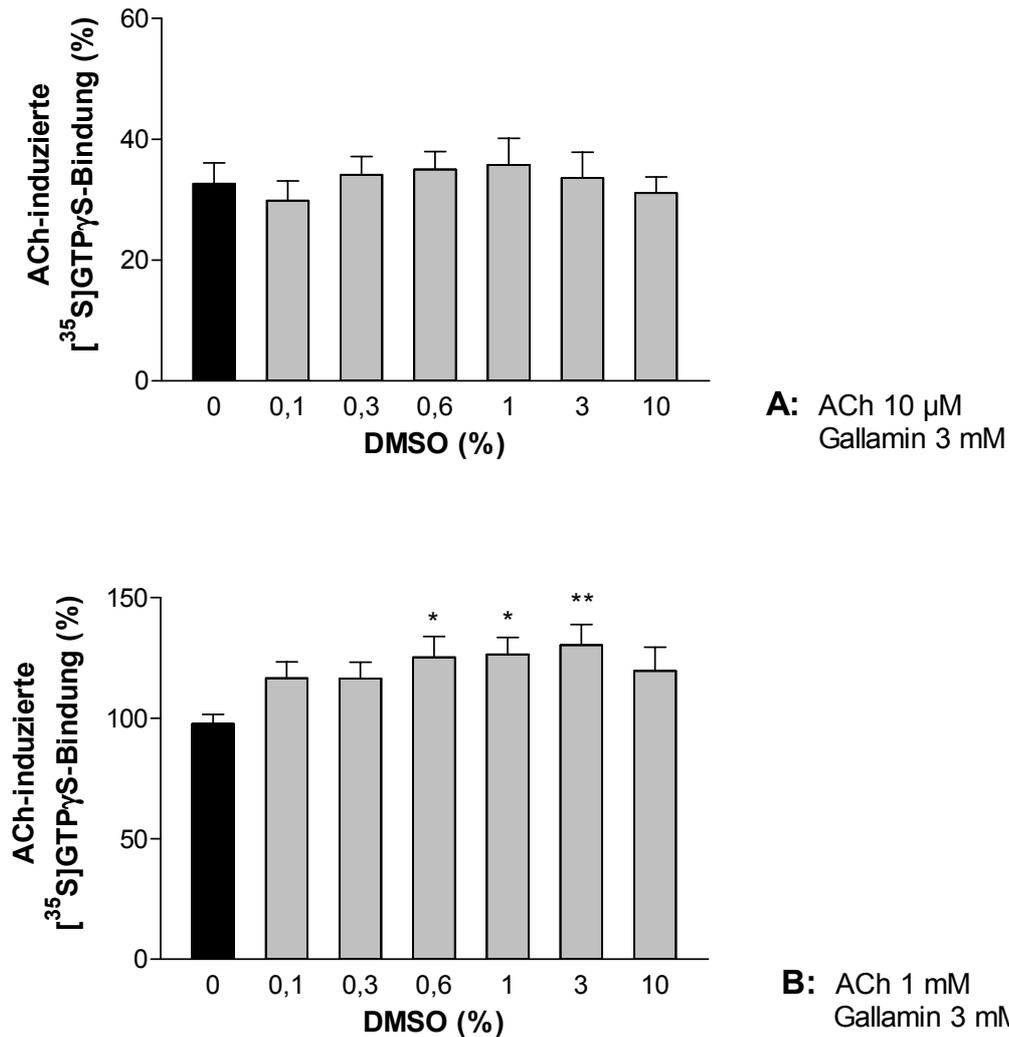


Abbildung 11: Einfluss von DMSO auf den halbmaximalen (**A:** ACh: 10 μ M) und maximalen (**B:** ACh: 1 mM) ACh-Effekt in Anwesenheit von Gallamin (3 mM). **Ordinate:** ACh-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung in Prozent (Basalaktivität = 0%, ACh-Maximaleffekt in Abwesenheit von DMSO und Gallamin = 100%). **Abszisse:** Konzentration von DMSO in Prozent. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten in Achtfachbestimmung.

* signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, $p < 0,05$).

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, $p < 0,01$).

Ergebnisse

		Kontrolle	DMSO 0,1%	DMSO 0,3%	DMSO 0,6%	DMSO 1%	DMSO 3%	DMSO 10%
A	$E_{\max/2}$ (%)	33 ± 3	30 ± 3	34 ± 3	35 ± 3	36 ± 4	34 ± 4	31 ± 3
	n	3	3	3	3	3	3	3
B	E_{\max} (%)	98 ± 4	117 ± 7	116 ± 7	125 ± 9*	126 ± 7*	130 ± 9**	120 ± 10
	n	2	2	2	2	2	2	2

Tabelle 10: Einfluss von DMSO auf den halbmaximalen (**A:** ACh: 10 µM) und maximalen (**B:** ACh: 1 mM) ACh-Effekt in Anwesenheit von Gallamin (3 mM). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten in Achtfachbestimmung.

$E_{\max/2}$: annähernd halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert durch 10 µM ACh in Prozent (Basalaktivität = 0%, Kontrollwert in Abwesenheit von DMSO und Alloster = 100%).

E_{\max} : maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert durch 1 mM ACh in Prozent (Basalaktivität = 0%, Kontrollwert in Abwesenheit von DMSO und Alloster = 100%).

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,05/0,01).

In den folgenden Versuchen wurde der Einfluss von 1% DMSO auf das Maximum der ACh-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung in Gegenwart weiterer Allosterer untersucht. In diesen Experimenten wurden ebenfalls keine vollständigen Konzentrations-Effekt-Kurven aufgenommen, sondern nur eine maximal wirksame ACh-Konzentration eingesetzt. Es wurde eine ACh-Konzentration von 1 mM gewählt, da bekannt war, dass mit dieser Konzentration auch in Anwesenheit der in diesem Experiment verwendeten allosterischen Modulatoren der ACh-stimulierte Maximal-effekt erreicht wurde (s. 3.3.2.2). In Abbildung 12 sowie in Tabelle 11 sind die Versuchsergebnisse dargestellt. Der Kontrollwert (1 mM ACh in Abwesenheit von DMSO und Alloster) wurde auf 100% festgesetzt. Es wurden jeweils die Werte eines allosterischen Modulators (bzw. der Kontrolle) mit und ohne DMSO miteinander verglichen und mittels eines t-Tests (p < 0,05; s. 2.5.1) überprüft, ob 1% DMSO eine signifikante Änderung hervorrief. Dies war bei keinem Wertepaar der Fall. Es war jedoch außer bei der Kontrolle eine Tendenz zur Senkung des Maximaleffektes durch DMSO zu beobachten. Dies sollte bei einer durch ein Alloster hervorgerufenen Absenkung der maximalen ACh-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung, die in Anwesenheit von 1% DMSO gemessen wurde, berücksichtigt werden.

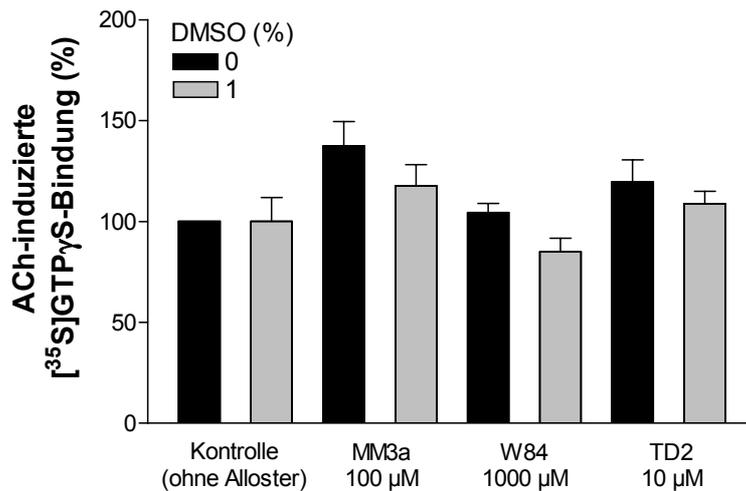


Abbildung 12: Einfluss von DMSO 1% auf die maximale ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung (ACh: 1mM) in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit verschiedener allosterischer Modulatoren. **Ordinate:** ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent (Basalaktivität = 0%, ACh-Maximaleffekt in Abwesenheit von DMSO und Alloster = 100%). **Abszisse:** Allosterische Modulatoren. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Achtfachbestimmung.

		Kontrolle	Naphmeth. 100 μM	W84 1000 μM	TD2 10μM
E _{max} (%)	ohne DMSO	100	137 ± 12	104 ± 4	120 ± 11
	DMSO 1%	100 ± 12	118 ± 10	85 ± 7	109 ± 6
n		3	3	3	3

Tabelle 11: ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent (± Standardfehler) unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss diverser allosterischer Modulatoren jeweils in An- und Abwesenheit von 1% DMSO.

E_{max}: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert durch 1 mM ACh (Basalaktivität = 0%, ACh-Maximaleffekt in Abwesenheit von DMSO und Alloster = 100%).

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

Die dargelegten Experimente deuten darauf hin, dass die in dieser Arbeit maximal im Versuchsansatz enthaltene DMSO-Konzentration von 1% keinen relevanten Einfluss auf die ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in An- und Abwesenheit eines Allostere hatte. Da der in Abbildung 12 dargestellte Versuch jedoch zeigte,

dass durch 1% DMSO in Anwesenheit von Alloster Unterschiede in der [³⁵S]GTPγS-Bindung von 10 bis 20% hervorgerufen werden konnten, die allerdings statistisch nicht signifikant waren, durfte auch eine DMSO-Konzentration von 1% nicht unkritisch eingesetzt werden.

3.2.3 Untersuchung einer mit ACh positiv kooperativen Substanz am M₄-Rezeptor

Vor der Untersuchung der Substanzen mit unbekanntem Verhalten gegenüber ACh am M₂-Rezeptor sollte geprüft werden, ob der Effekt einer Affinitätssteigernden Substanz unter den Versuchsbedingungen dieser Arbeit detektiert werden konnte. Lazareno et al. (2004) beobachteten in [³⁵S]GTPγS-Experimenten an M₄-Rezeptoren durch Thiochrom eine Erhöhung der Affinität von ACh um das 3,5-fache. Daher sollte auch in dieser Arbeit die Interaktion von Thiochrom mit ACh am M₄-Rezeptor untersucht werden. Die Versuche mit Thiochrom sind die einzigen dieser Arbeit, die am muskarinischen M₄-Rezeptor durchgeführt wurden. Der Einfluss von Thiochrom auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve ist in Abbildung 13 dargestellt. Die Affinitätssteigerung von ACh durch Thiochrom zeigte sich in einer Linksverschiebung der Kontrollkurve bei beiden eingesetzten Thiochrom-Konzentrationen (100 und 300 μM). Die Kurven, die in Anwesenheit von Thiochrom aufgenommen wurden, wurden mit einer konstanten Steigung von $n_H = 1$ ausreichend beschrieben. Die Kontrollkurve konnte mit einer freilaufenden Steigung besser angepasst werden ($n_H = 0,82 \pm 0,06$; F-Test, $p < 0,05$). 300 μM Thiochrom senkten signifikant den ACh-Maximaleffekt auf $85 \pm 4\%$ (Dunnett t-Test, $p < 0,05$). Die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung wurde durch Thiochrom nicht beeinflusst. 100 μM Thiochrom verschoben die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve um das 3,6-fache nach links. Die beobachtete Affinitätserhöhung entsprach der von Lazareno et al. (2004).

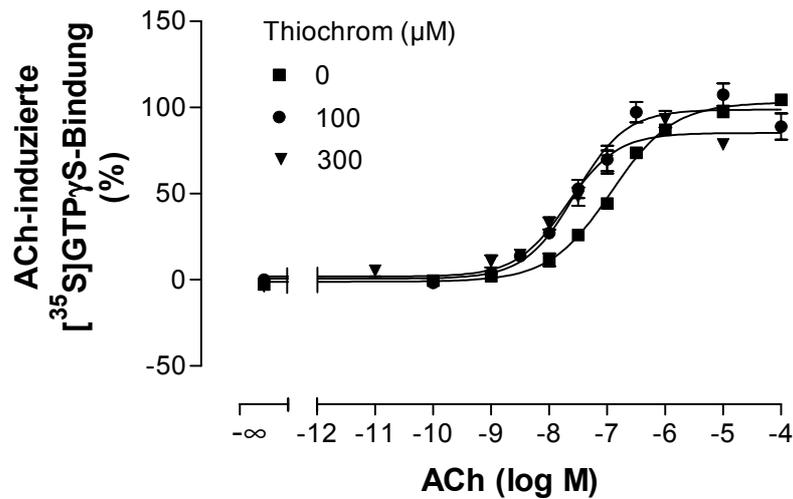


Abbildung 13: Einfluss steigender Konzentrationen von Thiochrom auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve an M_4 -Rezeptoren. **Ordinate:** ACh-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 4$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Thiochrom- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	Kontrolle	Thiochrom 100 μ M	Thiochrom 300 μ M
pEC ₅₀	6,94 \pm 0,05	7,55 \pm 0,10**	7,69 \pm 0,11**
Max (%)	100 \pm 2	99 \pm 4	85 \pm 4*
Min (%)	1 \pm 2	1 \pm 4	2 \pm 3
n _H (frei- laufend)	0,82 \pm 0,06 [#]	0,93 \pm 0,11	0,85 \pm 0,13
n	4	2	2

Tabelle 12: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 13 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von Thiochrom. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,05/0,01).

[#] signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05).

3.3 [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimente

3.3.1 Einfluss verschiedener Agonisten auf die [³⁵S]GTP γ S-Bindung

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf Untersuchungen zur allosterischen Modulation der ACh-induzierten [³⁵S]GTP γ S-Bindung an muskarinischen M₂-Rezeptoren. Darüber hinaus wurde der Effekt weiterer Voll- und Partialagonisten betrachtet. Die konzentrationsabhängige Wirkung dieser Agonisten wurde zunächst der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve gegenübergestellt und ein Vergleich bezüglich der Wirksamkeit am M₂-Rezeptor (pEC₅₀) und der maximal induzierbaren [³⁵S]GTP γ S-Bindung angestellt. Hierzu wurde das untere Plateau der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve (entspricht der basalen

Bindung) auf 0% festgelegt und das obere Plateau (entspricht dem ACh-Maximaleffekt) auf 100%.

3.3.1.1 ACh

Es wurde für den Vollagonisten ACh die konzentrationsabhängige [³⁵S]GTPγS-Bindung an CHO-M₂-Zellmembranen bestimmt. Die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve diente sowohl in Versuchen mit antagonistisch wirkenden Substanzen als auch in Experimenten mit anderen Agonisten an jedem Versuchstag als Kontrollkurve. Die Datenpunkte in Abbildung 14 ergaben sich aus der Mittelung der Messdaten (in %) aller 27 in dieser Arbeit gezeigten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven. An diese gemittelten Datenpunkte wurde eine Kurve angepasst. Der Wendepunkt lag bei pEC₅₀ = 7,69 ± 0,03. Die Steigung dieser Kurve war mit n_H = 0,76 ± 0,04 signifikant verschieden von 1. Es handelte sich dabei nicht um ein durch die Mittelung mehrerer Kurven entstandenes Artefakt. Denn wie für die Versuchsreihen „Atropin“ (3.3.2.1) und „W84“ (3.3.2.2.1) beispielhaft dargestellt, zeigten auch die individuellen ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven einzelner Versuchstage häufig eine tendenziell flache Kurvensteigung.

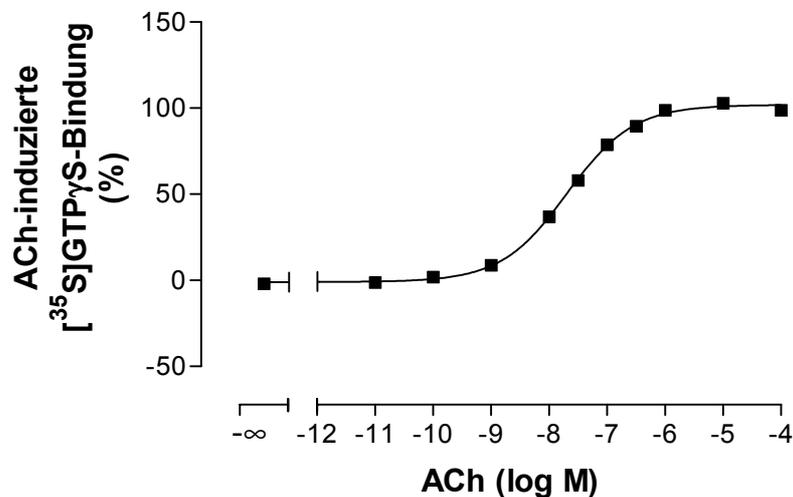


Abbildung 14: ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve aus den Mittelwerten aller in dieser Arbeit gezeigten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven. **Ordinate:** ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient: n_H = 0,76 ± 0,04. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 27 in dieser Arbeit dargestellten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven. Jede dieser 27 Kurven setzt sich aus Einzelkurven mehrerer Versuchstage zusammen. Jedes Einzelerperiment wurde in Vierfachbestimmung durchgeführt.

Lazareno und Birdsall (1995) ermittelten in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten mit CHO-M₂-Zellhomogenaten für den konzentrationsabhängigen Effekt von ACh einen Wendepunkt von $pEC_{50} = 7,6 \pm 0,1$ ($n = 3$) und eine Kurvensteilheit von $n_H = 0,9 \pm 0,1$. Diese Werte wichen nicht signifikant von den Werten dieser Arbeit ab (t-Test, $p > 0,05$). Weitere von Lazareno und Birdsall (1993) bzw. Birdsall et al. (1999) bestimmte Werte sind $pEC_{50} = 7,40 \pm 0,06$ und $n_H = 0,69 \pm 0,02$ ($n = 9$) bzw. $pEC_{50} = 7,20$. In funktionellen Experimenten an Meerschweinchen-Herzvorhöfen fand Zahn (1999) eine halbmaximale ACh-Wirkung bei $pEC_{50} = 7,68 \pm 0,16$ ($n = 5$). Die Kenngrößen der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve der vorliegenden Arbeit stimmten dementsprechend gut mit den Literaturwerten überein.

In Vorversuchen wurde bestimmt, um wieviel Prozent ACh die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung steigerte. Es wurden fünf ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven (Vierfachbestimmung der Werte pro Experiment) aufgenommen und jeweils das untere Plateau (entsprechend der basalen Bindung) auf 100% festgesetzt. Aus der gemittelten Kurve (nicht abgebildet) aus allen fünf Versuchen resultierte für das obere Plateau (maximaler ACh-Effekt) ein Wert von $258 \pm 5\%$. Es bestand kein signifikanter Unterschied zur prozentualen Steigerung der basalen Bindung durch Oxotremorin M ($243,7 \pm 7,5\%$; s. 3.1.2). Lazareno und Birdsall (1993) beobachteten durch ACh eine Erhöhung der [³⁵S]GTPγS-Bindung auf 217%. Diese lag in der gleichen Größenordnung.

In Vorversuchen (s. Abbildung 15) zeigte sich, dass 10 mM ACh eine Wirkung hervorriefen, die den Maximizeffekt unterschritt. Die prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung bei 10 mM ($78 \pm 4\%$) wich signifikant vom oberen Plateau der Kurve ab (t-Test, $p < 0,05$). Daher wurde in allen folgenden Experimenten keine über 1 mM hinausgehende ACh-Konzentration eingesetzt.

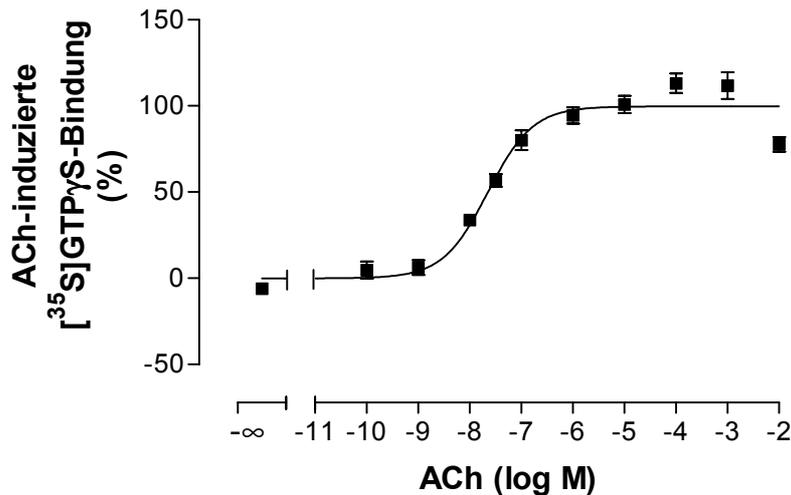


Abbildung 15: ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve bis 10 mM ACh. **Ordinate:** ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2 unabhängigen Experimenten (2 Versuchstage) in Vierfachbestimmung. $pEC_{50} = 7,65 \pm 0,08$; freilaufende Hillsteigung: $n_H = 0,81 \pm 0,15$ (nicht signifikant unterschiedlich von 1; F-Test, $p > 0,05$).

3.3.1.2 Carbachol

In Abbildung 16 ist die konzentrationsabhängige Wirkung von Carbachol im [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment im Vergleich zur ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt. Beide Kurven konnten nach einer Datenanpassung durch die „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ mit einem Steigungsmaß von $n_H = 1$ ausreichend beschrieben werden (F-Test, $p > 0,05$). Zwischen den Kenndaten von Carbachol und ACh (pEC_{50} , Max, Min) bestand kein signifikanter Unterschied (t-Test, $p > 0,05$; s. Tabelle 13). Der Wendepunkt der Carbachol-Konzentrations-Effekt-Kurve lag jedoch eine halbe Dekade weiter rechts.

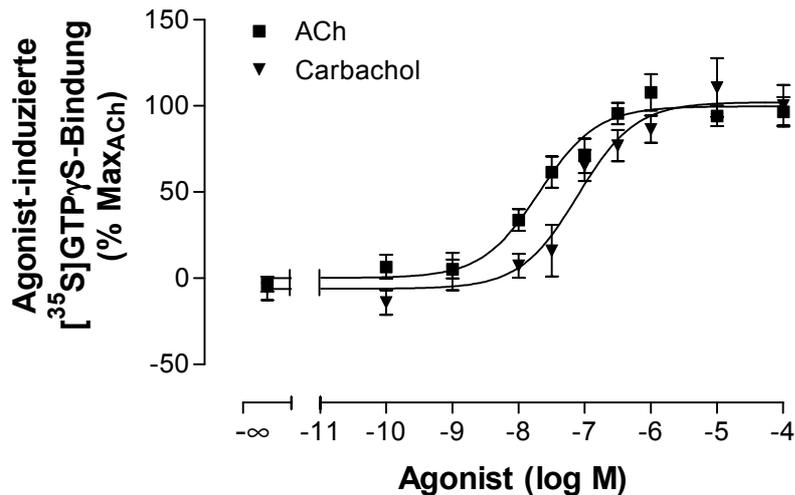


Abbildung 16: Carbachol-Konzentrations-Effekt-Kurve im Vergleich zur ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der ACh-Kurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der ACh-Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Agonisten. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Carbachol- und ein ACh-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Max (%)	Min (%)	n _H (freilaufend)	n
ACh	7,69 \pm 0,11	100 \pm 4	0 \pm 4	0,94 \pm 0,25	2
Carbachol	7,11 \pm 0,14	102 \pm 6	-6 \pm 5	0,98 \pm 0,28	2

Tabelle 13: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh- und Carbachol-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 16. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

Es wurden die Datenpunkte aller in dieser Arbeit dargestellten Carbachol-Konzentrations-Effekt-Kurven (Abbildung 16 und aus 3.3.3) gemittelt und eine Kurve daran angepasst (Kurve nicht abgebildet; n = 4). Der Wendepunkt dieser

Kurve lag bei $pEC_{50} = 6,57 \pm 0,07$. Die freilaufende Hill-Steigung ($n_H = 0,82 \pm 0,11$) war nicht signifikant verschieden von 1 (F-Test, $p > 0,05$). Im Vergleich dieser Daten mit denen der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve aus 3.3.1.1 erwies sich der Wirksamkeitsunterschied zwischen Carbachol und ACh als signifikant (t-Test, $p < 0,01$). Hilf et al. (1989) erhielten in [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimenten an Membranen aus Schweine-Herzvorhöfen mit verschiedenen Pufferzusammensetzungen einen pEC_{50} von 5,3 bis 5,0. Dong et al. (1995) bestimmten eine Affinität von Carbachol zum freien M_2 -Rezeptor in [3 H]NMS-Bindungsstudien an Homogenaten aus Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*, Sf9) von $pEC_{50} = 4,24$. Der relativ große Unterschied zu dem Wert dieser Arbeit war wahrscheinlich durch die verschiedenen Versuchsbedingungen (z. B. Puffer, Temperatur, Präparate) begründet.

3.3.1.3 Oxotremorin

Die Konzentrations-Effekt-Kurven von Oxotremorin und ACh sind in Abbildung 17 vergleichend gegenübergestellt. In Tabelle 14 finden sich die Kenndaten dieser Kurven, welche nicht signifikant voneinander abwichen. Beide Kurven waren mit einer Steigung von $n_H = 1$ hinlänglich beschrieben (F-Test, $p > 0,05$).

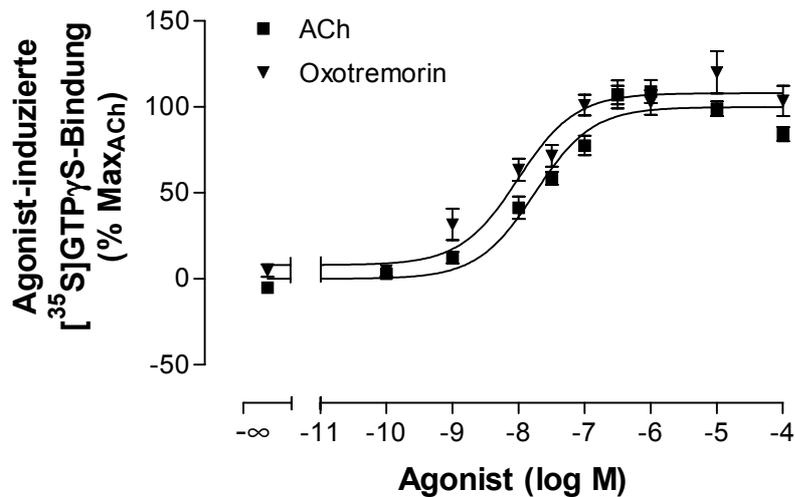


Abbildung 17: Oxotremorin-Konzentrations-Effekt-Kurve im Vergleich zur ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der ACh-Kurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der ACh-Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Agonisten. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Oxotremorin- und ein ACh-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Max (%)	Min (%)	n _H (freilaufend)	n
ACh	7,75 \pm 0,16	100 \pm 5	0 \pm 5	0,86 \pm 0,30	4
Oxotremorin	8,01 \pm 0,15	108 \pm 4	8 \pm 5	0,65 \pm 0,15	4

Tabelle 14: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh- und Oxotremorin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 17. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

In einer Kurve (nicht gezeigt; n = 4) aus den Mittelwerten aller in dieser Arbeit dargestellten Oxotremorin-Kurven (aus Abbildung 17 und aus 3.3.3), die

ausreichend mit einem Steigungsmaß von $n_H = 1$ beschrieben werden konnte (F-Test, $p > 0,05$; freilaufender Hill-Koeffizient: $n_H = 0,87 \pm 0,11$), lag der Wendepunkt bei $pEC_{50} = 7,99 \pm 0,06$. Dieser unterschied sich signifikant von dem Wendepunkt der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve aus 3.3.1.1. Oxotremorin hatte demnach eine geringfügig höhere Wirksamkeit am M_2 -Rezeptor als ACh. Tränkle et al. (1998a) ermittelten für die Affinität von Oxotremorin zum M_2 -Rezeptor in [3H]NMS-Bindungsexperimenten einen pEC_{50} von 7,89. Durch die Messung der Kontraktionskraft an Meerschweinchen-Herzvorhöfen fanden Dallanoce et al. (1999) einen pEC_{50} von 8,41. Diese Werte stimmten gut mit dem in dieser Arbeit gefundenen Wert überein (t-Test, $p > 0,05$).

3.3.1.4 Oxotremorin M

Abbildung 18 zeigt eine Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurve im Vergleich zur konzentrationsabhängigen Wirkung von ACh. Die Steigung der Kurven wich nicht signifikant von $n_H = 1$ ab (F-Test, $p > 0,05$). Die Kenngrößen der Kurven (Tabelle 15) unterschieden sich nicht signifikant voneinander (t-Test, $p > 0,05$), wobei der Wendepunkt der Oxotremorin M-Kurve gegenüber der ACh-Kurve um etwa eine halbe Dekade nach links versetzt lag.

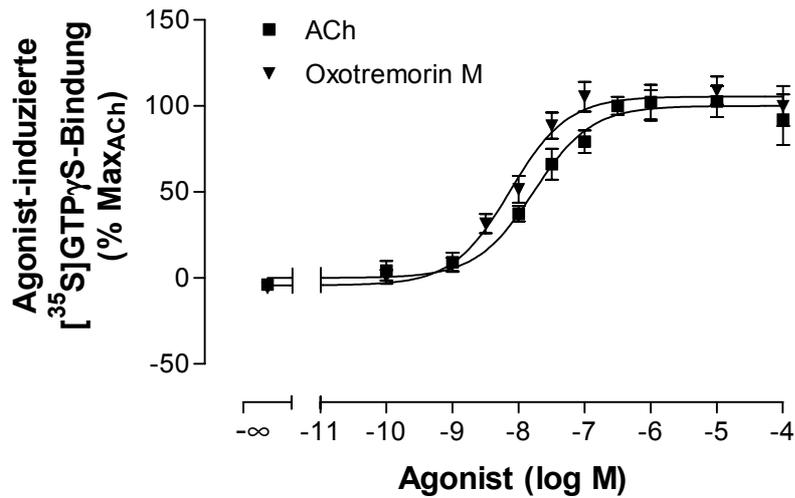


Abbildung 18: Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurve im Vergleich zur ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der ACh-Kurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der ACh-Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Agonisten. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Oxotremorin M- und ein ACh-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Max (%)	Min (%)	n _H (freilaufend)	n
ACh	7,77 \pm 0,11	100 \pm 4	0 \pm 4	0,90 \pm 0,23	2
Oxotremorin M	8,13 \pm 0,10	106 \pm 4	-4 \pm 4	1,08 \pm 0,21	2

Tabelle 15: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh- und Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 18. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

Analog zu den bisher gezeigten Agonisten wurden die Kurven dieser Arbeit für Oxotremorin M (aus Abbildung 18 und aus 3.3.3) zusammengefasst (n = 4). Die

Steilheit der Kurve (nicht abgebildet) war nicht signifikant verschieden von 1 (F-Test, $p > 0,05$; freilaufender Hill-Koeffizient: $n_H = 0,99 \pm 0,07$). Der Wendepunkt ($pEC_{50} = 8,07 \pm 0,03$) der Mittelwertskurve unterschied sich signifikant von dem der ACh-Mittelwertskurve (3.3.1.1). Oxotremorin M hatte somit eine höhere Wirksamkeit am muskarinischen M_2 -Rezeptor als ACh. Zahn et al. (2002) bestimmten in [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimenten einen pEC_{50} von 7,3. Bei Messungen der Kontraktionskraft von Meerschweinchen-Herzvorhöfen ermittelten sie einen pEC_{50} von 7,9. Dallanoce et al. (1999) erhoben mit der gleichen Methode einen Wert von $pEC_{50} = 7,94 \pm 0,03$. In Radioligandbindungsstudien fanden Maaß et al. (1996) mit [3 H]Oxotremorin M einen pEC_{50} von 8,4 und Großmüller (2003) mit [3 H]NMS einen pEC_{50} von 8,6 für die Affinität von Oxotremorin M zum M_2 -Rezeptor. Der in dieser Arbeit bestimmte pEC_{50} -Wert für Oxotremorin M war demnach in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten.

3.3.1.5 Pilocarpin

Der Einfluss verschiedener allosterischer Modulatoren auf die Wirksamkeit und die intrinsische Aktivität des Partialagonisten Pilocarpin wurde bereits von Klemt (2005) untersucht. In Abbildung 19 wird die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin der des Vollagonisten ACh gegenübergestellt. Der Partialagonismus von Pilocarpin zeigte sich durch einen signifikant niedrigeren Maximaleffekt ($79 \pm 3\%$; t-Test, $p < 0,01$). Außerdem wies Pilocarpin eine im Vergleich zu ACh signifikant geringere Wirksamkeit am M_2 -Rezeptor auf ($pEC_{50} = 6,35 \pm 0,09$; t-Test, $p < 0,01$). Die Steigungen beider Kurven waren mit $n_H = 1$ ausreichend beschrieben (F-Test, $p > 0,05$).

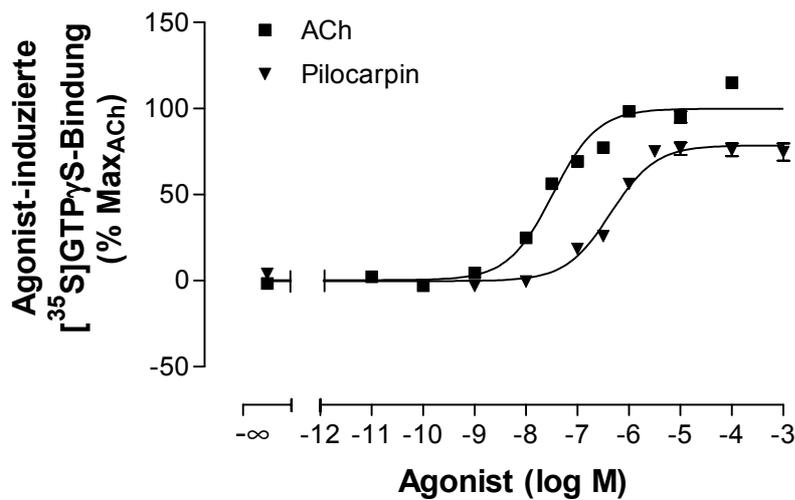


Abbildung 19: Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve im Vergleich zur ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der ACh-Kurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der ACh-Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Agonisten. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Pilocarpin- und ein ACh-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Max (%)	Min (%)	n _H (freilaufend)	n
ACh	7,48 \pm 0,12	100 \pm 5	0 \pm 4	0,63 \pm 0,13	4
Pilocarpin	6,35 \pm 0,09**	79 \pm 3**	0 \pm 3	1,22 \pm 0,24	4

Tabelle 16: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh- und Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 19. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Wert der ACh-Kurve (t-Test, $p < 0,01$).

Pilocarpin hatte gegenüber ACh ein vermindertes Effektmaximum, so dass das obere Plateau der Pilocarpin-Kurven bei Werten unter 100% lag. Zum Zwecke der

Mittelung der Messwerte der Pilocarpin-Kontrollkurven aus den einzelnen Versuchsreihen (s. 3.3.1.5/3.3.1.7/3.3.3.2.5) wurde das Pilocarpin-Effektmaximum der Kurve aus Abbildung 19 nicht in Prozent des Maximaleffektes von ACh ausgedrückt, sondern zu 100% gesetzt. An die gemittelten Messwerte wurde eine Kurve angepasst (nicht abgebildet) und aus dieser der EC₅₀-Wert entnommen: pEC₅₀ = 6,45 ± 0,06; n = 3. Die Steigung dieser Kurve war nicht signifikant verschieden von 1 (freilaufender Hill-Koeffizient: n_H = 1,16 ± 0,14).

Der pEC₅₀-Wert stimmte sehr gut überein mit dem Wert von Klemt (2005), der bei pEC₅₀ = 6,43 ± 0,03 (n = 16) liegt. Ebenfalls durch [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente erhielten Zahn et al. (2002) für die Wirksamkeit am M₂-Rezeptor einen Wert von pEC₅₀ = 5,48 ± 0,12; in Organbadversuchen mit isolierten Meerschweinchen-Herzvorhöfen bestimmten sie einen Wert von pEC₅₀ = 6,10 ± 0,03. Dong et al. (1995) ermittelten in [³H]NMS-Bindungsexperimenten an Sf9-Insektenzellen einen pEC₅₀ von 5,78 ± 0,08. Diese Literaturwerte unterschieden sich signifikant von dem Wert dieser Arbeit (t-Test, p < 0,05). McKinney et al. (1991) bestimmte Wirksamkeiten verschiedener Agonisten über die Inhibition der Bildung von cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat). Die festgestellte Wirksamkeit von Pilocarpin war zwar auch signifikant kleiner (pEC₅₀ = 5,0), das Wirksamkeitsmuster der Agonisten (Oxotremorin > Oxotremorin M > Carbachol > Pilocarpin > McN-A-343) stimmt jedoch abgesehen davon, dass Oxotremorin eine höhere Wirksamkeit als Oxotremorin M aufwies, mit dem überein, was in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde, so dass die Differenz der absoluten Werte möglicherweise methodisch bedingt war.

3.3.1.6 McN-A-343

Es wurde der konzentrationsabhängige Effekt von McN-A-343 mit dem von ACh verglichen (Abbildung 20). Ebenso wie Pilocarpin erwies sich McN-A-343 als Partialagonist. Der Maximaleffekt war mit 68 ± 4% signifikant geringer als der von ACh (t-Test, p < 0,01). Auch der Wendepunkt der McN-A-343-Kurve unterschied sich signifikant (pEC₅₀ = 5,99 ± 0,15; t-Test, p < 0,01).

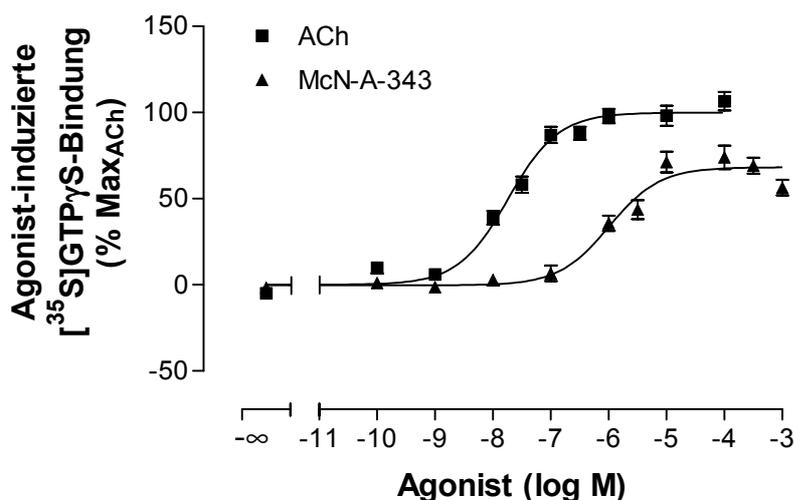


Abbildung 20: McN-A-343-Konzentrations-Effekt-Kurve im Vergleich zur ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der ACh-Kurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der ACh-Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Agonisten. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein McN-A-343- und ein ACh-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Max (%)	Min (%)	n _H (freilaufend)	n
ACh	7,73 \pm 0,09	100 \pm 3	0 \pm 3	0,76 \pm 0,11	4
McN-A-343	5,99 \pm 0,15**	68 \pm 4**	0 \pm 3	1,01 \pm 0,16	4

Tabelle 17: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh- und McN-A-343-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 20. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Wert der ACh-Kurve (t-Test, $p < 0,01$).

In einer zusammengefassten Kurve aus den Messwerten der Kurve aus Abbildung 20 (oberes Plateau gesetzt zu 100%) und den Messwerten aller weiteren McN-A-343-Kurven (s. 3.3.3) ergab sich ein Wendepunkt von $pEC_{50} = 5,83 \pm 0,06$ ($n = 4$). Die Konzentrations-Effekt-Kurven von McN-A-343 konnten ausreichend mit einer auf $n_H = 1$ festgelegten Steigung beschrieben werden (F-Test, $p > 0,05$; freilaufender Hill-Koeffizient: $n_H = 1,07 \pm 0,16$). Die in der Literatur gefundenen Werte für die Wirksamkeit von McN-A-343 am muskarinischen M_2 -Rezeptor wichen von dem Wert dieser Arbeit ab (t-Test, $p < 0,05$): 4,76 (McKinney et al., 1991; Inhibition von cAMP); 4,8 (Elnatan und Mitchelson, 1993; Organbadversuche an Meerschweinchen-Herzvorhöfen); 4,64 (Dong et al., 1995; [3H]NMS-Bindungsexperimente). Wie bereits unter 3.3.1.5 erwähnt, gab es jedoch mit McKinney et al. (1991) eine gute Übereinstimmung bezüglich der Wirksamkeitsabstufungen unterschiedlicher Agonisten. Auch die bei Dong et al. (1995) beobachtete höhere Wirksamkeit von Pilocarpin am M_2 -Rezeptor im Vergleich zu McN-A-343 wurde in dieser Arbeit bestätigt.

3.3.1.7 N-Methylpilocarpin

Es sollte überprüft werden, inwieweit eine Methylierung des Pilocarpin-Moleküls die Wirksamkeit am M_2 -Rezeptor und den Maximaleffekt beeinflusste. Dafür wurden Konzentrations-Effekt-Kurven von Pilocarpin und N-Methylpilocarpin aufgenommen (Abbildung 21). N-Methylpilocarpin hatte gegenüber Pilocarpin eine stark verminderte intrinsische Aktivität ($44 \pm 7\%$) und Wirksamkeit ($pEC_{50} = 3,99 \pm 0,27$). Die Steigung der Konzentrations-Effekt-Kurve von N-Methylpilocarpin war signifikant unterschiedlich von 1 ($n_H = 0,26 \pm 0,22$; F-Test, $p < 0,05$). Damit bestätigte sich die bereits in der Literatur beschriebene schwache muskarinische Aktivität von quaternisierten Pilocarpin-Derivaten (Bassat et al., 1971). Waters et al. (1973) quantifizierten den Antagonismus der muskarinischen Aktivität von ACh durch N-Methylpilocarpin gemessen an Meerschweinchen-Herzvorhöfen mit einem pA_2 -Wert von 2,2. Aufgrund der geringen intrinsischen Aktivität war N-Methylpilocarpin nicht geeignet, um in Experimenten mit allosterischen Modulatoren eingesetzt zu werden, wodurch möglicherweise die Bedeutung des protonierten Anteils an Pilocarpin bei der Reduktion der intrinsischen Aktivität durch Allosterie (Zahn et al., 2002; Klemm, 2005) hätte ermittelt werden können.

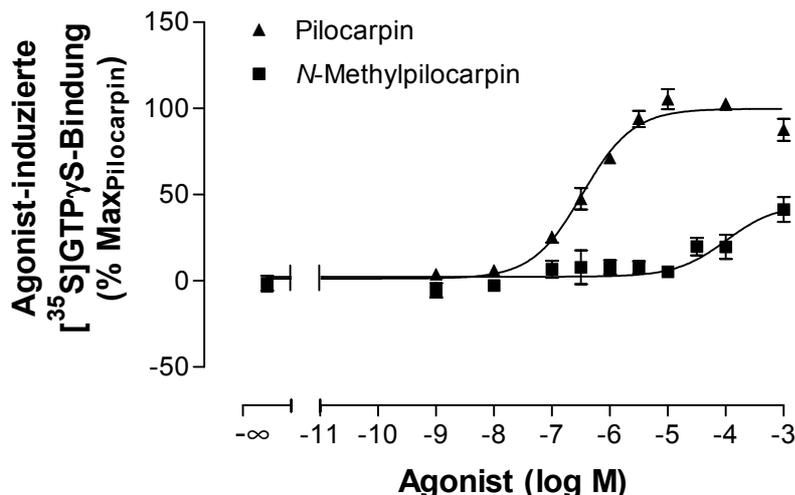


Abbildung 21: *N*-Methylpilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve im Vergleich zur Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Pilocarpin-Kurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Pilocarpin-Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Agonisten. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 6 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein *N*-Methylpilocarpin- und ein Pilocarpin-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Max (%)	Min (%)	n _H (freilaufend)	n
Pilocarpin	6,47 \pm 0,10	100 \pm 4	1 \pm 4	1,04 \pm 0,24	6
<i>N</i> -Methylpilocarpin	3,99 \pm 0,27**	44 \pm 7**	2 \pm 2	0,26 \pm 0,22 [#]	6

Tabelle 18: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten Pilocarpin- und *N*-Methylpilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 21. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

** signifikante Abweichung vom Wert der Pilocarpin-Kurve (t-Test, $p < 0,01$).

[#] signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$).

3.3.1.8 DDT-5

Da DDT-5 eine Hybrids substanz aus einem Oxotremorin M-verwandten Agonisten und einem allosterischen Liganden (W84) ist, wurde getestet, ob dieses Molekül agonistische Eigenschaften besitzt. In Abbildung 22 sind Konzentrations-Effekt-Kurven von DDT-5 und ACh, die jeweils gemeinsam aufgenommen wurden, dargestellt. Die Steigung beider Kurven war ausreichend mit $n_H = 1$ beschrieben (F-Test, $p > 0,05$). Zwischen den Kenngrößen von DDT-5 und ACh (Tabelle 19) bestand kein signifikanter Unterschied (t-Test, $p > 0,05$). DDT-5 war somit ein Vollagonist mit gleicher Wirksamkeit am M_2 -Rezeptor wie ACh.

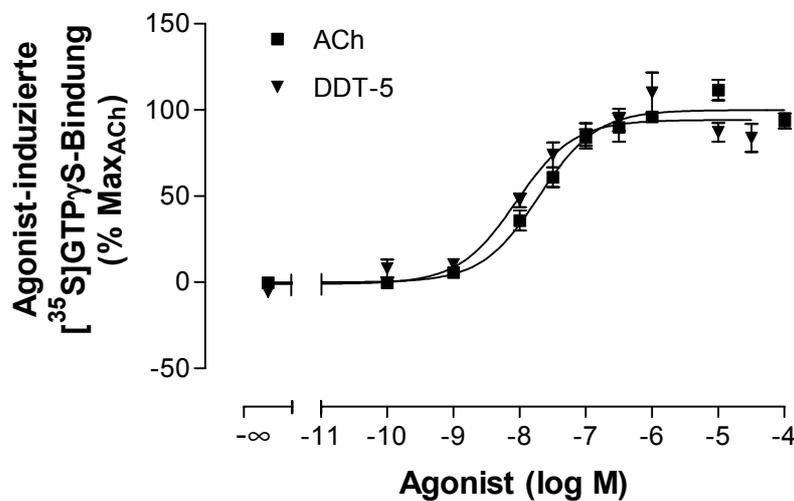


Abbildung 22: DDT-5-Konzentrations-Effekt-Kurve im Vergleich zur ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Agonist-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der ACh-Kurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der ACh-Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Agonisten. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein DDT-5- und ein ACh-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	pEC ₅₀	Max (%)	Min (%)	n _H (freilaufend)	n
ACh	7,71 ± 0,08	100 ± 3	0 ± 3	0,88 ± 0,15	2
DDT-5	8,05 ± 0,12	94 ± 3	-1 ± 4	0,98 ± 0,25	2

Tabelle 19: Kenngrößen (± Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh- und DDT-5-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 22. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

3.3.1.9 MM-H5-6

MM-H5-6 ist ebenfalls ein Hybrid aus einem Agonisten und einem Alloster (Naphmethonium). Analog zu DDT-5 wurde der agonistische Effekt dieser Substanz getestet. Die Konzentrations-Effekt-Kurven von MM-H5-6 und ACh sind in Abbildung 23 gezeigt. Beide Kurven konnten mit einem Steilheitsmaß von n_H = 1 hinlänglich beschrieben werden (F-Test, p > 0,05). Die MM-H5-6-Kurve unterschied sich im Wendepunkt sowie im unteren und oberen Plateau nicht signifikant von der ACh-Kurve (t-Test, p > 0,05). Der pEC₅₀-Wert von MM-H5-6 war um 0,5 log-Einheiten größer als der von ACh. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (t-Test, p > 0,05). Auch diese Hybridsubstanz war ein mit ACh vergleichbarer Vollagonist.

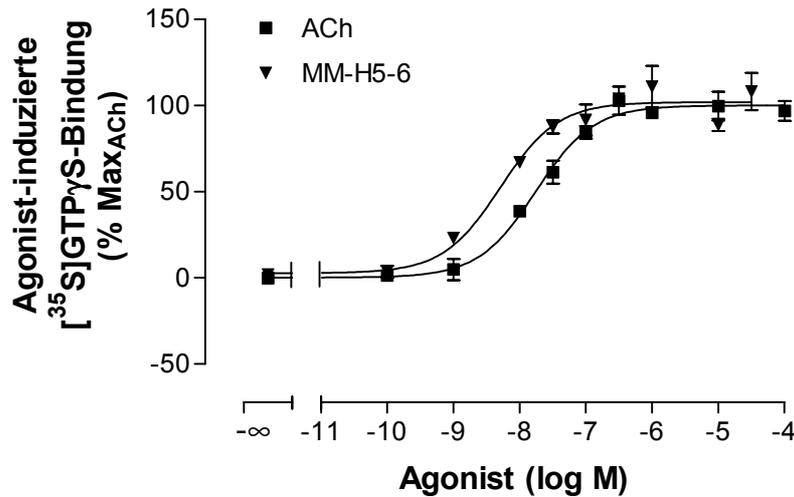


Abbildung 23: MM-H5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve im Vergleich zur ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der ACh-Kurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der ACh-Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Agonisten. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein MM-H5-6- und ein ACh-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Max (%)	Min (%)	n _H (freilaufend)	n
ACh	7,76 \pm 0,08	100 \pm 3	0 \pm 3	1,02 \pm 0,19	2
MM-H5-6	8,29 \pm 0,12	102 \pm 3	3 \pm 4	0,87 \pm 0,18	2

Tabelle 20: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh- und MM-H5-6-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 23. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

3.3.2 Einfluss der Testsubstanzen auf die ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

3.3.2.1 Atropin

Der Einfluss des orthosterisch bindenden Antagonisten Atropin auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve wurde unter den Versuchsbedingungen dieser Arbeit als ein Beispiel für kompetitiven Antagonismus untersucht. Das Vorgehen hinsichtlich der Versuchsdurchführung und -auswertung sei hier genauer geschildert: Um die Verschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve durch Atropin quantifizieren zu können, wurde bei jedem Versuch eine Konzentrations-Effekt-Kurve von ACh in Abwesenheit von Atropin mitgeführt. Daneben wurde die ACh-Kurve in Anwesenheit einer ausgewählten Konzentration von Atropin bestimmt. Um für diese beiden zu vergleichenden Kurven genau gleiche Versuchsbedingungen sicherstellen zu können, wurden diese stets in einem Experiment (auf einer Mikrotiterplatte) aufgenommen. In Tabelle 21 sind für alle in diesem Teilprojekt durchgeführten Versuche die Kenngrößen der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven, d. h. der Wendepunkt und das freilaufende Steigungsmaß, dargestellt und zwar jeweils für die Versuchs-Kontrollkurve als auch für die Kurve in Gegenwart von Atropin. Die Kurvenanpassung erfolgte mittels der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 6). Da bei der überwiegenden Zahl der Einzelversuche die Kurvensteilheit nicht signifikant verschieden von $n_H = 1$ war (Kontrolle: 15 von 16; Atropin: 10 von 16) und sich auch der Mittelwert der freilaufenden Hillkoeffizienten der Kontrollkurven ($n_H = 0,87 \pm 0,08$; Tabelle 21) nicht signifikant von $n_H = 1$ unterschied, wurden alle Versuche mit $n_H = 1$ angepasst. Die freilaufenden Hill-Koeffizienten ließen jedoch eine Tendenz der Kurven zu flacheren Steigungen erkennen, welche sich bei der Betrachtung der Gesamtheit der Kurven bestätigte (s. u.). In der letzten Spalte ist der aus dem Verschiebungsfaktor berechnete Wert (Berechnung s. 2.4.3) gezeigt, der für die Schild-Auftragung generiert wurde.

Ergebnisse

Versuchstag	Atropin (log M)	Kontrolle		Atropin		log (VF-1)
		pEC ₅₀	n _H (freilaufernd)	pEC ₅₀	n _H (freilaufernd)	
10.05.2004	-8	7,52 ± 0,12	0,42 ± 0,21 [#]	7,38 ± 0,13	0,61 ± 0,19	-0,40
12.05.2004	-8	7,11 ± 0,16	1,07 ± 0,36	7,01 ± 0,12	0,54 ± 0,11 [#]	-0,63
26.05.2004a	-8	7,54 ± 0,09	0,87 ± 0,16	6,91 ± 0,11	0,75 ± 0,17	0,52
26.05.2004b	-8	7,60 ± 0,18	1,75 ± 0,82	6,63 ± 0,09	0,91 ± 0,16	0,57
<i>Mittelwert</i>		<i>7,44 ± 0,11</i>	<i>1,03 ± 0,28</i>	<i>6,98 ± 0,15</i>	<i>0,70 ± 0,08*</i>	<i>0,02 ± 0,31</i>
25.05.2004a	-7,5	7,68 ± 0,12	0,92 ± 0,13	6,23 ± 0,09	0,60 ± 0,13 [#]	1,43
25.05.2004b	-7,5	7,45 ± 0,14	0,78 ± 0,21	6,38 ± 0,10	0,71 ± 0,14	1,03
26.04.2004	-7,5	7,77 ± 0,10	0,76 ± 0,15	6,50 ± 0,13	1,13 ± 0,33	1,25
<i>Mittelwert</i>		<i>7,63 ± 0,10</i>	<i>0,82 ± 0,05</i>	<i>6,37 ± 0,08</i>	<i>0,81 ± 0,16</i>	<i>1,24 ± 0,11</i>
06.05.2004	-7	7,89 ± 0,15	0,70 ± 0,20	6,14 ± 0,15	0,48 ± 0,13 [#]	1,74
12.05.2004	-7	7,13 ± 0,16	0,59 ± 0,17	5,81 ± 0,11	0,64 ± 0,11 [#]	1,31
<i>Mittelwert</i>		<i>7,51 ± 0,38</i>	<i>0,65 ± 0,05</i>	<i>5,98 ± 0,17</i>	<i>0,56 ± 0,08</i>	<i>1,53 ± 0,22</i>
12.05.2004	-6	6,93 ± 0,24	1,31 ± 0,72	4,80 ± 0,10	0,52 ± 0,10 [#]	2,14
14.05.2004	-6	7,99 ± 0,10	0,82 ± 0,17	4,90 ± 0,19	0,98 ± 0,38	3,08
24.05.2004	-6	7,40 ± 0,13	0,88 ± 0,23	4,91 ± 0,10	1,15 ± 0,25	2,49
24.06.2004	-6	7,59 ± 0,13	0,69 ± 0,18	5,16 ± 0,08	0,59 ± 0,09 [#]	2,43
<i>Mittelwert</i>		<i>7,48 ± 0,22</i>	<i>0,93 ± 0,13</i>	<i>4,94 ± 0,8</i>	<i>0,81 ± 0,30</i>	<i>2,54 ± 0,20</i>
19.05.2004	-5	7,80 ± 0,15	0,58 ± 0,14	4,03 ± 0,08	0,79 ± 0,17	3,77
24.05.2004	-5	7,12 ± 0,16	0,80 ± 0,24	4,01 ± 0,09	0,72 ± 0,20	3,11
24.06.2004	-5	7,68 ± 0,16	0,99 ± 0,36	4,21 ± 0,07	0,83 ± 0,13	3,47
<i>Mittelwert</i>		<i>7,53 ± 0,21</i>	<i>0,79 ± 0,12</i>	<i>4,08 ± 0,06</i>	<i>0,78 ± 0,03*</i>	<i>3,45 ± 0,19</i>
<i>Mittelung aller Werte der Kontrollkurven</i>		<i>7,51 ± 0,08</i>	<i>0,87 ± 0,08</i>			

Tabelle 21: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven der einzelnen Experimente unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von Atropin. Außerdem eingetragen sind die Mittelwerte \pm Standardfehler der Kenngrößen aller Kontrollkurven sowie für eine gegebene Atropin-Konzentration und deren zugehörige Kontrollkurven.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert (Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$).

n_H (freilaufernd): freilaufender Hill-Koeffizient.

VF: Verschiebungsfaktor ($EC_{50_Atropin}/EC_{50_Kontrolle}$)

signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten als mit $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$). Für diese Kurven sind im Anhang die pEC₅₀-Werte der Anpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten angegeben.

* signifikante Abweichung von $n_H = 1$ (t-Test, $p < 0,05$).

Aus den $\log(VF-1)$ -Werten aus Tabelle 21 ergab sich die in Abbildung 24 dargestellte Schild-Auftragung. Die Daten in Abbildung 24 wurden mithilfe der Gleichung von Arunlakshana und Schild zur Auswertung von kompetitivem Antagonismus (1959; s. 2.4.3, Gleichung 15) analysiert. Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse konnte die Affinität von Atropin zum freien Rezeptor mit $pK_A = 8,43 \pm 0,12$ ermittelt werden.

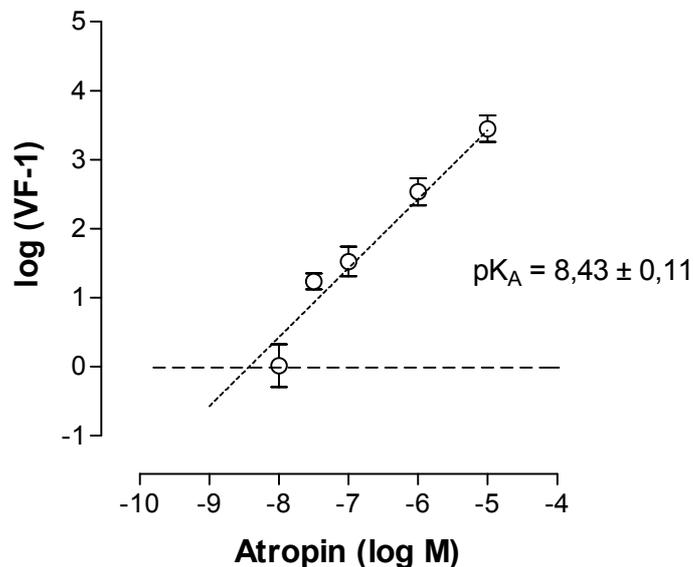


Abbildung 24: Schild-Auftragung der Atropin-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Atropin. **Kurvenanpassung:** Gleichung 15 (Arunlakshana und Schild, 1959; basierend auf den

pEC₅₀-Werten aus Tabelle 21). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Um eine graphische Zusammenschau der Ergebnisse aller Experimente des Atropin-Teilprojektes geben zu können, wurden die Messwerte (%-Werte der [³⁵S]GTP γ S-Bindung) der einzelnen Versuchstage jeweils für die Kontrollkurve und für jede Atropin-Konzentration gemittelt. An diese Mittelwerte wurden Kurven angepasst. Bei zwei dieser Kurven (Kontrollkurve und Kurve in Anwesenheit von 0,01 μ M Atropin) erwies sich eine Kurvenanpassung mit flacher Steigung statistisch als besser, verglichen mit einer Steigung von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$). Aus der statistischen Betrachtung der Gesamtheit der Kurven nach Lew und Angus (1995) ging hervor, dass eine Parallelverschiebung der zusammengefassten Kurven gegeben war, allerdings bei einer Anpassung mit einer flachen Kurvensteigung ($n_H = 0,69$; F-Test, $p < 0,05$). Daher wurden die Kurven in Abbildung 25 alle mit einem gemeinsamen Steigungsmaß von $n_H = 0,69$ generiert. Dieser Wert für den Hill-Koeffizienten ergab sich aus dem Mittelwert der freilaufenden Hill-Koeffizienten aller sechs in Abbildung 25 gezeigten Kurven. In Tabelle 22 finden sich die Kenngrößen der Kurven aus Abbildung 25. Bei der Betrachtung der dort dargestellten freilaufenden Hill-Koeffizienten wurde ebenfalls eine Tendenz zu flacheren Steigungen deutlich. Eine flache Kurvensteigung beschreibt demnach die Gesamtheit der Kurven besser als eine Steigung von $n_H = 1$.

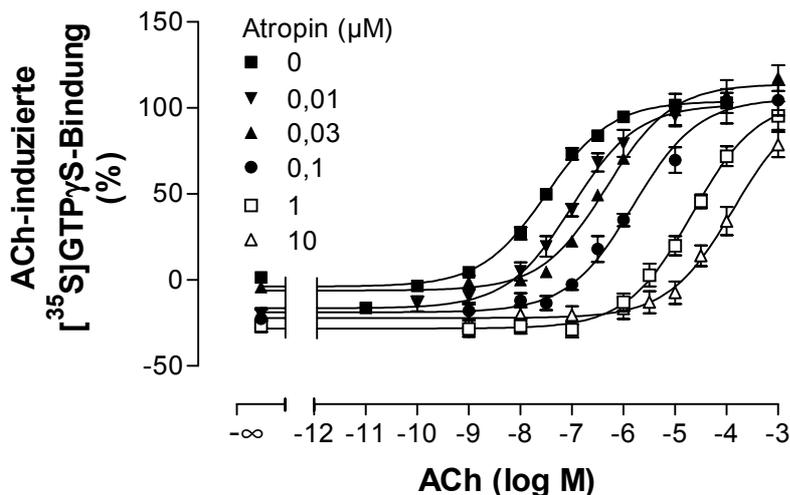


Abbildung 25: Einfluss steigender Konzentrationen von Atropin auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 0,69$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 16$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Atropin- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	Kontrolle	Atropin 0,01 μ M	Atropin 0,03 μ M	Atropin 0,1 μ M	Atropin 1 μ M	Atropin 10 μ M
pEC_{50}	7,49 $\pm 0,06$	7,00 $\pm 0,05^{**}$	6,33 $\pm 0,07^{**}$	5,81 $\pm 0,10^{**}$	4,67 $\pm 0,04^{**}$	3,87 $\pm 0,05^{**}$
Max (%)	104 \pm 2	102 \pm 2	114 \pm 2	106 \pm 4	105 \pm 2	104 \pm 4
Min (%)	-4 \pm 2	-16 \pm 2*	-6 \pm 2	-19 \pm 3*	-28 \pm 1*	-22 \pm 1*
n_H (frei- laufend)	0,76 $\pm 0,08^\#$	0,65 $\pm 0,05^\#$	0,76 $\pm 0,08$	0,56 $\pm 0,06$	0,68 $\pm 0,05$	0,71 $\pm 0,07$
n	16	4	3	2	4	3

Tabelle 22: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 25 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von Atropin. pEC_{50} , Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 0,69$. (Im Anhang sind die Kenngrößen für die Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten angegeben.)

pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, $p < 0,05/0,01$).

signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten als mit $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$).

Die Kurven aus Abbildung 25 dienten wie oben ausgeführt nicht als Grundlage für die Schild-Auftragung, da sich aus diesen für jede Atropin-Konzentration jeweils nur ein einzelner Verschiebungsfaktor ohne Streuung ergeben hätte, so dass die Streuung der Verschiebungsfaktoren sich nicht in der Schild-Auftragung wiedergefunden hätte. Die einzelnen Verschiebungsfaktoren waren jedoch mit einer Steigung von $n_H = 1$ erhalten worden, während die Zusammenfassung aller Experimente zeigte, dass die Kurvensteigung kleiner war. Um zu überprüfen, welche Auswirkung das Steilheitsmaß der Kurven auf das Ergebnis der Schild-Analyse hatte, wurden im Nachhinein für alle Einzelexperimente (s. Tabelle 21) Kurven mit der gemittelten Steigung von $n_H = 0,69$ (s. o.) generiert. In Abbildung 26 sind die daraus berechneten Verschiebungsfaktoren im Vergleich zu den Werten aus Abbildung 24 aufgetragen. Der Vergleich macht deutlich, dass sich die Verschiebungsfaktoren nicht signifikant änderten und demnach robust gegenüber der Kurvensteilheit waren, mit der die Kurven der Einzelexperimente generiert wurden. Dementsprechend unterschied sich der aus den flachen Konzentrations-Effekt-Kurven ermittelte $pK_A = 8,50 \pm 0,12$ auch nicht signifikant von dem in Abbildung 24 bestimmten Wert. Zur Orientierung sind in Abbildung 26 noch einmal die Mittelwerte der Verschiebungsfaktoren aufgetragen, die sich aus den pEC_{50} -Werten aus Tabelle 21 berechneten (Steigung der Einzelkurven: $n_H = 1$).

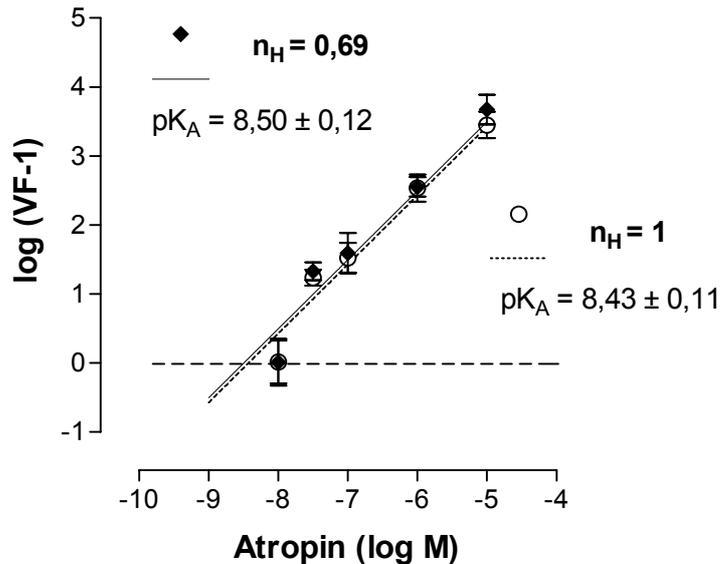


Abbildung 26: Schild-Auftragung der Atropin-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Atropin. **Kurvenanpassung:** Gleichung 15 (Arunlakshana und Schild, 1959). Geschlossene Symbole: VF berechnet aus den Kurven der Einzelerperimente mit $n_H = 0,69$; offene Symbole: VF berechnet aus den pEC₅₀-Werten aus Tabelle 21). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Unabhängig vom Berechnungsverfahren der Verschiebungsfaktoren ergab sich aus der Auswertung der Daten der Atropin-Versuchsreihe im Schild-Plot nach Arunlakshana und Schild (1959) eine Gerade mit einer Steigung von 1, d. h., dass sich das Ausmaß der Verschiebung ($\log(VF - 1)$) linear zur logarithmierten Konzentration von Atropin verhielt. Als Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse wurde eine Affinität von Atropin zum freien M₂-Rezeptor mit einem pK_A-Wert von $8,50 \pm 0,12$ ermittelt. Eine freilaufende Steigung der Schild-Geraden führte ebenso wie die Anwendung der Gleichung von Lanzafame et al. (1996 ; Beschreibung von allosterischem Antagonismus) zu keiner signifikant besseren Anpassung (F-Test, $p > 0,05$). Somit konnte das kompetitive Verhalten Atropins bestätigt werden.

Analog zu dem hier für den Antagonisten Atropin dargestellten Vorgehen wurde bei der Analyse des Verhaltens der allosterischen Modulatoren vorgegangen: Wenn die Mehrheit der Kurven der einzelnen Versuche mit einer Steigung von $n_H = 1$ angepasst werden konnte, wurden auf dieser Basis die Verschiebungsfaktoren

berechnet. Für die graphische Zusammenschau der Daten wurden die Messwerte der Kurven für jede Alloster-Konzentration gemittelt und neue Kurven generiert. Ergab eine statistische Analyse nach Lew und Angus (1995), dass eine Parallelverschiebung dieser Kurven nur mit einer flacheren Steigung und nicht mit $n_H = 1$ gegeben war, wurden nicht nur für die Daten der Zusammenschau, sondern auch für die Einzelexperimente nachträglich Kurven mit dieser flachen Steigung generiert und darauf beruhend die Verschiebungsfaktoren berechnet. Im Anhang wird gezeigt, dass dieses Verfahren auch für allosterische Modulatoren geeignet ist, um aussagekräftige Verschiebungsfaktoren berechnen zu können.

3.3.2.2 Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen und Derivate

3.3.2.2.1 W84

W84 ist wie die meisten allosterischen Modulatoren ein subtypselektiver Ligand mit einer Präferenz für den M_2 -Rezeptor (Tränkle et. al., 1998a). Mit Agonisten wie Carbachol und Oxotremorin interagiert es mit ausgeprägter negativer Kooperativität (Lüllmann et al., 1969).

W84 bewirkte eine in hohen Konzentrationen sättigbare Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve (Abbildung 27). Ab einer Konzentration von 1 μM verschob W84 die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven signifikant nach rechts. Der durch ACh induzierte Maximaleffekt wurde durch W84 im Wesentlichen nicht beeinflusst: 100 μM W84 riefen zwar eine signifikante Senkung des Maximaleffektes hervor, höhere Konzentrationen ließen die maximale ACh-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung jedoch unbeeinflusst, so dass es sich nicht um einen konzentrationsabhängigen Effekt von W84 handelte. Die basale [^{35}S]GTP γ S-Bindung wurde ab einer W84-Konzentration von 1 μM signifikant gesenkt (Ausnahme: 10 μM W84).

Für die Zusammenschau der Versuchsergebnisse konnte anhand der Methode nach Lew und Angus (1995) durch einen F-Test gezeigt werden, dass die Gesamtheit der Versuchsergebnisse ausreichend mit Kurven vom Steigungsmaß $n_H = 1$ beschrieben waren im Vergleich zu einem freilaufenden, individuellen Steigungsmaß für jede Konzentrations-Effekt-Kurve und es sich somit um eine Parallelverschiebung der Kurven handelte. Die Kontrollkurve für sich genommen wurde besser mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H < 1$ beschrieben (Tabelle 23).

Wurde der Mittelwert (\pm Standardfehler) der freilaufenden Hill-Koeffizienten der ACh-Kontrollkurven der einzelnen Versuchstage (aus der W84-Versuchsreihe) berechnet, ergab sich mit $n_H = 0,84 \pm 0,05$ ebenfalls eine signifikant kleinere Steigung als $n_H = 1$ ($p < 0,01$; siehe Anhang **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Dies bestätigt, dass die signifikant flachere Kontrollkurve nicht dadurch zustande kommt, dass Datenpunkte aus Einzelexperimenten mit normal steilen, aber parallel verschobenen Kontrollkurven zusammengenommen und einer gemeinsamen Kurvenanpassung unterworfen wurden. Die Steigung der meisten (12 von 15; siehe Anhang **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**) ACh-Kontrollkurven der einzelnen Versuchstage war hingegen nicht signifikant verschieden von $n_H = 1$. Somit erschien es angemessen für die Berechnung der Verschiebungsfaktoren, die sich an den einzelnen Versuchstagen ergaben, die jeweiligen Tages-Kontrollkurve mit dem Steilheitsmaß $n_H = 1$ anzupassen.

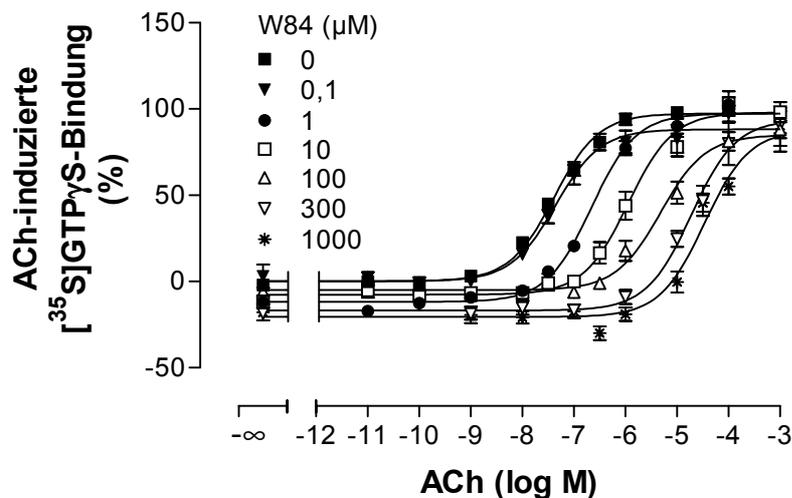


Abbildung 27: Einfluss steigender Konzentrationen von W84 auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 15$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein W84- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	W84 0,1 μ M	W84 1 μ M	W84 10 μ M	W84 100 μ M	W84 300 μ M	W84 1000 μ M
pEC ₅₀	7,38 \pm 0,05	7,35 \pm 0,07	6,66 \pm 0,07**	5,95 \pm 0,07**	5,32 \pm 0,09**	4,72 \pm 0,05**	4,47 \pm 0,10**
Max (%)	97 \pm 2	88 \pm 3	97 \pm 3	98 \pm 3	85 \pm 3	94 \pm 3	88 \pm 6
Min (%)	0 \pm 2	0 \pm 2	-12 \pm 2*	-8 \pm 2	-5 \pm 1	-17 \pm 2**	-21 \pm 2**
n _H (frei- laufend)	0,77 \pm 0,03 [#]	0,97 \pm 0,19	0,86 \pm 0,10	0,78 \pm 0,09	0,79 \pm 0,10	0,91 \pm 0,12	1,02 \pm 0,23
n	15	2	2	4	2	3	2

Tabelle 23: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 27 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von W84. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1. (Im Anhang sind die Kenngrößen für die Kurvenanpassung mit einem gemittelten Hill-Koeffizienten n_H = 0,87 angegeben.)

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/**signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,05/0,01).

[#] signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05).

Da W84 sich bekanntermaßen am muskarinischen M₂-Rezeptor allosterisch gegenüber dem Antagonisten NMS verhielt (Dissoziationsverzögerung von NMS; Tränkle et al., 1998a), erfolgte die Auswertung der Verschiebungsfaktoren, die aus den Wendepunkten der Kurven der einzelnen Versuchstage berechnet wurden, nach Lanzafame et al. (1996; Gleichung 17). Der gekrümmte Kurvenverlauf in der Schild-Auftragung spiegelte eine sättigbare Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven wider und gab einen Hinweis auf die Bildung ternärer Komplexe aus M₂-Rezeptor, ACh und W84. Aus der Datenanalyse in Abbildung 28 ergab sich für die Affinität von W84 zum freien Rezeptor ein Wert von pK_A = 6,64 \pm 0,14 und ein Faktor der Kooperativität zwischen W84 und ACh am M₂-Rezeptor von p α = -2,76 \pm 0,22. Daraus ließ sich die Affinität von W84 zum ACh-besetzten Rezeptor berechnen mit p(α -K_A) = 3,88.

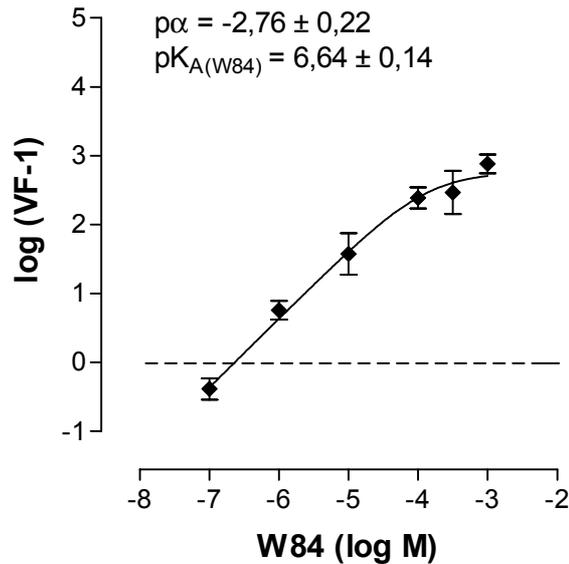


Abbildung 28: Schild-Auftragung der W84-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von W84. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten der Einzelerperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: $n_H = 1$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Zahn (1999) hatte die antagonistische Wirkung von W84 gegenüber ACh durch Messung der Kontraktionskraft an Meerschweinchen-Herzvorhöfen näher untersucht. Der pK_A -Wert (6,5) und der $p\alpha$ -Wert (-2,9) wichen nicht signifikant von den Werten dieser Arbeit ab. In Radioligandbindungsstudien mit [3H]NMS wurde schon mehrfach die Affinität von W84 zum freien M_2 -Rezeptor bestimmt, u. a. von Raasch et al. (2002: $pK_A = 6,53 \pm 0,02$; $n = 3$), Daiß et al. (2002: $pK_A = 6,41 \pm 0,18$; $n = 2-4$) und Muth et al. (2005: $pK_A = 6,19 \pm 0,13$; $n = 4$). Diese Literaturwerte unterschieden sich nicht signifikant von den Befunden dieser Arbeit (t-Test, $p > 0,05$).

Im Anhang findet sich eine Gegenüberstellung der Daten aus Tabelle 23/Abbildung 27 (konstante Steigung: $n_H = 1$) mit einer Auswertung, die den Mittelwert der Hill-Koeffizienten der in Abbildung 27 dargestellten Kurven (konstante Steigung: $n_H = 0,87$) zugrunde legt. Die resultierenden Maßzahlen für die Interaktion von W84 mit ACh unterschieden sich nicht signifikant von den in diesem Abschnitt beschriebenen.

3.3.2.2.2 SH28

SH28 ist ein verkürztes W84-Derivat mit nur einem quartären Stickstoff. Es wurde der Einfluss von SH28 auf die konzentrationsabhängige ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung untersucht. Genau wie die Muttersubstanz W84 führte SH28 zu einer Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve (Abbildung 29), jedoch signifikant erst ab einer Konzentration von 10 μM. Die statistische Betrachtung der Gesamtheit der Kurven nach Lew und Angus (1995) ergab, dass die Gesamtheit der Versuchsergebnisse ausreichend mit Kurven vom Steigungsmaß $n_H = 1$ beschrieben waren im Vergleich zu einem freilaufenden, individuellen Steigungsmaß für jede Konzentrations-Effekt-Kurve und es sich somit um eine Parallelverschiebung der Kurven handelte. Die Kontrollkurve und die Kurve in Anwesenheit von 1 μM SH28 für sich genommen wurden besser mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H < 1$ beschrieben. Die Werte der freilaufenden Steigungsmaße sind in Tabelle 24 gezeigt. Die Zugabe von SH28 führte zu keiner signifikanten Senkung der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung. Das obere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven wurde von SH28 nur in einer Konzentration von 300 μM signifikant herabgesetzt. Daher war nicht von einem konzentrations-abhängigen Effekt auszugehen.

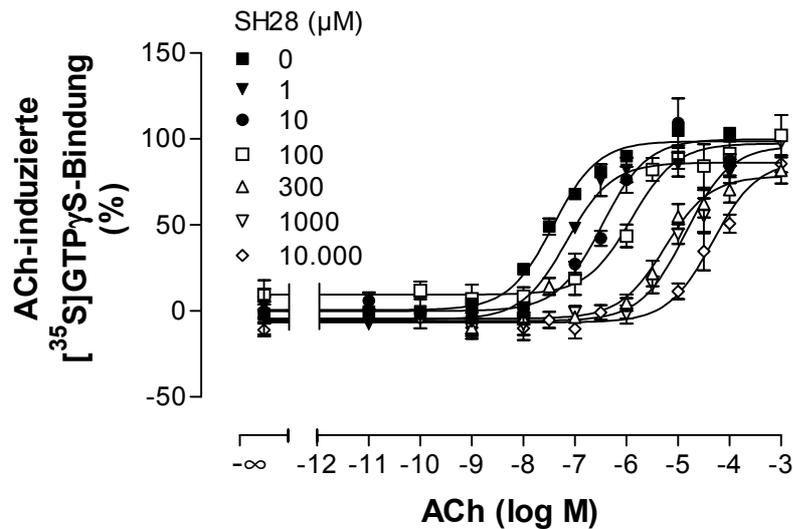


Abbildung 29: Einfluss steigender Konzentrationen von SH28 auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 17$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein SH28- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	Kontrolle	SH28 1 μ M	SH28 10 μ M	SH28 100 μ M	SH28 300 μ M	SH28 1000 μ M	SH28 10000 μ M
pEC ₅₀	7,42 \pm 0,07	7,16 \pm 0,11	6,47 \pm 0,12**	5,90 \pm 0,09**	5,25 \pm 0,11**	4,86 \pm 0,10**	4,32 \pm 0,08**
Max (%)	99 \pm 3	86 \pm 4	100 \pm 6	97 \pm 3	78 \pm 4**	96 \pm 5	87 \pm 5
Min (%)	1 \pm 2	-5 \pm 3	0 \pm 4	9 \pm 2	-4 \pm 3	-6 \pm 3	-7 \pm 2
n_H (frei- laufend)	0,68 \pm 0,05 [#]	1,82 \pm 0,52 [#]	1,08 \pm 0,32	1,24 \pm 0,31	1,08 \pm 0,27	0,80 \pm 0,15	0,59 \pm 0,10 [#]
n	17	2	3	3	4	3	2

Tabelle 24: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 29 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von SH28. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,01).

signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05).

In Abbildung 30 erfolgte eine Auswertung der Daten nach Lanzafame et al. (1996; Gleichung 17). Es resultierte ein pK_A-Wert (Affinität zum freien Rezeptor) von 5,54 ± 0,12 und ein pα-Wert (Kooperativitätsfaktor) von -3,46 ± 0,57. Aus pα und pK_A ließ sich die Affinität von SH28 zum ACh-besetzten Rezeptor berechnen mit p(α·K_A) = 2,08. Da der Datenpunkt der SH28-Konzentration 10 mM eine sehr große Streuung aufwies, zeigte sich nicht klar, dass die Schild-Kurve in hohen Konzentrationen abknickte und es sich somit um einen allosterischen Antagonismus handelte, bei dem das Ausmaß der Verschiebungsfaktoren einem Maximaleffekt zustrebt.

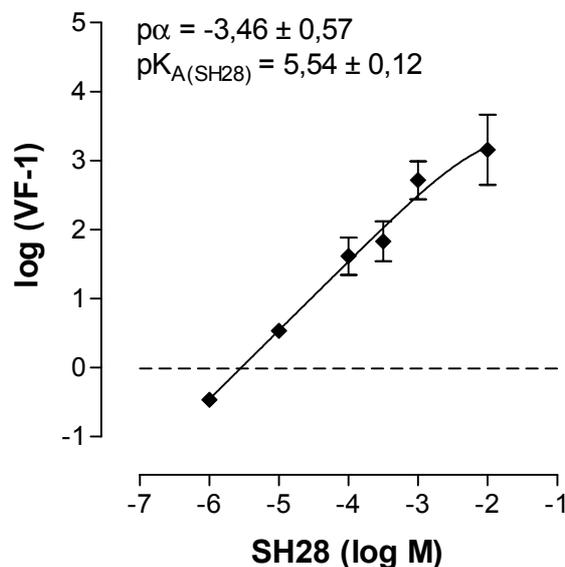


Abbildung 30: Schild-Auftragung der SH28-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von SH28. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC₅₀-Werten der Einzelexperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: n_H = 1). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Gilsbach et al. (2003) ermittelten für den allosterischen Modulator SH28, der die Dissoziation von [³H]NMS verzögerte im Na, K, P_i-Puffer einen pK_A-Wert von 5,87 ± 0,17 (n = 3). Dieser war trotz unterschiedlicher Pufferbedingungen nicht signifikant vom Wert dieser Arbeit verschieden (t-Test, p > 0,05).

3.3.2.2.3 Naphmethonium (MM3a)

Die Substanz Naphmethonium (MM3a) unterscheidet sich von dem Prototyp-Modulator W84 durch einen lateralen Naphthalimid-Ring sowie eine Dimethylierung in der Seitenkette. Es wurde der Einfluss von Naphmethonium auf die Kenngrößen der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve untersucht. Naphmethonium führte bereits bei einer Konzentration von 0,1 µM zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve, die in hohen Konzentrationen von Naphmethonium sättigbar war (Abbildung 31). In der Zusammenschau der Versuchsergebnisse erwies sich bei vier Kurven (Kontrollkurve und Kurven in Anwesenheit von 3, 30 und 100 µM Naphmethonium) eine Kurvenanpassung mit flacher Steigung statistisch als besser, verglichen mit einer Steigung von n_H = 1 (F-Test, p < 0,05). Eine statistische Betrachtung der Gesamtheit der Kurven (Lew und Angus, 1995; s. 2.4.4) zeigte, dass die Kurven parallel verschoben waren, allerdings bei einer Anpassung mit einer flachen Kurvensteigung (n_H = 0,91; F-Test, p < 0,05). In Tabelle 25 sind neben den Kenngrößen der Kurven aus Abbildung 31 die Steigungen angegeben, die sich bei einer Kurvenanpassung mit freilaufender Hill-Steigung ergaben. Weder das obere noch das untere Plateau der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve wurden durch Naphmethonium signifikant beeinflusst.

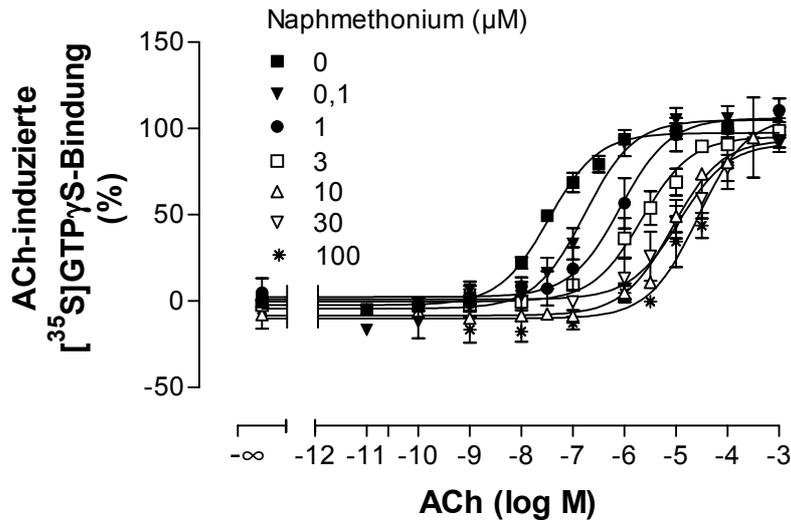


Abbildung 31: Einfluss steigender Konzentrationen von Naphmethonium auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 0,91$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 18$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Naphmethonium- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	Naphm. 0,1 μ M	Naphm. 1 μ M	Naphm. 3 μ M	Naphm. 10 μ M	Naphm. 30 μ M	Naphm. 100 μ M
pEC ₅₀	7,45 \pm 0,05	6,77 \pm 0,13**	6,08 \pm 0,08**	5,66 \pm 0,08**	5,07 \pm 0,06**	4,94 \pm 0,09**	4,57 \pm 0,12**
Max (%)	97 \pm 2	105 \pm 4	106 \pm 3	95 \pm 3	93 \pm 3	91 \pm 4	107 \pm 6
Min (%)	-2 \pm 2	-4 \pm 4	2 \pm 2	0 \pm 2	-8 \pm 1	1 \pm 2	-10 \pm 3
n _H (frei- laufend)	0,78 \pm 0,07 [#]	1,04 \pm 0,25	0,76 \pm 0,10	0,64 \pm 0,06 [#]	1,05 \pm 0,14	0,65 \pm 0,07 [#]	0,61 \pm 0,14 [#]
n	18	4	3	2	3	2	4

Tabelle 25: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 31 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von Naphmethonium. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 0,91.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,01).

[#] signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten als mit n_H = 1 (F-Test, p < 0,05).

Eine quantitative Darstellung der Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve durch Naphmethonium erfolgte in der Schild-Auftragung nach Lanzafame et al. (1996; Abbildung 32). Die Affinität von Naphmethonium zum freien M₂-Rezeptor hatte einen Wert von pK_A = 7,66 \pm 0,13. Die Kooperativität mit ACh wurde beschrieben durch einen α -Wert von -2,61 \pm 0,16. Daraus ließ sich die Affinität von Naphmethonium zum ACh-besetzten Rezeptor berechnen mit p(α ·K_A) = 5,05.

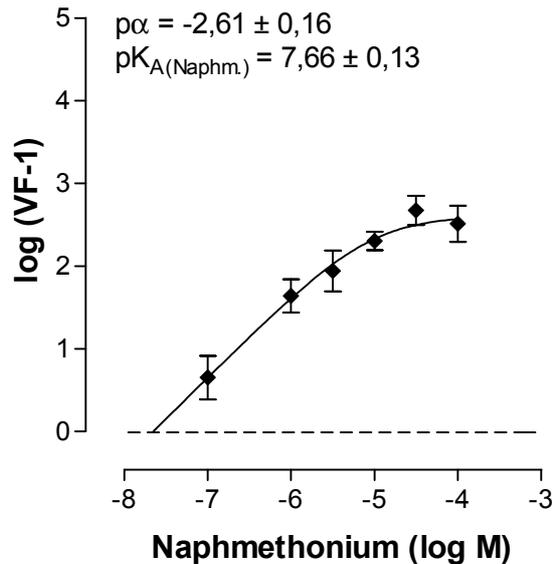


Abbildung 32: Schild-Auftragung der Naphmethonium-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Naphmethonium. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten der Einzelexperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: $n_H = 0,91$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung. (Im Anhang erfolgte auch eine Auswertung dieses Datensatzes, die auf einem Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven von $n_H = 1$ beruhte, sowie eine Auswertung, die die pEC_{50} -Werte aus Tabelle 25 zugrundelegte.)

Muth et al. (2003) fanden in [^3H]NMS-Bindungsexperimenten für Naphmethonium, welches eine Dissoziations-Verzögerung von NMS am M_2 -Rezeptor hervorrief, einen pK_A -Wert von $8,29 \pm 0,18$ ($n = 8$), der sich signifikant von dem in dieser Arbeit gefundenen Wert unterschied (t-Test, $p < 0,05$). Die Differenz, die weniger als eine Dekade betrug, war wahrscheinlich durch unterschiedliche Versuchsbedingungen zu erklären.

3.3.2.2.4 MM7a

MM7a ist ein „halbes“ Naphmethonium-Derivat, das den Naphthalimid-Ring und die Dimethylierung der Seitenkette enthält. Es verzögerte die Dissoziation von [^3H]NMS in Radioligandbindungsstudien, ließ die Gleichgewichtsbindung jedoch unbeeinflusst (Matthias Sennwitz, persönliche Mitteilung). Der Effekt von MM7a auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve ist im Folgenden dargestellt. Ab einer

Konzentration von 10 μM kam es durch MM7a zu einer signifikanten Verschiebung des Wendepunktes. Alle Kurven waren mit einer Steigung von $n_H = 1$ parallel verschoben (Test auf Parallelverschiebung nach Lew und Angus, 1995; s. 2.4.4). Die Steigungen einer Kurvenanpassung mit freilaufendem Steigungsmaß sind in Tabelle 26 angegeben. MM7a hatte keinen signifikanten Einfluss auf die basale [^{35}S]GTP γS -Bindung und den ACh-Maximaleffekt.

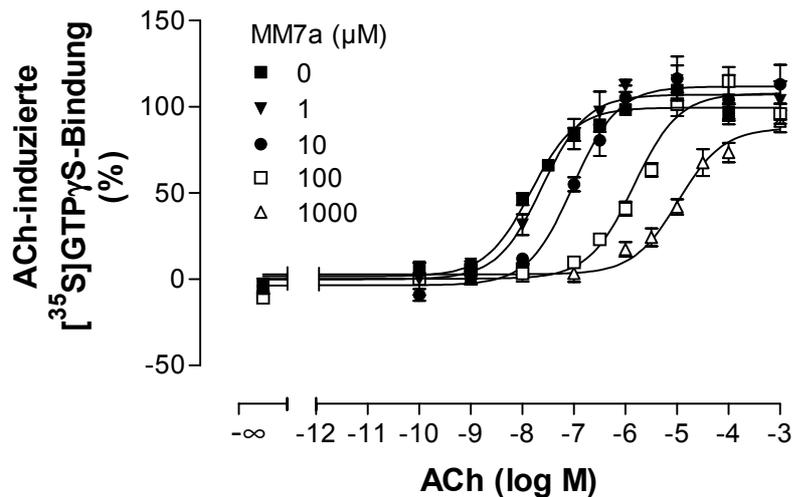


Abbildung 33: Einfluss steigender Konzentrationen von MM7a auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 10$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein MM7a- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	MM7a 1 μ M	MM7a 10 μ M	MM7a 100 μ M	MM7a 1000 μ M
pEC ₅₀	7,84 ± 0,09	7,62 ± 0,12	7,01 ± 0,07**	5,84 ± 0,12**	4,98 ± 0,10**
Max (%)	100 ± 3	107 ± 3	112 ± 3	108 ± 5	88 ± 4
Min (%)	2 ± 4	0 ± 4	-4 ± 3	0 ± 4	3 ± 2
n _H (frei- laufend)	0,76 ± 0,13	0,93 ± 0,19	0,90 ± 0,14	1,01 ± 0,25	0,69 ± 0,11
n	10	2	2	4	2

Tabelle 26: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 33 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von MM7a. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,01).

Aufgrund des bekannten allosterischen Verhaltens von MM7a (verzögernder Effekt von MM7a auf die [³H]NMS-Dissoziation; Matthias Sennwitz, persönliche Mitteilung) wurden die Daten in einer Schild-Auftragung nach Lanzafame et al. (1996) ausgewertet (Abbildung 34). Die Affinität von MM7a zum M₂-Rezeptor konnte beschrieben werden durch einen pK_A von 5,95 \pm 0,11. Wertete man die Daten aus Abbildung 34 mittels linearer Regression aus, ergab sich eine Gerade, deren Steigung nicht signifikant unterschiedlich von 1 war. Da MM7a vermutlich nicht an der orthosterischen Bindungsstelle angriff, konnte das antagonistische Verhalten als „pseudokompetitiv“ bezeichnet werden, d. h., dass MM7a sich formal wie ein kompetitiver Antagonist verhielt (parallele Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve; Schild-Gerade mit einer Steigung von 1) jedoch nicht mit dem Agonisten um das gleich Bindungsareal konkurrierte. Die Verschiebungsfaktoren (log (VF - 1)) in Abbildung 34 strebten keinem Maximum zu, so dass sich ein Konzentrationsbereich für die Bildung ternärer Komplexe aus MM7a, ACh und

M₂-Rezeptor nicht ableiten ließ. Die Kooperativität zwischen MM7a und ACh konnte mit $p\alpha < -3$ abgeschätzt werden, da der maximale Wert für $\log(VF-1)$ in Abbildung 34 bei 3 lag.

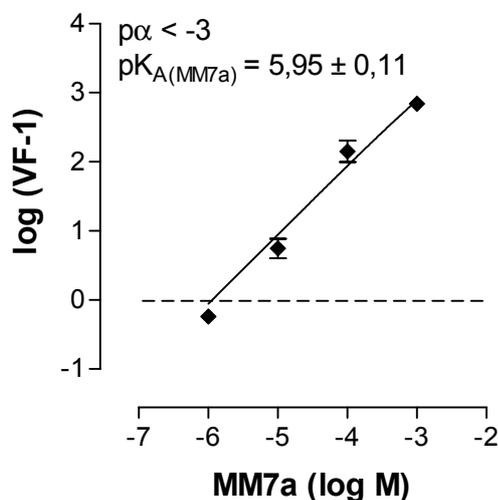


Abbildung 34: Schild-Auftragung der MM7a-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von MM7a. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten der Einzelerperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: $n_H = 1$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

3.3.2.2.5 TD2

TD2, ein W84-Derivat, ist die einzige Silicium-haltige Verbindung, die in dieser Arbeit untersucht wurde. Ebenso wie die Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen schwächte es die Affinität von ACh zum M₂-Rezeptor ab. Eine signifikante Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve erfolgte ab einer TD2-Konzentration von 1 μ M (Abbildung 35). Die Gesamtheit der Versuchsergebnisse war ausreichend mit Kurven vom Steigungsmaß $n_H = 1$ beschrieben im Vergleich zu einem freilaufenden Steigungsmaß für jede Konzentrations-Effekt-Kurve (Test auf Parallelverschiebung s. 2.4.4). Die Kontrollkurve für sich genommen wurde besser mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H < 1$ beschrieben (Tabelle 27). In hohen Konzentration von TD2 (ab 30 μ M) wurde die maximale ACh-induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung signifikant gesenkt, wohingegen die basale [³⁵S]GTP γ S-Bindung unbeeinflusst blieb.

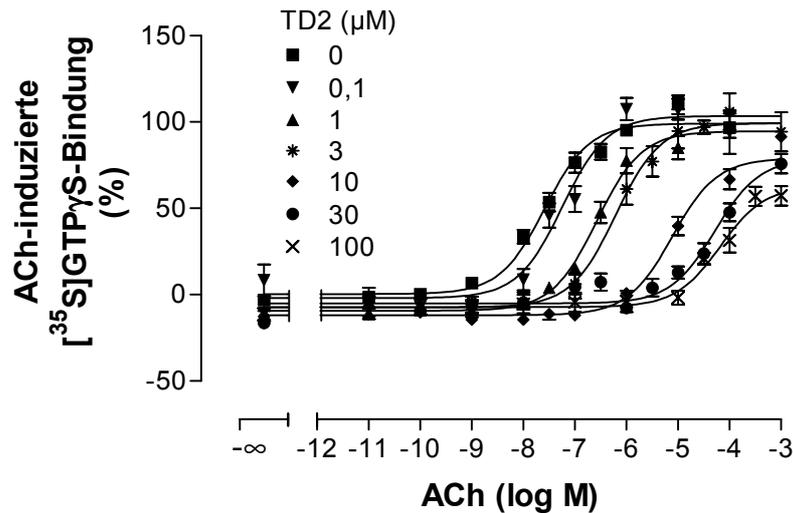


Abbildung 35: Einfluss steigender Konzentrationen von TD2 auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 17$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein TD2- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	TD2 0,1 μ M	TD2 1 μ M	TD2 3 μ M	TD2 10 μ M	TD2 30 μ M	TD2 100 μ M
pEC ₅₀	7,59 ± 0,09	7,24 ± 0,14	6,57 ± 0,05**	6,21 ± 0,07**	5,11 ± 0,09**	4,28 ± 0,15**	4,18 ± 0,11**
Max (%)	99 ± 3	104 ± 6	95 ± 3	99 ± 2	79 ± 4	79 ± 7*	63 ± 4**
Min (%)	0 ± 3	-2 ± 5	-9 ± 2	-7 ± 2	-12 ± 2	-5 ± 2	-7 ± 2
n _H (frei- laufend)	0,69 ± 0,10 [#]	1,03 ± 0,37	1,11 ± 0,14	0,97 ± 0,16	0,73 ± 0,13	0,68 ± 0,23	1,03 ± 0,27
n	17	2	2	2	3	4	4

Tabelle 27: Kenngrößen (± Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 35 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von TD2. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,05/0,01).

signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05).

Da die Absenkung des oberen Plateaus der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve auf ein allosterisches Verhalten hinwies und ein verzögernder Effekt von TD2 auf die Dissoziation von [³H]NMS bekannt war (Daiß et al., 2002), wurde eine Anpassung nach Lanzafame et al. (1996) vorgenommen (Abbildung 36). Die Affinität von TD2 zum freien Rezeptor betrug pK_A = 7,35 ± 0,14. Daiß et al. (2002) ermittelten einen Wert von pK_A = 6,46 ± 0,14 (n = 4). Die Abweichung beruhte vermutlich auf experimentellen Unterschieden. Der Kooperativitätsfaktor konnte mit pα < -3 abgeschätzt werden. Wertete man die Daten aus Abbildung 36 mittels linearer Regression aus, ergab sich eine Gerade, deren Steigung wie bei einem kompetitiven Antagonisten nicht signifikant verschieden von 1 war.

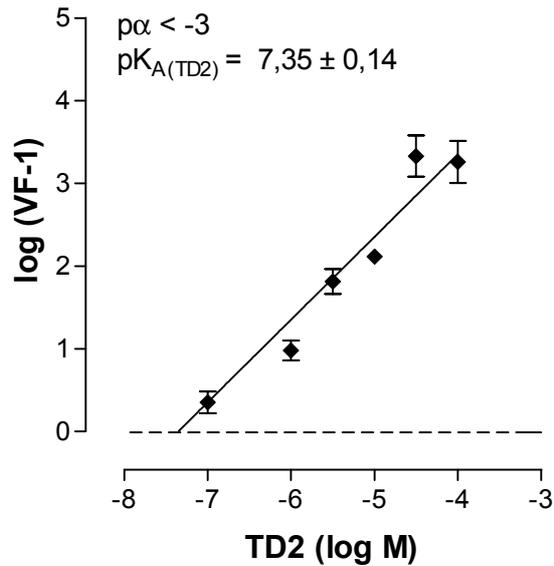


Abbildung 36: Schild-Auftragung der TD2-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von TD2. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten der Einzelexperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: $n_H = 1$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

In weiteren Versuchen wurde der konzentrationsabhängige Einfluss von TD2 auf den ACh-Maximaleffekt untersucht. Es wurde zu einer ACh-Konzentration (ACh 1 mM), die auch in Anwesenheit von TD2 im oberen Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve lag, steigende Konzentrationen von TD2 hinzugegeben. In Abbildung 37 sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten dargestellt (geschlossene Symbole). Zusätzlich sind die Max-Werte aus Tabelle 27, d. h. die Werte der oberen Plateaus der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven jeweils unter Einfluss einer bestimmten TD2-Konzentration, abgebildet (offene Symbole). An diese erfolgte jedoch keine Kurvenanpassung.

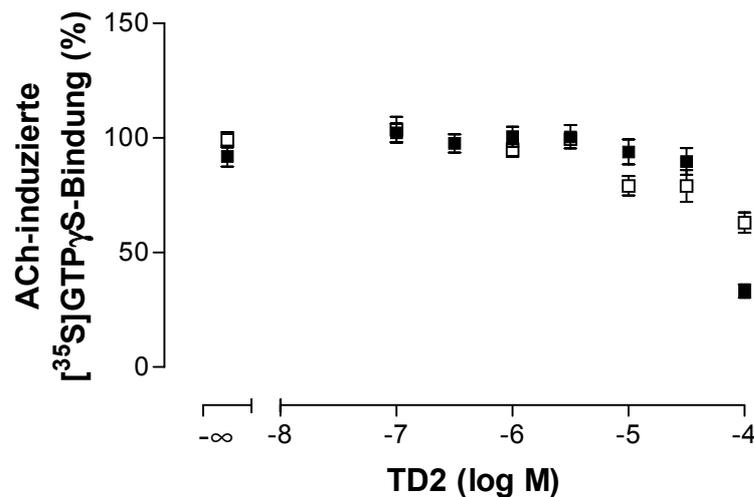


Abbildung 37: Einfluss steigender Konzentrationen von TD2 auf den ACh-induzierten Maximaleffekt (ACh: 1 mM). **Ordinate:** ACh-induzierte [³⁵S]GTP_γS-Bindung in Prozent [Basalaktivität = 0%, ACh-Maximaleffekt = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von TD2. **Kurvenanpassung:** Eine sinnvolle Anpassung mittels der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 6) war nicht möglich (s. Text). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten (geschlossene Symbole). Die Datenpunkte mit offenen Symbolen zeigen die Max-Werte aus Abbildung 35 bzw. Tabelle 27.

Die Daten (geschlossene Symbole) in Abbildung 37 sollten mithilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ ausgewertet werden. Da nur der Datenpunkt bei 100 μM TD2 signifikant von 100% abwich (t-Test, $p < 0,01$), war eine sinnvolle Kurvenanpassung und die damit verbundene Bestimmung eines Wendepunktes nicht möglich. Die Konzentrationsabhängigkeit der Reduktion des ACh-Maximaleffektes durch TD2 konnte demnach nicht gezeigt werden. Da es außerdem in Abbildung 36 keine Annäherung der Verschiebungsfaktoren an ein Maximum gab, war es wahrscheinlich, dass die Senkung der ACh-induzierten [³⁵S]GTP_γS-Bindung durch TD2 nicht auf der Bildung ternärer Komplexe beruhte, sondern möglicherweise andere Interaktionen von TD2 mit dem Rezeptor oder mit G-Proteinen als Ursache hatte.

3.3.2.3 Strychnin und Derivate

3.3.2.3.1 Strychnin

Der Einfluss des relativ kleinen, kompakten Moleküls Strychnin, das vereinfacht auch als ein Monomer des Alcuronium angesehen werden kann (Lazareno und Birdsall, 1995), auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve wird im Folgenden betrachtet. Strychnin verschob diese ab Konzentrationen von 10 μM signifikant nach rechts (Abbildung 38). Der Wirksamkeitsverlust von ACh ging in hohen Strychnin-Konzentrationen ab 1000 μM einher mit einer Verminderung des ACh-induzierten Maximaleffektes. Die spontane [^{35}S]GTP γ S-Bindung wurde durch Strychnin nicht signifikant moduliert (Dunnett t-Test, $p > 0,05$). In der Zusammenschau der Versuchsergebnisse erwies sich bei zwei Kurven (Kurven in Anwesenheit von 10 μM und 100 μM Strychnin) eine Kurvenanpassung mit flacher Steigung statistisch als besser, verglichen mit einer Steigung von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$). Eine statistische Betrachtung der Gesamtheit der Kurven (Lew und Angus, 1995; s. 2.4.4) zeigte, dass die Kurven parallel verschoben waren, allerdings bei einer Anpassung mit einer flachen Kurvensteigung ($n_H = 0,76$; F-Test, $p < 0,05$). Die freilaufenden Steigungsmaße sind neben den Kenngrößen der Kurven aus Abbildung 38 in Tabelle 28 dargestellt.

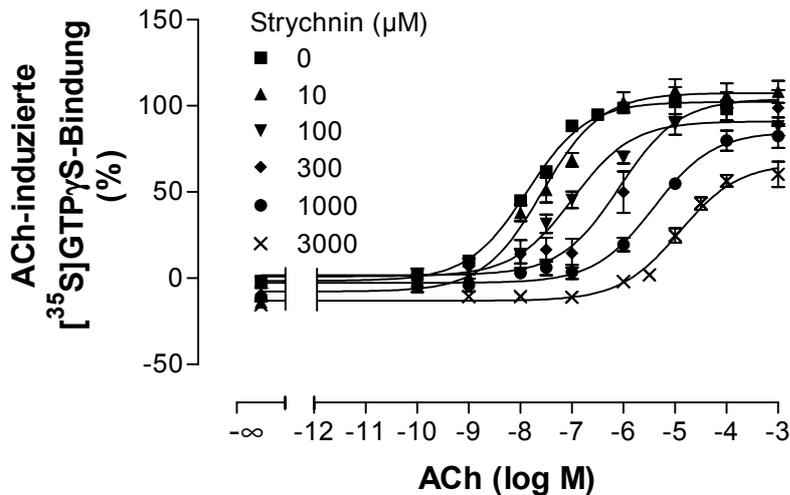


Abbildung 38: Einfluss steigender Konzentrationen von Strychnin auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 0,76$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 17$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Strychnin- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	Kontrolle	Strychnin 10 μ M	Strychnin 100 μ M	Strychnin 300 μ M	Strychnin 1000 μ M	Strychnin 3000 μ M
pEC ₅₀	7,87 $\pm 0,06$	7,58 $\pm 0,09$	6,98 $\pm 0,11^{**}$	6,07 $\pm 0,20^{**}$	5,41 $\pm 0,14^{**}$	4,92 $\pm 0,10^{**}$
Max (%)	102 \pm 2	108 \pm 3	91 \pm 3*	104 \pm 6	85 \pm 4**	67 \pm 3**
Min (%)	-2 \pm 2	-8 \pm 3	1 \pm 3	2 \pm 4	-3 \pm 2	-13 \pm 2
n_H (frei- laufend)	0,83 $\pm 0,09$	0,59 $\pm 0,08^\#$	0,59 $\pm 0,08^\#$	0,89 $\pm 0,32$	0,61 $\pm 0,13$	1,03 $\pm 0,12$
n	17	4	4	3	3	3

Tabelle 28: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 38 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von Strychnin. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 0,76$.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (**freilaufend**): freilaufender Hill-Koeffizient.

n : Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, $p < 0,05/0,01$).

signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten als mit $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$).

Die bereits von Lazareno und Birdsall (1995) in [³⁵S]GTPγS-Experimenten beobachtete Senkung des ACh-Maximaleffektes durch Strychnin deutete auf einen nicht-kompetitiven Antagonismus hin. Deshalb wurden die Daten nach dem allosterischen Modell (Lanzafame et al., 1996) analysiert (Abbildung 39). Die Affinität von Strychnin zum freien M₂-Rezeptor wurde beschrieben durch einen pK_A-Wert von $5,15 \pm 0,13$. In [³H]NMS-Bindungsexperimenten wurden pK_A-Werte von 4,96 (Lazareno und Birdsall; 1995), 4,93 (Jakubík et al., 1997), 4,56 (Jakubík et al.; 2005), und 5,47 (Proška und Tuček; 1996) für die Affinität von Strychnin zum unbesetzten M₂-Rezeptor gefunden. Die letzten beiden Werte unterschieden sich signifikant vom Ergebnis dieser Arbeit, jedoch nicht um mehr als eine Dekade, so dass insgesamt eine gute Übereinstimmung mit den Literaturwerten bestand. Ein pα-Wert, der auf die Bildung ternärer Komplexe hinwies, konnte nicht ermittelt werden, da die Verschiebungsfaktoren keinem Maximalwert zustrebten. Der Kooperativitätsfaktor konnte nur mit pα < -3 abgeschätzt werden. Bei Auswertung der Daten mittels linearer Regression (Gerade in Abbildung 39 nicht dargestellt) nahm die Steigung ungewöhnlicherweise mit $s = 1,26 \pm 0,10$ einen signifikant größeren Wert als 1 an (F-Test, $p < 0,05$).

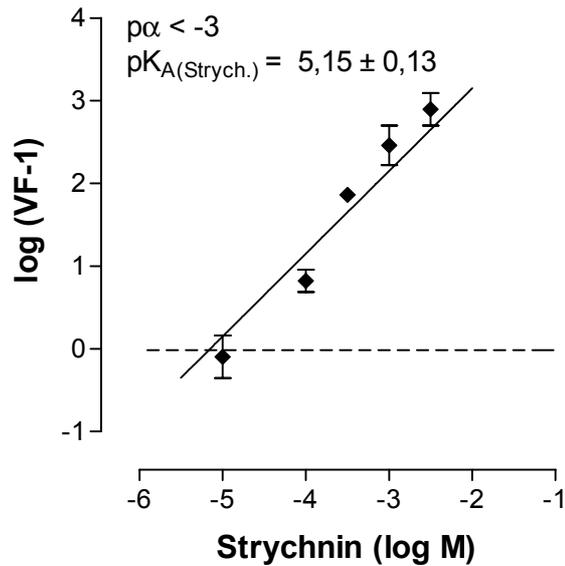


Abbildung 39: Schild-Auftragung der Strychnin-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Strychnin. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten der Einzelexperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: $n_H = 0,76$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Es wurde versucht den senkenden Einfluss von Strychnin auf den ACh-Maximaleffekt zu quantifizieren. Da die Max-Werte aus Tabelle 28 nicht zusammenhängend, sondern an verschiedenen Versuchstagen bestimmt wurden, wurden drei unabhängige Experimente mit jeweiliger Vierfachbestimmung durchgeführt, in denen zu einer konstanten, rezeptorsättigenden ACh-Konzentration (1mM) steigende Strychnin-Konzentrationen hinzugegeben wurden. Die gemittelten Messwerte dieser Experimente stellen die geschlossenen Symbole in Abbildung 40 dar. Die Max-Werte aus Tabelle 28, an die keine Kurvenanpassung erfolgte, sind zusätzlich als offene Symbole abgebildet. Die Daten der geschlossenen Symbole wurden mithilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ angepasst. Die Hill-Steigung war nicht signifikant verschieden von $n_H = -1$ (freilaufender Hill-Koeffizient: $n_H = -1,41 \pm 0,86$). Als pIC_{50} (Wendepunkt der Kurve) ergab sich ein Wert von $3,59 \pm 0,24$. Das untere Plateau der Kurve wurde beschrieben durch $E_{min} = 75 \pm 3\%$. Da sich in Abbildung 39 keine Sättigung der Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve zeigte, ist

es wahrscheinlich, dass die Senkung des Maximaleffektes nicht auf der Bildung ternärer Komplexe beruhte.

Auch Lazareno und Birdsall (1995) fanden in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten an M₂-Rezeptoren eine Reduktion des ACh-Maximaleffektes bei Strychnin-Konzentrationen ab 100 μM. In ihren Untersuchungen wurde jedoch zusätzlich die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung signifikant gesenkt. Die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven wurden durch Strychnin nach rechts verschoben. Ebenfalls durchgeführte Radioligandbindungsstudien mit [³H]NMS (Lazareno und Birdsall, 1995) zeigten, dass Strychnin allosterisch mit muskarinischen Rezeptoren interagiert.

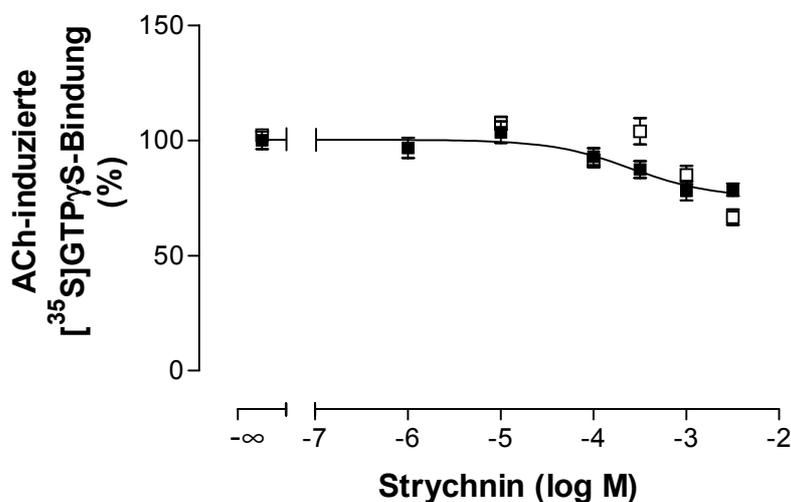


Abbildung 40: Einfluss steigender Konzentrationen von Strychnin auf den ACh-induzierten Maximaleffekt (ACh: 1 mM). **Ordinate:** ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Strychnin. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = -1$. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten (geschlossene Symbole). Die Datenpunkte mit offenen Symbolen zeigen die Max-Werte aus Abbildung 38 bzw. Tabelle 28.

3.3.2.3.2 Di-Strychnin-6

Zlotos et al. (2003) beobachteten in Radioligandbindungsstudien eine Erhöhung der Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS sowie eine [³H]NMS-Dissoziationsverzögerung vom M₂-Rezeptor durch Di-Strychnin-6, was als ein deutlicher Hinweis für eine allosterische Interaktion gilt (Lazareno et al., 2000). 10 μM Di-Strychnin-6 riefen bereits eine signifikante Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve hervor (Abbildung 41). Für die Zusammenschau der

Versuchsergebnisse konnte anhand der Methode nach Lew und Angus (1995; s. 2.4.4) durch einen F-Test gezeigt werden, dass die Gesamtheit der Versuchsergebnisse ausreichend mit Kurven vom Steigungsmaß $n_H = 1$ beschrieben waren verglichen mit einem freilaufenden, individuellen Steigungsmaß für jede Konzentrations-Effekt-Kurve. Somit handelte es sich um eine Parallelverschiebung der Kurven. Die höchste eingesetzte Di-Strychnin-6-Konzentration (100 μM) führte zu einer signifikanten Steigerung des ACh-induzierten Maximaleffektes auf $115 \pm 5\%$ (Dunnett t-Test, $p < 0,05$). Die basale [^{35}S]GTP γS -Bindung wurde nur in einer mittleren Di-Strychnin-6-Konzentration (30 μM) signifikant gesenkt (Dunnett t-Test, $p < 0,01$).

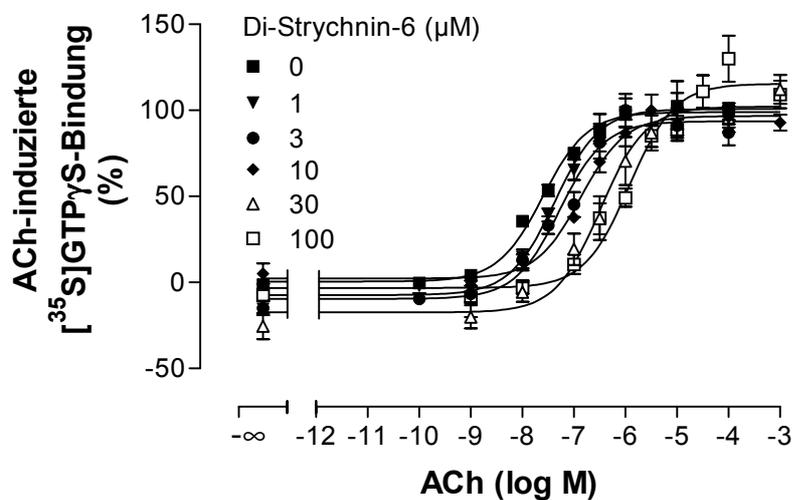


Abbildung 41: Einfluss steigender Konzentrationen von Di-Strychnin-6 auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 12$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Di-Strychnin-6- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	Di- Strychnin- 6 1 μ M	Di- Strychnin- 6 3 μ M	Di- Strychnin- 6 10 μ M	Di- Strychnin- 6 30 μ M	Di- Strychnin- 6 100 μ M
pEC ₅₀	7,60 ± 0,06	7,37 ± 0,06	7,27 ± 0,12	6,86 ± 0,07**	6,49 ± 0,10**	5,92 ± 0,12**
Max (%)	99 ± 2	101 ± 2	94 ± 5	97 ± 2	102 ± 4	115 ± 5*
Min (%)	1 ± 2	-7 ± 3	-10 ± 4	2 ± 3	-17 ± 4**	-3 ± 5
n _H (frei- laufend)	0,75 ± 0,06 [#]	0,95 ± 0,13	0,90 ± 0,23	1,19 ± 0,21	0,69 ± 0,11	0,73 ± 0,17
n	16	4	4	3	2	3

Tabelle 29: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 41 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von Di-Strychnin-6. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,05/0,01).

[#] signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05).

In der Schild-Auftragung (Abbildung 42) erfolgte eine Auswertung der Daten nach Lanzafame et al. (1996), da ein allosterisches Verhalten von Di-Strychnin-6 am M₂-Rezeptor festgestellt werden konnte (Zlotos et al., 2003). Der pK_A-Wert betrug 5,61 \pm 0,11. Da die Verschiebungsfaktoren im untersuchten Konzentrationsbereich keinem Maximalwert zustrebten, konnte der Kooperativitätsfaktor nur mit p α < -2 abgeschätzt werden. Höhere Konzentrationen an Di-Strychnin-6 konnten aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit der Substanz nicht untersucht werden.

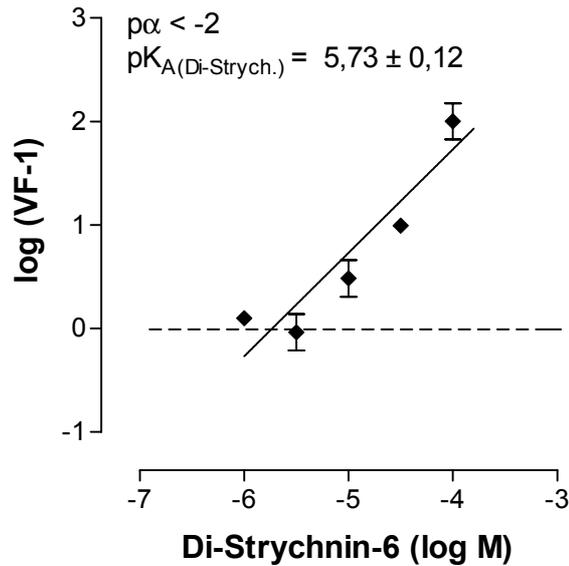


Abbildung 42: Schild-Auftragung der Di-Strychnin-6-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Di-Strychnin-6. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten der Einzelexperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: $n_H = 1$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

3.3.2.3.3 Str6Naph

Str6Naph ist ein Hybrid aus Strychnin und einer Teilstruktur von Naphmethonium. Sowohl die Naphthalimid-Struktur von Naphmethonium als auch der Strychnin-Rest sind Molekülteile, die zu einer hohen Affinität am M_2 -Rezeptor führen (Muth et al., 2005; Zlotos et al., 2003). Dancila (2003) fand in $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindungsexperimenten eine hohe Affinität von Str6Naph zum NMS-besetzten Rezeptor ($pEC_{50, \text{diss}} = 7,81 \pm 0,04$). Die Affinität zum freien M_2 -Rezeptor war relativ niedrig ($pK_A = 6,07 \pm 0,37$), so dass die durch Str6Naph hervorgerufene Steigerung der NMS-Affinität außergewöhnlich hoch war. Die Konzentrations-Effekt-Kurven von Str6Naph in den Radioligandbindungsstudien wiesen außerdem eine hohe Steilheit auf, die auf ein atypisches Bindungsverhalten hinwies (Dancila, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Str6Naph auf die ACh-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung untersucht. Str6Naph verhielt sich in allen eingesetzten Konzentrationen (ab $1 \mu\text{M}$) antagonistisch gegenüber ACh, so dass die ACh-

Konzentrations-Effekt-Kurve nach rechts verschoben wurde (Abbildung 43). Es handelte sich um eine Parallelverschiebung mit einer Steigung von $n_H = 1$ (Test auf Parallelverschiebung: s. 2.4.4). 100 μM Str6Naph führten zu einer signifikanten Steigerung des ACh-Maximaleffektes (Dunnett t-Test; $p < 0,01$) auf $156 \pm 7\%$. Die spontane [^{35}S]GTP γS -Bindung wurde durch einige Str6Naph-Konzentrationen signifikant, jedoch nicht konzentrationsabhängig herabgesetzt.

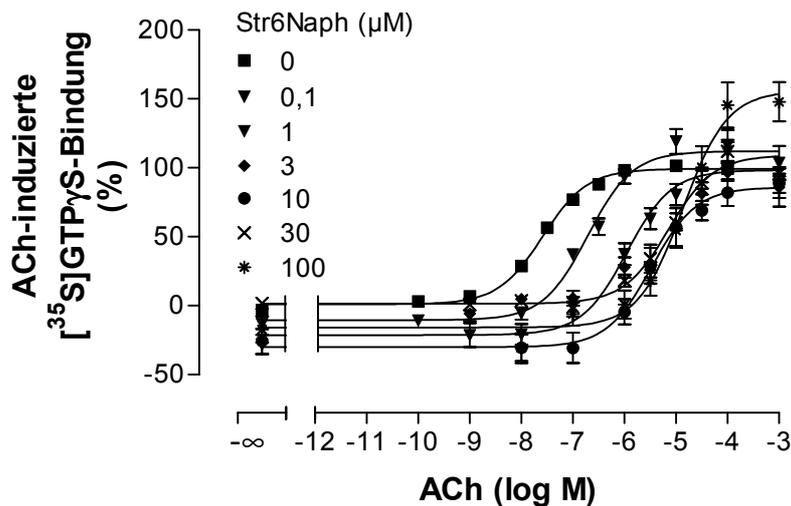


Abbildung 43: Einfluss steigender Konzentrationen von Str6Naph auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 17$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Str6Naph- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	Str6-Naph 0,1 µM	Str6-Naph 1 µM	Str6-Naph 3 µM	Str6-Naph 10 µM	Str6-Naph 30 µM	Str6-Naph 100 µM
pEC ₅₀	7,59 ± 0,04	6,71 ± 0,08**	5,96 ± 0,15**	5,23 ± 0,14**	5,48 ± 0,05**	5,15 ± 0,10**	4,87 ± 0,08**
Max (%)	99 ± 1	112 ± 4	98 ± 7	94 ± 6	86 ± 2*	109 ± 5	156 ± 7**
Min (%)	1 ± 2	-10 ± 3	-21 ± 6**	2 ± 4	-30 ± 2**	1 ± 3	-16 ± 5**
n _H (freilaufend)	0,85 ± 0,07	0,95 ± 0,18	0,75 ± 0,25	0,88 ± 0,27	0,96 ± 0,12	1,06 ± 0,22	1,00 ± 0,19
n	17	3	3	3	3	2	3

Tabelle 30: Kenngrößen (± Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 43 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von Str6Naph. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,05/0,01).

In einer Auftragung nach Lanzafame et al. (1996; Abbildung 44) zeigte die abflachende Kurve, dass es in Anwesenheit von Str6Naph zur Bildung ternärer Komplexe kam. Es ergab sich eine Affinität von Str6Naph zum freien Rezeptor von pK_A = 7,69 ± 0,11 und ein Kooperativitätsfaktor von pα = -2,69 ± 0,14. Daraus ließ sich die Affinität von Str6Naph zum ACh-besetzten Rezeptor berechnen mit p(α·K_A) = 5,00.

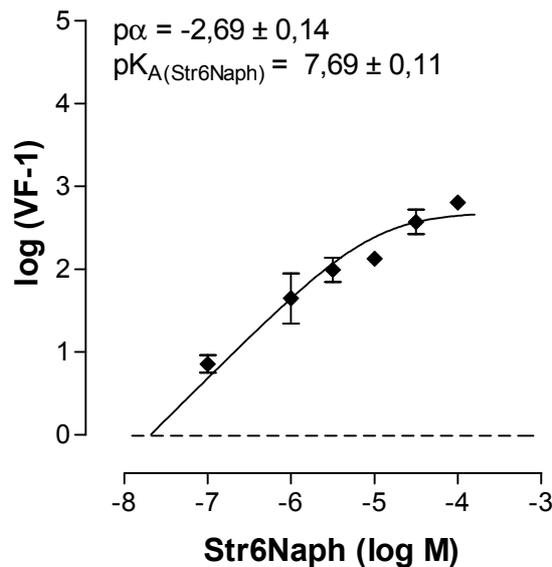


Abbildung 44: Schild-Auftragung der Str6Naph-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Str6Naph. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten aus Tabelle 30). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

3.3.2.4 Alcuronium und Caracurine

3.3.2.4.1 Alcuronium

Alcuronium weist gegenüber ACh am M_2 -Rezeptor eine ausgeprägte negative Kooperativität auf (Jakubík et al., 1997). Es bindet bekanntermaßen wie Gallamin, W84 und Strychnin an die „common allosteric site“ (Ellis und Seidenberg, 1992; Proška und Tuček, 1995; Lanzafame et al., 1997; Tränkle et al., 2003). In $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimenten mit dem Partialagonisten Pilocarpin wurde eine Reduktion des Agonist-induzierten Maximaleffektes beobachtet, ohne dass die Affinität von Pilocarpin beeinflusst wurde (Zahn et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Alcuronium auf die ACh-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung untersucht (Abbildung 45). Ab einer Konzentration von 1 μM führte Alcuronium zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. Für die Zusammenschau der Versuchsergebnisse konnte anhand der Methode nach Lew und Angus (1995; s. 2.4.4) durch einen F-Test gezeigt werden, dass die Gesamtheit der Versuchsergebnisse ausreichend

mit Kurven vom Steigungsmaß $n_H = 1$ beschrieben waren im Vergleich zu einem freilaufenden, individuellen Steigungsmaß für jede Konzentrations-Effekt-Kurve. Somit handelte es sich um eine Parallelverschiebung der Kurven. Die basale und die maximale ACh-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung wurden durch Alcuronium im Wesentlichen nicht beeinflusst (Ausnahme: 300 μ M Alcuronium: signifikante Verminderung des ACh-Maximaleffektes).

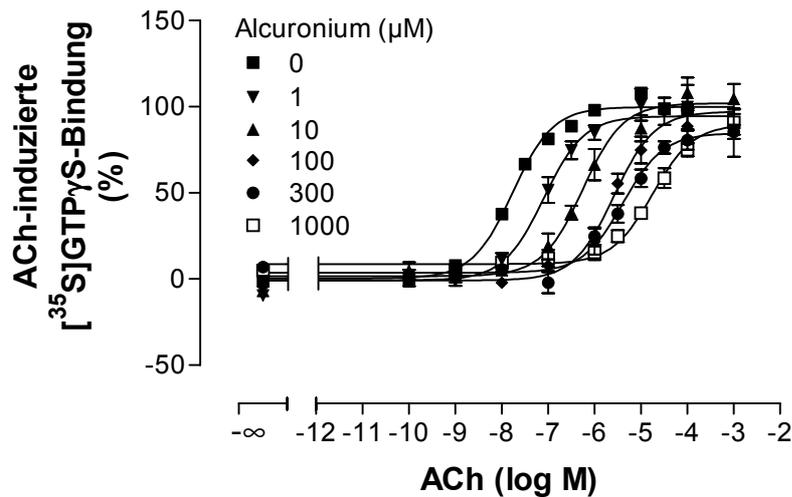


Abbildung 45: Einfluss steigender Konzentrationen von Alcuronium auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 12$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Alcuronium- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	Alcuronium 1 μ M	Alcuronium 10 μ M	Alcuronium 10 μ M	Alcuronium 300 μ M	Alcuronium 1000 μ M
pEC ₅₀	7,77 ± 0,06	7,09 ± 0,12**	6,25 ± 0,09**	5,58 ± 0,09**	5,38 ± 0,08**	4,75 ± 0,07**
Max (%)	100 ± 2	95 ± 3	102 ± 3	97 ± 4	85 ± 3*	90 ± 3
Min (%)	0 ± 2	-1 ± 3	3 ± 3	-1 ± 2	4 ± 2	9 ± 2
n _H (frei- laufend)	0,79 ± 0,09	0,88 ± 0,21	0,72 ± 0,13	1,15 ± 0,24	0,90 ± 0,15	0,73 ± 0,07 [#]
n	12	2	2	3	2	3

Tabelle 31: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 45 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von Alcuronium. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,05/0,01).

[#] signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05).

Der antagonistische Effekt von Alcuronium wurde anhand einer Schild-Auftragung quantifiziert (s. Abbildung 46). Die Analyse der Daten nach Lanzafame et al. (1996) ergab eine Affinität von Alcuronium zum freien Rezeptor von pK_A = 6,40 \pm 0,14 und einen Kooperativitätsfaktor von p α = -2,96 \pm 0,24. Die daraus berechnete Affinität von Alcuronium zum ACh-besetzten Rezeptor betrug p(α ·K_A) = 3,44.

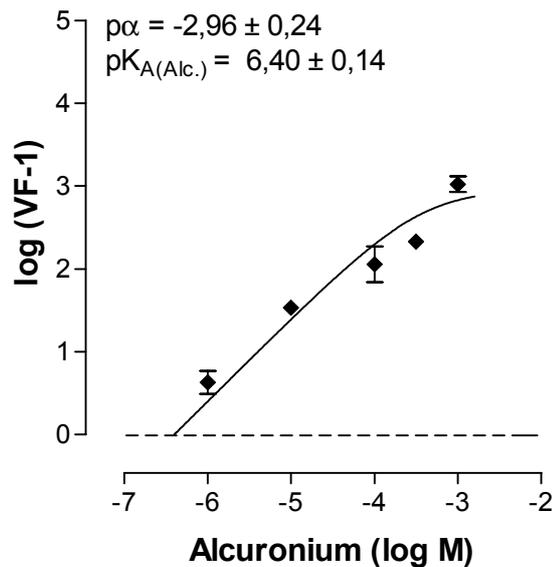


Abbildung 46: Schild-Auftragung der Alcuronium-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Alcuronium. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten der Einzelexperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: $n_H = 1$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

In Radioligandbindungsstudien mit [3H]NMS wurden in der Literatur folgende Werte für die Affinität von Alcuronium zum unbesetzten M_2 -Rezeptor (pK_A) gefunden: 6,50 (Dong et al., 1995), 6,82 (Proška und Tuček; 1996), 6,14 (Jakubík et al., 1997), 6,56 (Schröter et al., 2000; Mg, P_i , Tris-Puffer). Diese stimmten insgesamt gut mit den in dieser Arbeit erhobenen Befunden überein. In [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperimenten wurde ein pK_A -Wert von $6,09 \pm 0,06$ bestimmt (Zahn et al., 2002), welcher nicht signifikant von dem Wert der vorliegenden Arbeit abwich (t-Test, $p < 0,05$).

3.3.2.4.2 Caracurin V

Der allosterische Effekt von Caracurin V ist durch die Dissoziationsverzögerung von [3H]NMS in Radioligandbindungsstudien belegt (Buller, 2002). Die [3H]NMS-Gleichgewichtsbindung wurde durch Caracurin V nicht beeinflusst (Buller, 2002). In dieser Arbeit wurde der Effekt von Caracurin V auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve untersucht (Abbildung 47). Ab einer Konzentration von 30 μM

verschob Caracurin V diese signifikant nach rechts. Die Anwendung der Methode nach Lew und Angus (1995; s. 2.4.4) ergab für die Zusammenschau der Versuchsergebnisse, dass die Gesamtheit der Kurven ausreichend mit einem Steigungsmaß von $n_H = 1$ beschrieben waren im Vergleich zu einem freilaufenden, individuellen Steigungsmaß für jede Konzentrations-Effekt-Kurve. Somit handelte es sich um eine Parallelverschiebung der Kurven. Die basale und die maximale ACh-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung wurden durch Caracurin V nicht signifikant beeinflusst. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit konnte Caracurin V maximal in einer Konzentration von 100 μ M untersucht werden.

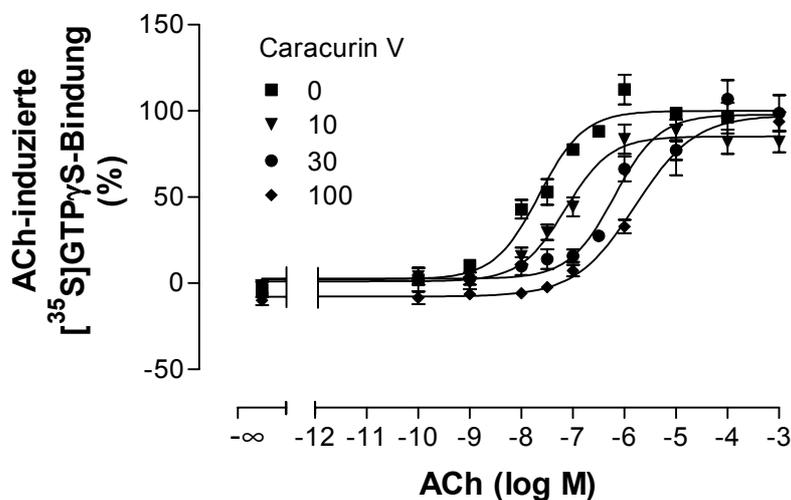


Abbildung 47: Einfluss steigender Konzentrationen von Caracurin V auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 9$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Caracurin V- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	Caracurin V 10 μ M	Caracurin V 30 μ M	Caracurin V 100 μ M
pEC ₅₀	7,65 \pm 0,13	7,14 \pm 0,08	6,17 \pm 0,12**	5,81 \pm 0,07**
Max (%)	100 \pm 4	85 \pm 2	98 \pm 5	94 \pm 2
Min (%)	2 \pm 5	1 \pm 3	3 \pm 4	-6 \pm 2
n _H (frei- laufend)	0,72 \pm 0,18	0,89 \pm 0,17	0,78 \pm 0,21	0,75 \pm 0,07 [#]
n	9	3	3	3

Tabelle 32: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 47 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von Caracurin V. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,01).

[#] signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05).

Die Verschiebungsfaktoren der Kurven aus Abbildung 47 wurden in einem Schild-Plot aufgetragen (Abbildung 48). Eine Analyse der Daten nach Lanzafame et al. (1996), die aufgrund des bekannten allosterischen Verhaltens mit M₂-Rezeptoren angewandt werden konnte (Buller, 2002), ergab eine Affinität von Caracurin V zum freien Rezeptor von pK_A = 5,77 \pm 0,18. Im untersuchten Konzentrationsbereich gab es keinen Hinweis auf die Bildung ternärer Komplexe. Der Kooperativitätsfaktor konnte mit $\rho\alpha < -2$ abgeschätzt werden (Abbildung 48).

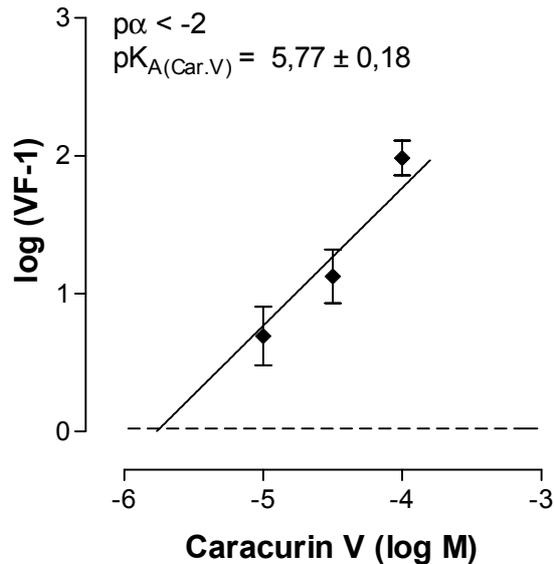


Abbildung 48: Schild-Auftragung der Caracurin V-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Caracurin V. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten der Einzelexperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: $n_H = 1$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

3.3.2.4.3 Caracurin VII (WGA)

WGA kann als halbiertes Caracurin V-Molekül angesehen werden. Es wurde der Effekt von WGA auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve untersucht (Abbildung 49). Die Kurven waren parallel nach rechts verschoben mit einer signifikant von 1 unterschiedlichen Steigung ($n_H = 0,70$; Test auf Parallelverschiebung: s. 2.4.4). Die sich bei freilaufendem Steigungsmaß in der Einzelanalyse der Kurven ergebenden Hill-Koeffizienten sind in Tabelle 33 abgebildet. WGA-Konzentrationen ab $100 \mu\text{M}$ verringerten signifikant die maximale ACh-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung. Die spontane [^{35}S]GTP γ S-Bindung wurde durch WGA nicht verändert.

Ergebnisse

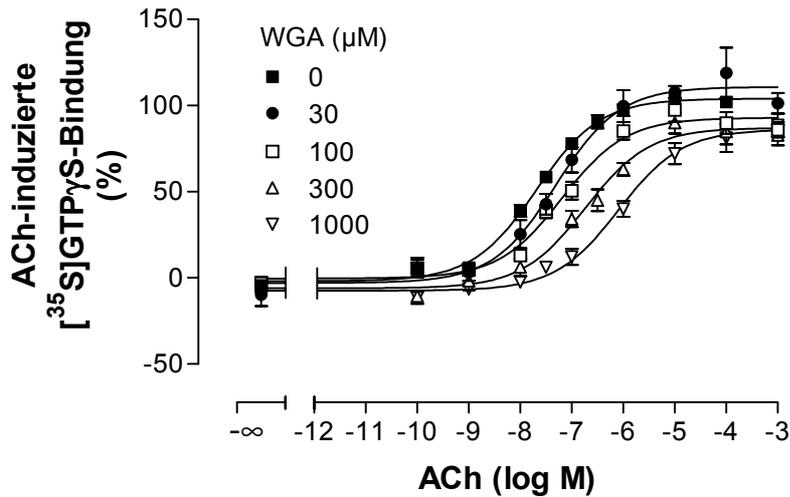


Abbildung 49: Einfluss steigender Konzentrationen von WGA auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 0,70$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-5 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 13$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein WGA- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	Kontrolle	WGA 30 μ M	WGA 100 μ M	WGA 300 μ M	WGA 1000 μ M
pEC ₅₀	7,69 $\pm 0,05$	7,30 $\pm 0,12$	7,18 $\pm 0,13^{**}$	6,74 $\pm 0,11^{**}$	6,09 $\pm 0,09^{**}$
Max (%)	104 \pm 2	111 \pm 3	93 \pm 3 ^{**}	87 \pm 3 ^{**}	86 \pm 2 ^{**}
Min (%)	-2 \pm 2	-3 \pm 4	0 \pm 3	-6 \pm 3	-8 \pm 2
n_H (frei-laufend)	0,72 $\pm 0,07^{\#}$	0,72 $\pm 0,15$	0,86 $\pm 0,19$	0,67 $\pm 0,12$	0,55 $\pm 0,04^{\#}$
n	13	2	5	3	3

Tabelle 33: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 49 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von WGA. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 0,70$.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (**freilaufernd**): freilaufender Hill-Koeffizient.

n : Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, $p < 0,01$).

signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten als mit $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$).

Von Jakubík et al. (2005) ist eine allosterische Interaktion zwischen WGA und NMS am M_2 -Rezeptor beschrieben worden. Daher konnten die Verschiebungsfaktoren der Kurven aus Abbildung 49 nach Lanzafame et al. (1996) analysiert werden (Abbildung 50). Es ergab sich eine Affinität von WGA zum freien Rezeptor von $pK_A = 4,45 \pm 0,19$. Jakubík et al. (2005) bestimmten in Radioligand-bindungsstudien einen pK_A -Wert von $4,52 \pm 0,01$, welcher nicht signifikant von dem Wert dieser Arbeit abwich (t-Test, $p > 0,05$). Einen Hinweis auf die Bildung ternärer Komplexe mit ACh und dem M_2 -Rezeptor gab es nicht. Aufgrund der Datenpunkte in Abbildung 50 konnte ein Kooperativitätsfaktor nur approximativ mit $p\alpha < -2$ bestimmt werden.

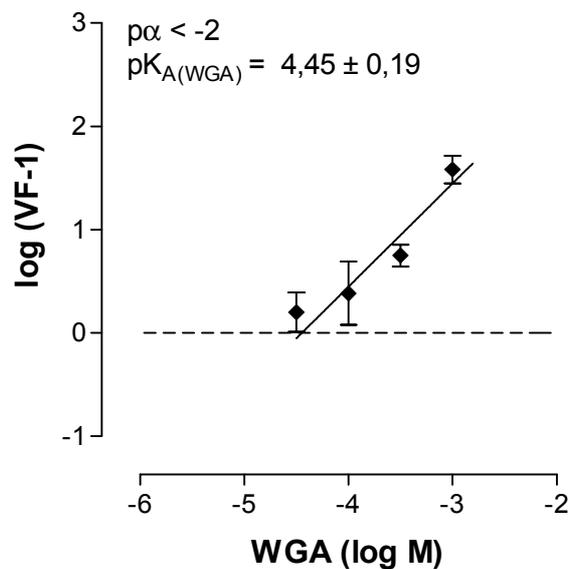


Abbildung 50: Schild-Auftragung der WGA-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von WGA. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten der Einzelexperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: $n_H = 0,70$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-5 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

3.3.2.5 Duo3

Duo3 wird u. a. wegen seiner steilen Konzentrations-Effekt-Kurven in [³H]NMS-Radioligandbindungsstudien und der geringen Empfindlichkeit gegenüber Veränderungen in der Puffer-Zusammensetzung als atypischer Modulator bezeichnet (Tränkle und Mohr, 1997; Schröter et al., 2000). Da außer der „common allosteric site“ (Ellis und Seidenberg, 1992) noch eine weitere allosterische Bindungsstelle beschrieben ist (Lazareno et al., 2000; 2002), wäre es möglich, dass Duo3 an beiden Bindungsstellen angreift (Tränkle et al., 2003). Außerdem wird diskutiert, dass es ein Gleichgewicht aus Monomeren und Dimeren von Rezeptoren gibt, in das Duo3 durch Änderung der Konformation der Rezeptoren eingreift (Tränkle et al., 2003). Neueste Untersuchungen mit Duo3 und Tacrin deuten darauf hin, dass diese zwar mit der „common allosteric site“ interagieren, jedoch eine andere topographische Region dieser Tasche besetzen (Tränkle et al., 2005).

Im Folgenden wird der Einfluss des atypischen Modulators Duo3 auf die ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung betrachtet. Duo3 führte in allen eingesetzten Konzentrationen (ab 0,1 μM) zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve ohne die basale oder die maximale ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung signifikant zu beeinflussen (Abbildung 51). Für die Zusammenschau der Versuchsergebnisse konnte anhand der Methode nach Lew und Angus (1995; s. 2.4.4) durch einen F-Test gezeigt werden, dass die Gesamtheit der Versuchsergebnisse ausreichend mit Kurven vom Steigungsmaß $n_H = 1$ beschrieben waren im Vergleich zu einem freilaufenden, individuellen Steigungsmaß für jede Konzentrations-Effekt-Kurve. Somit handelte es sich um eine Parallelverschiebung der Kurven. Die Kurve in Anwesenheit von 10 μM Duo3 für sich genommen wurde besser mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H < 1$ beschrieben.

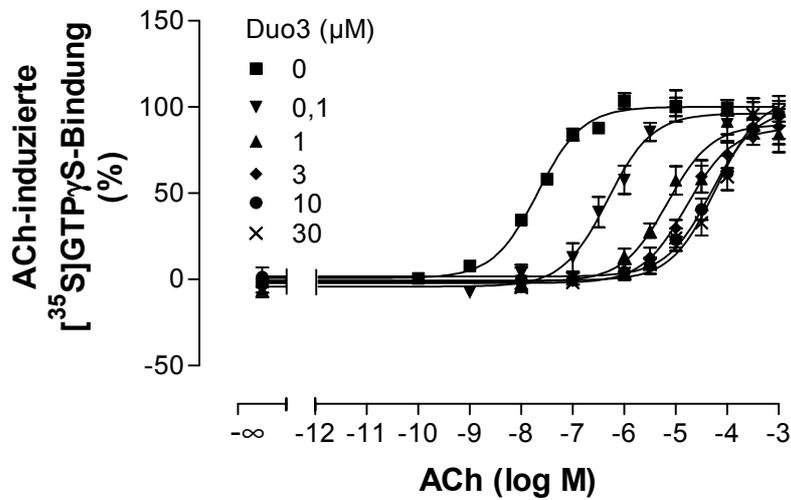


Abbildung 51: Einfluss steigender Konzentrationen von Duo3 auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 12$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Duo3- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	Duo3 0,1 μ M	Duo3 1 μ M	Duo3 3 μ M	Duo3 10 μ M	Duo3 30 μ M
pEC ₅₀	7,67 ± 0,06	6,32 ± 0,09**	5,16 ± 0,14**	4,78 ± 0,04**	4,31 ± 0,06**	4,22 ± 0,11**
Max (%)	100 ± 2	96 ± 3	89 ± 5	88 ± 2	99 ± 3	106 ± 7
Min (%)	1 ± 2	-4 ± 3	-1 ± 4	-2 ± 1	2 ± 1	-1 ± 3
n _H (frei- laufend)	0,88 ± 0,10	1,00 ± 0,19	0,75 ± 0,22	0,95 ± 0,08	0,80 ± 0,07 [#]	0,69 ± 0,16
n	12	2	2	2	2	4

Tabelle 34: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von Duo3. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,01).

[#] signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05).

In der Schild-Auftragung (Abbildung 52) zeigte Duo3 ein allosterisch-antagonistisches Verhalten, d. h. dass sich die Verschiebungsfaktoren (genauer log(VF - 1)) einem Maximalwert annäherten. Für die Affinität von Duo3 zum freien M₂-Rezeptor ergab sich nach einer Kurvenanpassung der Daten nach Lanzafame et al. (1996) ein Wert von pK_A = 8,48 \pm 0,13 und für den Kooperativitätsfaktor ein Wert von p α = -3,58 \pm 0,20. Mit p(α ·K_A) = 4,90 berechnete sich daraus die Affinität von Duo3 zum ACh-besetzten Rezeptor.

In [³H]NMS-Bindungsexperimenten fanden Schröter et al. (2000) pK_A-Werte von 7,20 \pm 0,03 (Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer) und 7,30 \pm 0,05 (Na, K, P_i-Puffer). Tränkle et al. (2003) ermittelten für die Affinität von Duo3 zum freien M₂-Rezeptor einen pK_A-Wert von 7,63 \pm 0,02. Möglicherweise ist der Unterschied durch die abweichenden Versuchsbedingungen erklärbar. Klemt (2005) erhielt in [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimenten einen dieser Arbeit ähnlichen Wert (pK_A = 8,00 \pm 0,09).

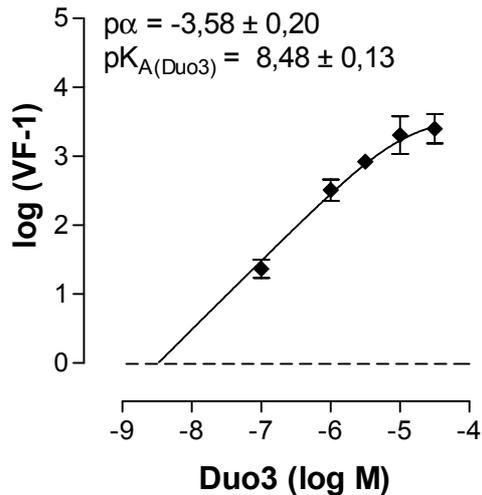


Abbildung 52: Schild-Auftragung der Duo3-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Duo3. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten der Einzelexperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: $n_H = 1$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

3.3.2.6 (-)-Eburnamonin

Jakubík et. al. (1997) berichteten von einer positiven Kooperativität zwischen Eburnamonin und ACh, die Lazareno et al. (1999) jedoch nicht bestätigen konnten. Lazareno et al. (1999) beobachteten eine Abnahme der ACh-Bindung in Gegenwart von Eburnamonin an den Rezeptorsubtypen $M_1 - M_4$. Auch Zahn (1999) stellte in Versuchen an Meerschweinchen-Herzvorhöfen einen Affinitätsverlust von ACh durch Eburnamonin fest.

In dieser Arbeit wurde der Effekt von Eburnamonin auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve noch einmal in einem funktionellen Experiment untersucht. Die schlechte Wasserlöslichkeit gestattete einen maximalen Einsatz von Eburnamonin in einer Konzentration von 100 μ M. In dieser Konzentration verschob Eburnamonin die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve signifikant nach rechts (Abbildung 53). Die Anwendung eines F-Tests anhand der Methode nach Lew und Angus (1995; s. 2.4.4) ergab für die Zusammenschau der Messwerte, dass die Gesamtheit der Versuchsergebnisse ausreichend mit Kurven vom Steigungsmaß $n_H = 1$ beschrieben waren im Vergleich zu einem freilaufenden, individuellen Steigungsmaß für jede Konzentrations-Effekt-Kurve. Somit handelte es sich um

eine Parallelverschiebung der Kurven. Die Kontrollkurve für sich genommen wurde besser mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H < 1$ beschrieben. 100 μM Eburnamonin führten zu einer signifikanten Absenkung der basalen $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (Dunnett t-Test, $p < 0,05$).

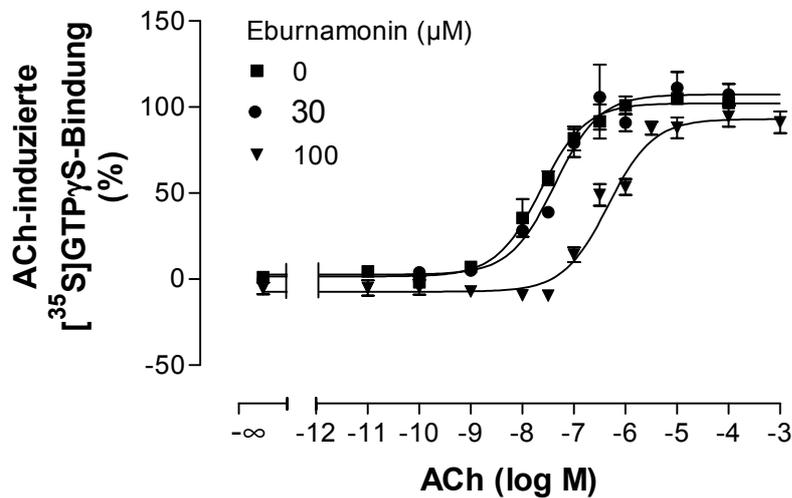


Abbildung 53: Einfluss steigender Konzentrationen von Eburnamonin auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 5$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Eburnamonin- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	Kontrolle	Eburnamonin 30 μM	Eburnamonin 100 μM
$p\text{EC}_{50}$	7,64 $\pm 0,04$	7,37 $\pm 0,10$	6,33 $\pm 0,09^{**}$
Max (%)	102 ± 1	107 ± 4	93 ± 3
Min (%)	2 ± 2	3 ± 4	$-7 \pm 2^*$
n_H (frei- laufend)	0,84 $\pm 0,06^\#$	0,97 $\pm 0,23$	0,93 $\pm 0,16$
n	5	2	3

Tabelle 35: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 53 unter Kontrollbedingungen sowie unter

Ergebnisse

Einfluss steigender Konzentrationen von Eburnamonin. pEC_{50} , Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [35 S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [35 S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [35 S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, $p < 0,05/0,01$).

signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$).

Eine Auswertung der Daten in einer Schild-Auftragung war mit zwei Punkten nur schwer möglich. Die Analyse auf der Basis des ternären Modells allosterischer Interaktionen von Lanzafame et al., 1996 (Gleichung 17) ergab einen pK_A -Wert für Eburnamonin von $5,00 \pm 0,42$ (Abbildung 54). Die von Jakubík et al. (1997; $pK_A = 4,16$) sowie Proška und Tuček (1996; $pK_A = 4,65$) bestimmten Affinitäten für Eburnamonin zum unbesetzten M_2 -Rezeptor lagen im gleichen Größenordnungsbereich. Die Bestimmung eines Kooperativitätsfaktors war in der vorliegenden Arbeit aufgrund des kleinen untersuchten Konzentrationsbereiches nicht möglich. Der $\rho\alpha$ -Wert musste in jedem Fall einen Wert kleiner $-1,2$ annehmen, da $\log(VF - 1)$ in Abbildung 54 maximal diesen Wert erreichte.

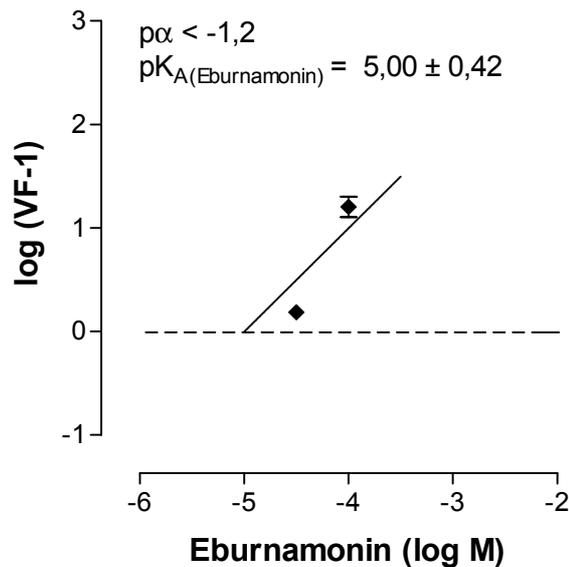


Abbildung 54: Schild-Auftragung der Eburnamonin-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Eburnamonin. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten der Einzelexperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: $n_H = 1$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

3.3.2.7 Gallamin

Gallamin war der erste allosterische Modulator, mit dem allosterische Interaktionen an muskarinischen Rezeptoren quantifiziert wurden (Stockton et al., 1983; Ehlert, 1988b).

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Gallamin auf die ACh-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung untersucht. In Konzentrationen ab $10 \mu\text{M}$ führte Gallamin zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve (Abbildung 55). Alle Kurven wurden mit einer Hill-Steigung von $n_H = 1$ ausreichend beschrieben und waren somit parallel. Ab hohen Gallamin-Konzentrationen von $3000 \mu\text{M}$ wurde der ACh-Maximaleffekt vermindert (Dunnett t-Test, $p < 0,01$), wobei die basale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung unbeeinflusst blieb (Dunnett t-Test, $p > 0,05$).

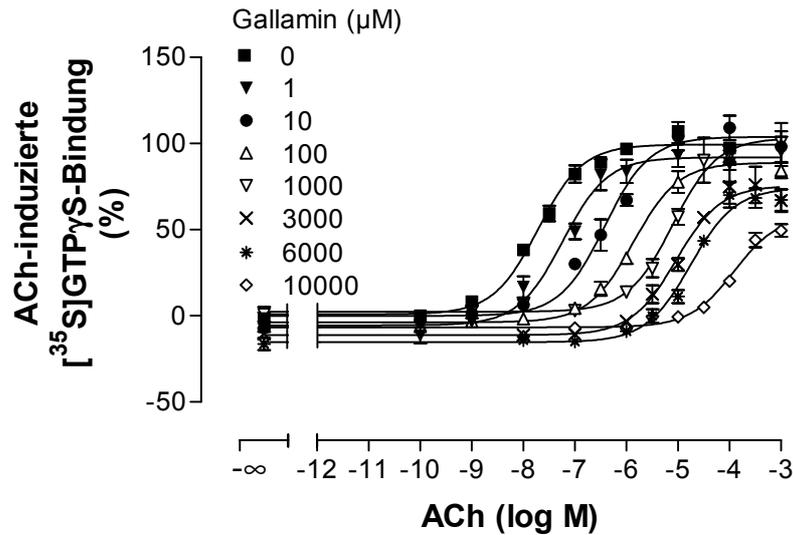


Abbildung 55: Einfluss steigender Konzentrationen von Gallamin auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 16$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Gallamin- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kon- trolle	Galla- min 1 μ M	Galla- min 10 μ M	Galla- min 100 μ M	Galla- min 1000 μ M	Galla- min 3000 μ M	Galla- min 6000 μ M	Galla- min 10.000 μ M
pEC ₅₀	7,71 \pm 0,07	7,23 \pm 0,10	6,42 \pm 0,09**	5,87 \pm 0,06**	5,10 \pm 0,06**	5,04 \pm 0,08**	4,76 \pm 0,09**	3,90 \pm 0,12**
Max (%)	99 \pm 2	92 \pm 3	104 \pm 4	89 \pm 2	103 \pm 3	76 \pm 3**	74 \pm 3**	59 \pm 5**
Min (%)	1 \pm 3	-6 \pm 3	0 \pm 3	-4 \pm 1	2 \pm 2	-11 \pm 2	-15 \pm 2	-7 \pm 2
n _H (frei- lau- fend)	0,77 \pm 0,09	0,83 \pm 0,15	0,72 \pm 0,13	0,95 \pm 0,12	1,23 \pm 0,14	1,13 \pm 0,21	1,34 \pm 0,23	1,13 \pm 0,31
n	16	2	2	3	2	2	2	3

Tabelle 36: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 55 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von Gallamin. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPyS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPyS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPyS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,01).

Aufgrund der Absenkung des ACh-Maximaleffektes und des bekannten allosterischen Verhaltens mit NMS am M₂-Rezeptor (Stockton et al., 1983) wurden die Daten in einer Schild-Auftragung (Abbildung 56) nach der Gleichung von Lanzafame et al. (1996) ausgewertet. Die Analyse führte zu einer Affinität von Gallamin zum freien Rezeptor von pK_A = 5,99 \pm 0,14 und einem Kooperativitätsfaktor von p α = -3,29 \pm 0,20. Es ließ sich die Affinität von Gallamin zum ACh-besetzten Rezeptor berechnen mit p(α ·K_A) = 2,70. Ebenfalls in [³⁵S]GTPyS-Experimenten erhielten Lazareno und Birdsall (1993, 1995) für die Affinität von Gallamin zu freien M₂-Rezeptor pK_A-Werte von 6,24 \pm 0,13 bzw. 6,30 \pm 0,05, die nicht signifikant von den Werten dieser Arbeit abwichen. Die Kooperativität mit ACh wurde mit einem p α -Wert von -2,5 beschrieben und lag

somit in der gleichen Größenordnung. Einen allosterischen Antagonismus, d. h. ein Abflachen der Schild-Kurve bei hohen Alloster-Konzentrationen, gegenüber ACh konnten Lazareno und Birdsall nicht erkennen. Die maximale Gallamin-Konzentration ihrer Untersuchungen lag jedoch bei 300 μM , bei der sich die Daten dieser Arbeit in der Schild-Auftragung ebenfalls noch im linearen Bereich befanden (Abbildung 56). Clark und Mitchelson (1976) und Ehlert (1988b) hingegen beobachteten in Untersuchungen mit ACh bzw. Oxotremorin M wie in der vorliegenden Arbeit ein Abflachen der Kurve in der Schild-Auftragung ab Gallamin-Konzentrationen von 100 μM .

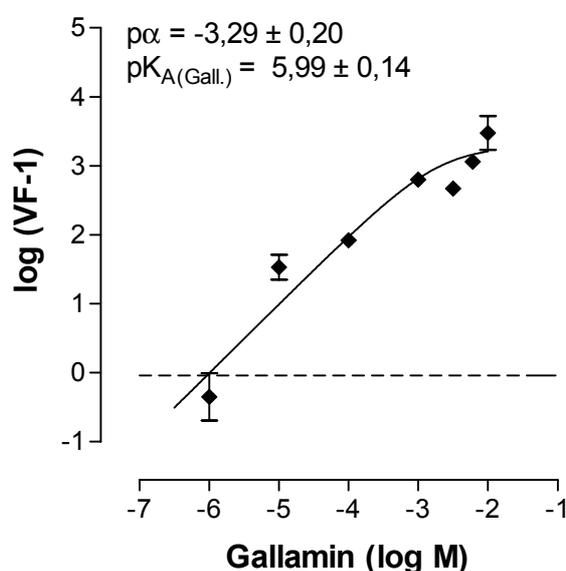


Abbildung 56: Schild-Auftragung der Gallamin-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Gallamin. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten der Einzelerperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: $n_H = 1$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Zur Quantifizierung des senkenden Effektes auf die maximale ACh-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung wurden drei weitere unabhängige Experimente durchgeführt, in denen zu einer ACh-Konzentration von 1 mM, die auch in Anwesenheit hoher Gallamin-Konzentrationen zu einem maximalen Effekt führte, steigende Konzentrationen an Gallamin hinzugefügt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 57 dargestellt (geschlossene Symbole). Zusätzlich wurden die Max-Werte aus Tabelle 36 aufgetragen (offene Symbole), an die jedoch keine Kurvenanpassung

erfolgte. Angesichts der fragmentarisch bestimmten Kurve waren Angaben zur Kurvensteilheit und zum Wendepunkt nur im Sinne einer groben Orientierung möglich. Die Daten konnten mit einer Steigung von $n_H = -3,44 \pm 0,79$ signifikant besser angepasst werden als mit auf -1 konstant gesetzter Steigung (F-Test, $p < 0,05$). Die Gallamin-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorrief, lag bei $pIC_{50} = 2,02 \pm 0,10$ und die maximal mögliche Verminderung des ACh-Maximaleffektes bei $E_{min} = 37 \pm 24\%$. Da nur wenige der eingesetzten Gallamin-Konzentrationen in Abbildung 57 den ACh-Maximaleffekt signifikant senkten, war die Kurve nicht vollständig beschrieben (kein unteres Plateau), so dass der pIC_{50} nicht eindeutig bestimmt werden konnte.

Wenn die Inhibition des Carbachol-Effektes durch die Bildung ternärer Komplexe bedingt war, sollte der pIC_{50} -Wert, bei dem Gallamin mit der Hälfte der ACh-besetzten Rezeptoren ternäre Komplexe bildet, dem $p(\alpha \cdot K_A)$ -Wert, welcher ein Maß für die Affinität von Gallamin zum ACh-besetzten Rezeptor darstellt, entsprechen. $pIC_{50} = 2,02 \pm 0,10$ und $p(\alpha \cdot K_A) = 2,70$ unterschieden sich in diesem Fall signifikant voneinander (t-Test, $p > 0,05$). Der Unterschied zwischen pIC_{50} und $p(\alpha \cdot K_A)$ war jedoch geringer als eine Dekade, so dass die Differenz möglicherweise auf der Unvollständigkeit der Kurve beruhte.

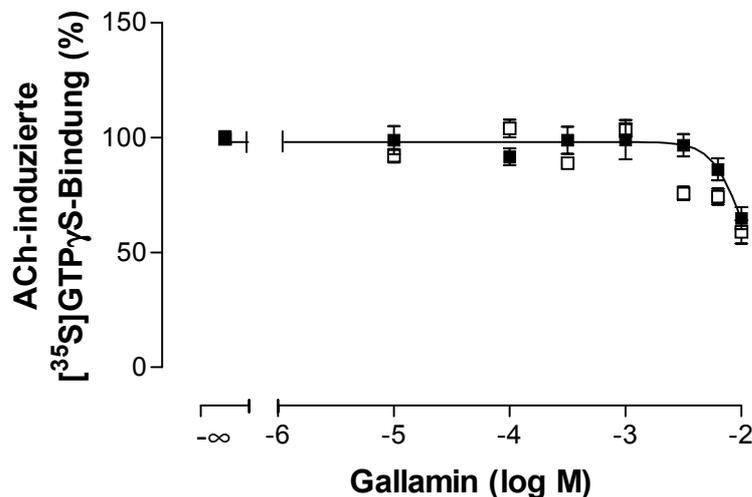


Abbildung 57: Einfluss steigender Konzentrationen von Gallamin auf den ACh-induzierten Maximaleffekt (ACh: 1 mM). **Ordinate:** ACh-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Prozent [Basalaktivität = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Gallamin. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient freiliegend: $n_H = -3,44 \pm 0,79$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten (geschlossene

Symbole). Die Datenpunkte mit offenen Symbolen zeigen die Max-Werte aus Abbildung 55 bzw. Tabelle 36.

3.3.2.8 EHW 141

Der Einfluss von EHW 141, einem Hybrid aus dem muskarinischen Antagonisten AF-DX 384 und einer Teilstruktur von W84, auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve ist in Abbildung 58 dargestellt. EHW 141 verschob ab einer Konzentration von 1 μM die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve signifikant nach rechts. Die Kurven waren mit einer Steigung von $n_H = 0,79$ parallel verschoben (Test auf Parallelverschiebung: s. 2.4.4). Die maximale ACh-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung wurde bei 10 μM EHW 141 signifikant erhöht und bei 100 μM EHW 141 signifikant gesenkt (Dunnett t-Test, $p < 0,01$). Diese Abweichungen waren vermutlich zufällig und beruhten nicht auf einem konzentrationsabhängigen Effekt von EHW 141. Die spontane [^{35}S]GTP γS -Bindung wurde ab 1 μM EHW 141 signifikant herabgesetzt (Dunnett t-Test, $p < 0,05$).

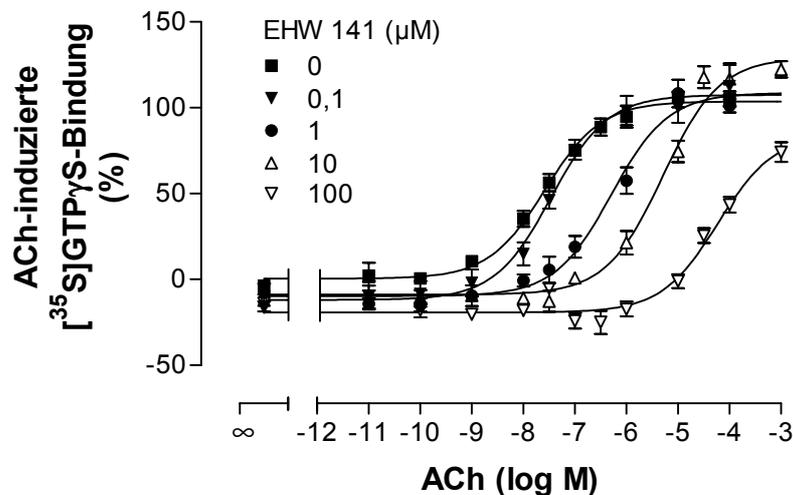


Abbildung 58: Einfluss steigender Konzentrationen von EHW 141 auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 0,79$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 11$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein EHW141- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	EHW 141 0,1 μ M	EHW 141 1 μ M	EHW 141 10 μ M	EHW 141 100 μ M
pEC ₅₀	7,58 \pm 0,05	7,46 \pm 0,07	6,29 \pm 0,13**	5,29 \pm 0,10**	4,22 \pm 0,12**
Max (%)	104 \pm 2	108 \pm 3	109 \pm 5	129 \pm 5**	85 \pm 6**
Min (%)	0 \pm 2	-12 \pm 3*	-10 \pm 3*	-9 \pm 2*	-19 \pm 2**
n _H (frei- laufend)	0,64 \pm 0,04 [#]	0,87 \pm 0,13	0,70 \pm 0,13	0,82 \pm 0,13	0,92 \pm 0,19
n	11	2	3	3	3

Tabelle 37: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 58 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von EHW 141. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 0,79.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,05/0,01).

[#] signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten n_H = 1 (F-Test, p < 0,05).

Eine Auswertung der Verschiebungsfaktoren (Abbildung 59), die aufgrund des bekannten allosterischen Verhaltens von EHW 141 an muskarinischen M₂-Rezeptoren (Mohr et al., 2004) nach Lanzafame et al. (1996) erfolgte, ergab eine Affinität von EHW 141 zum freien Rezeptor von pK_A = 7,23 \pm 0,09. In dem betrachteten Konzentrationsbereich gab es keinen Hinweis auf die Bildung ternärer Komplexe aus EHW 141, ACh und M₂-Rezeptor. Ein Kooperativitätsfaktor konnte nur mit p α < -3,5 annähernd beschrieben werden.

Der in Radioligandbindungsstudien gefundene Wert für die Affinität von EHW 141 zum freien Rezeptor (pK_A = 5,89 \pm 0,05; Mohr et al., 2004) wich möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen von dem Wert der vorliegenden Arbeit ab.

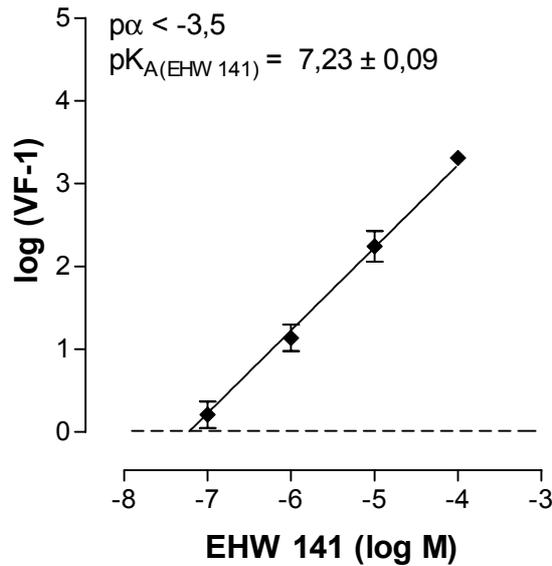


Abbildung 59: Schild-Auftragung der EHW 141-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von EHW 141. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten der Einzelexperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: $n_H = 0,79$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

3.3.2.9 DDT-5

Um zu überprüfen ob DDT-5, ein Hybrid aus einem Oxotremorin M-Derivat und einer Teilstruktur von W84, durch allosterische Interaktion die ACh-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung modulierte, wurde eine ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve in Gegenwart von 0,1 μM DDT-5 aufgenommen. In Abbildung 60 ist ersichtlich, dass sich die agonistischen Wirkungen von DDT-5 und ACh bei niedrigen ACh-Konzentrationen addierten, dass jedoch keine Addition über den ACh-Maximaleffekt hinaus stattfand. Der Wendepunkt der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve wurde durch 0,1 μM DDT-5 nicht signifikant beeinflusst (t-Test, $p > 0,05$).

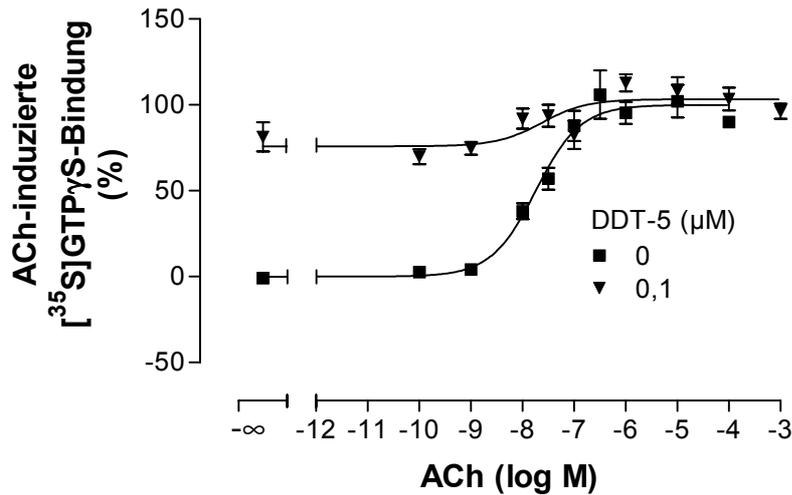


Abbildung 60: Einfluss von 0,1 μM DDT-5 auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein DDT-5- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	Kontrolle	DDT-5 0,1 μM
pEC_{50}	7,74 $\pm 0,10$	7,63 $\pm 0,36$
Max (%)	100 \pm 3	103 \pm 3
Min (%)	0 \pm 4	76 \pm 4**
n_H (freilaufend)	1,10 $\pm 0,27$	0,68 $\pm 0,54$
n	2	2

Tabelle 38: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 60 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss von 0,1 μM DDT-5. pEC_{50} , Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, $p < 0,01$).

3.3.3 Einfluss ausgewählter Allosterer auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert durch verschiedene Agonisten

Bisher wurde in dieser Arbeit der Einfluss verschiedener Allosterer auf die ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung behandelt. Alle untersuchten allosterischen Modulatoren erwiesen sich gegenüber ACh am muskarinischen M₂-Rezeptor als negativ kooperativ, d. h., dass in ihrer Gegenwart die Wirksamkeit von ACh am M₂-Rezeptor vermindert wurde. Der ACh-Maximaleffekt wurde bis auf einige Ausnahmen (TD2, Strychnin, Gallamin) durch die Allosterer nicht konzentrationsabhängig beeinflusst. Klemt (2005) untersuchte die gleichen Testsubstanzen am Pilocarpin-besetzten M₂-Rezeptor. Die von Zahn et al. (2002) beschriebene Beobachtung, dass Alcuronium die Pilocarpin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung stark reduzierte, konnte Klemt (2005) für alle weiteren in ihrer Arbeit eingesetzten allosterischen Modulatoren bestätigen.

Um zu überprüfen, ob die durch Allosterer hervorgerufene Absenkung der maximalen [³⁵S]GTPγS-Bindung eine Eigenschaft der Substanz Pilocarpin, der Gruppe der Partialagonisten oder von bestimmten Agonisten unabhängig vom Ausmaß der intrinsischen Aktivität war, wurde der Einfluss von drei Allosteren auf weitere Vollagonisten (Carbachol, Oxotremorin, Oxotremorin M) und einen weiteren Partialagonisten (McN-A-343) getestet. Als allosterische Modulatoren wurden die beiden Prototyp-Modulatoren W84 und Alcuronium eingesetzt: W84 mit negativ kooperativem Verhalten gegenüber dem Antagonisten NMS am M₂-Rezeptor und Alcuronium als positiv kooperative Substanz. Zusätzlich einbezogen wurde das Alloster Naphmethonium, welches als einziges der untersuchten Allosterer die Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin nach links verschob (Klemt, 2005). Mit NMS verhielt sich Naphmethonium am M₂-Rezeptor ebenfalls positiv kooperativ.

Bei den meisten Alloster-Agonist-Kombinationen wurde jeweils nur der Einfluss einer relativ hohen Alloster-Konzentration (W84 und Alcuronium: 300 μM; Naphmethonium: 100 μM) auf die Konzentrations-Effekt-Kurve des Agonisten untersucht, um eine qualitative Aussage über die mögliche Beeinflussung des Maximaleffektes machen zu können. Da sich bei Oxotremorin und Oxotremorin M eine Steigerung des maximalen Effektes durch Naphmethonium abzeichnete, wurden in den Versuchen mit Oxotremorin M (bei dem die Effektsteigerung

deutlicher ausgeprägt war als bei Oxotremorin) mehrere Naphmethonium-Konzentrationen eingesetzt, um einen besseren Einblick in die Konzentrations-Effekt-Beziehungen zu erlangen. In weiteren Versuchen wurde überprüft, ob sich die Wirkung von Naphmethonium auf den Oxotremorin M-Maximaleffekt durch W84 antagonisieren ließ. Deshalb wurde der Einfluss von W84 auf Oxotremorin M ebenfalls durch mehrere W84-Konzentrationen charakterisiert.

3.3.3.1 Alcuronium

3.3.3.1.1 Einfluss auf die Carbachol-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Es wurde zunächst die Interaktion des allosterischen Modulators Alcuronium mit dem Vollagonisten Carbachol getestet (Abbildung 61). Wie bei ACh wurde die Konzentrations-Effekt-Kurve des Agonisten nach rechts verschoben. Zusätzlich führte Alcuronium zu einer signifikanten Verminderung der maximal durch Carbachol induzierbaren [³⁵S]GTPγS-Bindung auf $71 \pm 3\%$ (t-Test, $p < 0,05$). Beide Kurven konnten durch ein Steigungsmaß von $n_H = 1$ beschrieben werden (F-Test, $p > 0,05$). Die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung wurde durch Alcuronium nicht signifikant beeinflusst (t-Test, $p > 0,05$).

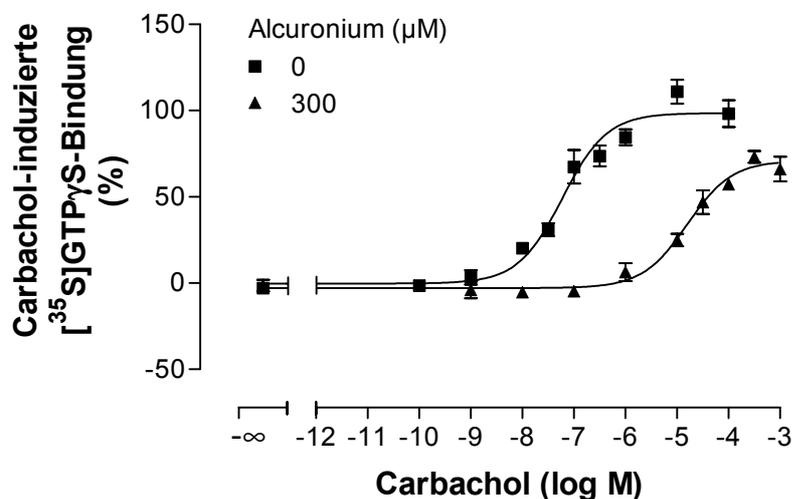


Abbildung 61: Einfluss von 300 μM Alcuronium auf die Carbachol-Konzentrations-Effekt-Kurve.

Ordinate: Carbachol-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Carbachol-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%].

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Carbachol. **Kurven-**

anpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Vierfach-

Ergebnisse

bestimmung, wobei jeweils ein Alcuronium- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Max (%)	Min (%)	n _H (freilaufend)	n
Kontrolle	7,22 ± 0,12	99 ± 5	0 ± 4	0,70 ± 0,14	3
Alcuronium (300 µM)	4,80 ± 0,08**	71 ± 3**	-3 ± 2	0,86 ± 0,18	3

Tabelle 39: Kenngrößen (± Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten Carbachol-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 61 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss von 300 µM Alcuronium. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Carbachol-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, p < 0,01).

3.3.3.1.2 Einfluss auf die Oxotremorin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Bei dem Vollagonisten Oxotremorin rief Alcuronium lediglich eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve hervor, ohne das obere und das untere Plateau signifikant zu beeinflussen (Abbildung 62). Der Hill-Koeffizient beider Kurven war nicht signifikant verschieden von n_H = 1 (F-Test, p > 0,05). In Tabelle 40 sind die Kenndaten der Kurven aufgeführt.

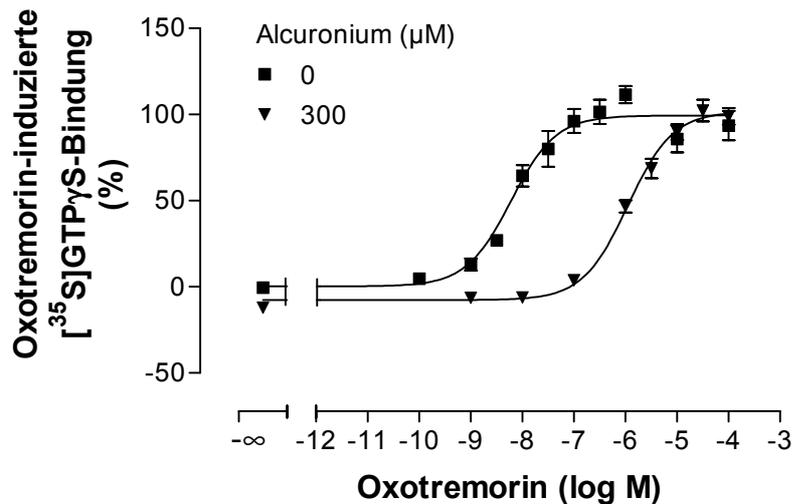


Abbildung 62: Einfluss von 300 μM Alcuronium auf die Oxotremorin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Oxotremorin-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Oxotremorin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Oxotremorin. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Alcuronium- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	pEC_{50}	Max (%)	Min (%)	n_H (freilaufend)	n
Kontrolle	$8,22 \pm 0,13$	100 ± 3	0 ± 4	$1,18 \pm 0,39$	3
Alcuronium (300 μM)	$5,95 \pm 0,06^{**}$	102 ± 2	-8 ± 2	$0,84 \pm 0,10$	3

Tabelle 40: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten Oxotremorin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 62 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss von 300 μM Alcuronium. pEC_{50} , Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus der Oxotremorin-Konzentration, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γS -Bindung induziert.

Max: maximale [^{35}S]GTP γS -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [^{35}S]GTP γS -Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, $p < 0,01$).

3.3.3.1.3 Einfluss auf die Oxotremorin M-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Auf den Vollagonisten Oxotremorin M übte Alcuronium ebenfalls einen Wirksamkeits-vermindernden Effekt aus (Abbildung 63). Die basale und die durch den Agonisten maximal induzierbare [³⁵S]GTPγS-Bindung blieben dabei unbeeinflusst (t-Test, $p > 0,05$). Die Steigung der Kurven unterschied sich sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Alcuronium nicht signifikant von $n_H = 1$ (F-Test, $p > 0,05$).

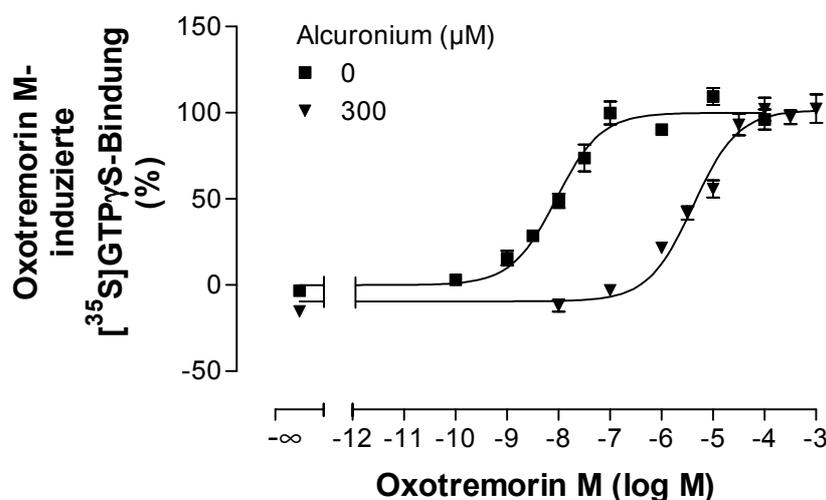


Abbildung 63: Einfluss von 300 μM Alcuronium auf die Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Oxotremorin M-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Oxotremorin M-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Oxotremorin M. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Alcuronium- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	pEC ₅₀	Max (%)	Min (%)	n _H (freilaufend)	n
Kontrolle	8,04 ± 0,10	100 ± 4	0 ± 4	0,88 ± 0,12	3
Alcuronium (300 µM)	5,39 ± 0,10**	102 ± 4	-9 ± 4	0,71 ± 0,12	3

Tabelle 41: Kenngrößen (± Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 63 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss von 300 µM Alcuronium. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Oxotremorin M-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, p < 0,01).

3.3.3.1.4 Einfluss auf die McN-A-343-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Wurde McN-A-343 als Agonist eingesetzt, führte Alcuronium neben einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve zu einer deutlichen Verringerung des McN-A-343-Maximaleffektes auf 17 ± 2% (Abbildung 64). Die spontane [³⁵S]GTPγS-Bindung wurde nicht signifikant beeinflusst (t-Test, p > 0,05). Beide Kurven wurden durch eine Hill-Steigung von n_H = 1 ausreichend beschrieben.

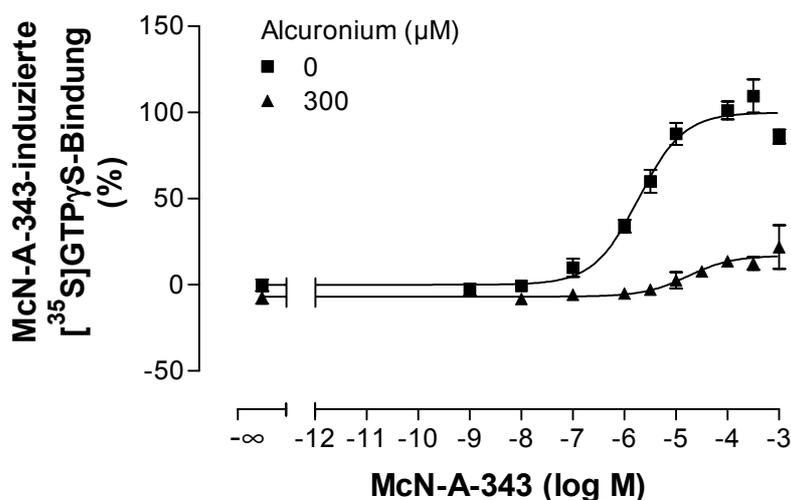


Abbildung 64: Einfluss von 300 μM Alcuronium auf die McN-A-343-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** McN-A-343-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, McN-A-343-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von McN-A-343. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Alcuronium- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	pEC_{50}	Max (%)	Min (%)	n_H (freilaufend)	n
Kontrolle	$5,73 \pm 0,10$	100 ± 4	0 ± 3	$1,03 \pm 0,27$	3
Alcuronium (300 μM)	$4,77 \pm 0,10^{**}$	$17 \pm 2^{**}$	-7 ± 1	$0,61 \pm 0,20$	3

Tabelle 42: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten McN-A-343-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 64 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss von 300 μM Alcuronium. pEC_{50} , Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus der McN-A-343-Konzentration, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, $p < 0,01$).

3.3.3.1.5 Kooperativität der Agonisten mit Alcuronium

In den Versuchen mit den in diesem Kapitel untersuchten Agonisten wurde jeweils nur eine Alcuronium-Konzentration (300 μM) eingesetzt, so dass für jeden Agonisten nur ein Verschiebungsfaktor berechnet werden konnte. Mit einem Verschiebungsfaktor für nur eine Alloster-Konzentration ist eine Auswertung der Daten nach Lanzafame et al. (1996) nicht möglich. Daher wurde der pK_A -Wert aus den Versuchen mit ACh übernommen: In der Schild-Auftragung spiegelt der Schnittpunkt der nach Lanzafame et al. (1996) ermittelten Kurve mit der Abszisse die Affinität der allosterischen Testsubstanz zum unbesetzten Rezeptor (pK_A) wider und ist somit unabhängig vom eingesetzten Agonisten. Deshalb wurde für alle Agonisten der Schnittpunkt mit der Abszisse auf den in Experimenten mit ACh bestimmten pK_A -Wert ($\text{pK}_{A_Alcuronium} = 6,40$) festgelegt. Damit lagen zwei Punkte vor, an die mittels der Gleichung von Lanzafame et al. (1996) eine Kurve angepasst wurde (s. Abbildung 65). Die daraus resultierenden Kooperativitätsfaktoren ($\text{p}\alpha$) sind in Tabelle 43 dargestellt. Für ACh wurde hier ebenfalls nur der Verschiebungsfaktor für die Alcuronium-Konzentration von 300 μM eingetragen. Der $\text{p}\alpha$ -Wert für ACh, der nur durch zwei Datenpunkte in der Schild-Auftragung abgeschätzt wurde, war nicht signifikant verschieden von dem Wert, der sich aus der ausführlicheren Schild-Auftragung (s. 3.3.2.4) ergab (t-Test, $p > 0,05$). Dies spricht für die Zuverlässigkeit des Zweipunkt-Schätzverfahrens von $\text{p}\alpha$.

Die Kooperativitätsfaktoren ($\text{p}\alpha$) für die Interaktion von Alcuronium mit den Vollagonisten unterschieden sich maximal um etwa eine halbe Dekade (Tabelle 43). Der $\text{p}\alpha$ -Wert des Partialagonisten McN-A-343 lag im Vergleich dazu um 1,5 bis 2 Dekaden höher, d. h. Alcuronium besaß eine relativ hohe Affinität zum McN-A-343 besetzten Rezeptor.

Jakubík et al. (1997) beobachteten in Radioligandbindungsexperimenten mit [^3H]NMS ebenfalls eine negative Kooperativität zwischen Alcuronium und Carbachol am M_2 -Rezeptor ($\text{p}\alpha = -1$). Für die Interaktion zwischen Alcuronium und Oxotremorin M stellten Maaß et al. (1995) sowie Zahn et al. (2002) einen formal kompetitiven Antagonismus fest, d. h. dass kein Abflachen der Schild-Geraden erkennbar war. Es wurden Alcuronium-Konzentrationen bis zu 100 μM bzw. 1000 μM untersucht. Die Schild-Kurve für Oxotremorin M in Abbildung 65 wich auch erst

in höheren Konzentrationen von einer Geraden mit der Steigung $s = 1$ ab, so dass es keinen großen Widerspruch zu den Literaturbefunden gab.

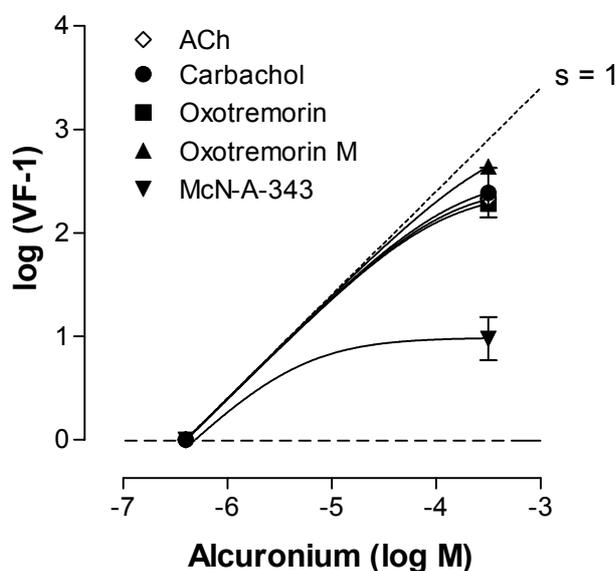


Abbildung 65: Schild-Auftragung der Alcuronium-induzierten Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven verschiedener Agonisten. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Alcuronium. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten aus Tabelle 39 bis Tabelle 42 bzw. Tabelle 31 für ACh). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

	$p\alpha$	n
ACh	$-2,47 \pm 0,05$	2
Carbachol	$-2,55 \pm 0,28$	3
Oxotremorin	$-2,41 \pm 0,02$	3
Oxotremorin M	$-2,99 \pm 0,13$	3
McN-A-343	$-1,03 \pm 0,16$	3

Tabelle 43: Kooperativitätsfaktoren ($p\alpha$), die sich aus der Kurvenanpassung in Abbildung 65 zwischen den dargestellten Agonisten und dem allosterischen Modulator Alcuronium ergeben. Angegebene Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.3.3.2 W84

3.3.3.2.1 Einfluss auf die Carbachol-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Der Einfluss von 300 μM W84 auf die Konzentrations-Effekt-Kurve des Vollagonisten Carbachol ist in Abbildung 66 gezeigt. W84 setzte die Wirksamkeit des Agonisten am M₂-Rezeptor herab (Rechtsverschiebung). Zugleich kam es zu einer Absenkung der maximalen Carbachol-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung auf $71 \pm 3\%$ (t-Test, $p < 0,05$). Die Hill-Steigung war bei beiden Kurven nicht signifikant verschieden von $n_H = 1$ (F-Test, $p > 0,05$). W84 reduzierte die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung signifikant auf $-13 \pm 1\%$ (t-Test, $p < 0,05$).

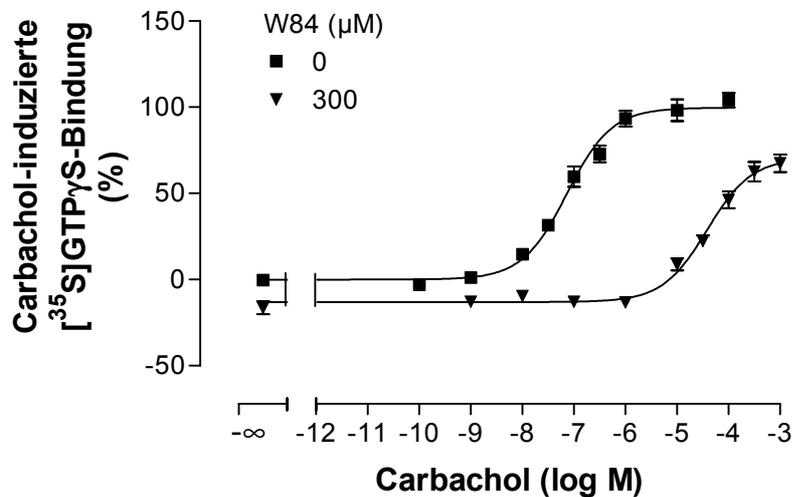


Abbildung 66: Einfluss von 300 μM W84 auf die Carbachol-Konzentrations-Effekt-Kurve.
Ordinate: Carbachol-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Carbachol-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%].
Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Carbachol.
Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein W84- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	pEC ₅₀	Max (%)	Min (%)	n _H (freilaufend)	n
Kontrolle	7,13 ± 0,06	100 ± 2	0 ± 2	0,80 ± 0,07	4
W84 (300 µM)	4,42 ± 0,06**	71 ± 3**	-13 ± 1**	0,89 ± 0,13	4

Tabelle 44: Kenngrößen (± Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten Carbachol-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 66 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss von 300 µM W84. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Carbachol-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, p < 0,01).

3.3.3.2 Einfluss auf die Oxotremorin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

W84 führte bei Oxotremorin zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve, ohne die maximale Oxotremorin-Wirkung zu beeinflussen (Abbildung 67). Die spontane [³⁵S]GTPγS-Bindung wurde durch W84 signifikant auf -14 ± 3% gesenkt (t-Test, p < 0,05). Die Kurven wurden mit einer Steigung von n_H = 1 ausreichend beschrieben (F-Test, p > 0,05). In Tabelle 45 finden sich die Kenndaten der Kurven.

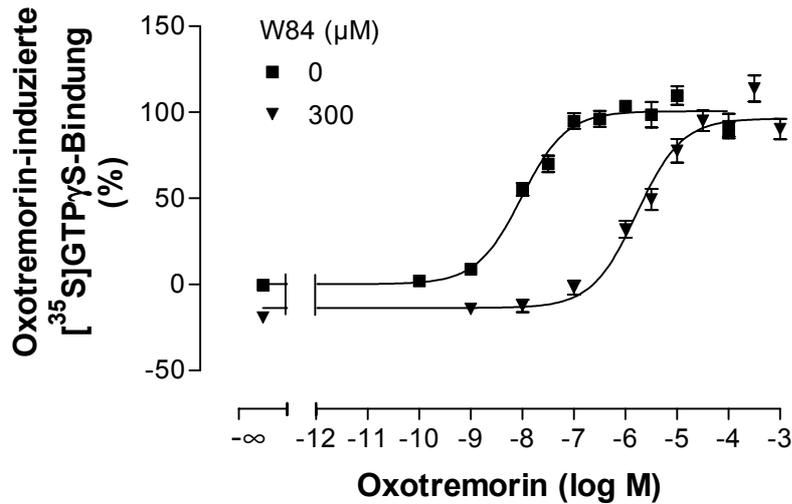


Abbildung 67: Einfluss von 300 μM W84 auf die Oxotremorin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Oxotremorin-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Oxotremorin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Oxotremorin. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 5 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein W84- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	pEC_{50}	Max (%)	Min (%)	n_H (freilaufend)	n
Kontrolle	$8,02 \pm 0,10$	101 ± 3	0 ± 3	$0,93 \pm 0,22$	5
W84 (300 μM)	$5,78 \pm 0,10^{**}$	96 ± 4	$-14 \pm 3^*$	$0,78 \pm 0,15$	5

Tabelle 45: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten Oxotremorin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 67 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss von 300 μM W84. pEC_{50} , Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus der Oxotremorin-Konzentration, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, $p < 0,05/0,01$).

3.3.3.2.3 Einfluss auf die Oxotremorin M-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

In Abbildung 68 ist der konzentrationsabhängige Einfluss von W84 auf die Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt. Es erfolgte eine Rechtsverschiebung ohne signifikante Beeinflussung des Maximaleffektes (Dunnett t-Test, $p > 0,05$). Für die Zusammenschau der Versuchsergebnisse konnte anhand der Methode nach Lew und Angus (1995; s. 2.4.4) durch einen F-Test gezeigt werden, dass die Gesamtheit der Versuchsergebnisse ausreichend mit Kurven vom Steigungsmaß $n_H = 1$ beschrieben waren im Vergleich zu einem freilaufenden, individuellen Steigungsmaß für jede Konzentrations-Effekt-Kurve. Somit handelte es sich um eine Parallelverschiebung der Kurven. Die Kurven in Anwesenheit von 1000 μM W84 für sich genommen wurde besser mit Hill-Koeffizienten von $n_H < 1$ beschrieben. Die Werte der Hill-Koeffizienten bei einer Kurvenanpassung mit freilaufendem Steigungsmaß werden in Tabelle 46 gezeigt. Die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung wurde ab W84-Konzentrationen von 300 μM signifikant gesenkt (Dunnett t-Test, $p < 0,05$).

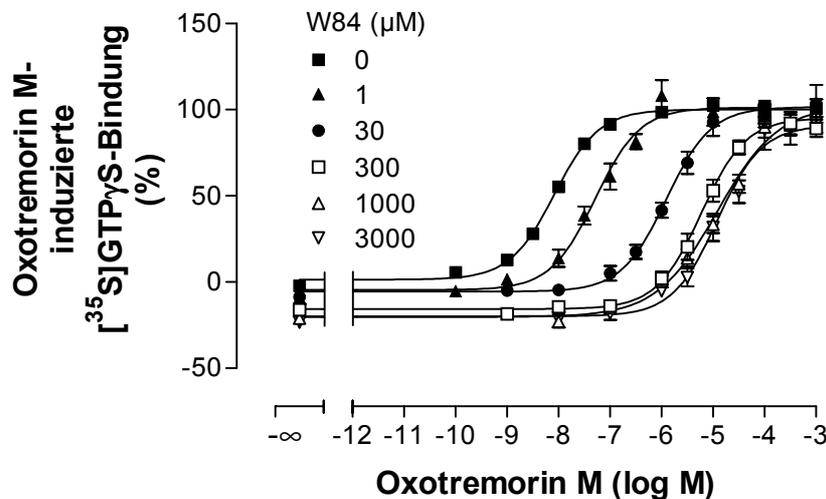


Abbildung 68: Einfluss steigender Konzentrationen von W84 auf die Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Oxotremorin M-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Oxotremorin M-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Oxotremorin M. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 13$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein W84- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	W84 1 μ M	W84 30 μ M	W84 300 μ M	W84 1000 μ M	W84 3000 μ M
pEC ₅₀	8,08 ± 0,04	7,29 ± 0,09**	5,91 ± 0,04**	5,23 ± 0,05**	4,91 ± 0,08**	4,92 ± 0,09**
Max (%)	100 ± 1	101 ± 4	102 ± 2	95 ± 2	97 ± 3	91 ± 4
Min (%)	1 ± 2	-5 ± 3	-6 ± 1	-16 ± 2**	-16 ± 3**	-20 ± 3**
n _H (frei- laufend)	0,96 ± 0,09	0,93 ± 0,18	0,95 ± 0,07	1,06 ± 0,11	0,73 ± 0,09 [#]	0,97 ± 0,18
n	13	2	2	4	3	2

Tabelle 46: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 68 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von W84. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Oxotremorin M-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,01).

[#] signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05).

Die in Abbildung 68 dargestellte Rechtsverschiebung der Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurve durch W84 wurde mittels einer Schild-Auftragung (Abbildung 69) quantifiziert. Eine Auswertung der Daten erfolgte nach der Gleichung von Lanzafame et al. (1996; Gleichung 17). Für die Interaktion zwischen Oxotremorin M und W84 ergab sich ein Kooperativitätsfaktor von $\rho\alpha = -3,13 \pm 0,08$. Die hier ermittelte Affinität von W84 zum freien M₂-Rezeptor (pK_A = 6,79 \pm 0,09) wich nicht signifikant von dem Wert ab, der in Experimenten mit ACh (pK_A = 6,64 \pm 0,14) bestimmt wurde (t-Test, p > 0,05).

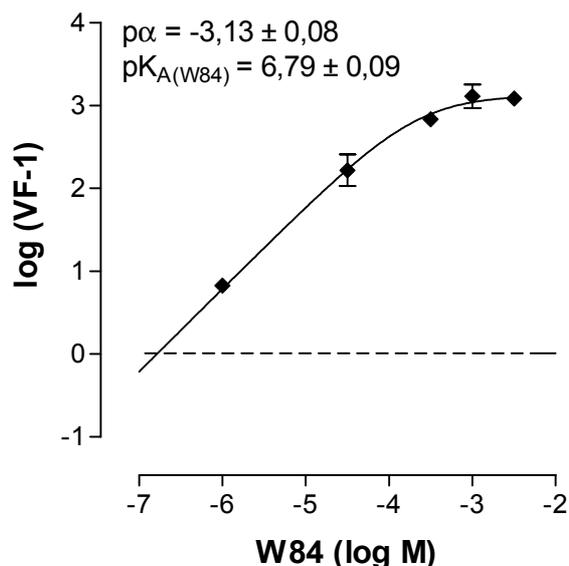


Abbildung 69: Schild-Auftragung der W84-induzierten Rechtsverschiebung der Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von W84. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten der Einzelexperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: $n_H = 1$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

3.3.3.2.4 Einfluss auf die McN-A-343-induzierte [35 S]GTPyS-Bindung

Der antagonistische Effekt von W84 auf die McN-A-343-induzierte [35 S]GTPyS-Bindung ist in Abbildung 70 dargestellt. W84 verminderte nicht nur die Wirksamkeit von McN-A-343 am M_2 -Rezeptor, sondern senkte auch die maximale intrinsische Aktivität von McN-A-343 auf $75 \pm 3\%$. Die basale [35 S]GTPyS-Bindung wurde durch W84 ebenfalls signifikant reduziert (t-Test, $p < 0,05$). Die Kurven wurden mit einer Hill-Steigung von $n_H = 1$ ausreichend beschrieben (F-Test, $p > 0,05$).

Ergebnisse

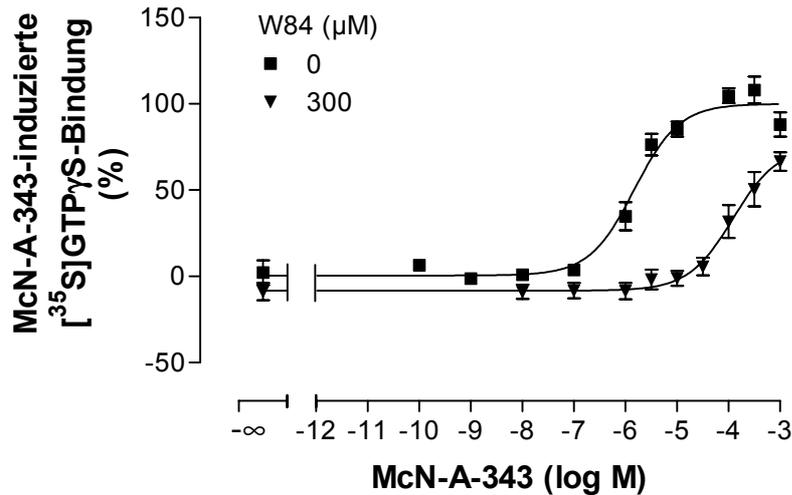


Abbildung 70: Einfluss von 300 μM W84 auf die McN-A-343-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Carbachol-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, McN-A-343-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Carbachol. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein W84- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	pEC_{50}	Max (%)	Min (%)	n_H (freilaufend)	n
Kontrolle	$5,83 \pm 0,10$	100 ± 4	1 ± 3	$1,41 \pm 0,08$	3
W84 (300 μM)	$3,91 \pm 0,06^{**}$	$75 \pm 3^{**}$	$-8 \pm 1^*$	$1,02 \pm 0,08$	3

Tabelle 47: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten McN-A-343-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 70 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss von 300 μM W84. pEC_{50} , Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus der McN-A-343-Konzentration, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, $p < 0,05/0,01$).

3.3.3.2.5 Einfluss auf die Pilocarpin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Wie schon von Klemt (2005) beschrieben verminderte W84 den maximalen Pilocarpin-Effekt bei gleichzeitiger Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve von Pilocarpin (s. Abbildung 71). Die Pilocarpin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung wurde durch 300 μM W84 auf 24 ± 2 gesenkt. Die Hill-Koeffizienten beider Kurven unterschieden sich nicht signifikant von $n_H = 1$ (F-Test, $p > 0,05$).

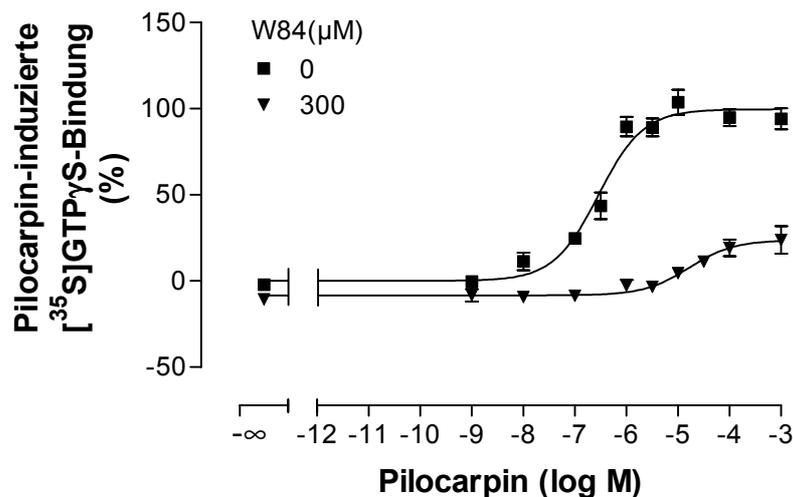


Abbildung 71: Einfluss von 300 μM W84 auf die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve.

Ordinate: Carbachol-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%].

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Carbachol.

Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein W84- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	pEC ₅₀	Max (%)	Min (%)	n _H (freilaufend)	n
Kontrolle	6,54 ± 0,11	100 ± 4	0 ± 4	1,31 ± 0,10	3
W84 (300 µM)	4,78 ± 0,11**	24 ± 2**	-8 ± 1	0,71 ± 0,14	3

Tabelle 48: Kenngrößen (± Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 71 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss von 300 µM W84. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Pilocarpin-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, p < 0,01).

3.3.3.2.6 Kooperativität der Agonisten mit W84

Bei der Mehrheit der Agonisten wurde der Einfluss nur einer W84-Konzentration untersucht. Deshalb wurde analog zu dem Vorgehen bei Alcuronium (s. 3.3.3.1.5) der Schnittpunkt der Kurve in der Auswertung nach Lanzafame et al. (1996) für alle Agonisten durch den pK_A-Wert von Alcuronium, der in Experimenten mit ACh ermittelt wurde, festgesetzt (pK_A = 6,64), um Kooperativitätsfaktoren der Agonisten mit W84 abschätzen zu können. Die daraus resultierenden Kooperativitätsfaktoren (pα) sind in Tabelle 49 dargestellt. Für ACh und Oxotremorin M wurden ebenfalls nur die Verschiebungsfaktoren für die W84-Konzentration von 300 µM eingetragen. Die pα-Werte für ACh und Oxotremorin M, die hier nur durch zwei Punkte abgeschätzt wurden, waren nicht signifikant verschieden von den Werten, die sich aus entsprechenden Schild-Auftragungen mit mehr Datenpunkten (s. 3.3.2.2.1 für ACh und 3.3.3.2.3 für Oxotremorin M) ergaben (t-Test, p > 0,05).

Die Kurve für Oxotremorin M wich nur schwach von einer Geraden mit der Steigung s = 1 ab. Am ausgeprägtesten war das allosterische Verhalten bei den Partialagonisten Pilocarpin und McN-A-343. Der Kooperativitätsfaktor (pα) von W84 mit Pilocarpin war nicht signifikant verschieden von dem von Klemt (2005) ermittelten Wert (pα = -1,68 ± 0,21; t-Test, p > 0,05). Großmüller (2003) untersuchte den Einfluss von W84 auf die Bindung von [³H]Oxotremorin M und

erhielt einen α -Wert von $-1,96 \pm 0,14$. Dieser differierte um eine Dekade von dem in dieser Arbeit ermittelten Wert, stimmte jedoch qualitativ (negative Kooperativität) damit überein. Maaß et al. (1995) und Tränkle et al. (1998a) bestimmten an isolierten Meerschweinchen-Herzvorhöfen einen α -Wert von $-2,5$ für die Interaktion zwischen Oxotremorin und W84. Dieser Wert unterschied sich nicht signifikant von dem in der vorliegenden Arbeit erhobenen Wert (t-Test, $p > 0,05$).

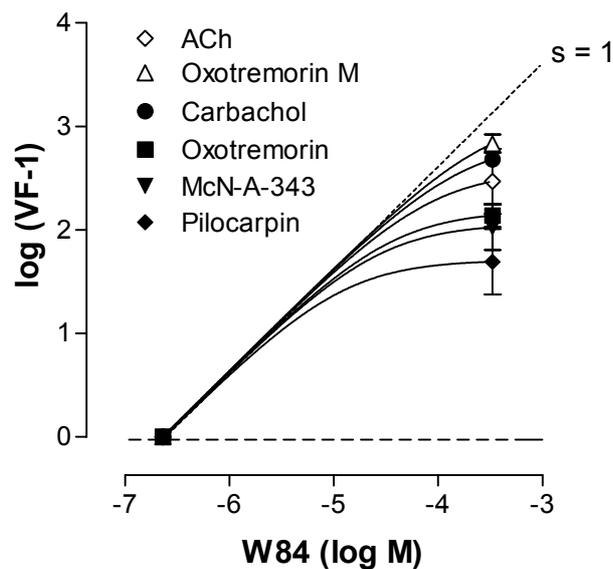


Abbildung 72: Schild-Auftragung der W84-induzierten Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven verschiedener Agonisten. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von W84. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten aus Tabelle 44 bis Tabelle 48 bzw. Tabelle 23 für ACh). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

	$p\alpha$	n
ACh	$-2,57 \pm 0,32$	3
Oxotremorin M	$-3,11 \pm 0,14$	4
Carbachol	$-2,86 \pm 0,04$	4
Oxotremorin	$-2,19 \pm 0,11$	5
McN-A-343	$-2,06 \pm 0,20$	4
Pilocarpin	$-1,72 \pm 0,26$	3

Tabelle 49: Kooperativitätsfaktoren ($p\alpha$), die sich aus der Kurvenanpassung in Abbildung 72 zwischen den dargestellten Agonisten und dem allosterischen Modulator W84 ergeben. Angegebene Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.3.3.3 Naphmethonium (MM3a)

3.3.3.3.1 Einfluss auf die Carbachol-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung

Es wurde getestet, welchen Einfluss das W84-Derivat Naphmethonium, das mit dem Partialagonisten Pilocarpin positiv kooperativ (Klemt 2005) und mit ACh negativ kooperativ (3.3.2.2.3) interagiert, auf den Vollagonisten Carbachol ausübte.

Naphmethonium bewirkte eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve von Carbachol ohne Beeinflussung des oberen und unteren Plateaus (Abbildung 73). Die Kurvensteilheit von $n_H = 1$ wurde durch Naphmethonium nicht verändert (F-Test, $p > 0,05$).

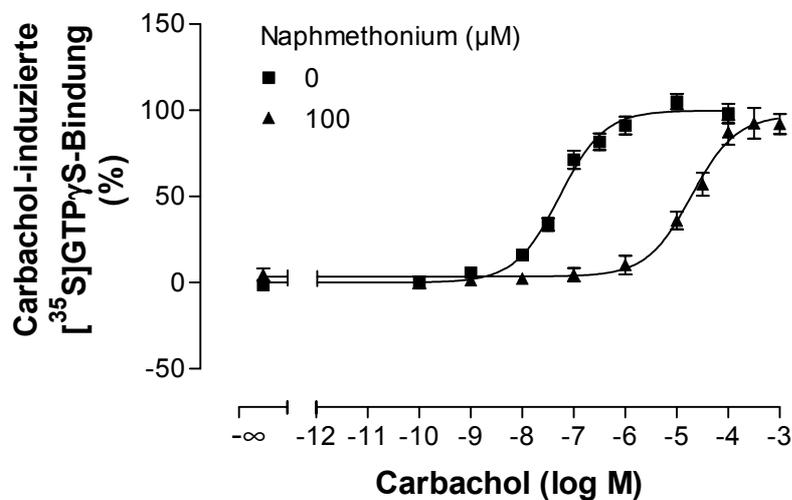


Abbildung 73: Einfluss von 100 μM Naphmethonium auf die Carbachol-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Carbachol-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Carbachol-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Carbachol. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Naphmethonium- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	Max (%)	Min (%)	n _H (freilaufend)	n
Kontrolle	7,27 \pm 0,06	100 \pm 2	0 \pm 2	0,97 \pm 0,14	4
Naphmethonium (100 μM)	4,71 \pm 0,06**	97 \pm 2	4 \pm 1	1,01 \pm 0,16	4

Tabelle 50: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten Carbachol-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 73 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss von 100 μM Naphmethonium. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Carbachol-Konzentration, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γS -Bindung induziert.

Max: maximale [^{35}S]GTP γS -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [^{35}S]GTP γS -Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, p < 0,01).

3.3.3.3.2 Einfluss auf die Oxotremorin-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung

Als weiterer Vollagonist wurde Oxotremorin eingesetzt. In Abbildung 74 ist ersichtlich, dass Naphmethonium die Konzentrations-Effekt-Kurve von Oxotremorin nach rechts verschob und zugleich die maximale Oxotremorin-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung signifikant erhöhte (t-Test, p < 0,05). Die Hill-Steigung beider Kurven war nicht signifikant verschieden von n_H = 1 (F-Test, p > 0,05). Es kam durch Naphmethonium zu einer signifikanten Senkung der basalen [^{35}S]GTP γS -Bindung auf -13 \pm 3% (t-Test, p < 0,05). Die maximale [^{35}S]GTP γS -Bindung wurde durch Naphmethonium signifikant erhöht.

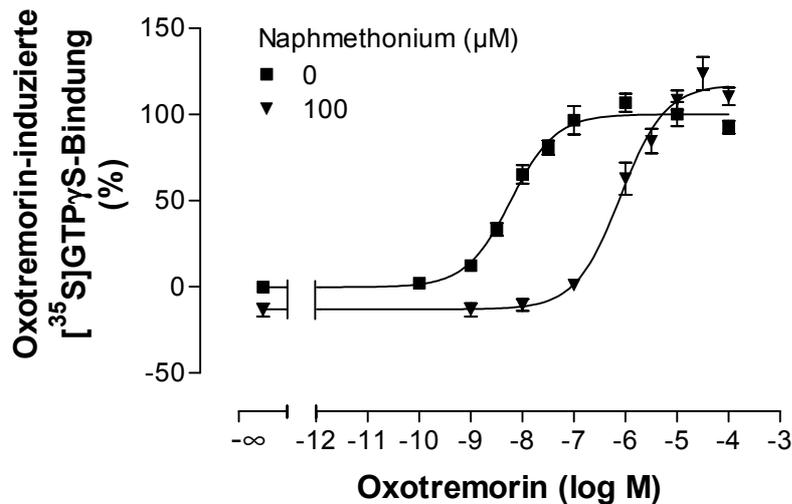


Abbildung 74: Einfluss von 100 μM Naphmethonium auf die Oxotremorin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Oxotremorin-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Oxotremorin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Oxotremorin. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Naphmethonium- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	pEC_{50}	Max (%)	Min (%)	n_H (freilaufend)	n
Kontrolle	$8,22 \pm 0,07$	100 ± 2	0 ± 2	$1,05 \pm 0,15$	4
Naphmethonium (100 μM)	$6,10 \pm 0,08^{**}$	$117 \pm 4^{**}$	$-13 \pm 3^*$	$0,94 \pm 0,17$	4

Tabelle 51: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten Oxotremorin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 74 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss von 100 μM Naphmethonium. pEC_{50} , Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus der Oxotremorin-Konzentration, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, $p < 0,05/0,01$).

3.3.3.3.3 Einfluss auf die Oxotremorin M-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Im Folgenden wurde der konzentrationsabhängige Effekt von Naphmethonium auf die Oxotremorin M-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung untersucht (Abbildung 75). Analog zu ACh erfolgte eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve von Oxotremorin M. Bemerkenswert war jedoch eine Steigerung des Oxotremorin M-induzierten Maximaleffektes durch Naphmethonium ab Konzentrationen von 10 μM. (Dieses Verhalten von Naphmethonium wurde unter 3.3.3.4.2 genauer untersucht.) Alle Kurven konnten ausreichend mit einer Steigung von $n_H = 1$ beschrieben werden (F-Test, $p > 0,05$). Die Hill-Koeffizienten bei Kurvenanpassung mit freilaufendem Steigungsmaß sind in Tabelle 52 dargestellt. Die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung wurde durch Naphmethonium nicht beeinflusst (t-Test, $p > 0,05$).

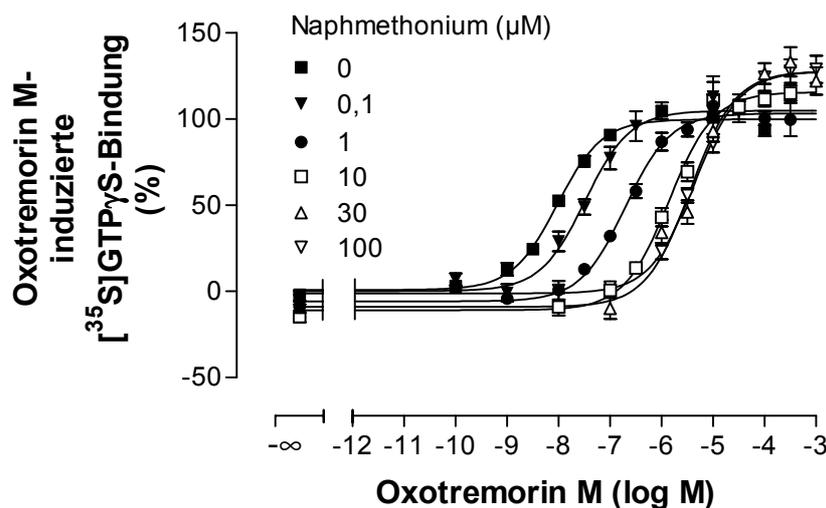


Abbildung 75: Einfluss steigender Konzentrationen von Naphmethonium auf die Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Oxotremorin M-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, Oxotremorin M-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Oxotremorin M. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 13$) in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Naphmethonium- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	Naphm. 0,1 μ M	Naphm. 1 μ M	Naphm. 10 μ M	Naphm. 30 μ M	Naphm. 100 μ M
pEC ₅₀	8,02 ± 0,05	7,48 ± 0,08**	6,71 ± 0,05**	5,86 ± 0,07**	5,43 ± 0,09**	5,35 ± 0,04**
Max (%)	100 ± 2	105 ± 3	103 ± 2	116 ± 3*	128 ± 4**	128 ± 2**
Min (%)	1 ± 2	0 ± 3	-6 ± 2	-6 ± 4	-5 ± 5	-5 ± 2
n _H (frei- laufend)	0,96 ± 0,11	0,97 ± 0,18	0,94 ± 0,10	0,97 ± 0,16	0,82 ± 0,16	0,84 ± 0,06
n	14	3	2	2	3	4

Tabelle 52: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 75 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von Naphmethonium. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit n_H = 1.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Oxotremorin M-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, p < 0,05/0,01).

Die aus den Kurven von Abbildung 75 ermittelten Verschiebungsfaktoren wurden in einer Schild-Auftragung abgebildet (Abbildung 76). Es erfolgte eine Datenanpassung nach Lanzafame et al. (1996). Daraus ergab sich ein pK_A-Wert von 7,30 \pm 0,04 und ein Kooperativitätsfaktor p α von -2,93 \pm 0,07. Die Affinität zum Oxotremorin M besetzten Rezeptor betrug demnach für Naphmethonium p(α ·K_A) = 4,37. Der pK_A-Wert unterschied sich signifikant von dem in ACh-Experimenten ermittelten Wert (pK_A = 7,66 \pm 0,13; n = 18; s. 3.3.2.2.3). Die absolute Differenz betrug jedoch nicht mehr als 0,4 log-Einheiten.

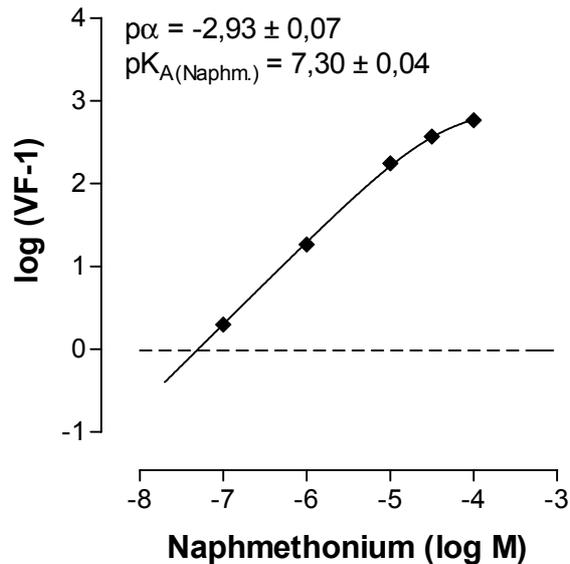


Abbildung 76: Schild-Auftragung der Naphmethonium-induzierten Rechtsverschiebung der Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von W84. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten der Einzelerperimente; Steigungsmaß der einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven: $n_H = 1$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

3.3.3.3.4 Einfluss auf die McN-A-343-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung

100 μ M Naphmethonium senkten sowohl die Wirksamkeit von McN-A-343 am M_2 -Rezeptor (Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve) als auch die maximale McN-A-343-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung, welche auf $73 \pm 3\%$ reduziert wurde. Die spontane [35 S]GTP γ S-Bindung wurde nicht signifikant beeinflusst (t-Test, $p > 0,05$). Die Steigung der Kurven konnte mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ beschrieben werden (F-Test, $p > 0,05$).

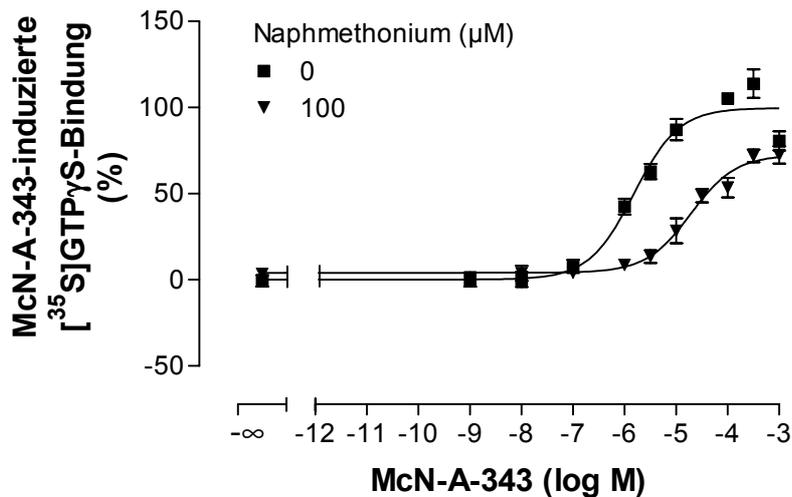


Abbildung 77: Einfluss von 100 μM Naphmethonium auf die McN-A-343-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** McN-A-343-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, McN-A-343-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von McN-A-343. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung, wobei jeweils ein Naphmethonium- und ein Kontroll-Experiment gemeinsam durchgeführt wurden.

	pEC_{50}	Max (%)	Min (%)	n_H (freilaufend)	n
Kontrolle	$5,82 \pm 0,15$	100 ± 5	0 ± 5	$0,95 \pm 0,35$	3
Naphmethonium (100 μM)	$4,71 \pm 0,08^{**}$	$73 \pm 3^*$	4 ± 2	$0,82 \pm 0,14$	3

Tabelle 53: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten McN-A-343-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 77 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss von 100 μM Naphmethonium. pEC_{50} , Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 1$.

pEC_{50} : negativer dekadischer Logarithmus der McN-A-343-Konzentration, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [^{35}S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, $p < 0,05/0,01$).

3.3.3.3.5 Kooperativität der Agonisten mit Naphmethonium

Analog zu Alcuronium (3.3.3.1.5) und W84 (3.3.3.2.6) wurden die Verschiebungsfaktoren, die Naphmethonium bei den Konzentrations-Effekt-Kurven der verschiedenen Agonisten hervorrief, berechnet. Unter der Annahme, dass der pK_A -Wert (Affinität des Allosters zum unbesetzten Rezeptor) unabhängig vom Agonisten war, wurde der in Experimenten mit ACh für Naphmethonium ermittelte pK_A -Wert ($pK_A = 7,66$) als Schnittpunkt mit der Abszisse festgesetzt. Die Daten wurden nach der Gleichung von Lanzafame et al. (1996) ausgewertet (s. Abbildung 78). Die daraus resultierenden Kooperativitätsfaktoren ($\rho\alpha$) sind in Tabelle 54 dargestellt. Für ACh und Oxotremorin M wurden ebenfalls nur die Verschiebungsfaktoren für die Naphmethonium-Konzentration von $100 \mu\text{M}$ eingetragen. Die hier nur durch zwei Datenpunkte in der Schild-Auftragung abgeschätzten $\rho\alpha$ -Werte für ACh und Oxotremorin M unterschieden sich nicht signifikant von den Werten, die aus den ausführlicheren Schild-Auftragungen (s. 3.3.2.2.3 für ACh und 3.3.3.3.3 für Oxotremorin M) resultierten (t-Test, $p > 0,05$). Die $\rho\alpha$ -Werte der Vollagonisten lagen dicht beieinander, wohingegen der Kooperativitätsfaktor ($\rho\alpha$) des Partialagonisten McN-A-343 gegenüber den anderen Agonisten einen um 1 bis 1,5 Dekaden größeren Wert annahm.

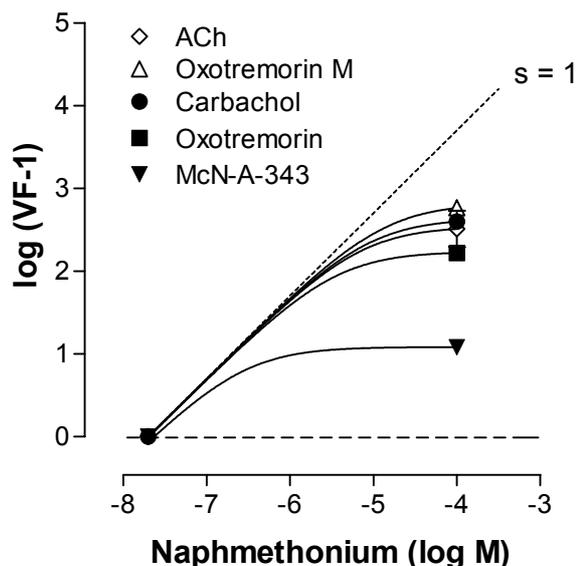


Abbildung 78: Schild-Auftragung der Naphmethonium-induzierten Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven verschiedener Agonisten. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Naphmethonium. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (basierend auf den pEC_{50} -Werten aus Tabelle 50 bis Tabelle 53 bzw. Tabelle 25 für ACh). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

	$p\alpha$	n
ACh	$-2,54 \pm 0,20$	4
Oxotremorin M	$-2,82 \pm 0,08$	4
Carbachol	$-2,64 \pm 0,04$	4
Oxotremorin	$-2,24 \pm 0,05$	4
McN-A-343	$-1,12 \pm 0,05$	3

Tabelle 54: Kooperativitätsfaktoren ($p\alpha$), die sich aus der Kurvenanpassung in Abbildung 78 zwischen den dargestellten Agonisten und dem allosterischen Modulator Naphmethonium ergeben. Angegebene Werte sind Mittelwerte \pm Standardfehler.

3.3.3.4 Konzentrationsabhängige Beeinflussung des Agonist-induzierten Maximaleffektes durch Allosterie

In 3.3.3.1 bis 3.3.3.3 zeigte sich, dass die durch verschiedene Agonisten (d. h. nicht nur durch Pilocarpin; vgl. Zahn et al. (2002), Klemm (2005)) maximal induzierbare $[^{35}S]GTP\gamma S$ -Bindung durch Allosterie beeinflusst werden konnte. Im

Folgendes wurde für jeden Agonisten am Beispiel eines Allostere überprüft, ob es sich dabei um einen konzentrationsabhängigen Effekt handelte. Bei Oxotremorin war eine Veränderung des Maximaleffektes (soweit überhaupt vorhanden) durch die verwendeten Allostere nicht ausgeprägt genug, um einen Zusammenhang zwischen Konzentration und Effekt untersuchen zu können.

3.3.3.4.1 Carbachol/W84

In Abbildung 79 ist der Einfluss steigender Konzentrationen von W84 auf die maximale Carbachol-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung (Carbachol: 1 mM) dargestellt. Ab einer W84-Konzentration von 300 μM wurde der Carbachol-Maximaleffekt signifikant gesenkt ($p < 0,05$). Die Steigung der Kurve war nicht signifikant verschieden von $n_H = -1$ (F-Test, $p > 0,05$). Das untere Plateau, d. h. die maximal durch W84 erreichbare Reduktion des Maximaleffektes lag bei $68 \pm 17\%$. Für den Wendepunkt der Kurve ergab sich ein pIC_{50} von $3,34 \pm 0,56$. Dieser unterschied sich nicht signifikant von dem $p(\alpha \cdot K_A)$ -Wert 3,78, der sich aus dem $p\alpha$ -Wert für die Interaktion zwischen Carbachol und W84 aus Tabelle 49 und dem pK_A -Wert von W84 (6,64) berechnete. Falls die Inhibition des Carbachol-Effektes durch die Bildung ternärer Komplexe bedingt war, sollte der pIC_{50} -Wert $p(\alpha \cdot K_A)$ entsprechen. Die gute Übereinstimmung der Werte deutete darauf hin, dass die Senkung des Carbachol-Maximaleffektes durch W84 auf der Bildung ternärer Komplexe beruhte.

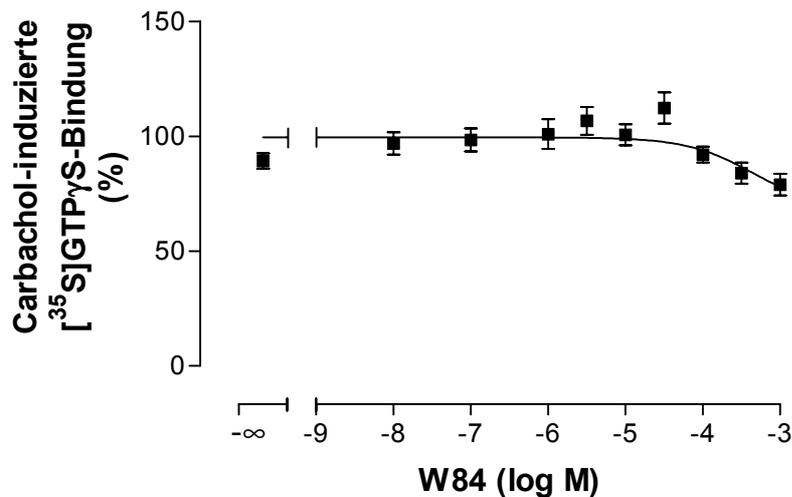


Abbildung 79: Einfluss steigender Konzentrationen von W84 auf den Carbachol-induzierten Maximaleffekt (Carbachol: 1 mM). **Ordinate:** Carbachol-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität = 0%, Carbachol-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von W84. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = -1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Sechsfachbestimmung.

3.3.3.4.2 Oxotremorin M/Naphmethonium

In 3.3.3.3 konnte bei hohen Naphmethonium-Konzentrationen eine Steigerung der maximal durch Oxotremorin M induzierbaren [³⁵S]GTPγS-Bindung beobachtet werden. Zur genaueren Betrachtung dieses Effektes wurden zu einer maximal wirksamen Konzentration von Oxotremorin M (300 μ M) steigende Naphmethonium-Konzentrationen hinzugegeben (Abbildung 80, geschlossene Symbole). Bei nicht-festgesetztem Steigungsmaß ergab sich eine Steigung von $n_H = 0,24 \pm 0,13$, ein Maximum von $184 \pm 110\%$ sowie ein pIC_{50} von $-3,43 \pm 4,15$ (durchgezogene Kurve). Das kleine Messfenster (30%) führte zu relativ großen experimentellen Streuungen. In Abbildung 75 schien jedoch bei ca. 130% eine Sättigungsgrenze des Effektes erreicht zu sein. Dies entsprach bei auf $n_H = 1$ festgesetzter Kurvensteigung dem oberen Plateau ($130 \pm 3\%$; Abbildung 80). Der pIC_{50} betrug in diesem Fall $5,86 \pm 0,29$. Mit offenen Symbolen sind in Abbildung 80 zur Orientierung die Max-Werte aus Tabelle 52, die die maximale Oxotremorin M-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung unter Einfluss der jeweils angegebenen Naphmethonium-Konzentration darstellen, aufgetragen worden. Es wurde jedoch

keine Kurve angepasst. Aus der Schild-Auftragung (s. 3.3.3.3) errechnete sich eine Affinität von Naphmethonium zum Oxotremorin M-besetzten Rezeptor von $p(\alpha \cdot K_A) = 4,37$. Falls die Steigerung des Oxotremorin M-Effektes durch die Bildung ternärer Komplexe bedingt war, sollte der pIC_{50} -Wert, bei dem Naphmethonium mit der Hälfte der Oxotremorin M-besetzten Rezeptoren ternäre Komplexe bildete, dem $p(\alpha \cdot K_A)$ -Wert entsprechen. $pIC_{50} = 5,86 \pm 0,29$ ($n_H = 1$) und $p(\alpha \cdot K_A) = 2,70$ unterschieden sich signifikant voneinander (t-Test, $p < 0,05$). Aufgrund der großen Streuung gab es keine signifikante Differenz zu dem pIC_{50} -Wert der Kurvenanpassung mit freilaufendem Steigungsmaß ($pIC_{50} = -3,43 \pm 4,15$). Da sich die Steigerung der maximalen Oxotremorin M-induzierten [35 S]GTP γ S-Bindung durch Naphmethonium in einem sehr kleinen Messfenster abspielte, schlossen die abweichenden Werte von $p(\alpha \cdot K_A)$ und pIC_{50} nicht aus, dass der Effekt durch die Bildung ternärer Komplexe bedingt war.

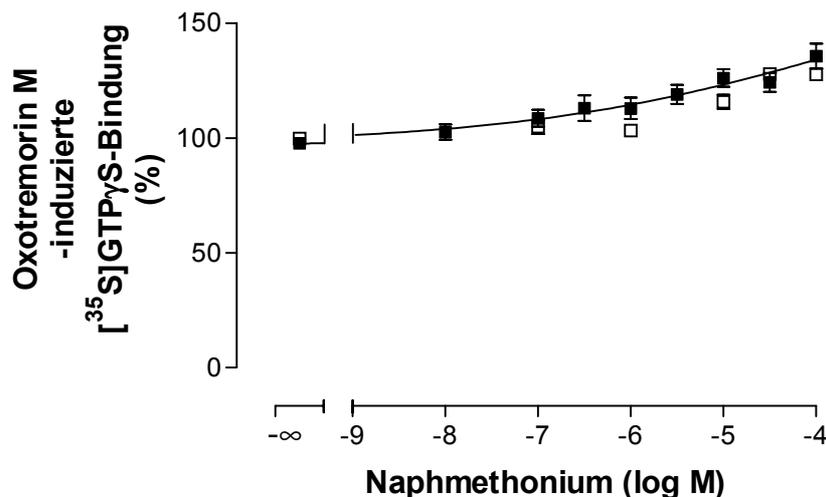


Abbildung 80: Einfluss steigender Konzentrationen von Naphmethonium auf den Oxotremorin M-induzierten Maximaler Effekt (Oxotremorin M: 300 μ M). **Ordinate:** Oxotremorin M-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung in Prozent [Basalaktivität = 0%, Oxotremorin M-Maximaler Effekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Naphmethonium. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); durchgezogene Kurve: Hill-Koeffizient freilaufend ($n_H = 0,24 \pm 0,13$), gestrichelte Kurve: Hill-Koeffizient konstant ($n_H = 1$). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten in Sechsfachbestimmung (geschlossene Symbole). Die Datenpunkte mit offenen Symbolen zeigen die Max-Werte aus Abbildung 75 bzw. Tabelle 52.

In einem weiteren Experiment sollte versucht werden, den durch Naphmethonium erzielten Effekt durch den prototypischen allosterischen Modulator W84 zu antagonisieren, um zu prüfen, ob die Wirkung von Naphmethonium durch Bindung an die allosterische Bindungsstelle induziert wurde. In dem Versuch sollten konstant 30 μM Naphmethonium eingesetzt werden. Als Konzentration für Oxotremorin M wurden 100 μM gewählt, da diese einen in Anwesenheit von 30 μM Naphmethonium maximalen Effekt hervorriefen (s. Abbildung 75).

Vor der Durchführung des oben beschriebenen Experimentes wurden zunächst die Oxotremorin M-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit verschiedener W84-Konzentrationen (Abbildung 68) noch einmal dahingehend betrachtet, ob es einen Eigeneffekt von W84 auf die maximale Oxotremorin M-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung gab. Von jeder Konzentrations-Effekt-Kurve aus Abbildung 68 wurde der Wert bei 100 μM Oxotremorin M übernommen und in Abbildung 81 aufgetragen. Obwohl die Oxotremorin M-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung in Abbildung 81 mit steigenden Konzentrationen von W84 signifikant abnahm (unteres Plateau: $86 \pm 5\%$), bedeutete dies nicht, dass W84 einen senkenden Einfluss auf den Oxotremorin M-Maximaleffekt hatte. Denn bei 100 μM Oxotremorin M war in Anwesenheit hoher W84-Konzentrationen das obere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve noch nicht erreicht (s. Abbildung 68). In Abbildung 82 wird deutlich, dass bei der Auftragung der Max-Werte (obere Plateaus) aus Abbildung 68 bzw. Tabelle 46 keine signifikante Beeinflussung des Maximaleffektes von Oxotremorin M stattfand (t-Test, $p > 0,05$; unteres Plateau: $92 \pm 4\%$). Die Hill-Koeffizienten der Kurven in Abbildung 81 und Abbildung 82 unterschieden sich nicht signifikant von $n_H = -1$ (F-Test, $p > 0,05$). Der Wendepunkt der Kurve lag in Abbildung 81 bei $3,12 \pm 0,43$ und in Abbildung 82 bei $3,31 \pm 0,67$.

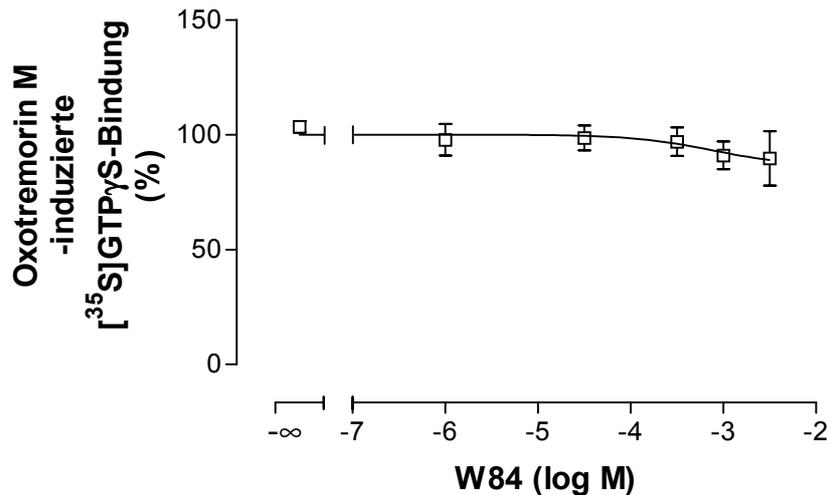


Abbildung 81: Einfluss steigender Konzentrationen von W84 auf die durch 100 μM Oxotremorin M induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. **Ordinate:** Oxotremorin M-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Prozent [Basalaktivität = 0%, Oxotremorin M-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von W84. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = -1$. Die Datenpunkte zeigen die Werte (Mittelwerte \pm Standardfehler) bei jeweils 100 μM Oxotremorin M der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 68.

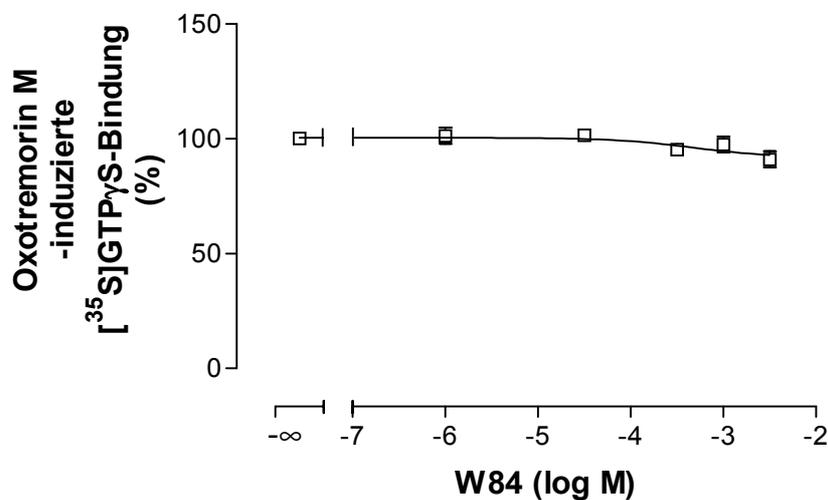


Abbildung 82: Einfluss steigender Konzentrationen von W84 auf den Oxotremorin M-induzierten Maximaleffekt (Oxotremorin M: 1 mM). **Ordinate:** Oxotremorin M-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Prozent [Basalaktivität = 0%, Oxotremorin M-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von W84. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = -1$. Die Datenpunkte zeigen die Max-Werte (Mittelwerte \pm Standardfehler) der Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 68 bzw. Tabelle 46.

W84 konnte demnach im Experiment zur Verdrängung von Naphmethonium vom Oxotremorin M-besetzten Rezeptor eingesetzt werden, ohne dass eine Beeinflussung des Oxotremorin M-Maximaleffektes durch W84 zu erwarten war. Zu 30 μM Naphmethonium- und 100 μM Oxotremorin M wurden steigende Konzentrationen an W84 hinzugefügt (Abbildung 83). Die maximale Oxotremorin M-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung in Abwesenheit von Naphmethonium und W84 wurde auf den Wert von 100% festgelegt. Das obere Plateau der Kurve ($122 \pm 2\%$) gab demnach den maximalen Oxotremorin M-Effekt in Anwesenheit von 30 μM Naphmethonium wieder. Es zeigte sich, dass durch Erhöhung der W84-Konzentration die Wirkung von Naphmethonium abnahm. Die Kurve konnte mit einer Steigung von $n_{\text{H}} = -1$ ausreichend beschrieben werden (F-Test, $p > 0,05$). Der Wendepunkt lag bei $\text{pIC}_{50} = 3,08 \pm 0,37$. Das untere Plateau nahm einen Wert von $93 \pm 8\%$ an, welcher sich nicht signifikant von 100% unterschied (t-Test, $p > 0,05$). Die Effekt-steigernde Wirkung von Naphmethonium konnte folglich durch W84 vollständig aufgehoben werden.

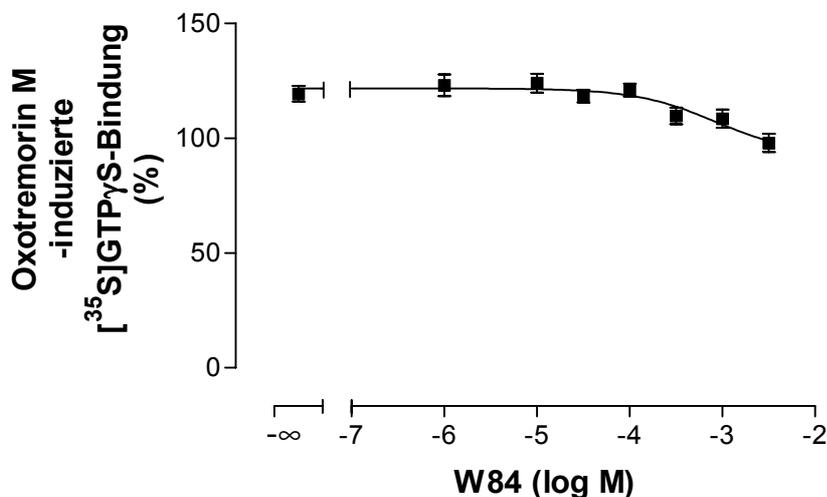


Abbildung 83: Einfluss steigender Konzentrationen von W84 auf den Oxotremorin M-induzierten, durch Naphmethonium modulierten Maximaleffekt (Oxotremorin M: 100 μM ; Naphmethonium: 30 μM). **Ordinate:** Oxotremorin M-induzierte [^{35}S]GTP γS -Bindung in Prozent [Basalaktivität = 0%, Oxotremorin M-Maximaleffekt in Abwesenheit von Naphmethonium = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von W84. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_{\text{H}} = -1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Achtfachbestimmung.

3.3.3.4.3 McN-A-343/Naphmethonium

Es wurde überprüft, ob es sich bei der in Abbildung 77 ersichtlichen Senkung der McN-A-343-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung durch Naphmethonium um einen konzentrationsabhängigen Effekt handelte. Abbildung 84 zeigt den Einfluss von steigenden Naphmethonium-Konzentrationen auf den McN-A-343-Maximaleffekt. Es resultierte eine Kurve mit sigmoidem Verlauf. Das Steigungsmaß war nicht signifikant verschieden von $n_H = -1$ (t-Test, $p > 0,05$). Der freilaufende Hill-Koeffizient betrug $n_H = -2,48 \pm 1,64$. Das untere Plateau der Kurve lag bei $71 \pm 3\%$. Der Wendepunkt wurde durch $pIC_{50} = 6,10 \pm 0,20$ beschrieben. Er unterschied sich signifikant von dem berechneten $p(\alpha \cdot K_A)$ -Wert von 6,54. Die Differenz betrug jedoch weniger als eine halbe Dekade. Dies sprach dafür, dass es sich bei der Interaktion zwischen Naphmethonium und McN-A-343 um einen allosterischen Antagonismus handelte, durch den die intrinsische Aktivität von McN-A-343 abgeschwächt wurde.

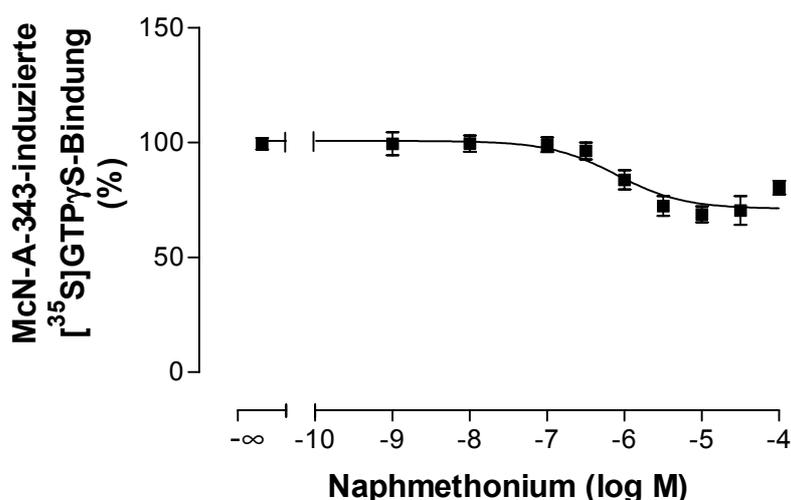


Abbildung 84: Einfluss steigender Konzentrationen von Naphmethonium auf den McN-A-343-induzierten Maximizeffekt (McN-A-343: 300 μ M). **Ordinate:** McN-A-343-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität = 0%, McN-A-343-Maximizeffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Naphmethonium. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = -1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 5 unabhängigen Experimenten in Sechsfachbestimmung.

3.3.3.4.4 Pilocarpin/Naphmethonium

Die Interaktion zwischen Pilocarpin und Naphmethonium am M_2 -Rezeptor wurde bereits von Klemt (2005) betrachtet. Hier wurde noch einmal der konzentrationsabhängige Einfluss von Naphmethonium auf den Pilocarpin-Maximaleffekt (Pilocarpin: 1 mM) untersucht. Die freilaufende Kurvensteigung betrug $n_H = -0,83 \pm 0,24$, lieferte jedoch keine bessere Kurvenanpassung als $n_H = -1$ (F-Test, $p > 0,05$). Das untere Plateau ($-2 \pm 6\%$) war nicht signifikant verschieden von 0% (t-Test, $p > 0,05$), was mit dem Befund von Klemt (2005) übereinstimmte. Der Wendepunkt lag bei $pIC_{50} = 7,24 \pm 0,14$. Dieser unterschied sich signifikant von dem Wert von Klemt (2005; $pIC_{50} = 7,67 \pm 0,09$). Angesichts der experimentellen Schwankungen wurde dem Unterschied keine Bedeutung beigemessen.

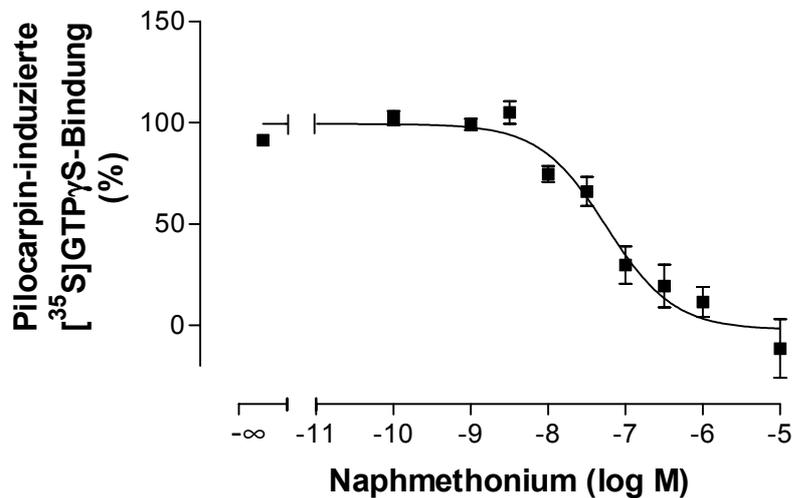


Abbildung 85: Einfluss steigender Konzentrationen von Naphmethonium auf den Pilocarpin-induzierten Maximaleffekt (Pilocarpin: 1 mM). **Ordinate:** Pilocarpin-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in Prozent [Basalaktivität = 0%, Pilocarpin-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Naphmethonium. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = -1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

3.4 [³H]NMS-Bindungsexperimente

In den vorangegangenen [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten wurde stets angenommen, aus den beobachteten Konzentrations-Effekt-Kurven auf die Affinität, d. h. die Bindungsneigung des Liganden an den Rezeptor, rückschließen zu können. Im Folgenden wurde für die Interaktion zwischen Naphmethonium und ACh bzw. Pilocarpin überprüft, ob sich die in den funktionellen Experimenten erhobenen Befunde in [³H]NMS-Bindungsexperimenten bestätigen ließen. Zahn et al. (2002) konnten dies bereits für Oxotremorin M und Alcuronium in [³H]Agonist-Bindungsstudien nachweisen. Für das in den folgenden Versuchen verwendete Zellhomogenat wurden in homologen Kompetitionsexperimenten (n = 3) eine M₂-Rezeptorkonzentration B_{max} von 2870 fmol/ mg Protein und eine Affinität von NMS zu den Rezeptoren von pK_D = 9,3 ermittelt.

3.4.1 Einfluss von Naphmethonium auf die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung

Zunächst wurde der konzentrationsabhängige Einfluss von Naphmethonium auf die Gleichgewichtsbindung des Antagonisten [³H]NMS untersucht (Abbildung 86), um bei der Durchführung der Interaktionsexperimente zwischen [³H]NMS, Agonist und Naphmethonium (s. 3.4.2/3.4.3) die Art der Wechselwirkung zwischen dem Radioliganden [³H]NMS und dem allosterischen Modulator Naphmethonium in Abwesenheit des Agonisten zu kennen. Die Inkubationszeit zur Erreichung des Bindungsgleichgewichtes wurde nach Lazareno und Birdsall (1995; Gleichung 12) berechnet und betrug 5,5 h. Die in Anwesenheit von 1 μM Atropin bestimmte unspezifische Bindung betrug durchschnittlich 2,2%. Die Auswertung der Daten erfolgte nach dem ternären Modell allosterischer Interaktion von Ehlert (1988a; Gleichung 11), wobei das untere Plateau (B₀) jedes Einzelexperimentes auf 100% festgesetzt wurde. Es wurden die Mittelwerte der an den einzelnen Versuchstagen erhaltenen Einzelwerte für α (über die Berechnung von pα) und logK_A berechnet. Die Datenpunkte ergaben sich aus der Mittelung der jeweiligen Daten der einzelnen Versuchstage. Die Kurve beschrieb die Daten zufriedenstellend. Es ergab sich für Naphmethonium eine Affinität zum freien M₂-Rezeptor von pK_A = 8,10 ± 0,42. Die positive Kooperativität mit [³H]NMS wurde beschrieben durch pα

= $0,31 \pm 0,06$ (d. h. $\alpha = 0,49$). Diese Mittelwerte für α und $\log K_A$ wurden in Abbildung 86 benutzt, um eine Kurve festzulegen. Die Maßzahlen für die Kurve unterschieden sich nicht signifikant von den von Muth et al. (2003) erhobenen Befunden: $pK_A = 8,29 \pm 0,18$ und $p\alpha = 0,37 \pm 0,08$ (t-Test, $p > 0,05$). In den in Abbildung 86 dargestellten Experimenten wurde keine maximale Rezeptorbesetzung erreicht. Beim 100%-Wert spezifischer [^3H]NMS-Bindung (Abbildung 86) waren 30% aller Rezeptoren besetzt. Durch Naphmethonium erhöhte sich der Anteil der [^3H]NMS-besetzten Rezeptoren auf 48%. Der bindungsfördernde Effekt von Naphmethonium wurde daher nicht durch eine maximale Rezeptorbesetzung limitiert. Die Affinität von Naphmethonium zum [^3H]NMS-besetzten Rezeptor ließ sich aus pK_A und $p\alpha$ berechnen: $p(\alpha \cdot K_A) = 8,41$.

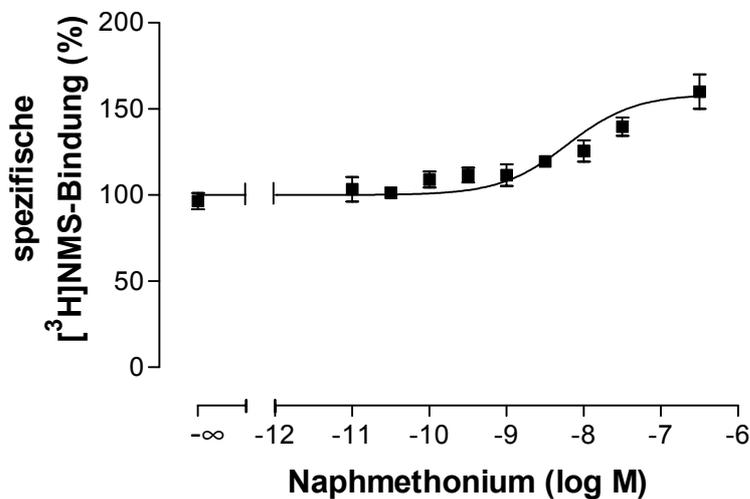


Abbildung 86: Einfluss von Naphmethonium auf die Gleichgewichtsbindung von [^3H]NMS an M_2 -Rezeptoren. Die Inkubationszeit zur Erreichung des Bindungsgleichgewichtes wurde berechnet nach Lazareno und Birdsall (1995; Gleichung 12) und betrug 5,5 h. **Ordinate:** Spezifische [^3H]NMS-Bindung in Prozent; spezifische Bindung von [^3H]NMS in Abwesenheit von Naphmethonium (B_0) = 100%. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Naphmethonium. **Kurvenanpassung:** Die Kurvenanpassung erfolgte nach dem ternären Modell allosterischer Interaktion von Ehlert (1988a; Gleichung 11). Mittelwerte von α und $\log K_A$ sind konstant gesetzt (s. Text). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 6 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

3.4.2 Inhibition der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung durch ACh in An- und Abwesenheit von Naphmethonium

Zur qualitativen Bestimmung des Effektes von Naphmethonium auf die ACh-Bindung wurden zu einer konstanten [³H]NMS-Konzentration (0,2 nM) in An- und Abwesenheit von 0,3 μ M Naphmethonium steigende Konzentrationen von ACh hinzugegeben (Abbildung 87). Die Zunahme der prozentualen [³H]NMS-Bindung in Anwesenheit von Naphmethonium war durch die bindungsfördernden Eigenschaften von Naphmethonium gegenüber [³H]NMS begründet (Muth et al., 2003; 3.4.1). Die Rechtsverschiebung der Kontrollkurve bestätigt die in [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimenten gefundene negative Kooperativität von Naphmethonium gegenüber ACh (3.3.2.2.3). Die Steigung der Kurven war signifikant verschieden von $n_H = -1$ (F-Test, $p < 0,05$). Die Kurven in Abbildung 87 (durchgehende Linie) wurden mit einem gemeinsamen Hill-Koeffizienten von $n_H = -0,69 \pm 0,03$ angepasst. Eine Anpassung, bei der das Steigungsmaß jeder Kurve freiliegend war, ergab keine signifikante Verbesserung (F-Test, $p > 0,05$). Die in Anwesenheit von 1 μ M Atropin bestimmte unspezifische Bindung betrug durchschnittlich 1,5% der [³H]NMS-Gesamtbindung und unterschied sich nicht signifikant von den unteren Plateaus der Kurven (t-Test, $p > 0,05$). Nach der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973; Gleichung 7) ließ sich aus dem Wendepunkt der Kontrollkurve ein Schätzwert für die apparente Affinität von ACh zum freien M₂-Rezeptor ermitteln mit $pK_i = 6,8$. Lazareno und Birdsall (1995) erhielten in ähnlichen Experimenten mit Strychnin als allosterischem Modulator und in Anwesenheit von 0,2 mM GTP eine Steigung von $n_H = -0,78 \pm 0,01$. Für die Affinität von ACh zum freien M₂-Rezeptor berechneten sie $pK_i = 6,17 \pm 0,03$.

Agonisten können in Abwesenheit von Guanylnukleotiden zwischen hochaffinen und niedrigaffinen Rezeptorzuständen unterscheiden (Birdsall et al., 1978; Hulme et al., 1981; Waelbroeck et al., 1982; Potter et al., 1991; Lefkowitz et al., 1993). Guanylnukleotide vermindern die hochaffine Rezeptorfraktion (Hulme et al., 1981; Waelbroeck et al., 1982) und führen zu einer Entkopplung der G-Proteine vom Rezeptor (Berrie et al., 1984; Florio und Sternweis, 1985). Die beiden Guanylnukleotide GDP und GTP vermögen die Affinität von Agonisten dabei in gleichem Maße selektiv zu verringern (Berrie et al., 1979; Rosenberger et al., 1979, 1980).

In dem Versuchsansatz dieser Arbeit wurde kein GTP zugefügt, welches Lazareno et al. (1997, 2004) in einer Konzentration von 0,2 mM einsetzten, um die hochaffine Bindung von ACh zu reduzieren, sondern GDP in einer geringeren Konzentration (0,01 mM) wie sie im [³⁵S]GTPγS-Versuch Verwendung fand. Diese Konzentration ließ möglicherweise noch eine Unterscheidung zwischen hoch- und niedrigaffiner Bindungsstelle zu. Daher wurde für die Kurven in Abbildung 87 mittels eines F-Tests überprüft, ob eine biphasische Kurvenanpassung (Gleichung 13), welche im Kurvenverlauf zwei Wendepunkte zulässt, die Kurven besser beschrieb. Dies war nicht der Fall (F-Test, $p > 0,05$). Die Kenngrößen der biphasischen Kurvenanpassung fanden sich in Tabelle 56. Wie in Abbildung 87 ersichtlich ist, unterschied sich der biphasische Kurvenverlauf (gestrichelte Linie) kaum von dem, der mithilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 6) ermittelt wurde.

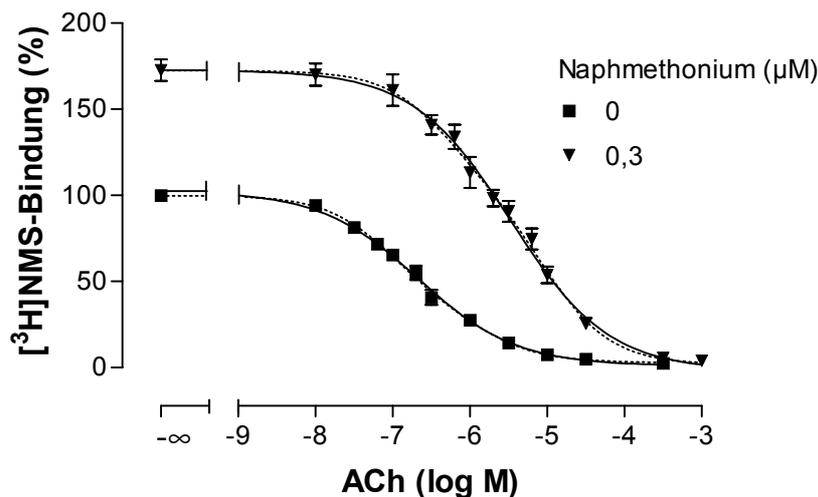


Abbildung 87: Inhibition der der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung durch ACh in An- und Abwesenheit von 0,3 µM Naphmethonium. **Ordinate:** [³H]NMS-Bindung in Prozent ohne Abzug der unspezifischen Bindung; Gesamtbindung von [³H]NMS in Abwesenheit von Naphmethonium = 100%. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** durchgehende Linie: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6), Hill-Koeffizient (gemeinsam): $n_H = -0,69 \pm 0,03$; gestrichelte Linie: biphasische Kurvenanpassung (Gleichung 13). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die in Anwesenheit von 1 µM Atropin bestimmte unspezifische Bindung betrug durchschnittlich 1,5% der [³H]NMS-Gesamtbindung.

Ergebnisse

	pEC ₅₀	Max (%)	Min (%)	n _H (freilaufend)	n
Kontrolle	6,67 ± 0,03	103 ± 1	1 ± 1	-0,76 ± 0,03	4
Naphmethonium (0,3 µM)	5,47 ± 0,04**	173 ± 2**	-2 ± 3	-0,66 ± 0,05	4

Tabelle 55: Kenngrößen (± Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der Kurven (durchgehende Linien) aus Abbildung 87. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6). Die Kenngrößen pEC₅₀, Max und Min beziehen sich auf die Kurvenanpassung mit einer gemeinsamen Hill-Steigung von n_H = -0,69, da die Kurvenanpassung mit freilaufendem Steigungsmaß keine signifikante Verbesserung ergab (F-Test, p > 0,05).

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die die [³H]NMS-Gesamtbindung halbmaximal reduziert.

Max: [³H]NMS-Gesamtbindung (oberes Plateau der Kurve).

Min: maximal durch ACh reduzierte [³H]NMS-Bindung (unteres Plateau der Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, p < 0,01).

	pEC _{50_1}	pEC _{50_2}	Max (%)	Min (%)	Fraktion 1	n
Kontrolle	7,02 ± 0,13	5,86 ± 0,28	100 ± 2	3 ± 2	0,67 ± 0,12	4
Naphmethonium (0,3 µM)	6,31 ± 0,18*	5,01 ± 0,13*	172 ± 2**	2 ± 3	0,40 ± 0,08	4

Tabelle 56: Kenngrößen (± Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der Kurven (gestrichelte Linien) aus Abbildung 87. Kurvenanpassung: biphasisches Modell (Gleichung 13).

pEC_{50_1}: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die die Bindung des Radioliganden an der hochaffinen Rezeptorfraktion um 50% reduziert (1. Wendepunkt).

pEC_{50_2}: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die die Bindung des Radioliganden an der niedrigaffinen Rezeptorfraktion um 50% reduziert (2. Wendepunkt)

Max: [³H]NMS-Gesamtbindung in Abwesenheit von ACh (oberes Plateau der Kurve).

Min: [³H]NMS-Gesamtbindung in Anwesenheit hoher ACh-Konzentrationen (unteres Plateau der Kurve).

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, p < 0,05/0,01).

Da die Kurven in Abbildung 87 mit der gleichen Steigung angepasst werden konnten, wurde anhand einer Auswertung nach Arunlakshana und Schild (1959) die Affinität zum freien M₂-Rezeptor abgeschätzt. Es ist zu beachten, dass die

oberen Plateaus der Kurven signifikant verschieden waren (t-Test, $p < 0,01$). Außerdem war der pK_A -Wert, der durch die Bestimmung einer Geraden ($s = 1$) durch nur einen Datenpunkt ermittelt wurde, als approximativ anzusehen. Der Einfluss von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ auf die Verschiebung des Wendepunktes wurde nicht berücksichtigt. In den $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimenten begann die Schild-Kurve erst bei Naphmethonium-Konzentrationen von ca. $10 \mu\text{M}$ abzuflachen (3.3.2.2.3). Daher wurde angenommen, dass sich der in den $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindungsexperimenten bei $0,3 \mu\text{M}$ Naphmethonium bestimmte Wert noch im linearen Bereich der Schild-Geraden befand. Aus dem Schnittpunkt mit der Abszisse ergab sich ein pK_A -Wert von 7,7. Dieser stimmte gut mit den Werten aus den $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsversuchen mit Naphmethonium ($pK_A = 8,10 \pm 0,42$; 3.4.1) und den $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperimenten mit ACh ($pK_A = 7,66 \pm 0,13$; 3.3.2.2.3) überein.

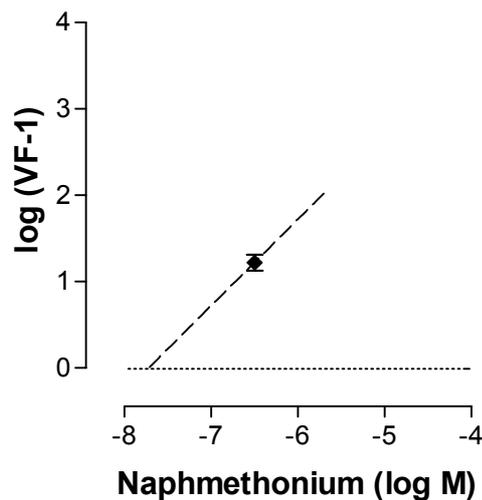


Abbildung 88: Schild-Auftragung der Naphmethonium-induzierten Rechtsverschiebung der Kurven aus Abbildung 87. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Naphmethonium. **Kurvenanpassung:** Gleichung 15 (Arunlakshana und Schild, 1959). Es wurde eine Gerade mit einer Steigung von $s = 1$ durch den Punkt gelegt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

3.4.3 Inhibition der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung durch Pilocarpin in An- und Abwesenheit von Naphmethonium

Klemt (2005) beobachtete in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten, dass Naphmethonium die Affinität von Pilocarpin zum M₂-Rezeptor erhöhte, jedoch die intrinsische Aktivität bis auf maximal 0% senkte.

Es wurden [³H]NMS-Bindungsexperimente durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die positive Kooperativität zwischen Pilocarpin und Naphmethonium dort bestätigen ließ. Dafür wurden eine Kontrollkurve und eine Kurve in Anwesenheit von 0,3 μM Naphmethonium aufgenommen (Abbildung 89). Zu einer konstanten [³H]NMS-Konzentration (0,2 nM) wurden jeweils steigende Pilocarpin-Konzentrationen hinzugegeben. Die Steigung der Kurven war nicht signifikant verschieden von $n_H = -1$ (F-Test, $p > 0,05$). Die in Anwesenheit von 1 μM Atropin bestimmte unspezifische Bindung betrug durchschnittlich 1,9% der [³H]NMS-Gesamtbindung und unterschied sich nicht signifikant von den unteren Plateaus der Kurven (t-Test, $p > 0,05$). Für Pilocarpin wurde anhand der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973; Gleichung 7) die apparente Affinität zum unbesetzten M₂-Rezeptor berechnet mit $pK_i = 5,9$. Neben der Steigerung der [³H]NMS-Bindung (bedingt durch die positive Kooperativität zwischen [³H]NMS und Naphmethonium) war eine signifikante Verschiebung der Pilocarpin-Kontrollkurve nach links erkennbar (t-Test, $p < 0,01$), welche die Ergebnisse aus den funktionellen Versuchen bestätigte.

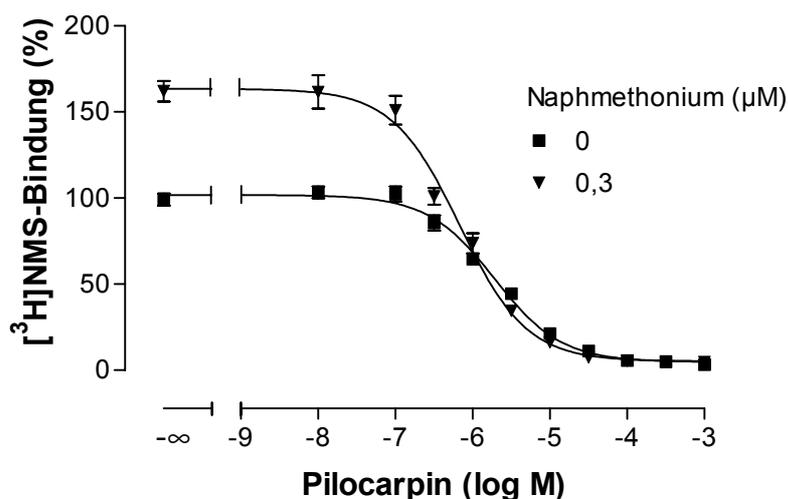


Abbildung 89: Inhibition der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung durch Pilocarpin in An- und Abwesenheit von 0,3 μM Naphmethonium. **Ordinate:** [³H]NMS-Bindung in Prozent ohne Abzug der unspezifischen Bindung; Gesamtbindung von [³H]NMS in Abwesenheit von Naphmethonium = 100%. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Pilocarpin. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: n_H = -1. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Die in Anwesenheit von 1 μM Atropin bestimmte unspezifische Bindung betrug durchschnittlich 1,9% der [³H]NMS-Gesamtbindung.

	pEC ₅₀	Max (%)	Min (%)	n _H (freilaufend)	n
Kontrolle	5,72 ± 0,05	102 ± 2	5 ± 2	-0,92 ± 0,10	4
Naphmethonium (0,3 μM)	6,17 ± 0,05**	163 ± 3**	5 ± 3	-0,96 ± 0,10	4

Tabelle 57: Kenngrößen (± Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der Kurven aus Abbildung 89.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der Pilocarpin-Konzentration, die die [³H]NMS-Gesamtbindung halbmaximal reduziert.

Max: [³H]NMS-Gesamtbindung (oberes Plateau der Kurve).

Min: maximal durch Pilocarpin reduzierte [³H]NMS-Bindung (unteres Plateau der Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, p < 0,01).

4 Diskussion

4.1 Einfluss allosterischer Modulatoren auf die M₂-Rezeptor-vermittelte G-Protein-Aktivierung

In dieser Arbeit wurde der Einfluss strukturell unterschiedlicher allosterischer Modulatoren auf die Acetylcholin(ACh)-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung untersucht. Bis auf einige Ausnahmen übten die getesteten Allosteren keinen konzentrations-abhängigen Einfluss auf das Maximum der ACh-Wirkung aus, auch dann nicht, wenn klare Hinweise auf die Bildung ternärer Komplexe vorlagen. Für Pilocarpin war hingegen zuvor gezeigt worden, dass die in dieser Arbeit getesteten allosterischen Modulatoren die Pilocarpin-stimulierte [³⁵S]GTPγS-Bindung um mindestens 50% des Maximums unter Kontrollbedingungen senkten (Zahn et al., 2002; Klemm, 2005), d. h., dass allosterische Modulatoren in der Lage sind, den Agonismus Pilocarpins in einen Antagonismus umzuwandeln. De Lean et al. (1980) sowie Kent et al. (1980) berichteten, dass Partialagonisten nicht nur aktive, sondern auch inaktive Rezeptorkonformationen stabilisieren. Dies bietet einen Ansatz, die allosterische Modulation am Partialagonist-besetzten Rezeptor zu verstehen. Betrachtet man dieses Verhalten unter dem Aspekt der „conformational selection“ (Spalding et al., 1998; Christopoulos und Kenakin, 2002) lässt sich die Aufhebung der intrinsischen Aktivität folgendermaßen erklären: Die prototypischen allosterischen Liganden wie z. B. Alcuronium und Gallamin besitzen eine hohe Affinität zu inaktiven Rezeptorkonformationen, was sich in einer höheren Affinität zu Antagonist- als zu Agonist- besetzten Rezeptoren zeigt (Zahn et al., 2002). Dadurch wird bei der Bildung ternärer Komplexe aus Pilocarpin, Rezeptor und Alloster der Anteil inaktiver Konformationen, die keine G-Protein-Aktivierung vermitteln können, erhöht, so dass eine Verminderung des Pilocarpin-induzierten Effektmaximums resultiert.

In Abwesenheit von Agonisten liegen die Rezeptoren hauptsächlich in inaktiven Konformationen vor. Es existieren jedoch auch spontan aktive Rezeptoren, die eine basale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorrufen (Costa et al., 1992; Milligan et al., 1995; Tuček, 1997; Kenakin, 1997a). Da die allosterischen Modulatoren inaktive Rezeptoren bevorzugen, wäre zu erwarten, dass die Modulatoren die spontane [³⁵S]GTPγS-Bindung reduzieren. Deshalb wird hier zunächst dieser Aspekt, der sich auf die Beeinflussung des unteren Plateaus der Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurven durch Allosterie bezieht, näher betrachtet (4.1.1). Der Effekt der allosterischen Modulatoren auf die Agonist-induzierte G-Protein-Aktivierung wird sodann unter besonderer Berücksichtigung der Frage betrachtet, ob die durch Allosterie hervorgerufene Absenkung der intrinsischen Aktivität (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven) eine Eigenschaft der Substanz Pilocarpin, der Gruppe der Partialagonisten im Allgemeinen oder nur von bestimmten Agonisten ist (4.1.2). Schließlich wird die Affinität der Allosterie zu freien und zu unterschiedlich (Agonist-, Partialagonist- oder Antagonist-) besetzten Rezeptoren miteinander verglichen (4.1.3/4.1.4).

4.1.1 Allosterische Modulation der basalen Rezeptoraktivität

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren können spontan einen aktiven Zustand annehmen, wodurch es auch in Abwesenheit von Agonisten zu einer G-Protein-Aktivierung kommen kann (Costa et al., 1992; Milligan et al., 1995; Tuček, 1997; Kenakin, 1997a). Bei einer Überexpression von Rezeptoren ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten konstitutiv aktiver Rezeptoren erhöht (Milligan et al., 1995). Die basale Aktivität kann durch inverse Agonisten herabgesetzt werden, welche die Rezeptoren in einer inaktiven Konformation stabilisieren (Kenakin, 2002). Bei kompetitiven muskarinischen Antagonisten wie z. B. Atropin ließ sich inverser Agonismus beobachten (Hilf und Jakobs, 1992; Jakubík et al., 1995; Akam et al., 1996). Auch für allosterische Modulatoren an muskarinischen Rezeptoren wie W84, Gallamin, Alcuronium und Strychnin konnte ein solches Verhalten gezeigt werden (Hilf und Jakobs, 1992; Lazareno et al., 1995; Birdsall et al., 1999; Zahn et al., 2002). Jakubík et al. (1996) beobachteten überraschenderweise in Experimenten mit CHO-Zellen, die mit jeweils einem Subtyp muskarinischer Rezeptoren (M₁-M₄) stabil transfiziert waren, eine agonistische Wirkung von Alcuronium, Gallamin und Strychnin auf die Synthese

von cAMP bzw. Inositolphosphat. Ein analoger Befund wurde von anderen Gruppen bisher nicht mitgeteilt. In künstlichen Membranen aus Liposomen, die den M₂-Rezeptor enthielten, stellten Jakubík et al. (1998) fest, dass je nach Rezeptor-G-Protein-Verhältnis durch Alcuronium eine Stimulation oder Reduktion der [³⁵S]GTPγS-Bindung möglich war. Die stimulierende Wirkung auf die basale Bindung trat nur bei geringer Rezeptorexpression und bei bestimmten Rezeptor-G-Protein-Verhältnissen auf. Der Befund, dass allosterische Antagonisten die basale Bindung in Abwesenheit von Agonisten erhöhen können, ist derzeit nicht auf der Basis des ternären Modells allosterischer Interaktionen erklärbar (Birdsall und Lazareno, 2005). Von zwei agonistisch wirksamen Substanzen, AC-42 (4-*n*-Butyl-1-[4-(2-methylphenyl)-4-oxo-1-butyl]-piperidin-Hydrogenchlorid; Spalding et al., 2002) und *N*-Desmethylozapin (Sur et al., 2003), wird vermutet, dass sie an einer anderen, „ektopischen“ Bindungsstelle am Rezeptor angreifen als ACh und andere orthosterische Liganden. AC-42 weist eine funktionelle, *N*-Desmethylozapin eine Bindungs-Selektivität für den M₁-Rezeptor auf. Für AC-42 konnte das allosterische Verhalten kürzlich durch weitere Experimente bestätigt werden (Langmead et al., 2005). Es verzögerte die Dissoziation von [³H]NMS und die Interaktion von AC-42 mit Atropin ergab eine gekrümmte Kurve in der Schild-Auftragung, was auf negative Kooperativität hinweist. Die agonistische Aktivität wurde sowohl bei AC-42 als auch bei *N*-Desmethylozapin nicht durch eine Mutation von M₁³¹⁸-Tyrosin vermindert (Spalding et al., 2002), bei *N*-Desmethylozapin wurde sie sogar erhöht (Sur et al., 2003). M₁³¹⁸-Tyrosin wird als wichtiges Epitop für die Bindung und die agonistische Wirkung von ACh angesehen (Spalding et al., 1998; Ward et al., 1999; Lu et al., 2001). Die beiden Agonisten binden offensichtlich nicht an die gleichen Epitope wie ACh. Ob sie an eine der schon beschriebenen allosterischen Bindungsstellen, d. h. an die „common allosteric site“ (Ellis und Seidenberg, 1992; Matsui et al., 1995; Tränkle und Mohr, 1997) oder die von Lazareno et al. (2000, 2002) beschriebene „zweite allosterische Bindungsstelle“ binden, ist noch nicht geklärt.

In dieser Arbeit riefen alle untersuchten allosterischen Modulatoren tendenziell eine Senkung der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung hervor. Die einzige in dieser Arbeit eingesetzte Testsubstanz, die die Affinität von ACh zum M₄(!)-Rezeptor erhöhte (Thiochrom), übte keinen Einfluss auf die spontane [³⁵S]GTPγS-Bindung

aus und bestätigt damit die theoretische Vorstellung, dass Substanzen, die die Wirkung eines Agonisten verstärken, keinen negativen Einfluss auf die Basalaktivität haben sollten, weil sie bevorzugt aktive Rezeptorkonformationen stabilisieren. Eher wäre eine Steigerung der Basalaktivität zu erwarten. Signifikant war die Verminderung der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung in dieser Arbeit bei W84, Str6Naph, Eburnamonin und EHW 141. Das Ausmaß der Reduktion der spontanen Bindung lag bei 10-20%. Der Antagonist Atropin verminderte die Basalaktivität um 25%. Diese Befunde sind in guter Übereinstimmung mit denen von Hilf und Jakobs (1992). Sie beschrieben an Membranen aus Schweineherzen eine Senkung der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung durch Atropin um 20% und durch W84 um 25%. Lazareno et al. (1993) fanden in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten für verschiedene muskarinische Antagonisten und Allosterie (u. a. Gallamin) eine nicht-signifikante Verringerung der Basalaktivität um 5-10%. Eine Reduktion der spontanen [³⁵S]GTPγS-Bindung in dieser Größenordnung wurde auch für die meisten Testsubstanzen in dieser Arbeit beobachtet. Für Strychnin stellten Lazareno und Birdsall (1995) eine ca. 25%-ige Verminderung der Basalaktivität fest. Zahn et al. (2002) beobachteten in Anwesenheit von Alcuronium oder Atropin jeweils eine Senkung der basalen Bindung um ca. 35%. Es lässt sich zusammenfassen, dass es außer den Befunden von Jakubík et al. (1996, 1998) keine Hinweise darauf gibt, dass die in dieser Arbeit eingesetzten allosterischen Modulatoren in Abwesenheit von Agonisten aktive Konformationen des Rezeptors zu stabilisieren bzw. induzieren vermögen und selbst agonistische Aktivität entfalten könnten, sondern im Gegenteil - wie erwartet - dazu neigen, die spontane Aktivität der Rezeptoren zu reduzieren.

Im Gegensatz zu den Befunden von Zahn et al. (2002; Senkung der basalen Bindung um ca. 35%) rief Alcuronium bei Klemt (2005) und in dieser Arbeit keine signifikante Verminderung der basalen Rezeptoraktivität hervor. Hingegen konnten Zahn et al. (2002) keinen Unterschied zwischen der maximal induzierbaren [³⁵S]GTPγS-Bindung des Partialagonisten Pilocarpin und des Vollagonisten Oxotremorin M beobachten. Der Maximaleffekt lag für beide Agonisten bei ca. 170% der basalen Bindung (basale Bindung = 100%). In der vorliegenden Arbeit erhöhte Oxotremorin M die [³⁵S]GTPγS-Bindung auf 250% und Pilocarpin steigerte sie auf 200% (basale Bindung = 100%). Dies spricht dafür, dass bei Zahn et al.

(2002) die spontane [³⁵S]GTPγS-Bindung stärker ausgeprägt war. Unter dieser Bedingung ließe sich durch inverse Agonisten eine deutlichere Senkung der [³⁵S]GTPγS-Bindung erkennen, die Fähigkeit der Agonisten, die [³⁵S]GTPγS-Bindung noch weiter zu steigern, wäre jedoch geringer. Interessanterweise gab es aber keinen offensichtlichen Zusammenhang zwischen B_{\max} (maximale Anzahl spezifischer Bindungsstellen für NMS) und dem Ausmaß spontaner [³⁵S]GTPγS-Bindung. Der Gehalt an Rezeptoren in den CHO-M₂-Zellhomogenaten betrug bei Zahn et al. (2002), die eine hohe Basalaktivität beobachteten, 2,5 pmol/mg Protein. Klemt (2005) fand $B_{\max} = 2,7$ pmol/mg Protein. In der vorliegenden Arbeit war $B_{\max} = 5,1$ pmol/mg Protein. Wenn ein Zusammenhang bestehen würde, müssten die B_{\max} -Werte von Klemt (2005) und aus dieser Arbeit übereinstimmen, aber unterschiedlich gegenüber dem Wert von Zahn et al. (2002) sein.

Als weitere mögliche Ursache für die unterschiedlich ausgeprägte Basalaktivität müssen die Versuchsbedingungen in Betracht gezogen werden. Zelltyp, transfizierter Rezeptor, Puffer und Inkubationszeit waren identisch und können als Ursache ausgeschlossen werden. Abweichend zu der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Filtration mittels eines Harvesters für Mikrotiterplatten verwendeten Zahn et al. (2002) keine automatisierte Abfiltrationsmethode und arbeiteten mit größeren Ansatzvolumina. Welchen Einfluss diese Abweichungen auf die G-Protein-Aktivierung haben, ist nicht bekannt. Ein weiterer variabler Faktor ist das in der Zellkultur eingesetzte fetale Rinderserum, bei dem die Zusammensetzung an Substanzen, die möglicherweise das Wachstum und den Expressionsgrad der Zelle beeinflussen, nicht genau bekannt ist. Milligan (2003) führt als möglichen Auslöser für ein unterschiedliches Ausmaß an konstitutiver Aktivität Wechselwirkungen zwischen Rezeptor bzw. G-Protein und zellulären Proteinen an. Die Expression solcher Proteine könnte z. B. bei Zahn et al. (2002) anders gewesen sein als in dieser Arbeit.

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit war es von Vorteil, dass der Agonist-Effekt deutlich ausgeprägter war als der Effekt inverser Agonisten. Denn aufgrund des größeren Messfensters war es besser möglich, den Einfluss allosterischer Modulatoren auf den Agonist-induzierten Maximaleffekt zu untersuchen.

4.1.2 Intrinsische Aktivität von Agonisten

4.1.2.1 Divergente allosterische Modulation der intrinsischen Aktivität von ACh und Pilocarpin

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten allosterischen Modulatoren riefen im Konzentrationsbereich, in dem es zur Bildung ternärer Komplexe kam, keine konzentrationsabhängige Verminderung der intrinsischen Aktivität von ACh hervor. Ausnahmen waren Gallamin, Strychnin, TD2 und WGA. Gallamin und TD2 verminderten die ACh-induzierte G-Protein-Aktivierung maximal um ca. 40%, Strychnin um 25% und WGA um 15%. Eine Bildung ternärer Komplexe, die die Verminderung der intrinsischen Aktivität von ACh erklären würde, ließ sich jedoch in der Schild-Auftragung nur für Gallamin feststellen. Denkbar wäre z. B., dass diese Allosteren von der Innenseite des Rezeptors her die Interaktion von Rezeptor und G-Protein beeinträchtigen. Eine Senkung der intrinsischen Aktivität von ACh durch das dreifach positiv geladene Gallamin erfolgte erst ab Konzentrationen von 3 mM Gallamin. In diesem Konzentrationsbereich liegen z. B. auch die Magnesium-Ionen im Versuchsansatz vor, welche zur Einstellung eines optimalen Messfensters eingesetzt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass die Erhöhung der Ionenstärke das Ausmaß der G-Protein-Aktivierung beeinflusst. Daher gibt es keinen eindeutigen Hinweis, dass die intrinsische Aktivität von ACh über einen allosterischen Mechanismus vermindert werden kann.

Klemt (2005) betrachtete die Interaktion der meisten der in dieser Arbeit eingesetzten allosterischen Modulatoren mit dem Partialagonisten Pilocarpin. Wie schon von Zahn et al. (2002) für Alcuronium beschrieben, riefen alle untersuchten Testsubstanzen eine deutliche Absenkung des Pilocarpin-Maximaleffektes hervor. Die Hälfte der Allosteren hob den Pilocarpin-Effekt in hohen Konzentrationen vollständig auf. Die übrigen Substanzen verursachten in sättigenden Konzentrationen eine Herabsetzung der maximalen Pilocarpin-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung um mindestens 50%. Die Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin, die in allen Fällen mit der Bildung ternärer Komplexe verbunden war, ist demnach von der Art des Allostere abhängig. Aus der unterschiedlichen Beeinflussbarkeit der intrinsischen Aktivität von ACh und Pilocarpin lässt sich ebenfalls eine Abhängigkeit von der Art des Agonisten ableiten.

4.1.2.2 Divergente allosterische Modulation der intrinsischen Aktivität verschiedener Voll- und Partialagonisten

Es stellte sich die Frage, ob die allosterische Senkung der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin Folge seines partialagonistischen Charakters oder eine Pilocarpin-spezifische Besonderheit ist. Daher wurde der Einfluss allosterischer Modulatoren auf die intrinsische Aktivität weiterer Voll- und Partialagonisten untersucht. Eingesetzt wurden die Allosteren W84 und Alcuronium und das W84-Derivat Naphmethonium, welches die Affinität von Pilocarpin zum M_2 -Rezeptor erhöht (Klemt, 2005), sowie die Vollagonisten Carbachol, Oxotremorin und Oxotremorin M und McN-A-343 als ein weiterer Partialagonist. In Abbildung 90 ist jeweils der Maximaleffekt (E_{max}) verschiedener Agonisten in Anwesenheit einer Alloster-Konzentration aufgetragen, bei der es zur Bildung ternärer Komplexe kommt. 100% E_{max} beziehen sich auf den jeweils maximalen Effekt eines Agonisten in Abwesenheit von Alloster, d. h., dass ohne Zugabe von Alloster alle Säulen 100% ausmachen würden. Die E_{max} -Werte sind die %-Werte der oberen Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven aus 3.3.3. Die Konzentrations-Effekt-Kurven wurden jeweils durch Datenpunkte bis ins obere Plateau beschrieben. In Abbildung 90 ist zusätzlich der prozentuale Anteil an Rezeptoren dargestellt, der in Anwesenheit der jeweiligen Agonist- und Alloster-Konzentration in Form von ternären Komplexen vorlag. Der Anteil ternärer Komplexe ließ sich unter Berücksichtigung der Alloster- und der Agonist-Konzentration sowie der Affinität der beiden Liganden zum freien Rezeptor und dem Kooperativitätsfaktor abschätzend berechnen (siehe 2.4.5). Der Einfluss auf die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve wurde in dieser Arbeit nur mit dem Alloster W84 untersucht. Die Werte für Alcuronium und Naphmethonium (Abbildung 90B und C) stammen von Klemt (2005). Klemt (2005) setzte maximal jeweils nur ein Drittel der in dieser Arbeit verwendeten Alloster-Konzentration ein, konnte jedoch zeigen, dass diese Alloster-Konzentrationen bereits einen sättigenden Effekt auf die Senkung der Pilocarpin-induzierten [35 S]GTP γ S-Bindung ausübten. Die Daten von Klemt (2005) können daher zu einem qualitativen Vergleich des Einflusses der Allosteren auf verschiedene Agonisten herangezogen werden.

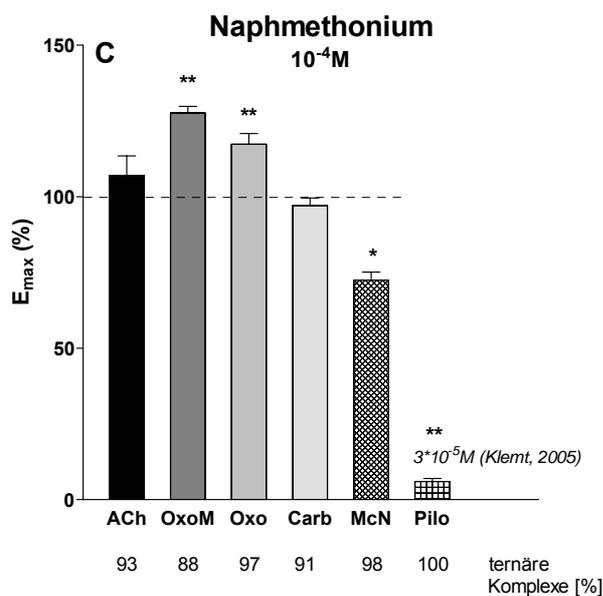
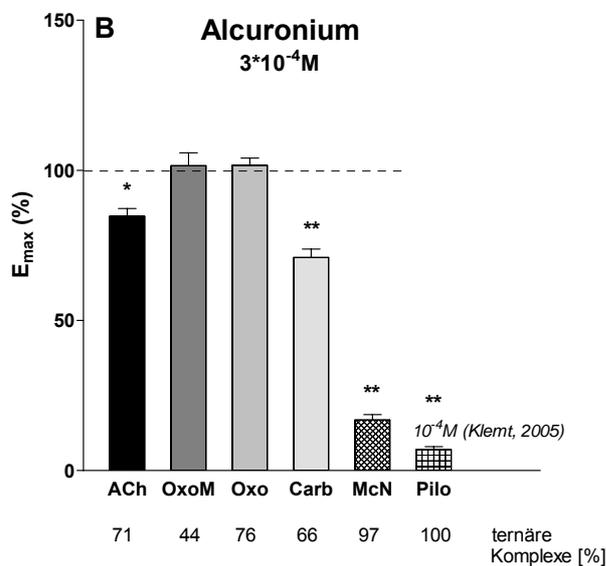
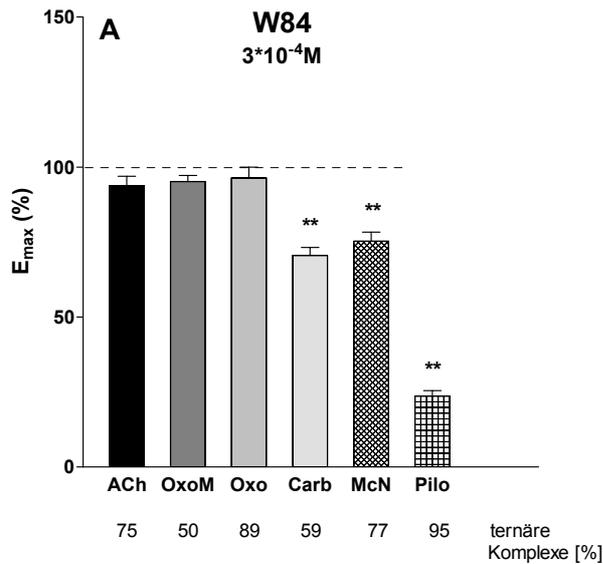


Abbildung 90: Einfluss allosterischer Modulatoren (A: 300 μM W84, B: 300 μM Alcuronium, C: 100 μM Naphmethonium) auf die maximale Agonist-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung. **Ordinate:** E_{max} (maximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung) in Prozent der maximalen Agonist-induzierten [^{35}S]GTP γ S-Bindung in Abwesenheit von Alloster = 100%. **Abszisse:** Agonisten. Dargestellt sind die Max-Werte der Konzentrations-Effekt-Kurven aus 3.3.3 als Mittelwerte \pm Standardfehler (n = 3-5 in Vierfachbestimmung). Unterhalb der Abszisse ist der geschätzte prozentuale Anteil ternärer Komplexe an den gesamt vorhandenen Agonist-Rezeptor-Komplexen in Anwesenheit des Allostere für die jeweilige Agonist-Konzentration aufgetragen (Berechnung: siehe 2.4.5). */** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (t-Test, p < 0,05/0,01). OxoM: Oxotermorin M, Oxo: Oxotremorin, Carb: Carbachol, McN: McN-A-343, Pilo: Pilocarpin.

Die vergleichende Betrachtung (Abbildung 90) zeigt, dass allosterische Modulatoren den Maximizeffekt von Pilocarpin am stärksten zu senken vermochten. Alle drei ausgewählten Allosterie verminderten ebenfalls den Effekt von McN-A-343. Jedoch nur Alcuronium rief eine Reduktion des Maximizeffektes in einem ähnlichen Ausmaß wie bei Pilocarpin hervor. W84 und Naphmethonium verminderten die maximale durch McN-A-343-induzierbare [³⁵S]GTPγS-Bindung auf ca. 70%. Auch für Carbachol konnte eine Verminderung des Maximizeffektes beobachtet werden, jedoch nur für zwei der eingesetzten Modulatoren. Naphmethonium beeinflusste die Wirkung des Vollagonisten Carbachol nicht. Die Maximizeffekte der anderen Vollagonisten werden durch W84 und Alcuronium im Wesentlichen nicht verändert. Die Senkung der ACh-Wirkung durch Alcuronium ist zwar signifikant (t-Test, $p < 0,05$), tritt jedoch bei der nächst höheren Alcuronium-Konzentration nicht mehr auf (3.3.2.4.1) und kann daher als zufällig betrachtet werden.

Eine Auffälligkeit gab es bei der Wirkung des allosterischen Modulators Naphmethonium auf Oxotremorin und Oxotremorin M. Naphmethonium rief bei diesen Vollagonisten eine signifikante Erhöhung des maximalen Effektes hervor (t-Test, $p < 0,05$). In 3.3.3.4.2 konnte gezeigt werden, dass es sich dabei um einen konzentrationsabhängigen Einfluss des Allostere handelt. Dennoch muss bedacht werden, dass eine Veränderung der maximal durch einen Agonisten induzierbaren [³⁵S]GTPγS-Bindung z. B. auch methodische Ursachen haben könnte. Denn wie unter 2.4.1 beschrieben, folgen die basale und die Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung möglicherweise unterschiedlichen Assoziationskinetiken. Wenn der allosterische Modulator die Bindung von [³⁵S]GTPγS an G-Proteine unbesetzter Rezeptoren verlangsamen oder die an G-Proteine Agonist-besetzter Rezeptoren beschleunigen würde, käme es zu dem beobachteten Effekt. Falls weitere Versuche zeigen würden, dass Naphmethonium keinen Einfluss auf die Assoziationskinetik der [³⁵S]GTPγS-Bindung hat, kämen zwei weitere Erklärungsmöglichkeiten für den beobachteten Effekt in Betracht. Zum einen könnte Naphmethonium – im Gegensatz zu seinem Verhalten mit Pilocarpin – die aktiven, Oxotremorin- bzw. Oxotremorin M-besetzten Rezeptoren stabilisieren und durch Verschiebung des Gleichgewichtes der Rezeptorkonformationen in diese Richtung die maximale intrinsische Aktivität erhöhen. Zum anderen könnte Naphmethonium die katalytische Fähigkeit des Rezeptors erhöhen, d. h. den Rezeptor in die Lage

versetzen, mit mehr G α -Untereinheiten pro Zeiteinheit zu interagieren. Denkbar wäre dann noch die Möglichkeit, dass Naphmethonium in hoher Konzentration eine Saponin-artige Wirkung besitzt und die Anzahl der aktivierbaren G-Proteine durch Beseitigung von Permeabilitäts- oder sonstigen Zugangs-Barrieren erhöht (s. 3.2.1). Dies ist jedoch ein unspezifischer Effekt, der eine Steigerung des Maximaleffektes bei allen Agonisten hervorrufen müsste. Da es auch unwahrscheinlich scheint, dass Naphmethonium beim Pilocarpin-besetzten Rezeptor inaktive und bei den Oxotremorin- bzw. und Oxotremorin M-besetzten Rezeptoren aktive Rezeptorkonformationen bevorzugt, bleibt eine Erklärung für dieses Phänomen noch aus.

Um zu überprüfen, ob es einen Zusammenhang mit dem Ausmaß der Veränderung des Agonist-induzierten Effektes gibt, wurde der Anteil an Rezeptoren berechnet, der in Form ternärer Komplexe aus Rezeptor, Agonist und Alloster vorlag (s. 2.4.5). Dabei zeigte sich, dass es offenbar keine Korrelation gibt. Bei Pilocarpin, dessen intrinsische Aktivität am stärksten beeinflussbar war, lagen zwar – wie es ein solcher Zusammenhang erwarten lassen würde – bei sättigenden Alloster-Konzentrationen nahezu alle Rezeptoren in Form ternärer Komplexe vor. Bei McN-A-343 z. B. führte ein ca. 97%-iger Anteil ternärer Komplexe mit dem allosterischen Modulator Alcuronium zu einer Senkung des Maximaleffektes auf ca. 20%, der gleiche Anteil ternärer Komplexe mit Naphmethonium jedoch nur auf ca. 70%. Außerdem gab es unter Naphmethonium bei 90% ternärer Komplexe an Carbachol-besetzten M₂-Rezeptoren keine Veränderung, wohingegen ein Anteil von nur 60% ternärer Komplexe unter W84 zu einer Reduktion der Carbachol-induzierten G-Protein-Aktivierung auf 70% führte. Man kann also das überwiegend inerte Verhalten Vollagonist-besetzter Rezeptoren gegenüber einer Modulation der intrinsischen Aktivität nicht darauf zurückführen, dass es nicht zur Bildung ternärer Komplexe kommt. Auch bei der Betrachtung eines bestimmten Agonisten korreliert der Anteil ternärer Komplexe unter verschiedenen Allostereen nicht mit der Senkbarkeit der maximalen G-Protein-Kopplung.

Die Versuche mit den weiteren Agonisten zeigen demnach, dass nicht nur die intrinsische Aktivität des Partialagonisten Pilocarpin, sondern auch die weiterer

Agonisten durch allosterische Modulatoren zu beeinflussen war. Es zeichnete sich jedoch ab, dass das Phänomen der Senkbarkeit der intrinsischen Aktivität bei Partialagonisten wesentlich stärker ausgeprägt war als bei Vollagonisten. Für die untersuchten Agonisten ergab sich für die Sensitivität gegenüber einer Modulation der maximalen G-Protein-Aktivierung folgende Reihenfolge: Pilocarpin > McN-A-343 > Carbachol >> ACh, Oxotremorin M, Oxotremorin. Es lassen sich keine allgemeinen Regeln aufstellen, bei der Kombination welcher Agonisten mit welchen Allosteren es zu einer Veränderung des Maximaleffektes kommt.

4.1.3 Übereinstimmungen und Besonderheiten der Affinitäten allosterischer Modulatoren zum freien M₂-Rezeptor bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen

Zur Charakterisierung der Interaktion allosterischer Modulatoren mit muskarinischen M₂-Rezeptoren wurde sowohl die Affinität der Allosteren zu freien Rezeptoren als auch zu Orthoster-besetzten Rezeptoren bestimmt. Die in dieser Arbeit durchgeführten [³H]NMS-Bindungsexperimente konnten die in den funktionellen Experimenten durch Allosteren hervorgerufenen Affinitätsveränderungen bestätigen, d. h., dass eine Ableitung von Affinitäten aus den [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten möglich war. Als orthosterische Liganden zur Ermittlung der Affinität der Allosteren in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten dienten in dieser Arbeit die Agonisten ACh und Oxotremorin M. In Tabelle 58 werden die mit ACh bzw. Oxotremorin M ermittelten pK_A-Werte den Daten von Klemt (2005), die mit Pilocarpin bestimmt worden waren, und denen, die aus Radioligandbindungsstudien mit [³H]NMS hervorgehen, gegenübergestellt. Die von Klemt (2005) erhobenen Daten wichen bis auf wenige Ausnahmen (Naphmethonium, MM7a, Duo3) nicht signifikant von den Werten dieser Arbeit ab. Die pK_A-Werte von Naphmethonium und MM7a wurden von Klemt (2005) aufgrund der positiven bzw. neutralen Kooperativität nicht mittels einer Schild-Auftragung, sondern auf der Basis der Gleichung $p(\alpha \cdot K_A) = pIC_{50}$ berechnet. pIC₅₀ gibt genau wie p(α·K_A) die Affinität des Allostere zum Agonist-besetzten Rezeptor an und wurde ermittelt aus Versuchen, in denen zu einer maximalen Agonist-Konzentration steigende Konzentrationen Alloster hinzugegeben wurden, welche zu einer Senkung der intrinsischen Aktivität führten. Die Experimente dieser Arbeit sowie die von Klemt

(2005) und die meisten der [^3H]NMS-Bindungsstudien wurden in relativ „physiologischen“ Puffern durchgeführt, die divalente Kationen enthielten. Schröter et al. (2000), die die Effekte von allosterischen Modulatoren sowohl unter „physiologischen“ als auch unter „nicht-physiologischen“ Pufferbedingungen untersucht haben, stellten eine Pufferabhängigkeit der Affinität der Allosterie zum freien Rezeptor (pK_A) fest. Dies ist, abgesehen von anderen Variablen, in der Versuchsdurchführung eine Erklärung für die Abweichung der mit [^3H]NMS ermittelten Affinitäten von den pK_A -Werten dieser Arbeit. Beachtenswert ist jedoch, dass die allosterischen Modulatoren Duo3, EHW141, Str6Naph und TD2 unter den Bedingungen der [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperimente eine wesentlich höhere Affinität zum freien M_2 -Rezeptor zeigen als in [^3H]NMS-Bindungsstudien. Die [^3H]NMS-Bindungsexperimente für diese Allosterie wurden hauptsächlich an Schweineherz-Homogenaten in einem Mg, P_i , Tris-Puffer (pH 7,3) bei 37°C durchgeführt. Dies ist ein interessanter Befund, da normalerweise eine Erhöhung der Konzentration divalenter Kationen und somit der Ionenstärke zu einer Wirksamkeitsabnahme allosterischer Modulatoren führt (Tränkle et al., 1996; Schröter et al., 2000). Naphmethonium hingegen ist im [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperiment weniger affin. Zur Aufklärung des abweichenden Verhaltens oben genannter allosterischer Modulatoren sind weitere Experimente erforderlich.

Diskussion

	ACh	Oxo M	Pilocarpin	NMS	Quellen der mit [³ H]NMS bestimmten Werte
	(diese Arbeit)	(diese Arbeit)	(Klemt, 2005)	(Quellen: s. rechte Spalte)	
W84	6,64 ± 0,14 (n = 15)	6,79 ± 0,09 (n = 13)	6,46 ± 0,10 (n = 11)	6,41 ± 0,18 (n = 2-4) ^a	Daiß et al., 2002
				6,53 ± 0,02 (n = 3) ^a	Raasch et al., 2002
				6,19 ± 0,13 (n = 4) ^a	Muth et al., 2005
SH28	5,54 ± 0,12 (n = 17)		5,60 ± 0,07 (n = 19)	5,02 (n = 2) ^{a **}	Ataie, 2000
				5,87 ± 0,17 (n = 3) ^b	Gilsbach et al., 2003
Naphmethonium (MM3a)	7,66 ± 0,13 (n = 18)	7,30 ± 0,04 (n = 14)*	~7,07° **	8,29 ± 0,18 (n = 8) ^{a *}	Muth et al., 2003
MM7a	5,95 ± 0,11 (n = 10)		4,87° **	5,50 ± 0,01** (n = 4) ^a	Sennwitz, persönliche Mitteilung
TD2	7,35 ± 0,14 (n = 17)			6,46 ± 0,14 (n = 2-4) ^{a *}	Daiß et al., 2002
Strychnin	5,15 ± 0,13 (n = 17)		4,91 ± 0,12 (n = 15)	4,96 ± 0,11 (n = 4) ^c	Lazareno und Birdsall; 1995
				5,47 (n = 4) ^{d *}	Proška und Tuček; 1995
				4,93 (n = 4-5) ^e	Jakubík et al., 1997
				4,56 ± 0,07 (n = 3-6) ^e	Jakubík et al., 2005
Di-Strychnin-6	5,61 ± 0,10 (n = 12)		5,71°		
Str6Naph	7,69 ± 0,11 (n = 17)		7,64 ± 0,27 (n = 12)	6,07 ± 0,37 (n = 7) ^{a **}	Dancila, 2003
Alcuronium	6,40 ± 0,14 (n = 12)		5,95°	6,50 ± 0,50 (n = 2) ^f	Dong et al., 1995
				6,82 (n = 4) ^{d *}	Proška und Tuček; 1995
				6,14 (n = 4-5) ^e	Jakubík et al., 1997
				6,56 ± 0,07 (n = 4) ^a	Schröter et al., 2000
				8,02 ± 0,03 (n = 4) ^{b **}	Schröter et al., 2000
Caracurin V	5,77 ± 0,11 (n = 9)		5,35 ± 0,32 (n = 11)		

Diskussion

	ACh	Oxo M	Pilocarpin	NMS	Quellen der mit [³ H]NMS bestimmten Werte
	(diese Arbeit)	(diese Arbeit)	(Klemt, 2005)	(Quellen: s. rechte Spalte)	
Caracurin VII (WGA)	4,45 ± 0,16 (n = 13)		4,31 ± 0,24 (n = 8)	4,52 ± 0,01 (n = 3-6) ^e	Jakubík et al., 2005
Duo3	8,48 ± 0,13 (n = 12)		8,00 ± 0,09 (n = 18)**	7,20 ± 0,03 (n = 7) ^{a **}	Schröter et al., 2000
				7,30 ± 0,05 (n = 5) ^{b **}	Schröter et al., 2000
				7,63 ± 0,02 (n = 4-7) ^{g**}	Tränkle et al., 2003
Eburnamonin	5,00 ± 0,42 (n = 5)			4,65 (n = 4) ^d	Proška und Tuček; 1996
				4,16 (n = 4-5) ^e	Jakubík et al., 1997
Gallamin	5,99 ± 0,14 (n = 16)		6,31 ± 0,13 (n = 22)	5,96 (n = 4) ^h	Ehlert, 1988b
				7,38 (n = 2-3) ^{i **}	Leppik et al., 1994
				6,83 (n = 4) ^{d **}	Proška und Tuček, 1995
				6,82 ± 0,04 (n = 5) ^{a **}	Schröter et al., 2000
				9,17 ± 0,06 (n = 6) ^{b **}	Schröter et al., 2000
EHW141	7,23 ± 0,09 (n = 11)			5,89 ± 0,05 (n = 3-4) ^{a **}	Mohr et al., 2004

Tabelle 58: Affinitäten (pK_A) allosterischer Modulatoren zum freien M₂-Rezeptor ermittelt durch Experimente mit ACh, Oxotremorin M, Pilocarpin bzw. [³H]NMS als orthosterischen Liganden. Die angegebenen pK_A-Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. Wurde der pK_A aus K_A berechnet, ist kein Standardfehler angegeben. ° pK_A wurde aufgrund der Gleichung $p(\alpha \cdot K_A) = pIC_{50}$ (siehe Text) bestimmt. Puffer-Zusammensetzung: ^a 2,6-3,0 mM MgHPO₄, 45-52 mM TrisHCl, pH 7,3, 37°C; ^b 4mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄; pH 7,4; 23°C; ^c 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, pH 7,4, 30°C; ^d 100 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4, 25°C; ^e 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄ bzw. MgCl₂, 10 mM Na-HEPES, pH 7,4, 25°C; ^f 20 mM K-phosphat, pH 7, 30°C; ^g 20 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,4, 23°C; ^h 100 mM NaCl, 5,0 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,5 mM EGTA, 30 mM Na-HEPES, pH 7,5, 25°C; ⁱ 50 mM Natrium/Kalium-phosphatpuffer, pH 7,4, 22°C. */** signifikante Abweichung vom mit ACh bestimmten Wert (t-Test, p < 0,05/0,01).

4.1.4 Einfluss der Besetzung der orthosterischen Bindungsstelle auf die Affinität von allosterischen Modulatoren

An Agonist- und Antagonist-besetzten Rezeptoren weisen allosterische Modulatoren im Vergleich zum Rezeptor-Grundzustand eine veränderte Affinität auf. Das Ausmaß der Affinitätsänderung hängt vom Orthoster ab und wird durch den Kooperativitätsfaktor α quantifiziert. Es stellte sich die Frage, ob es eine Korrelation zwischen den Affinitätsveränderungen verschiedener Allosterie am Vollagonist-, Partialagonist- und Antagonist-besetzten Rezeptor gibt, so dass z. B. durch das Verhalten eines allosterischen Modulators am Antagonist-besetzten Rezeptor auch eine Aussage über das Verhalten am Agonist-besetzten Rezeptor gemacht werden könnte.

Im Gegensatz zu den pK_A -Werten (Affinität zum freien Rezeptor, s. 4.1.3) werden die $p\alpha$ -Werte (Kooperativitätsfaktor) nur gering durch die Pufferbedingungen beeinflusst (Schröter et al., 2000), da sich in verschiedenen Puffern die Affinität zum freien und zum besetzten Rezeptor im gleichen Maße verändert. Daher war es möglich Kooperativitäten ($p\alpha$), die unter verschiedenen Pufferbedingungen ermittelt wurden, miteinander zu vergleichen. Die $p\alpha$ -Werte in Tabelle 59 dienen als Grundlage für die sich anschließenden Korrelationsanalysen.

Diskussion

	ACh	Pilocarpin	NMS	
	(diese Arbeit)	(Klemt, 2005)	(Quellen: s. rechte Spalte)	Quellen der mit [³ H]NMS bestimmten Werte
W84	-2,76 ± 0,22 (n = 15)	-1,68 ± 0,21 (n = 11)	-0,53 (n = 2-4) ^a	Daiß et al., 2002
			-0,48 ± 0,02 (n = 3) ^a	Raasch et al., 2002
			-0,47 ± 0,06 (n = 4) ^a	Muth et al., 2005
SH28	-3,46 ± 0,57 (n = 17)	-3,37 ± 0,33 (n = 19)	-1,30 (n = 2) ^a	Ataie, 2000
			-0,97 ± 0,11 (n = 3) ^b	Gilsbach et al., 2003 ^d
Naphmethonium (MM3a)	-2,61 ± 0,16 (n = 18)	~0,6 ^o	0,37 ± 0,08 (n = 8) ^a	Muth et al., 2003
MM7a	< -3 (n = 10)	0 [□]	-0,02 ± 0,01 (n = 4) ^a	Sennwitz, persön- liche Mitteilung
TD2	< -3 (n = 17)		0,44 (n = 2-4) ^a	Daiß et al., 2002
Strychnin	< -3 (n = 17)	-0,68 ± 0,06 (n = 15)	0,34 (n = 4) ^c	Lazareno und Birdsall; 1995
			0,36 (n = 4) ^d	Proška und Tuček; 1995
			0,54 (n = 4-5) ^e	Jakubík et al., 1997
			0,81 ± 0,07 (n = 3-6) ^e	Jakubík et al.; 2005
Di-Strychnin-6	< -2 (n = 12)	0 [□]		
Str6Naph	-2,69 ± 0,14 (n = 17)	-0,91 ± 0,09 (n = 12)	1,88 ± 0,27 (n = 7) ^a	Dancila, 2003
Alcuronium	-2,96 ± 0,24 (n = 12)	0 [□]	0,51 (n = 4) ^d	Proška und Tuček; 1995
			0,52 (n = 4-5) ^e	Jakubík et al., 1997
			0,66 (n = 4) ^a	Schröter et al., 2000
			0,59 (n = 4) ^b	Schröter et al., 2000
Caracurin V	< -2 (n = 9)	-1,00 ± 0,34 (n = 11)	0 ^{Δ b}	Buller, 2002
Caracurin VII (WGA)	< -2 (n = 13)	-1,14 ± 0,45 (n = 8)	-0,40 ± 0,01 (n = 3-6) ^e	Jakubík et al., 2005

Diskussion

	ACh	Pilocarpin	NMS	
	(diese Arbeit)	(Klemt, 2005)	(Quellen: s. rechte Spalte)	Quellen der mit [³ H]NMS bestimmten Werte
Duo3	-3,58 ± 0,20 (n = 12)	-3,01 ± 0,19 (n = 18)	-1,29 (n = 7) ^a	Schröter et al., 2000
			-0,95 (n = 5) ^b	Schröter et al., 2000
			-1,05 (n = 4-7) ^f	Tränkle et al., 2003
Eburnamonin	< -1,2 (n = 5)		0,46 (n = 4) ^d	Proška und Tuček; 1996
			0,92 (n = 4-5) ^e	Jakubík et al., 1997
Gallamin	-3,29 ± 0,20 (n = 16)	-2,53 ± 0,16 (n = 22)	-1,33 (n = 4) ^d	Proška und Tuček, 1995
			-1,32 (n = 4) ^g	Ehlert, 1988b
			-1,87 (n = 2-3) ^h	Leppik et al., 1994
			-1,93 (n = 5) ^a	Schröter et al., 2000
			-2,07 (n = 6) ^b	Schröter et al., 2000
EHW141	< -3,5 (n = 11)		1,07 ± 0,13 (n = 3-4) ^a	Mohr et al., 2004

Tabelle 59: Kooperativitätsfaktoren ($\rho\alpha$) für die Interaktion allosterischer Modulatoren mit den Orthosteren ACh, Pilocarpin und NMS am M₂-Rezeptor. Die angegebenen $\rho\alpha$ -Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler. Wurde der $\rho\alpha$ aus α berechnet, ist kein Standardfehler angegeben. ° $\rho\alpha$ wurde aus einer Auftragung der pEC₅₀-Werte von Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven in Anwesenheit verschiedener Naphmethonium-Konzentrationen gegen den negativen dekadischen Logarithmus der Naphmethonium-Konzentration ermittelt. □ Aufgrund der neutralen Kooperativität der Substanz nimmt $\rho\alpha$ den Wert 0 an: im [³⁵S]GTPyS-Bindungsexperiment erfolgte keine Verschiebung der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Δ Caracurin V rief keine signifikante Änderung der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung hervor. Puffer-Zusammensetzung: ^a 2,6-3,0 mM MgHPO₄, 45-52 mM TrisHCl, pH 7,3, 37°C; ^b 4mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄; pH 7,4; 23°C; ^c 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM HEPES, pH 7,4, 30°C; ^d 100 mM NaCl, 20 mM HEPES, pH 7,4, 25°C; ^e 136 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄ bzw. MgCl₂, 10 mM Na-HEPES, pH 7,4, 25°C; ^f 20 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,4, 23°C; ^g 100 mM NaCl, 5,0 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,5 mM EGTA, 30 mM Na-HEPES, pH 7,5, 25°C; ^h 50 mM Natrium/Kalium-phosphatpuffer, pH 7,4, 22°C. */** signifikante Abweichung vom mit ACh bestimmten Wert (t-Test, p < 0,05/0,01).

In Abbildung 91 und Abbildung 92 sind jeweils die $\rho\alpha$ -Werte der Allosteren aus Tabelle 59 für zwei Orthostere gegeneinander aufgetragen. Allosteren, für deren Interaktion mit ACh kein konkreter $\rho\alpha$ -Wert bestimmt werden konnte, gingen nicht in die Korrelation ein. Daher beinhalten die Graphen in Abbildung 92 weniger Datenpunkte als in Abbildung 91.

Die Daten wurden mittels linearer Regressionsanalyse ausgewertet und überprüft, ob eine Korrelation besteht (Methodik: s. 2.5.3). Der Spearman-Korrelationskoeffizient r gibt an, in welchem Ausmaß die eine Variable die Werte der anderen Variable bestimmt (Motulsky, 1995). r kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen. Ist r genau 1 bzw. -1 , liegt eine perfekte positive bzw. negative Korrelation vor.

Klemt (2005) fand, dass zwischen den $\rho\alpha$ -Werten der Allosteren mit NMS bzw. Pilocarpin eine signifikante Korrelation bestand. In Abbildung 91 ist der Zusammenhang der $\rho\alpha$ -Werte aus den Interaktionen mit Pilocarpin und NMS noch einmal dargestellt. Die Regressionsgerade konnte beschrieben werden mit $y = (0,91 \pm 0,31) \cdot x - (1,12 \pm 0,29)$. Steigung und Y-Achsenabschnitt sind jeweils mit dem aus der Regressionsanalyse resultierendem Standardfehler angegeben. Die Steigung war nicht signifikant verschieden von 1 (F-Test, $p > 0,05$). Der Spearman-Korrelationskoeffizient r lag bei $0,79$.

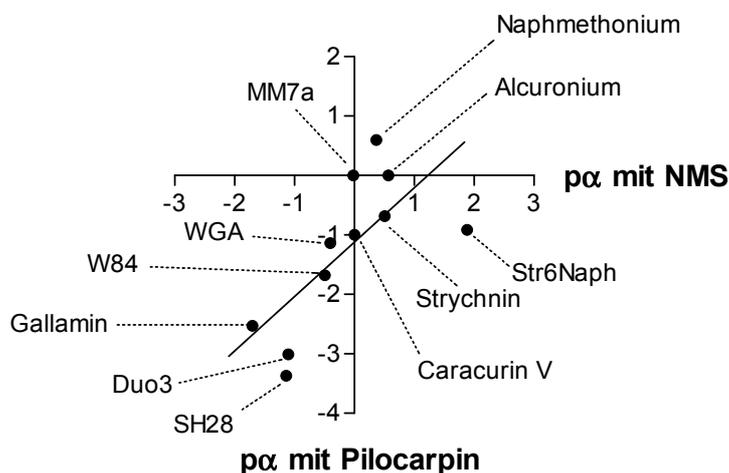


Abbildung 91: Korrelation zwischen den Kooperativitätsfaktoren ($\rho\alpha$) der Interaktion der in Tabelle 59 aufgeführten allosterischen Modulatoren mit Pilocarpin und NMS. **Ordinate:** Kooperativitätsfaktor ($\rho\alpha$) des jeweiligen Alloster mit Pilocarpin. **Abszisse:** Kooperativitätsfaktor ($\rho\alpha$) des jeweiligen Alloster mit NMS. **Geradenanpassung:** Lineare Regressionsanalyse. Die Datenpunkte resultieren aus den $\rho\alpha$ -Werten aus Tabelle 59. Sind dort mehrere Werte für NMS angegeben, wurde für diese Darstellung der Mittelwert gebildet.

Aus der Analyse der Daten in Abbildung 92A, in der im Unterschied zu Abbildung 91 die Allosteren herausgenommen wurden, für die aus der Interaktion mit ACh kein konkreter Zahlenwert für $p\alpha$ bestimmt werden konnte, ergab sich aufgrund der geringen Zahl an Datenpunkten keine signifikante Korrelation ($p > 0,05$). Die Gleichung der Regressionsgeraden lautete: $y = (0,89 \pm 0,37) \cdot x - (1,35 \pm 0,44)$. Der Spearman-Korrelationskoeffizient betrug $r = 0,75$.

Aus Abbildung 91 und Abbildung 92A lässt sich erkennen, dass mit steigender Affinität der Allosteren zum Pilocarpin-besetzten Rezeptor eine steigende Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor parallel geht. Dies deutet daraufhin, dass die allosterische Bindungsstelle am NMS- bzw. Pilocarpin-besetzten Rezeptor eine ähnliche Konformation aufweist (Klemm, 2005). Die Bindungsneigung der eingesetzten Allosteren zu NMS-besetzten Rezeptoren war dabei immer größer als zu Pilocarpin-besetzten Rezeptoren.

In Abbildung 92B und Abbildung 92C wurde für die eigenen Befunde mit ACh überprüft, ob es einen Zusammenhang zu Affinitätsveränderungen der Allosteren am Pilocarpin- und NMS-besetzten Rezeptor gab. Aus den Abbildungen ist ersichtlich, dass zwischen den $p\alpha$ -Werten der Allosteren aus der Interaktion mit ACh und den $p\alpha$ -Werten aus der Interaktion mit NMS bzw. Pilocarpin keine eindeutige Korrelation bestand. Bildeten die Allosteren ternäre Komplexe mit ACh-besetzten M_2 -Rezeptoren, war die Interaktion zwischen Allosteren und ACh stark negativ kooperativ, d. h., dass die Bindung eines der beiden Liganden die Affinität des jeweils anderen stark verminderte. Die Kooperativitätsfaktoren ($p\alpha$) mit ACh variierten bei den untersuchten allosterischen Modulatoren nur um eine Dekade, wohingegen die Spanne der $p\alpha$ -Werte der Allosteren mit NMS und Pilocarpin jeweils 4 Dekaden umfasste. Daher waren die Steigungen der Regressionsgeraden relativ flach (B: $0,24 \pm 0,09$; C: $0,22 \pm 0,06$) und signifikant verschieden von 1 (F-Test, $p < 0,05$). Die Schnittpunkte mit der Ordinate lagen bei $-3,00 \pm 0,11$ (B) und $-2,71 \pm 0,13$ (C). Abbildung 92B und Abbildung 92C zeigen, dass die Korrelation zwischen den $p\alpha$ -Werten von ACh mit Pilocarpin bzw. NMS sehr ähnlich war: Eine Zunahme in der Affinität der Allosteren zum Pilocarpin- bzw. NMS-besetzten Rezeptor bedeutete fast keine Zunahme in der Affinität zum ACh-besetzten Rezeptor. Dieser Zusammenhang war für Pilocarpin und ACh signifikant ($p < 0,05$) mit einem Korrelationskoeffizienten r von 0,86. Für die Korrelation der $p\alpha$ -Werte von NMS und ACh betrug der Korrelationskoeffizient $r = 0,68$. Diese

Korrelation war jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). Für die Affinitäten allosterischer Modulatoren zu Orthoster-besetzten Rezeptoren ließ sich folgende Rangfolge feststellen: NMS > Pilocarpin > ACh.

Die Korrelationsanalyse zeigt, dass sich die Affinitätsveränderungen allosterischer Modulatoren gegenüber freien Rezeptoren an NMS- und an Pilocarpin-besetzten M_2 -Rezeptoren parallel verhielten. Am ACh-besetzten M_2 -Rezeptor ergab sich eine insgesamt stärker ausgeprägte Affinitätsabnahme, die für alle Allosterie fast das gleiche Ausmaß annahm und so gut wie keine Parallelität mit der Affinitätsabnahme an NMS- und Pilocarpin-besetzten Rezeptoren aufwies. Das lässt darauf schließen, dass die Konformation des ACh-besetzten Rezeptors sehr verschieden sein muss verglichen mit den Konformationen des Pilocarpin- und des NMS-besetzten Rezeptors.

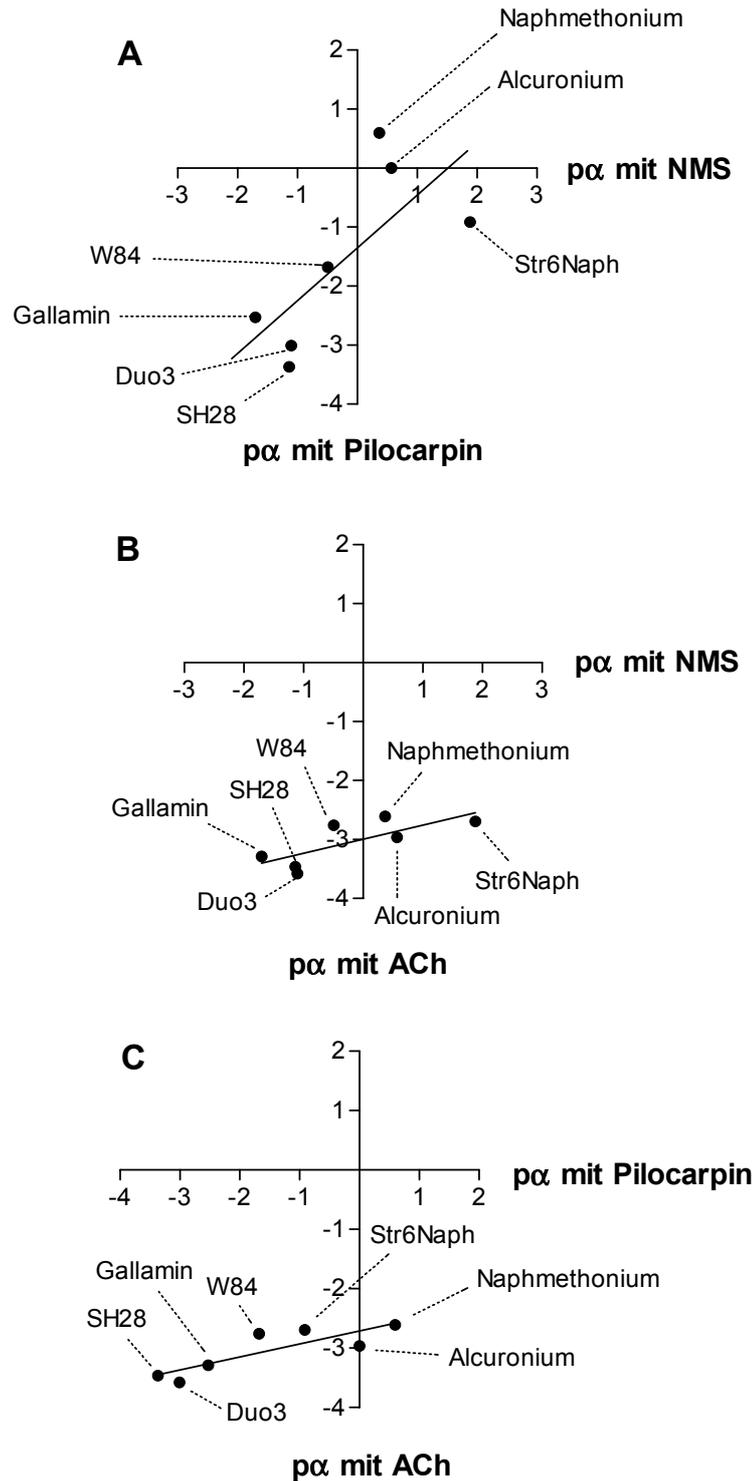


Abbildung 92: Korrelation zwischen den Kooperativitätsfaktoren ($p\alpha$) der Interaktion der in Tabelle 59 aufgeführten allosterischen Modulatoren mit Pilocarpin und NMS (A), mit ACh und NMS (B) und mit ACh und Pilocarpin (C). In der Teilabbildung A sind nur die Allosteren aufgeführt, die auch in B und C enthalten sind. **Ordinate:** Kooperativitätsfaktor ($p\alpha$) des jeweiligen Allosters mit Pilocarpin (A) bzw. ACh (B/C). **Abszisse:** Kooperativitätsfaktor ($p\alpha$) des jeweiligen Alloster mit NMS (A/B) bzw. Pilocarpin (C). **Geradenanpassung:** Lineare Regressionsanalyse. Die Datenpunkte

resultieren aus den $p\alpha$ -Werten aus Tabelle 59. Sind dort mehrere Werte für NMS angegeben, wurde für diese Darstellung der Mittelwert gebildet.

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass aus der Interaktion der allosterischen Modulatoren mit dem Vollagonisten ACh nur hoch negative $p\alpha$ -Werte resultierten, wohingegen sich mit dem Partialagonisten Pilocarpin schwächer negative bis positive Werte ergaben. Um zu überprüfen, ob dieses Verhalten der Allosterie bei anderen Voll- und Partialagonisten analog zu beobachten ist, sind in Tabelle 60 die Kooperativitäten der Allosterie Alcuronium, W84 und Naphmethonium mit den Vollagonisten ACh, Carbachol, Oxotremorin M und Oxotremorin sowie den Partialagonisten Pilocarpin und McN-A-343 noch einmal zusammenfassend dargestellt. Die Agonisten sind nach steigender negativer Kooperativität mit dem jeweiligen Alloster aufgelistet. Ein Zusammenhang zwischen den Affinitäten der Agonisten zum freien M_2 -Rezeptor und dem Ausmaß der Kooperativität mit allosterischen Modulatoren scheint nicht zu bestehen. Für alle untersuchten Orthostere ergab sich mit den Agonisten folgende Reihenfolge der Kooperativitäten ($p\alpha$): Pilocarpin > McN-A-343 > Oxotremorin > ACh > Carbachol > Oxotremorin M. Die Kooperativitäten aus der Interaktion der allosterischen Modulatoren mit den Partialagonisten nahmen insgesamt deutlich weniger negative $p\alpha$ -Werte an als mit den Vollagonisten. Die $p\alpha$ -Werte aus der Interaktion mit den Vollagonisten waren durchgehend stark negativ und unterschieden sich nur geringfügig voneinander. Es zeichnete sich also ein paralleles Verhalten der Agonisten im Hinblick auf die intrinsische Aktivität und die Kooperativität mit allosterischen Modulatoren ab.

Diskussion

	Agonist		Alcuronium		W84		Naphmethonium	
	pEC ₅₀	n	pα	n	pα	n	pα	n
Pilocarpin	6,45 ± 0,06	3	0°	-	-1,72 ± 0,26	3	~ 0,6°	-
McN-A-343	5,83 ± 0,06	4	-1,03 ± 0,16	3	-2,06 ± 0,20	4	-1,12 ± 0,05	3
Oxotremorin	7,99 ± 0,06	4	-2,41 ± 0,02	3	-2,19 ± 0,11	5	-2,24 ± 0,05	4
ACh	7,69 ± 0,03	27	-2,47 ± 0,05	2	-2,57 ± 0,32	3	-2,54 ± 0,20	4
Carbachol	6,57 ± 0,07	4	-2,55 ± 0,28	3	-2,86 ± 0,04	4	-2,64 ± 0,04	4
Oxotremorin M	8,07 ± 0,03	4	-2,99 ± 0,13	3	-3,11 ± 0,14	4	-2,82 ± 0,08	4

Tabelle 60: Kooperativitätsfaktoren (pα) der Interaktion der allosterischen Modulatoren W84, Alcuronium und Naphmethonium mit verschiedenen Voll- und Partialagonisten am M₂-Rezeptor und Wirksamkeiten (pEC₅₀) der Agonisten am freien M₂-Rezeptor. Die angegebenen pα-Werte sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3.3.3.1.5/3.3.3.2.6/3.3.3.3.5. Die pEC₅₀-Werte (Mittelwerte ± Standardfehler) stammen aus 3.3.1. ° Werte von Klemt (2005). Da Alcuronium den Wendepunkt der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve im betrachteten Konzentrationsbereich nicht veränderte, wurde neutrale Kooperativität (pα = 0) abgeleitet. Der Wert für die positive Kooperativität Naphmethoniums wurde anhand der Veränderung der pEC₅₀-Werte der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve abgeschätzt.

4.2 Molekular-mechanistische Betrachtung allosterischer Modulation

In diesem Kapitel werden die topologischen Aspekte der orthosterischen und der allosterischen Bindungsstelle an muskarinischen Rezeptoren sowie der Aktivierungsmechanismus G-Protein-gekoppelter Rezeptoren besprochen. Dies dient als Grundlage für einen Deutungsversuch der in dieser Arbeit mit allosterischen Modulatoren erhobenen Befunde auf molekular-mechanistischer Ebene.

4.2.1 Topologie der Ligand-Bindung an muskarinischen Rezeptoren

Die muskarinischen Rezeptoren gehören zur Rhodopsin-artigen Familie (Klasse A) der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die sich u. a. durch sieben transmembranäre Domänen (TM) auszeichnet (Wess, 1996; Caulfield und Birdsall, 1998; Hulme et al., 2003). Die Röntgenkristallstruktur des Rinder-Rhodopsins (Protein Data Base accession no. 1F88/1HZX; Palczewski et al., 2000) lieferte die Basis für die dreidimensionale Modellierung des mit NMS-besetzten M₂-Rezeptors (Jöhren und Höltje, 2002). Zusammen mit Mutagenese- und Radioligandbindungsstudien ist es durch dieses Modell möglich geworden, genauere Vorstellungen von dem Bindungsverhalten orthosterischer und allosterischer Liganden sowie vom Aktivierungsmechanismus G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zu entwickeln.

4.2.1.1 Topologie der Bindung orthosterischer Liganden

Die orthosterische Bindungsstelle ist innerhalb der fünf Subtypen muskarinischer Rezeptoren hoch konserviert (Hulme et al., 1990; Wess, 1996; Caulfield und Birdsall, 1998; Hulme et al., 2003). Sowohl Agonisten (z. B. ACh) als auch kompetitive Antagonisten (z. B. NMS) binden im Bereich der transmembranären Domänen (Hulme et al., 1990; Birdsall, 1993; Wess, 1993). Mutagenesestudien deuten darauf hin, dass ACh und NMS in ähnlicher Weise gebunden werden; die ACh-Seitenkette reicht jedoch nicht so tief in die transmembranäre Region hinein

(Hulme et al., 2003). Als primäre Interaktionsstelle mit dem positiv geladenen Stickstoff von ACh bzw. NMS dient wahrscheinlich die M₁-Aminosäure Aspartat¹⁰⁵ in TM3 (Curtis et al., 1989; Fraser et al., 1989; Spalding et al., 1994; Matsui et al., 1995). Aromatische Aminosäuren umgeben diesen Stickstoff wie eine Art Käfig, der durch Ladungen stabilisiert wird (Hibert et al., 1991; Hulme et al., 2003). Als wichtige Aminosäure für die Affinität orthosterischer Liganden identifizierten Matsui et al. (1995) die M₁-Aminosäure Tryptophan⁹¹. Für die genannten Aminosäuren am M₁-Rezeptor existieren analoge Aminosäuren an den anderen vier Subtypen. Weitere Orthoster-Kontaktstellen wurden für TM3 (Lu und Hulme, 1999), TM5 (Allman et al., 2000), TM6 (Ward et al., 1999) und TM7 (Wess et al., 1992) beschrieben.

4.2.1.2 Topologie der Bindung allosterischer Liganden

Allosterische Liganden binden extrazellulär zur orthosterischen Bindungsstelle (Ellis et al., 1993; Leppik et al., 1994; Matsui et al., 1995). Die Aminosäuren sind in diesem Bereich weniger konserviert und geben somit die Möglichkeit Liganden mit größerer Subtyp-Selektivität zu entwickeln (Proška und Tuček, 1995; Wess, 1996; Ellis, 1997). Die meisten allosterischen Modulatoren besitzen die höchste Affinität zum M₂-Rezeptor und die geringste zum M₅-Rezeptor (Ellis et al., 1991; Lee und El-Fakahany, 1991; Holzgrabe und Mohr, 1998; Ellis und Seidenberg, 2000). Untersuchungen an M₂/M₅-Rezeptorhybriden lieferten Hinweise auf Areale, die für die Affinität allosterischer Liganden essentiell sind (Ellis et al., 1993; Gnagey et al., 1999; Ellis und Seidenberg, 2000; Buller et al., 2002; Voigtländer et al., 2003; Huang et al., 2005). Dabei handelt es sich um Aminosäuren in den extrazellulären Schleifen und in äußeren Segmenten verschiedener transmembranärer Helices. Die zweite und dritte extrazelluläre Schleife (o₂/o₃) scheinen besondere Relevanz für die Bindung bzw. Selektivität allosterischer Modulatoren zu haben. Die relative Bedeutung der Bindungsregionen variiert bei verschiedenen Allosteren (Ellis und Seidenberg, 2000; Voigtländer et al., 2003; Huang et al., 2005). Für W84 konnten z. B. M₂⁴²³Threonin (TM7; Buller et al., 2002) und M₂¹⁷⁷Tyrosin (o₂; Voigtländer et al., 2003) als verantwortliche Aminosäuren für die hochaffine Bindung an den NMS-besetzten M₂-Rezeptor im Unterschied zur niedrigeren Affinität am M₅-Rezeptor identifiziert werden. Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass die Aromaten von M₂¹⁷⁷Tyrosin (o₂) und M₂⁴²²Tryptophan (TM7) das aromatische

System von W84 über π - π -Wechselwirkungen wie eine Art „Sandwich“ einschließen (Prilla et al., 2005). Bei Gallamin spielt zusätzlich zu M_2^{423} Threonin (Huang et al., 2005) eine negativ geladene, so genannte EDGE-Sequenz (o2, Glu-Asp-Gly-Glu) eine Rolle für die Bindungsaffinität (Leppik et al., 1994; Gnagey et al., 1999). Jakubík et al. (2005) konnten für die Affinität von Caracurin VII und Strychnin am NMS-besetzten M_2 -Rezeptor drei wichtige Aminosäuren in der dritten extrazellulären Schleife identifizieren. Trotz ihrer Abhängigkeit von nicht immer identischen Epitopen scheinen die meisten allosterischen Modulatoren kompetitiv an der „common allosteric site“ zu interagieren (Ellis und Seidenberg, 1992, 2000; Tränkle und Mohr, 1997).

Für einige allosterische Modulatoren wird postuliert, dass sie nicht an der „common allosteric site“ binden. Dabei handelt es sich um Duo3 (Tränkle und Mohr, 1997) sowie Staurosporin-Derivate und WIN 62.577 (Lazareno et al., 2000; 2002). Neueste Untersuchungen mit Duo3 und Tacrin, in denen das Verhalten gegenüber den allosterischen Antagonisten Hexamethonium, Obidoxim und Mg^{2+} -Ionen überprüft wurde, deuten darauf hin, dass diese zwar mit der allosterischen Bindungsstelle des M_2 -Rezeptors interagieren, jedoch eine andere topographische Region dieser Tasche besetzen (Tränkle et al., 2005). Ein Hinweis für das atypische Verhalten von Duo3 im 3D-Modell ist, dass Duo3 nicht so nah wie W84 an die Aminosäuren M_2^{423} Threonin und M_2^{177} Tyrosin herankommt (Tränkle et al., 2005).

4.2.2 Aktivierungsmechanismus G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

4.2.2.1 Aktivierung durch Agonisten

Um die Kopplung von G-Proteinen zu ermöglichen, durchlaufen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nach Bindung eines agonistischen Liganden eine Konformationsänderung, die sich von der Ligand-Bindungsstelle bis zu den intrazellulären Domänen des Rezeptors ausbreitet (Gether und Kobilka, 1998; Meng und Bourne, 2001; Sakmar et al., 2002; Hubbell et al., 2003). Es wird vermutet, dass dabei eine Annäherung der transmembranären Helices TM3, TM6 und TM7 erfolgt (Ghanouni et al., 2001; Hulme et al., 2003; Han et al., 2005; Massotte und Kieffer, 2005). Dadurch kommt es zum Aufbrechen intramolekularer

Ionenbrücken (Sealfon et al., 1995; Porter et al., 1996; Schulz et al., 2000). Spalding et al. (1998) sowie Ford et al., (2002) bezeichnen TM6 in diesem Zusammenhang als einen „Schalter“. Die Interaktion von Liganden mit TM6 stabilisiert hiernach den Rezeptor entweder in einem aktiven oder inaktiven Zustand. Ford et al. (2002) konnten zeigen, dass Mutationen im Bereich des äußeren Segments von TM6 bei allen Subtypen muskarinischer Rezeptoren zu konstitutiver Aktivität führen kann. Die Konformationsänderungen von TM3 und TM6 stehen im Einklang mit der Vorstellung, dass der aromatische „Käfig“ (s. 4.2.1.1) näher an den positiven Stickstoff von ACh herangezogen wird (Lu et al., 2002; Han et al., 2005). Struktur-Wirkungs-Beziehungen haben gezeigt, dass eine Substitution der *N*-Methyl-Gruppen von ACh durch größere Alkylreste aufgrund sterischer Hinderung zur Reduktion bzw. Aufhebung der intrinsischen Aktivität führen kann (Barlow, 1964; Wess et al., 1990). Dies stimmt überein mit den Befunden dieser Arbeit, dass das *N*-methylierte Pilocarpin-Derivat im Vergleich zu Pilocarpin eine stark verminderte intrinsische Aktivität hervorrief. Klco et al. (2005) fanden in Mutationsstudien am Komplementfaktor-5a-Rezeptor heraus, dass auch der zweiten extrazellulären Schleife eine wichtige Rolle im Mechanismus der Rezeptoraktivierung zukommt. Demnach liegt die zweite extrazelluläre Schleife im Grundzustand wie ein Deckel auf den transmembranären Helices und stabilisiert den inaktiven Rezeptorzustand (Massotte und Kieffer, 2005). Die Schleife ist über eine Disulfid-Brücke zwischen zwei konservierten Cystein-Resten mit TM3 verbunden und faltet sich in den Raum zwischen der vierten und fünften transmembranären Domäne hinein. Klco et al. (2005) vermuten, dass die zweite extrazelluläre Schleife in anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren eine ähnliche Funktion hat. Der Komplementfaktor-5a-Rezeptor gehört wie die muskarinischen Rezeptoren zur Klasse A der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Ott et al. (2002) führten Mutationen in der zweiten extrazellulären Schleife des GnRH-Rezeptors (ebenfalls ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor der Klasse A) durch. Sie konnten dadurch den Antagonisten 135-18 in einen Agonisten umwandeln. Die zweite extrazelluläre Schleife ist laut Ott et al. (2002) ein bestimmender Faktor dafür, ob ein Ligand vom Rezeptor als Agonist oder Antagonist erkannt wird. Zu dem gleichen Schluss kommen auch Herold et al. (2004), die Untersuchungen an G-Protein-gekoppelten ATP-Rezeptoren (P_2Y_4 -Rezeptoren) durchführten. Antikörper, die gegen die zweite extrazelluläre Schleife

muskarinischer Rezeptoren gerichtet waren, führten zu einer Aktivierung des Rezeptors (Masuda et al., 1998; Wang et al., 2000; Peter et al., 2004), die möglicherweise durch ein „Aufklappen des Deckels“ hervorgerufen wurde.

Wie in 4.1.1 dargestellt gibt es mit AC-42 und *N*-Desmethylozapin offensichtlich auch Liganden, die durch Interaktion mit einer allosterischen Bindungsstelle eine agonistische Wirkung entfalten können. Detailliertere mechanistische Erklärungen stehen jedoch noch aus.

4.2.2.2 Modulation der M₂-Rezeptor-Aktivierung durch Allosterie

Die Bindung von allosterischen Liganden kann Konformationsänderungen des Rezeptorproteins hervorrufen, die die Affinität der gebundenen Agonisten bzw. Antagonisten verändern (Tuček et al., 1990; Dong et al., 1995; Jakubík et al., 1995; Lazareno und Birdsall, 1995). Auf der Basis der Befunde von Klco et al. (2005; s. 4.2.2.1) und dem Wissen um die Bedeutung der zweiten extrazellulären Schleife für die Bindung von allosterischen Modulatoren kann spekuliert werden, dass Allosterie durch eine Stabilisierung bzw. Aufhebung der „Deckelfunktion“ der zweiten extrazellulären Schleife einen wesentlichen Beitrag zum Aktivitätszustand des Rezeptors leisten können. Beispielsweise könnte die von Prilla et al. (2005) vermutete „Sandwich“-Konstellation aus M₂¹⁷⁷Tyrosin (o2), aromatischem System von W84 und M₂⁴²²Tryptophan (TM7) so interpretiert werden, dass W84 durch Herstellung einer Brücke zwischen diesen beiden Aminosäuren die zweite extrazelluläre Schleife in ihrer inaktivierenden Konformation stabilisiert. Dieses Verhalten wäre z. B. am Pilocarpin-besetzten Rezeptor denkbar, da W84 die agonistische Aktivität Pilocarpins aufhob (Klemm, 2005). Der Agonist-Effekt von ACh wurde durch W84 nicht beeinflusst und die Affinität von W84 zum ACh-besetzten Rezeptor war deutlich niedriger als zum freien, zum NMS-besetzten und zum Pilocarpin-besetzten M₂-Rezeptor. Dies wäre dadurch erklärbar, dass in der ACh-gebundenen Konformation des Rezeptors M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²²Tryptophan räumlich so weit auseinander liegen, dass das Affinitäts-gebundene Sandwich-Arrangement nicht mehr möglich ist, also eine Überbrückung der beiden Aminosäuren durch W84 nicht mehr hergestellt werden kann.

Die Zusammenschau aller bisherigen Befunde einschließlich der vorliegenden Arbeit zeigt, dass die Kombination aus Alloster und Agonist entscheidet, ob eine Inaktivierung des Agonist-besetzten Rezeptors möglich ist. Die durch Partial-

agonisten wie Pilocarpin und McN-A-343 stabilisierten Konformationen scheinen eine Umwandlung in einen inaktiven Zustand eher zuzulassen als Konformationen, die durch Vollagonisten hervorgerufen werden.

4.3 Perspektiven zur Entwicklung von Förderern der Bindung von ACh an muskarinischen Rezeptoren

4.3.1 Bisherige Forschungsergebnisse

Bisher sind nur wenige Substanzen beschrieben, die die Affinität des endogenen Agonisten ACh an muskarinischen Rezeptoren erhöhen. Birdsall et al. (1997) berichteten, dass sich Brucin und einige seiner Derivate positiv kooperativ mit ACh an bestimmten Muskarinrezeptor-Subtypen verhielten. Brucin erhöhte die Affinität von ACh am M₁-Rezeptor, übte jedoch an den anderen vier Subtypen eine negative Kooperativität auf ACh aus. *N*-Chloromethylbrucin erhöhte die Affinität von ACh am M₃-Rezeptor um das 3- bis 5-fache. Am M₄-Rezeptor war es neutral kooperativ, an M₁, M₂ und M₅ negativ kooperativ. Brucin-*N*-oxid verstärkte die Bindung von ACh an die Rezeptorsubtypen M₃ und M₄. Jakubík et al. (1997) untersuchten in [³H]NMS-Bindungsexperimenten den Einfluss von fünf allosterischen Modulatoren auf zwölf Agonisten. Bezüglich ACh erwiesen sich Brucin (an M₁ und M₃) und Eburnamonin (an M₂ und M₄) als positiv kooperative Liganden. Die positive Kooperativität von Eburnamonin konnte von Lazareno et al. (1999), von Zahn (1999) sowie in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. 1999 beschrieben Lazareno et al. den bisher einzigen Förderer der Affinität von ACh an M₂-Rezeptoren. Bei der Substanz handelt es sich um ein pentazyklisches Molekül, welches die Ringstruktur von Brucin enthält. Die Affinität von ACh wurde am M₂-Rezeptor um das 3-fache erhöht, an M₁-, M₃- und M₄-Rezeptoren wurde sie durch diese Substanz erniedrigt. KT 5720 steigerte die Affinität von ACh an M₁-Rezeptoren um das 1,4-fache (Lazareno et al., 2002). 2004 berichteten Lazareno et al., dass der Thiamin-Metabolit Thiochrom die Bindung von ACh selektiv am M₄-Rezeptor um das 3- bis 5-fache erhöhte. Dieser Effekt von Thiochrom konnte auch

in dieser Arbeit gezeigt werden (3.2.3). Die Erhöhung der Wirksamkeit von ACh an muskarinischen Rezeptoren wurde für einige allosterische Modulatoren auch in funktionellen Experimenten gefunden (Doležal und Tuček, 1998; Birdsall et al., 1999; Lazareno et al., 1999, 2004).

4.3.2 Ausblick

Bisher ist es nicht möglich, aufgrund der Struktur eines Moleküls oder sonstiger molekularer Eigenschaften eine positiv kooperative Interaktion eines allosterischen Modulators mit dem endogenen Agonisten ACh an muskarinischen Rezeptoren vorherzusagen. Zwischen den Kooperativitätsfaktoren für die Interaktion mit Pilocarpin und NMS im Vergleich zur Interaktion mit ACh ergaben sich in dieser Arbeit keine eindeutigen Korrelationen. Alle untersuchten Allosteren verhielten sich mit ACh am M_2 -Rezeptor stark negativ kooperativ. Aufgrund dieser Befunde scheint es unwahrscheinlich, durch die systematische Suche nach Allosteren mit einer sehr stark ausgeprägten positiven Kooperativität mit NMS oder Pilocarpin einen allosterischen Modulator finden zu können, der sich positiv kooperativ mit ACh verhält. Die Entdeckung solcher Substanzen erfordert daher andere Ansätze als die Nutzung von Förderern der Antagonist-Bindung.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intrinsische Aktivität von ACh bei der Bildung ternärer Komplexe mit allosterischen Modulatoren nicht spezifisch beeinflusst wurde. Es scheint demnach durchaus möglich zu sein, die Bindung von ACh modulieren zu können, ohne gleichzeitig die maximale G-Protein-Aktivierung zu modifizieren. Die Förderung der ACh-Bindung an muskarinischen Rezeptoren ist demnach weiterhin ein hoffnungsvolles Forschungsgebiet für Arzneistoffe, die einen Mangel des endogenen Neurotransmitters Acetylcholin kompensieren sollen.

5 Zusammenfassung

Acetylcholin ist der endogene Ligand an allen fünf Subtypen muskarinischer Acetylcholin-Rezeptoren. Zusätzlich zu der orthosterischen Bindungsstelle, an die z. B. Acetylcholin bindet, besitzen muskarinische Rezeptoren auch mindestens eine allosterische Bindungsstelle. Die meisten bekannten Allosteren binden an die „common allosteric site“. Sind ein Alloster und ein Orthoster gleichzeitig am Rezeptor gebunden, spricht man von einem ternären Komplex. Allosterische Liganden können die Affinität und die intrinsische Aktivität von Orthosteren modulieren. In Radioligandbindungsstudien war der Einfluss zahlreicher allosterischer Modulatoren auf die Bindung des Antagonisten [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS) untersucht worden. Durch geeignete Allosteren ließ sich die Bindung von [³H]NMS entweder erhöhen, erniedrigen oder auch unverändert halten. In funktionellen Experimenten mit dem Partialagonisten Pilocarpin als orthosterischem Liganden hatte sich jedoch gezeigt, dass alle untersuchten Allosteren bei unterschiedlicher Beeinflussung der Wirksamkeit von Pilocarpin dessen intrinsische Aktivität verminderten oder ganz aufhoben (Zahn et al., *J Pharmacol Exp Ther*, **301**:720-728, 2002; Klemt, Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte festgestellt werden, ob die intrinsische Aktivität von Acetylcholin ebenfalls empfindlich ist gegenüber einer allosterischen Modulation. Durch Messung der [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-Zellen, die stabil mit dem Gen für den humanen M₂-Rezeptor transfiziert waren, wurde der Einfluss strukturell unterschiedlicher allosterischer Modulatoren (u. a. Alkan-bis-Ammoniumverbindungen, Strychnin und Derivate, Caracurine, Alcuronium, Duo3) auf die Wirksamkeit und die intrinsische Aktivität von Acetylcholin am M₂-Rezeptor untersucht. Alle Substanzen führten zu einer Abnahme der Wirksamkeit von Acetylcholin, was sich in einer Verschiebung seiner Konzentrations-Effekt-Kurven zu höheren Konzentrationen zeigte. Bei der Hälfte der allosterischen Modulatoren gab es im untersuchten Konzentrationsbereich

Hinweise auf die Bildung ternärer Komplexe. Die maximale Acetylcholin-induzierte G-Protein-Aktivierung blieb jedoch in allen Fällen im Wesentlichen unbeeinflusst. Eine Modulation der Wirksamkeit von Acetylcholin durch Allosterie war demnach ohne eine gleichzeitige Veränderung der intrinsischen Aktivität möglich.

Um der Frage nachzugehen, ob die allosterische Senkbarkeit der intrinsischen Aktivität von Pilocarpin eine spezifische Substanzeigenschaft Pilocarpins ist oder ob dies auch bei anderen Partial- oder auch Vollagonisten möglich ist, wurden Carbachol, Oxotremorin, Oxotremorin M (Vollagonisten) und McN-A-343 (Partialagonist) zusammen mit ausgewählten Allosteren in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten eingesetzt. Es zeigte sich, dass die intrinsische Aktivität von McN-A-343 und Carbachol durch die allosterischen Modulatoren ebenfalls vermindert wurde. Das Ausmaß der Reduktion war jedoch geringer als das bei Pilocarpin beobachtete. Die Verminderung der Agonist-induzierten M₂-Rezeptor-vermittelten G-Protein-Aktivierung durch Allosterie war demnach nicht nur bei Partialagonisten, sondern auch bei Vollagonisten möglich, trat dort allerdings nicht so häufig auf und war weniger stark ausgeprägt.

Da in den funktionellen Experimenten nicht direkt die Bindung des Agonisten gemessen wurde, sondern die erste Stufe der Rezeptoraktivierung, wurden in Radioligandbindungsstudien [³H]NMS und Acetylcholin bzw. Pilocarpin kompetitiv in An- und Abwesenheit eines Allostere eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass die funktionellen Experimente es erlaubten, Affinitätsänderungen von Testsubstanzen zutreffend abzuleiten.

Zwischen dem Affinitätsmuster der Allosterie am [³H]NMS- und am Acetylcholin-besetzten Rezeptor bestand keine Korrelation. Aufgrund einer Kenntnis der Kooperativität allosterischer Modulatoren mit dem Antagonisten [³H]NMS an muskarinischen Rezeptoren kann demzufolge nicht der Alloster-Effekt auf die Acetylcholin-Affinität vorhergesagt werden. Die Konformationsveränderungen des M₂-Rezeptors bei der Bindung eines Agonisten einerseits und eines Antagonisten andererseits gehen offenbar mit grundlegenden Veränderungen der allosterischen Bindungsstelle einher.

6 Literaturverzeichnis

Aimi N, Sakai SI, and Ban Y (1989) In *The alkaloids* (Brossi A ed) Academic Press, San Diego, Vol. 36, Chapter 1, p 43.

Akam EC, Challiss RA, and Nahorski SR (2001) $G_{q/11}$ and $G_{i/o}$ activation profiles in CHO cells expressing human muscarinic acetylcholine receptors: dependence on agonist as well as receptor-subtype. *Br J Pharmacol* **132**:950-958.

Akam EC, Challiss RA, and Nahorski SR (2005) Inverse agonist activity of atropine at human M_2 and M_4 muscarinic acetylcholine receptors revealed by [35 S]GTP γ S binding. *Br J Pharmacol* **119**:6P.

Allman K, Page KM, Curtis CA, and Hulme EC (2000) Scanning mutagenesis identifies amino acid side chains in transmembrane domain 5 of the M_1 muscarinic receptor that participate in binding the acetyl methyl group of acetylcholine. *Mol Pharmacol* **58**:175-184.

Ariëns EJ (1966) Eine Molekulargrundlage für die Wirkung von Pharmaka, I. Teil. *Arzneimittelforschung* **16**:1376-1395.

Arunlakshana O and Schild HO (1959) Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol* **14**:48-58.

Ataie A (2000) Sondierung der Überlappung des Haftareals des M_2 -prävalenten Antagonisten AF-DX-384 mit der allosterischen Bindungsstelle von M_2 -Acetylcholinrezeptoren unter Verwendung einseitig verkürzter Alkan-bis-Ammonium-Verbindungen. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Baldwin JM, Schertler GF, and Unger VM (1997) An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J Mol Biol* **272**:144-164.

Barlow R and Blake JF (1989) Hill coefficients and the logistic equation. *Trends Pharmacol Sci* **10**:440-441.

Barlow RB (1964) *Introduction to Chemical Pharmacology*. Methuen, London.

Barocelli E, Ballabeni V, Bertoni S, Dallanocce C, De Amici M, De Micheli C, and Impicciatore M (2000) New analogues of oxotremorine and oxotremorine-M: estimation of their in vitro affinity and efficacy at muscarinic receptor subtypes. *Life Sci* **67**:717-723.

Barr AJ, Brass LF, and Manning DR (1997) Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor G protein coupling. *J Biol Chem* **272**:2223-2229.

Ben-Bassat A, Lavie D, Edery H, and Porath G (1971) Quaternary pilocarpine derivatives acting as acetylcholine antagonists. *J Med Chem* **14**:1066-1069.

Bennet J and Yamamura H (1985) Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding methods, in *Neurotransmitter receptor binding*. Raven Press, New York.

Bernauer K, Berlage F, von Philipsborn W, Schmid H., and Karrer P (1959) Über die Konstitution der Kalebassen-Alkaloide C-Dihydrotoxiferin und C-Toxiferin-I und des Caracurin-V aus *Strychnos toxifera*. Synthetische Versuche mit Wieland-Gumlich-Aldehyd als Ausgangsstoff. *Helv Chim Acta* **41**:2293-2308.

Birdsall NJ, Burgen AS, and Hulme EC (1978) The binding of agonists to brain muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **14**:723-736.

Birdsall NJ, Farries T, Gharagozloo P, Kobayashi S, Kuonen D, Lazareno S, Popham A, and Sugimoto M (1997) Selective allosteric enhancement of the binding and actions of acetylcholine at muscarinic receptor subtypes. *Life Sci* **60**:1047-1052.

Birdsall NJ, Farries T, Gharagozloo P, Kobayashi S, Lazareno S, and Sugimoto M (1999) Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogs and acetylcholine at muscarinic receptors: functional studies. *Mol Pharmacol* **55**:778-786.

Birdsall NJ and Lazareno S (2005) Allosterism at muscarinic receptors: ligands and mechanisms. *Mini Rev Med Chem* **5**:523-543.

Birdsall NJ (1993) G protein coupled receptors, in *Encyclopadia of Molecular Biology* (Kendrew J ed) Blackwell, Oxford, UK.

Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, and Brann MR (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* **237**:527-532.

Bonner TI, Young AC, Brann MR, and Buckley NJ (1988) Cloning and expression of the human and rat M₅ muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* **1**:403-410.

Buckley NJ, Bonner TI, Buckley CM, and Brann MR (1989) Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Mol Pharmacol* **35**:469-476.

Buller S (2002) Identifizierung von Rezeptorepitopen für die Subtyp-selektive Interaktion allosterischer Modulatoren mit muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren anhand von Mutagenese-Untersuchungen. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Buller S, Zlotos DP, Mohr K, and Ellis J (2002) Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: a single amino acid in transmembrane region 7 is critical to the subtype selectivities of caracurine V derivatives and alkane-bisammonium ligands. *Mol Pharmacol* **61**:160-168.

Burford NT, Wang D, and Sadee W (2000) G-protein coupling of mu-opioid receptors (OP3): elevated basal signalling activity. *Biochem J* **348 Pt 3**:531-537.

Caulfield MP and Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* **50**:279-290.

Cheng Y and Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**:3099-3108.

Chidiac P and Wells JW (1992) Effects of adenyly nucleotides and carbachol on cooperative interactions among G proteins. *Biochemistry* **31**:10908-10921.

Christopoulos A, Grant MK, Ayoubzadeh N, Kim ON, Sauerberg P, Jeppesen L, and El Fakahany EE (2001) Synthesis and pharmacological evaluation of dimeric muscarinic acetylcholine receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **298**:1260-1268.

Christopoulos A and Kenakin T (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* **54**:323-374.

- Clark AL and Mitchelson F (1976) The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. *Br J Pharmacol* **58**:323-331.
- Cohen FR, Lazareno S, and Birdsall NJ (1996) The effects of saponin on the binding and functional properties of the human adenosine A₁ receptor. *Br J Pharmacol* **117**:1521-1529.
- Costa T, Ogino Y, Munson PJ, Onaran HO, and Rodbard D (1992) Drug efficacy at guanine nucleotide-binding regulatory protein-linked receptors: thermodynamic interpretation of negative antagonism and of receptor activity in the absence of ligand. *Mol Pharmacol* **41**:549-560.
- Curtis CA, Wheatley M, Bansal S, Birdsall NJ, Eveleigh P, Pedder EK, Poyner D, and Hulme EC (1989) Propylbenzilylcholine mustard labels an acidic residue in transmembrane helix 3 of the muscarinic receptor. *J Biol Chem* **264**:489-495.
- Daiß JO, Duda-Johner S, Burschka C, Holzgrabe U, Mohr K, and Tacke R (2002) N⁺/Si replacement as a tool for probing the pharmacophore of allosteric modulators of muscarinic M₂ receptors: synthesis, allosteric potency, and positive cooperativity of silicon-based W84 derivatives. *Organometallics* **21**:803-811.
- Dallanoce C, Conti P, De Amici M, De Micheli C, Barocelli E, Chiavarini M, Ballabeni V, Bertoni S, and Impicciatore M (1999) Synthesis and functional characterization of novel derivatives related to oxotremorine and oxotremorine-M. *Bioorg Med Chem* **7**:1539-1547.
- Dancila I (2003) Untersuchung zur allosterischen Interaktion zwischen der Hybridspezies STR6NAPH und [³H]N-Methylscopolamin an muskarinischen M₂-Rezeptoren. *Diplomarbeit*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Darvesh S, Hopkins DA, and Geula C (2003) Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci* **4**:131-138.
- De Lean A, Stadel JM, and Lefkowitz RJ (1980) A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **255**:7108-7117.
- DeBlasi A, O'Reilly K, and Motulsky HJ (1989) Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci* **10**:227-229.
- Doležal V, Tuček S, and Hynie S (1989) Effects of pertussis toxin suggest a role for G-proteins in the inhibition of acetylcholine release from rat myenteric plexus by opioid and presynaptic muscarinic receptors. *Eur J Neurosci* **1**:127-131.
- Doležal V and Tuček S (1998) The effects of brucine and alcuronium on the inhibition of [³H]acetylcholine release from rat striatum by muscarinic receptor agonists. *Br J Pharmacol* **124**:1213-1218.
- Dong GZ, Kameyama K, Rinken A, and Haga T (1995) Ligand binding properties of muscarinic acetylcholine receptor subtypes (m1-m5) expressed in baculovirus-infected insect cells. *J Pharmacol Exp Ther* **274**:378-384.
- Dörje F, Levey AI, and Brann MR (1991) Immunological detection of muscarinic receptor subtype proteins (m1-m5) in rabbit peripheral tissues. *Mol Pharmacol* **40**:459-462.
- Dunnett CW (1955) A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J Am Stat Assoc* **50**:1096-1121.
- Eckstein N (2004) Pharmakologische und biochemische Untersuchungen zur allosterischen Modulation Agonist-induzierter Wirkungen an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrichs-Wilhelms-Universität Bonn.

Eglen RM, Choppin A, and Watson N (2001) Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sci* **22**:409-414.

Ehlert FJ (1988a) Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol* **33**:187-194.

Ehlert FJ (1988b) Gallamine allosterically antagonizes muscarinic receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase activity in the rat myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* **247**:596-602.

Ehlert FJ, Delen FM, Yun SH, and Liem HA (1990) The interaction of amitriptyline, doxepin, imipramine and their *N*-methyl quaternary ammonium derivatives with subtypes of muscarinic receptors in brain and heart. *J Pharmacol Exp Ther* **253**:13-19.

Ellis J, Huyler J, and Brann MR (1991) Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* **42**:1927-1932.

Ellis J and Seidenberg M (1992) Two allosteric modulators interact at a common site on cardiac muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **42**:638-641.

Ellis J, Seidenberg M, and Brann MR (1993) Use of chimeric muscarinic receptors to investigate epitopes involved in allosteric interactions. *Mol Pharmacol* **44**:583-588.

Ellis J (1997) Allosteric binding sites on muscarinic receptors. *Drug Development Research* **40**:193-204.

Ellis J and Seidenberg M (2000) Interactions of alcuronium, TMB-8, and other allosteric ligands with muscarinic acetylcholine receptors: studies with chimeric receptors. *Mol Pharmacol* **58**:1451-1460.

Elnatan A and Mitchelson F (1993) The interaction of McN-A-343 with muscarine receptors in cardiac and smooth muscle. *Biochem Pharmacol* **46**:993-1003.

Evans T, Hepler JR, Masters SB, Brown JH, and Harden TK (1985) Guanine nucleotide regulation of agonist binding to muscarinic cholinergic receptors. Relation to efficacy of agonists for stimulation of phosphoinositide breakdown and Ca²⁺ mobilization. *Biochem J* **232**:751-757.

Felder CC (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* **9**:619-625.

Ford DJ, Essex A, Spalding TA, Burstein ES, and Ellis J (2002) Homologous mutations near the junction of the sixth transmembrane domain and the third extracellular loop lead to constitutive activity and enhanced agonist affinity at all muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **300**:810-817.

Fraser CM, Wang CD, Robinson DA, Gocayne JD, and Venter JC (1989) Site-directed mutagenesis of m1 muscarinic acetylcholine receptors: conserved aspartic acids play important roles in receptor function. *Mol Pharmacol* **36**:840-847.

Gether U and Kobilka BK (1998) G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* **273**:17979-17982.

Ghanouni P, Gryczynski Z, Steenhuis JJ, Lee TW, Farrrens DL, Lakowicz JR, and Kobilka BK (2001) Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor. *J Biol Chem* **276**:24433-24436.

Gharagozloo P, Lazareno S, Miyauchi M, Popham A, and Birdsall NJ (2002) Substituted pentacyclic carbazolones as novel muscarinic allosteric agents: synthesis and structure-affinity and cooperativity relationships. *J Med Chem* **45**:1259-1274.

- Gierschik P, Moghtader R, Straub C, Dieterich K, and Jakobs KH (1991) Signal amplification in HL-60 granulocytes. Evidence that the chemotactic peptide receptor catalytically activates guanine-nucleotide-binding regulatory proteins in native plasma membranes. *Eur J Biochem* **197**:725-732.
- Gilsbach R, Großmüller M, Alptüzün V, Erciyas E, Tränkle C, Holzgrabe U, and Mohr K (2003) Cooperative interactions at M₂ muscarinic acetylcholine receptors: structure/activity relationships in stepwise shortening bispyridinium- and bis(ammonio)alkane-type allosteric modulators. *Neurochem Res* **28**(3/4):667-673.
- Gnagey A and Ellis J (1996) Allosteric regulation of the binding of [³H]acetylcholine to m2 muscarinic receptors. *Biochem Pharmacol* **52**:1767-1775.
- Gnagey AL, Seidenberg M, and Ellis J (1999) Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **56**:1245-1253.
- Gomez J, Zhang L, Kostenis E, Felder C, Bymaster F, Brodtkin J, Shannon H, Xia B, Deng C, and Wess J (1999) Enhancement of D₁ dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M₄ muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:10483-10488.
- Gomez J, Shannon H, Kostenis E, Felder C, Zhang L, Brodtkin J, Grinberg A, Sheng H, and Wess J (1999) Pronounced pharmacologic deficits in M₂ muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:1692-1697.
- Goyal RK and Rattan S (1978) Neurohumoral, hormonal, and drug receptors for the lower esophageal sphincter. *Gastroenterology* **74**:598-619.
- Grando SA (1997) Biological functions of keratinocyte cholinergic receptors. *J Investig Dermatol Symp Proc* **2**:41-48.
- Großmüller M (2003) Interaktion allosterischer Modulatoren mit dem Agonisten [³H]Oxotremorin M und dem Antagonisten [³H]N-Methylscopolamin an muskarinischen M₂-Rezeptoren. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Guo ZD, Suga H, Okamura M, Takeda S, and Haga T (2001) Receptor-Galpa fusion proteins as a tool for ligand screening. *Life Sci* **68**:2319-2327.
- Hammer R, Berrie CP, Birdsall NJ, Burgen AS, and Hulme EC (1980) Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* **283**:90-92.
- Han SJ, Hamdan FF, Kim SK, Jacobson KA, Bloodworth LM, Li B, and Wess J (2005) Identification of an agonist-induced conformational change occurring adjacent to the ligand-binding pocket of the M₃ muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* **280**:34849-34858.
- Harrison C and Traynor JR (2003) The [³⁵S]GTPgammaS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci* **74**:489-508.
- Hepler JR and Gilman AG (1992) G proteins. *Trends Biochem Sci* **17**:383-387.
- Herold CL, Qi AD, Harden TK, and Nicholas RA (2004) Agonist versus antagonist action of ATP at the P2Y₄ receptor is determined by the second extracellular loop. *J Biol Chem* **279**:11456-11464.
- Hibert MF, Trumpp-Kallmeyer S, Bruinvels A, and Hoflack J (1991) Three-dimensional models of neurotransmitter G-binding protein-coupled receptors. *Mol Pharmacol* **40**:8-15.
- Hilf G, Gierschik P, and Jakobs KH (1989) Muscarinic acetylcholine receptor-stimulated binding of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) to guanine-nucleotide-binding proteins in cardiac membranes. *Eur J Biochem*. **186**:725-731.

Hilf G and Jakobs KH (1992) Agonist-independent inhibition of G protein activation by muscarinic acetylcholine receptor antagonists in cardiac membranes. *Eur J Pharmacol* **225**:245-252.

Hill AV (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol (Proc)* **40**:iv-vii.

Holzgrabe U and Mohr K (1998) Allosteric modulators of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors. *Drug Discovery Today* **3**:214-222.

Horstman DA, Brandon S, Wilson AL, Guyer CA, Cragoe EJ, Jr., and Limbird LE (1990) An aspartate conserved among G-protein receptors confers allosteric regulation of alpha 2-adrenergic receptors by sodium. *J Biol Chem* **265**:21590-21595.

Huang XP, Prilla S, Mohr K, and Ellis J (2005) Critical amino acid residues of the common allosteric site on the M₂ muscarinic acetylcholine receptor: more similarities than differences between the structurally divergent agents gallamine and bis(ammonio)alkane-type hexamethylene-bis-[dimethyl-(3-phthalimidopropyl)ammonium]dibromide. *Mol Pharmacol* **68**:769-778.

Hubbell WL, Altenbach C, Hubbell CM, and Khorana HG (2003) Rhodopsin structure, dynamics, and activation: a perspective from crystallography, site-directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking. *Adv Protein Chem* **63**:243-290.

Hulme EC, Berrie CP, Birdsall NJ, and Burgen AS (1981) Two populations of binding sites for muscarinic antagonists in the rat heart. *Eur J Pharmacol*. **73**:137-142.

Hulme EC, Birdsall NJ, and Buckley NJ (1990) Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**:633-673.

Hulme EC, Lu ZL, Saldanha JW, and Bee MS (2003) Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans* **31**:29-34.

Jakubík J, Bacakova L, El Fakahany EE, and Tuček S (1995) Subtype selectivity of the positive allosteric action of alcuronium at cloned M₁-M₅ muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **274**:1077-1083.

Jakubík J, Bacakova L, Lisa V, El Fakahany EE, and Tucke S (1996) Activation of muscarinic acetylcholine receptors via their allosteric binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** :8705-8709.

Jakubík J, Bacakova L, El Fakahany EE, and Tuček S (1997) Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **52**:172-179.

Jakubík J, Haga T, and Tuček S (1998) Effects of an agonist, allosteric modulator, and antagonist on guanosine-gamma-[³⁵S]thiotriphosphate binding to liposomes with varying muscarinic receptor/G_o protein stoichiometry. *Mol Pharmacol* **54**:899-906.

Jakubík J, Krejčí A, and Doležal V (2005) Asparagine, valine, and threonine in the third extracellular loop of muscarinic receptor have essential roles in the positive cooperativity of strychnine-like allosteric modulators. *J Pharmacol Exp Ther* **313**:688-696.

Jöhren K and Höltje HD (2002) A model of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor. *J Comput Aided Mol Des* **16**:795-801.

Jöhren K (2004). Der muskarinerge M₂-Rezeptor - Theoretische Betrachtungen des Bindungsmodus orthosterischer und allosterischer Liganden. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Kawashima K and Fujii T (2000) Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Ther* **86**:29-48.

- Kenakin T (1995) Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* **16**:232-238.
- Kenakin T (1997a) Agonist-specific receptor conformations. *Trends Pharmacol Sci* **18**:416-417.
- Kenakin T (1997b) Allotopic, noncompetitive, and irreversible antagonism, in *Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction*, pp 374-395.
- Kenakin T (2002) Efficacy at G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Drug Discov* **1**:103-110.
- Kenakin T (2003) Ligand-selective receptor conformations revisited: the promise and the problem. *Trends Pharmacol Sci* **24**:346-354.
- Kent RS, De Lean A, and Lefkowitz RJ (1980) A quantitative analysis of beta-adrenergic receptor interactions: resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modeling of ligand binding data. *Mol Pharmacol* **17**:14-23.
- Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Unger RE, Kriegsmann J, Kilbinger H, and Wessler I (2001) The non-neuronal cholinergic system in the endothelium: evidence and possible pathobiological significance. *Jpn J Pharmacol* **85**:24-28.
- Klco JM, Wiegand CB, Narzinski K, and Baranski TJ (2005) Essential role for the second extracellular loop in C5a receptor activation. *Nat Struct Mol Biol* **12**:320-326.
- Klemt D (2005). Allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung am muskarinischen M₂- und M₄-Acetylcholin-Rezeptor. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Krejčí A and Tuček S (2002) Quantitation of mRNAs for M₁ to M₅ subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. *Mol Pharmacol* **61**:1267-1272.
- Krejčí A, Michal P, Jakubík J, Ricny J, and Doležal V (2004) Regulation of signal transduction at M₂ muscarinic receptor. *Physiol Res* **53** (Suppl 1):S131-S140.
- Kruh J (1982) Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem* **42**:65-82.
- Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, and Kangawa K (1986) Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **323**:411-416.
- Langmead CJ, Fry VA, Forbes IT, Branch CL, Christopoulos A, Wood MD, and Herdon HJ (2005) Probing the molecular mechanism of interaction between AC-42 and the muscarinic M₁ receptor: Direct pharmacological evidence that AC-42 is an allosteric agonist. *Mol Pharmacol* [Epub ahead of print]
- Lanzafame A, Christopoulos A, and Mitchelson F (1996) Interactions of agonists with an allosteric antagonist at muscarinic acetylcholine M₂ receptors. *Eur J Pharmacol* **316**:27-32.
- Lanzafame A, Christopoulos A, and Mitchelson F (1997) 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.
- Lazareno S, Farries T, and Birdsall NJ (1993) Pharmacological characterization of guanine nucleotide exchange reactions in membranes from CHO cells stably transfected with human muscarinic receptors m1-m4. *Life Sci* **52**:449-456.
- Lazareno S and Birdsall NJ (1995) Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors: interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **48**:362-378.

Lazareno S (1999) Measurement of agonist-stimulated [³⁵S]GTP gamma S binding to cell membranes. *Methods Mol Biol* **106**:231-245.

Lazareno S, Birdsall B, Fukazawa T, Gharagozloo P, Hashimoto T, Kuwano H, Popham A, Sugimoto M, and Birdsall NJ (1999) Allosteric effects of four stereoisomers of a fused indole ring system with [³H]N-methylscopolamine and acetylcholine at M₁-M₄ muscarinic receptors. *Life Sci* **64**:519-526.

Lazareno S, Popham A, and Birdsall NJ (2000) Allosteric interactions of staurosporine and other indolocarbazoles with N-[methyl-3H]scopolamine and acetylcholine at muscarinic receptor subtypes: identification of a second allosteric site. *Mol Pharmacol* **58**:194-207.

Lazareno S, Popham A, and Birdsall NJ (2002) Analogs of WIN 62,577 define a second allosteric site on muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **62**:1492-1505.

Lazareno S, Doležal V, Popham A, and Birdsall NJ (2004) Thiochrome enhances acetylcholine affinity at muscarinic M₄ receptors: receptor subtype selectivity via cooperativity rather than affinity. *Mol Pharmacol* **65**:257-266.

Lee NH and El Fakahany EE (1991) Allosteric interactions at the m1, m2 and m3 muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **256**:468-479.

Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P, and Costa T (1993) Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Trends Pharmacol Sci* **14**:303-307.

Leppik RA, Miller RC, Eck M, and Paquet JL (1994) 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.

Levey AI (1993) Immunological localization of M₁ - M₂ muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. *Life Sci* **52**:441-448.

Lew MJ and Angus JA (1995) Analysis of competitive agonist-antagonist interactions by nonlinear regression. *Trends Pharmacol Sci* **16**:328-337.

Li M, Yasuda RP, Wall SJ, Wellstein A, and Wolfe BB (1991) Distribution of m2 muscarinic receptors in rat brain using antisera selective for m2 receptors. *Mol Pharmacol* **40**:28-35.

Lorenzen A, Beukers MW, van der Graaf PH, Lang H, Muijlwijk-Koezen J, de Groote M, Menge W, Schwabe U, and Ijzerman AP (2002) Modulation of agonist responses at the A(1) adenosine receptor by an irreversible antagonist, receptor-G protein uncoupling and by the G protein activation state. *Biochem Pharmacol* **64**:1251-1265.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**:265-275.

Lu ZL and Hulme EC (1999) The functional topography of transmembrane domain 3 of the M₁ muscarinic acetylcholine receptor, revealed by scanning mutagenesis. *J Biol Chem* **274**:7309-7315.

Lu ZL, Saldanha JW, and Hulme EC (2001) Transmembrane domains 4 and 7 of the M₁ muscarinic acetylcholine receptor are critical for ligand binding and the receptor activation switch. *J Biol Chem* **276**:34098-34104.

Lu ZL, Saldanha JW, and Hulme EC (2002) Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. *Trends Pharmacol Sci* **23**:140-146.

Lullmann H, Ohnesorge FK, Schauwecker GC, and Wassermann O (1969) Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *Eur J Pharmacol* **6**:241-247.

Lüllman H, Mohr K, and Wehling M (2003) *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*. Thieme Verlag, Stuttgart.

Maass A and Mohr K (1996) Opposite effects of alcuronium on agonist and on antagonist binding to muscarinic receptors. *Eur J Pharmacol* **305**:231-234.

Massotte D and Kieffer BL (2005) The second extracellular loop: a damper for G protein-coupled receptors? *Nat Struct Mol Biol* **12**:287-288.

Masuda MO, Levin M, De Oliveira SF, Dos Santos Costa PC, Bergami PL, Dos Santos Almeida NA, Pedrosa RC, Ferrari I, Hoebeke J, and Campos de Carvalho AC (1998) Functionally active cardiac antibodies in chronic Chagas' disease are specifically blocked by Trypanosoma cruzi antigens. *FASEB J* **12**:1551-1558.

Matsui H, Lazareno S, and Birdsall NJ (1995) Probing of the location of the allosteric site on m1 muscarinic receptors by site-directed mutagenesis. *Mol Pharmacol* **47**:88-98.

Matsui M, Motomura D, Karasawa H, Fujikawa T, Jiang J, Komiya Y, Takahashi S, and Taketo MM (2000) Multiple functional defects in peripheral autonomic organs in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor gene for the M₃ subtype. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**:9579-9584.

May LT, Lin Y, Sexton PM, and Christopoulos A (2005) Regulation of M₂ muscarinic acetylcholine receptor expression and signaling by prolonged exposure to allosteric modulators. *J Pharmacol Exp Ther* **312**:382-390.

McKinney M, Miller JH, Gibson VA, Nickelson L, and Aksoy S (1991) Interactions of agonists with M₂ and M₄ muscarinic receptor subtypes mediating cyclic AMP inhibition. *Mol Pharmacol* **40**:1014-1022.

Meng EC and Bourne HR (2001) Receptor activation: what does the rhodopsin structure tell us? *Trends Pharmacol Sci* **22**:587-593.

Michal P, Lysikova M, and Tuček S (2001) Dual effects of muscarinic M₂ acetylcholine receptors on the synthesis of cyclic AMP in CHO cells: dependence on time, receptor density and receptor agonists. *Br J Pharmacol* **132**:1217-1228.

Milligan G, Bond RA, and Lee M (1995) Inverse agonism: pharmacological curiosity or potential therapeutic strategy? *Trends Pharmacol Sci* **16**:10-13.

Milligan G (2003) Principles: extending the utility of [³⁵S]GTP gamma S binding assays. *Trends Pharmacol Sci* **24**:87-90.

Mohr M, Heller E, Ataie A, Mohr K, and Holzgrabe U (2004) Development of a new type of allosteric modulator of muscarinic receptors: hybrids of the antagonist AF-DX 384 and the hexamethonio derivative W84. *J Med Chem* **47**:3324-3327.

Molenaar P and Polak RL (1980) Inhibition of acetylcholine release by activation of acetylcholine receptors. *Prog Pharmacol* **3/4**:39-44.

Monod J, Wyman J, and Changeux JP (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol* **12**:88-118.

Monod J, Changeux JP, and Jacob F (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol* **6**:306-329.

Motulsky HJ (1995) *Intuitive Biostatistics*. Oxford University Press, Inc., New York.

Motulsky H (1996) *The GraphPad guide to nonlinear regression*. San Diego.

- Munshi R, Pang IH, Sternweis PC, and Linden J (1991) A₁ adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins G_{i1}, G_{i2}, and G_o. *J Biol Chem* **266**:22285-22289.
- Muth M, Bender W, Scharfenstein O, Holzgrabe U, Balatkova E, Tränkle C, and Mohr K (2003) Systematic development of high affinity bis(ammonio)alkane-type allosteric enhancers of muscarinic ligand binding. *J Med Chem* **46**:1031-1040.
- Muth M, Sennwitz M, Mohr K, and Holzgrabe U (2005) Muscarinic allosteric enhancers of ligand binding: pivotal pharmacophoric elements in hexamethonio-type agents. *J Med Chem* **48**:2212-2217.
- Mutschler E, Moser U, Wess J, and Lambrecht G (1995) Muscarinic receptor subtypes-pharmacological, molecular biological and therapeutical aspects. *Pharm Acta Helv* **69**:243-258.
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H.K., and Schäfer-Korting M. (2001) *Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Negishi M, Namba T, Sugimoto Y, Irie A, Katada T, Narumiya S, and Ichikawa A (1993) Opposite coupling of prostaglandin E receptor EP3C with G_s and G_o. Stimulation of G_s and inhibition of G_o. *J Biol Chem* **268**:26067-26070.
- Newman-Tancredi A, Cussac D, Audinot V, Pasteau V, Gavaudan S, and Millan MJ (1999) G protein activation by human dopamine D₃ receptors in high-expressing Chinese hamster ovary cells: A guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)- triphosphate binding and antibody study. *Mol Pharmacol* **55**:564-574.
- Olianas MC, Onali P, Neff NH, and Costa E (1983) Adenylate cyclase activity of synaptic membranes from rat striatum. Inhibition by muscarinic receptor agonists. *Mol Pharmacol* **23**:393-398.
- Olianas MC and Onali P (1991) Muscarinic stimulation of adenylate cyclase activity of rat olfactory bulb. I. Analysis of agonist sensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* **259**:673-679.
- Onaran HO, Costa T, and Rodbard D (1993) Beta gamma subunits of guanine nucleotide-binding proteins and regulation of spontaneous receptor activity: thermodynamic model for the interaction between receptors and guanine nucleotide-binding protein subunits. *Mol Pharmacol* **43**:245-256.
- Ott TR, Troskie BE, Roeske RW, Illing N, Flanagan CA, and Millar RP (2002) Two mutations in extracellular loop 2 of the human GnRH receptor convert an antagonist to an agonist. *Mol Endocrinol* **16**:1079-1088.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le TI, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **289**:739-745.
- Peter JC, Wallukat G, Tugler J, Maurice D, Roegel JC, Briand JP, and Hoebeke J (2004) Modulation of the M₂ muscarinic acetylcholine receptor activity with monoclonal anti-M₂ receptor antibody fragments. *J Biol Chem* **279**:55697-55706.
- Porter JE, Hwa J, and Perez DM (1996) Activation of the alpha1b-adrenergic receptor is initiated by disruption of an interhelical salt bridge constraint. *J Biol Chem* **271**:28318-28323.
- Potter LT, Ballesteros LA, Bichajian LH, Ferrendelli CA, Fisher A, Hanchett HE, and Zhang R (1991) Evidence of paired M₂ muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **39**:211-221.
- Prilla S, Jöhren K, Höltje HD, Ellis J, and Mohr K (2005) Muscarinic allosteric site: identification of a tryptophan that is essential for the M₂/M₅ subtype-independent baseline affinity of an archetypal allosteric agent. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol* **371**:R25.

Proška J and Tuček S (1994) Mechanisms of steric and cooperative actions of alcuronium on cardiac muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **45**:709-717.

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

Proška J and Tuček S (1996) Positive allosteric action of eburnamonine on cardiac muscarinic acetylcholine receptors. *Eur J Pharmacol* **305**:201-205.

Raasch A, Scharfenstein O, Tränkle C, Holzgrabe U, and Mohr K (2002) Elevation of ligand binding to muscarinic M₂ acetylcholine receptors by bis(ammonio)alkane-type allosteric modulators. *J Med Chem* **45**:3809-3812.

Racké K and Matthiesen S (2004) The airway cholinergic system: physiology and pharmacology. *Pulm Pharmacol Ther* **17**:181-198.

Ringdahl B (1987) Selectivity of partial agonists related to oxotremorine based on differences in muscarinic receptor reserve between the guinea pig ileum and urinary bladder. *Mol Pharmacol* **31**:351-356.

Römpf Online (2005), *Version 2.9*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York.

Roskowski AP (1961) An unusual type of sympathetic ganglionic stimulant. *Br J Pharmacol* **132**:156-170.

Rouse ST and Levey AI (1997) Muscarinic acetylcholine receptor immunoreactivity after hippocampal commissural/associational pathway lesions: evidence for multiple presynaptic receptor subtypes. *J Comp Neurol* **380**:382-394.

Rouse ST, Hamilton SE, Potter LT, Nathanson NM, and Conn PJ (2000) Muscarinic-induced modulation of potassium conductances is unchanged in mouse hippocampal pyramidal cells that lack functional M₁ receptors. *Neurosci Lett* **278**:61-64.

Sakmar TP, Menon ST, Marin EP, and Awad ES (2002) Rhodopsin: insights from recent structural studies. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**:443-484.

Schröter A, Tränkle C, and Mohr K (2000) Modes of allosteric interactions with free and [³H]N-methylscopolamine-occupied muscarinic M₂ receptors as deduced from buffer-dependent potency shifts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**:512-519.

Schulz A, Bruns K, Henklein P, Krause G, Schubert M, Gudermann T, Wray V, Schultz G, and Schöneberg T (2000) Requirement of specific intrahelical interactions for stabilizing the inactive conformation of glycoprotein hormone receptors. *J Biol Chem* **275**:37860-37869.

Sealfon SC, Chi L, Ebersole BJ, Rodic V, Zhang D, Ballesteros JA, and Weinstein H (1995) Related contribution of specific helix 2 and 7 residues to conformational activation of the serotonin 5-HT_{2A} receptor. *J Biol Chem* **270**:16683-16688.

Selley DE, Liu Q, and Childers SR (1998) Signal transduction correlates of mu opioid agonist intrinsic efficacy: receptor-stimulated [³⁵S]GTP gamma S binding in mMOR-CHO cells and rat thalamus. *J Pharmacol Exp Ther* **285**:496-505.

Senogles SE, Spiegel AM, Padrell E, Iyengar R, and Caron MG (1990) Specificity of receptor-G protein interactions. Discrimination of G_i subtypes by the D₂ dopamine receptor in a reconstituted system. *J Biol Chem* **265**:4507-4514.

Spalding TA, Birdsall NJ, Curtis CA, and Hulme EC (1994) Acetylcholine mustard labels the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* **269**:4092-4097.

Spalding TA, Burstein ES, Henderson SC, Ducote KR, and Brann MR (1998) Identification of a ligand-dependent switch within a muscarinic receptor. *J Biol Chem* **273**:21563-21568.

Spalding TA, Trotter C, Skjaerbaek N, Messier TL, Currier EA, Burstein ES, Li D, Hacksell U, and Brann MR (2002) Discovery of an ectopic activation site on the M₁ muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* **61**:1297-1302.

Stockton JM, Birdsall NJ, Burgen AS, and Hulme EC (1983) Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. *Mol Pharmacol* **23**:551-557.

Sur C, Mallorga PJ, Wittmann M, Jacobson MA, Pascarella D, Williams JB, Brandish PE, Pettibone DJ, Scolnick EM, and Conn PJ (2003) *N*-desmethylozapine, an allosteric agonist at muscarinic 1 receptor, potentiates *N*-methyl-D-aspartate receptor activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:13674-13679.

Tota MR and Schimerlik MI (1990) Partial agonist effects on the interaction between the atrial muscarinic receptor and the inhibitory guanine nucleotide-binding protein in a reconstituted system. *Mol Pharmacol* **37**:996-1004.

Tränkle C, Kostenis E, Burgmer U, and Mohr K (1996) Search for lead structures to develop new allosteric modulators of muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **279**:926-933.

Tränkle C and Mohr K (1997) Divergent modes of action among cationic allosteric modulators of muscarinic M₂ receptors. *Mol Pharmacol* **51**:674-682.

Tränkle C, Andresen I, Lambrecht G, and Mohr K (1998a) M₂ receptor binding of the selective antagonist AF-DX 384: possible involvement of the common allosteric site. *Mol Pharmacol* **53**:304-312.

Tränkle C, Mies-Klomfass E, Cid MH, Holzgrabe U, and Mohr K (1998b) Identification of a [³H]Ligand for the common allosteric site of muscarinic acetylcholine M₂ receptors. *Mol Pharmacol* **54**:139-145.

Tränkle C, Weyand O, Voigtländer U, Mynett A, Lazareno S, Birdsall NJ, and Mohr K (2003) Interactions of orthosteric and allosteric ligands with [³H]dimethyl-W84 at the common allosteric site of muscarinic M₂ receptors. *Mol Pharmacol* **64**:180-190.

Tränkle C, Dittmann A, Schulz U, Weyand O, Buller S, Jöhren K, Heller E, Birdsall NJ, Holzgrabe U, Ellis J, Höltje HD, and Mohr K (2005) Atypical muscarinic allosteric modulation: cooperativity between modulators and their atypical binding topology in muscarinic M₂ and M₂/M₅ chimeric receptors. *Mol Pharmacol* **68**:1597-1610.

Traynor JR, Clark MJ, and Remmers AE (2002) Relationship between rate and extent of G protein activation: comparison between full and partial opioid agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **300**:157-161.

Tuček S, Doležal V, Folbergrova J, Hynie S, Kolar F, and Ostadal B (1987) Pertussis toxin inhibits negative inotropic and negative chronotropic muscarinic cholinergic effects on the heart. *Pflugers Arch* **408**:167-172.

Tuček S, Musilkova J, Nedoma J, Proška J, Shelkovnikov S, and Vorlicek J (1990) Positive cooperativity in the binding of alcuronium and *N*-methylscopolamine to muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **38**:674-680.

Tuček S (1997) Is the R and R dichotomy real? *Trends Pharmacol Sci* **18**:414-416.

Vogel WK, Mosser VA, Bulseco DA, and Schimerlik MI (1995) Porcine m2 muscarinic acetylcholine receptor-effector coupling in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **270**:15485-15493.

Vogel WK, Sheehan DM, and Schimerlik MI (1997) Site-directed mutagenesis on the m2 muscarinic acetylcholine receptor: the significance of Tyr403 in the binding of agonists and functional coupling. *Mol Pharmacol* **52**:1087-1094.

Voigtländer U, Jöhren K, Mohr M, Raasch A, Tränkle C, Buller S, Ellis J, Höltje HD, and Mohr K (2003) Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: identification of two amino acids in the muscarinic M₂ receptor that account entirely for the M₂/M₅ subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in N-methylscopolamine-occupied receptors. *Mol Pharmacol* **64**:21-31.

Waelbroeck M, Robberecht P, Chatelain P, and Christophe J (1982) Rat cardiac muscarinic receptors. I. Effects of guanine nucleotides on high- and low-affinity binding sites. *Mol Pharmacol* **21**:581-588.

Wang H, Guo ZD, Li Z, and Liu HR (2002) Effects of various muscarinic ligands on M₂AChR-Gi1alpha fusion protein expressed in Sf9 insect cells. *Acta Pharmacol Sin.* **23**:230-236.

Wang W, Guo G, Tang J, Li J, Zhao R, Hjalmarson A, and Fu LX (2000) Stimulatory activity of anti-peptide antibodies against the second extracellular loop of human M₂ muscarinic receptors. *Chin Med J (Engl)* **113**:867-871.

Ward SD, Curtis CA, and Hulme EC (1999) Alanine-scanning mutagenesis of transmembrane domain 6 of the M₁ muscarinic acetylcholine receptor suggests that Tyr381 plays key roles in receptor function. *Mol Pharmacol* **56**:1031-1041.

Waters IW, Aboul-Enein HY, Clark CR, and Borne RF (1973) Cholinergic activity of pilocarpine methiodide. Reinvestigation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **62**:1903-1904.

Wess J, Buhl T, Lambrecht G, and Mutschler E (1990) *Comprehensive Medicinal Chemistry*. Pergamon Press, Oxford.

Wess J, Maggio R, Palmer JR, and Vogel Z (1992) Role of conserved threonine and tyrosine residues in acetylcholine binding and muscarinic receptor activation. A study with m3 muscarinic receptor point mutants. *J Biol Chem* **267**:19313-19319.

Wess J (1993) Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci* **14**:308-313.

Wess J (1996) Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev. Neurobiol.* **10**:69-99.

Wessler I, Kirkpatrick CJ, and Racke K (1998) Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther* **77**:59-79.

Wessler I, Kirkpatrick CJ, and Racke K (1999) The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**:198-205.

Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, and Kirkpatrick CJ (2001) The biological role of non-neuronal acetylcholine in plants and humans. *Jpn J Pharmacol* **85**:2-10.

Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F, Unger R, and Kirkpatrick CJ (2003) The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Sci* **72**:2055-2061.

Yang Q and Lanier SM (1999) Influence of G protein type on agonist efficacy. *Mol Pharmacol* **56**:651-656.

Zahn K (1999). Verminderung der intrinsischen Aktivität eines Muskarin-Rezeptor-Agonisten durch allosterische Modulatoren im Meerschweinchen-Herzvorhof. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Zahn K, Eckstein N, Tränkle C, Sadee W, and Mohr K (2002) Allosteric modulation of muscarinic receptor signaling: alcuronium-induced conversion of pilocarpine from an agonist into an antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* **301**:720-728.

Zlotos DP, Buller S, Holzgrabe U, and Mohr K (2003) Bisquaternary dimers of strychnine and brucine. A new class of potent enhancers of antagonist binding to muscarinic M₂ receptors. *Bioorg Med Chem* **11**:2627-2634.

7 Anhang

Im Ergebnisteil zeigte sich, dass manche ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven in An- und Abwesenheit von Allosteren flachere Kurvensteilheiten als $n_H = 1$ aufwiesen. Da die Kurvenanpassung mit $n_H < 1$ in einigen Fällen signifikant besser war als mit einer Steilheit von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$) und in anderen Fällen nicht (F-Test, $p > 0,05$), stellte sich die Frage, ob das Steigungsmaß, mit dem die Kurven generiert wurden, einen Einfluss hatte auf die Verschiebungsfaktoren und die sich ergebenden Kenngrößen für die Wirkung allosterischer Modulatoren. In diesem Anhang wird anhand von Auswertungen mit verschiedenen Kurvensteilheiten für die mit den Testsubstanzen Atropin, W84 und Naphmethonium erhobenen Messergebnisse gezeigt, dass das Steigungsmaß der Kurven die Verschiebungsfaktoren nicht signifikant beeinflusste (t-Test, $p > 0,05$). Auch die Kenngrößen der Kurven (pEC_{50} , Max, Min) wichen bei unterschiedlichen Hill-Koeffizienten nicht signifikant voneinander ab (t-Test, $p > 0,05$).

7.1 Steilheiten der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven im Einzelversuch und in der Versuchszusammenfassung

Für das im Ergebnisteil dargestellte Teilprojekt „W84 – Einfluss auf die Wirkung von ACh“ (3.3.2.2.1) sind in Tabelle 61 die Hill-Koeffizienten der ACh-Tageskontrollkurven angegeben, die aus einer Kurvenanpassung mit freilaufendem Steigungsmaß resultierten. Bei nur 3 der 15 Kurven ergab sich mit flacher Steigung eine signifikant bessere Kurvenanpassung als mit einem Steilheitsmaß von $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$). Der aus den 15 Kontrollkurven berechnete Mittelwert ($n_H = 0,84 \pm 0,05$) ist hingegen signifikant verschieden von 1 (t-Test, $p < 0,01$). Dies zeigt, dass nicht nur dann eine Kurve mit flacher Steigung resultiert, wenn die Messdaten mehrerer Versuche gemittelt und daran eine neue Kurve angepasst wird, sondern auch bei Mittelung der Hill-Koeffizienten der Einzelkurven. Die Feststellung, dass die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve ein Steilheitsmaß von $n_H < 1$ besitzt, ergibt sich erst dann, wenn die Ergebnisse mehrerer Einzel-

versuche zusammengefasst werden, und ist nicht abhängig von der Art der Mittelwertbildung.

Kontrollkurve	n_H (freilaufend)	Kontrollkurve	n_H (freilaufend)	Kontrollkurve	n_H (freilaufend)
1	0,48 $\pm 0,14^{\#}$	6	0,96 $\pm 0,16$	11	0,88 $\pm 0,17$
2	0,74 $\pm 0,12$	7	0,82 $\pm 0,12$	12	1,08 $\pm 0,22$
3	0,55 $\pm 0,18$	8	1,28 $\pm 0,42$	13	0,97 $\pm 0,21$
4	0,94 $\pm 0,24$	9	0,94 $\pm 0,26$	14	0,93 $\pm 0,27$
5	0,55 $\pm 0,12^{\#}$	10	0,75 $\pm 0,21$	15	0,71 $\pm 0,09^{\#}$

Mittelwert
(1-15) $0,84 \pm 0,05^{**}$

Tabelle 61: Freilaufende Hill-Koeffizienten n_H (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der ACh-Kontrollkurven der einzelnen Experimente mit W84 in Vierfachbestimmung.

$\#$ signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten als mit $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$).

$**$ signifikante Abweichung von $n_H = 1$ (t-Test, $p < 0,01$).

7.2 Kein Einfluss verschiedener Steilheitsmaße auf die Lage der Wendepunkte von ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven im Einzelversuch

In Tabelle 21 im Ergebnisteil sind für das Teilprojekt mit Atropin die Wendepunkte der ACh-Kurven der Einzelversuche aufgelistet. Bei 7 von 16 Kurven erwies sich eine Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten besser als eine Anpassung mit $n_H = 1$ (F-Test, $p < 0,05$). Um festzustellen, ob der Kurvenwendepunkt von der Kurvensteilheit abhängt, sind für diese Versuche in Tabelle 62 die Wendepunkte für beide Kurvenanpassungen dargestellt. Zwischen den Wendepunkten der Kurven mit $n_H = 1$ und denen der Kurven mit freilaufendem Steigungsmaß gab es jeweils keinen signifikanten Unterschied (t-Test, $p > 0,05$).

	Atropin (log M)	pEC ₅₀ (n _H = 1)	pEC ₅₀ (n _H : freilaufend)	n _H (freilaufend)
10.05.2004	-8	7,52 ± 0,12	7,29 ± 0,21	0,42 ± 0,21
12.05.2004	-8	7,01 ± 0,12	6,90 ± 0,17	0,54 ± 0,11
25.05.2004a	-7,5	6,23 ± 0,09	6,13 ± 0,13	0,60 ± 0,13
06.05.2004	-7	6,14 ± 0,15	5,85 ± 0,30	0,48 ± 0,13
12.05.2004	-7	5,81 ± 0,11	5,69 ± 0,15	0,64 ± 0,11
12.05.2004	-6	4,80 ± 0,10	4,47 ± 0,23	0,52 ± 0,10
24.06.2004	-6	5,16 ± 0,08	4,97 ± 0,14	0,59 ± 0,09

Tabelle 62: Wendepunkte pEC₅₀ (± Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Experimenten der Atropin-Versuchsreihe, bei denen sich mit freilaufendem Hill-Koeffizienten eine signifikant bessere Kurvenanpassung ergab (F-Test, p < 0,05). Angegeben ist jeweils der Wendepunkt, der bei einer Kurvenanpassung mit n_H = 1 resultiert, und der Wendepunkt der Kurvenanpassung mit freilaufendem n_H.

pEC₅₀ (n_H = 1): negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert (Hill-Koeffizient konstant: n_H = 1).

pEC₅₀ (n_H: freilaufend): negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert (Hill-Koeffizient: freilaufend).

n_H (freilaufend): Zahlenwert des freilaufenden Hill-Koeffizienten.

7.3 Kein Einfluss verschiedener Steilheitsmaße auf die Kenngrößen von gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven

Im Ergebnisteil (3.3.2.1) ging für das Teilprojekt Atropin aus der statistischen Betrachtung der Gesamtheit der Kurven nach Lew und Angus (1995) hervor, dass eine Parallelverschiebung der Kurven nur mit einer Kurvensteigung von n_H < 1 gegeben war. Deshalb wurde für die zusammengefassten Daten aller Atropin-Konzentrationsbedingungen jeweils immer die gemeinsame Steigung von n_H = 0,69 gewählt, um die Kenngrößen der Kurven zu ermitteln. In Tabelle 63 sind die Kenngrößen dargestellt, die sich aus einer Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten ergeben. Bei einem Vergleich der in Tabelle 63 abgebildeten Kenngrößen (pEC₅₀, Max, Min) mit denen aus Tabelle 22 in 3.3.2.1 (n_H = 0,69) zeigte sich, dass sich die Kenngrößen nicht signifikant änderten (t-Test, p > 0,05).

	Kontrolle	Atropin 0,01 μ M	Atropin 0,03 μ M	Atropin 0,1 μ M	Atropin 1 μ M	Atropin 10 μ M
pEC ₅₀	7,49 \pm 0,06	6,99 \pm 0,05**	6,34 \pm 0,07**	5,73 \pm 0,11**	4,67 \pm 0,05**	3,91 \pm 0,07**
Max (%)	103 \pm 2	103 \pm 3	112 \pm 3	111 \pm 5	105 \pm 4	101 \pm 8
Min (%)	-3 \pm 2	-17 \pm 2**	-5 \pm 3	-21 \pm 3**	-28 \pm 1**	-22 \pm 1**
n _H (frei- laufend)	0,76 \pm 0,08 [#]	0,65 \pm 0,05 [#]	0,76 \pm 0,08	0,56 \pm 0,06	0,68 \pm 0,05	0,71 \pm 0,07
n	16	4	3	2	4	3

Tabelle 63: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von Atropin. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (freilaufend): freilaufender Hill-Koeffizient.

n: Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, $p < 0,05/0,01$).

[#] signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten als mit n_H = 1 (F-Test, $p < 0,05$).

7.4 Gleiche Maßzahlen der Alloster-Wirksamkeit bei Anpassung paralleler Kurven mit verschiedenem Steilheitsmaß

7.4.1 Versuche mit W84

Bei dem Datensatz zum Effekt von W84 auf die ACh-Kurve stellte sich die Frage, welchen Einfluss es hat, wenn der Mittelwert der Hill-Koeffizienten der ACh-Kurven für die zusammengefassten Daten der einzelnen W84-Konzentrationsbedingungen als gemeinsames Steigungsmaß gewählt wird anstelle von n_H = 1. Aus der statistischen Betrachtung der Gesamtheit der Kurven nach Lew und Angus (1995) war hervorgegangen, dass bei einer Steigung von n_H = 1 eine parallele Rechtsverschiebung der Kurven gegeben war, obwohl die Kontrollkurve eine Steigung von n_H < 1 aufwies.

Für das Teilprojekt W84 werden im Folgenden Kurven mit dem gemittelten Steigungsmaß der Einzelkurven angepasst (Mittelwert der Hill-Koeffizienten der Kurven für die zusammengefassten Daten der einzelnen Konzentrationsbedingung: $n_H = 0,87$). Für die Kontrollkurve war die Anpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten immer noch besser als die Festsetzung auf die gemittelte Steigung von $n_H = 0,87$. Insofern stellte die Anpassung mit $n_H = 0,87$ keine Verbesserung gegenüber einer Anpassung mit $n_H = 1$ dar. Aus dem Vergleich der Summe der Abstandsquadrate von allen in Abbildung 93 dargestellten Kurven ($n_H = 0,87$) mit der Summe der Abstandsquadrate der mit $n_H = 1$ angepassten Kurven ging allerdings hervor, dass die Anpassung mit $n_H = 0,87$ die Daten besser beschrieb, so dass sich für die Gesamtheit der Kurven aus der Anpassung mit $n_H = 0,87$ ein Vorteil ergeben würde. Die Zahlenwerte der pharmakologischen Kenngrößen (Max, Min, pEC_{50} ; siehe Tabelle 64) unterschieden sich jedoch nicht signifikant von den Werten bei Kurvenanpassung mit $n_H = 1$ (Tabelle 23 in 3.3.2.2.1). Wenn aufgrund der statistischen Betrachtung der Gesamtheit der Kurven nach Lew und Angus (1995) eine Parallelverschiebung der Kurven bei einem Steigungsmaß von $n_H = 1$ gegeben war, wurde daher in dieser Arbeit nicht getestet, ob das aus den Einzelkurven ermittelte eventuell flachere Steilheitsmaß eine Verbesserung der Kurvenanpassung ergeben könnte.

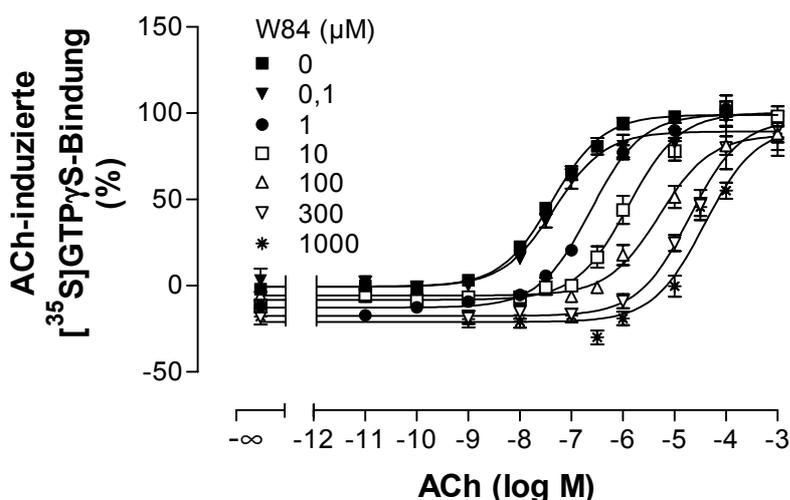


Abbildung 93: Einfluss steigender Konzentrationen von W84 auf die ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** ACh-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent [Basalaktivität (unteres Plateau der Kontrollkurve) = 0%, ACh-Maximaleffekt (oberes Plateau der Kontrollkurve) = 100%]. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von ACh. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 6); Hill-Koeffizient konstant: $n_H = 0,87$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten (Kontrollkurve: $n = 15$) in Vierfachbestimmung.

	Kontrolle	W84 0,1 μ M	W84 1 μ M	W84 10 μ M	W84 100 μ M	W84 300 μ M	W84 1000 μ M
pEC ₅₀	7,37 $\pm 0,03$	7,33 $\pm 0,08$	6,63 $\pm 0,07^{**}$	5,90 $\pm 0,06^{**}$	5,29 $\pm 0,08^{**}$	4,71 $\pm 0,06^{**}$	4,42 $\pm 0,11^{**}$
Max (%)	99 \pm 1	89 \pm 3	99 \pm 3	100 \pm 3	87 \pm 3*	97 \pm 3	92 \pm 7
Min (%)	-1 \pm 1	0 \pm 2	-13 \pm 2**	-8 \pm 2**	-6 \pm 1	-18 \pm 2**	-21 \pm 3**
n _H (frei- laufend)	0,77 $\pm 0,03^{\#}$	0,97 $\pm 0,19$	0,86 $\pm 0,10$	0,78 $\pm 0,09$	0,79 $\pm 0,10$	0,91 $\pm 0,12$	1,02 $\pm 0,23$
n	15	2	2	4	2	3	2

Tabelle 64: Kenngrößen (\pm Standardfehler resultierend aus der Kurvenanpassung) der gemittelten ACh-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 93 unter Kontrollbedingungen sowie unter Einfluss steigender Konzentrationen von W84. pEC₅₀, Max und Min beruhen auf einer Kurvenanpassung mit $n_H = 0,87$.

pEC₅₀: negativer dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung induziert.

Max: maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Min: minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

n_H (**freilaufernd**): freilaufender Hill-Koeffizient.

n : Anzahl der unabhängigen Experimente.

*/** signifikante Abweichung vom Kontrollwert (Dunnett t-Test, $p < 0,05/0,01$).

signifikant bessere Kurvenanpassung mit freilaufendem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$).

Für die Schild-Auftragung wurden die Kurven der einzelnen Versuchstage ebenfalls mit dem für die zusammengefassten Kurven ermittelten Steilheitsmaß ($n_H = 0,87$) angepasst und die Verschiebungsfaktoren berechnet. Der aus der Analyse nach Lanzafame et al. (1996) resultierende $p\alpha$ -Wert war identisch mit dem, der im Ergebnisteil dargestellt wurde. Der Zahlenwert für die Affinität von W84 zum freien Rezeptor (pK_A) divergierte nicht signifikant (um 0,05 log-Einheiten) von dem Wert bei Auswertung der Verschiebungsfaktoren mit einer Kurvensteilheit von $n_H = 1$ (t-Test, $p > 0,05$). Die aus der Schild-Auftragung hervorgehenden Kenngrößen für die Wirkung des allosterischen Modulators W84 wurden demnach nicht signifikant durch eine Anpassung der Daten mit verschiedenen Steigungsmaßen beeinflusst.

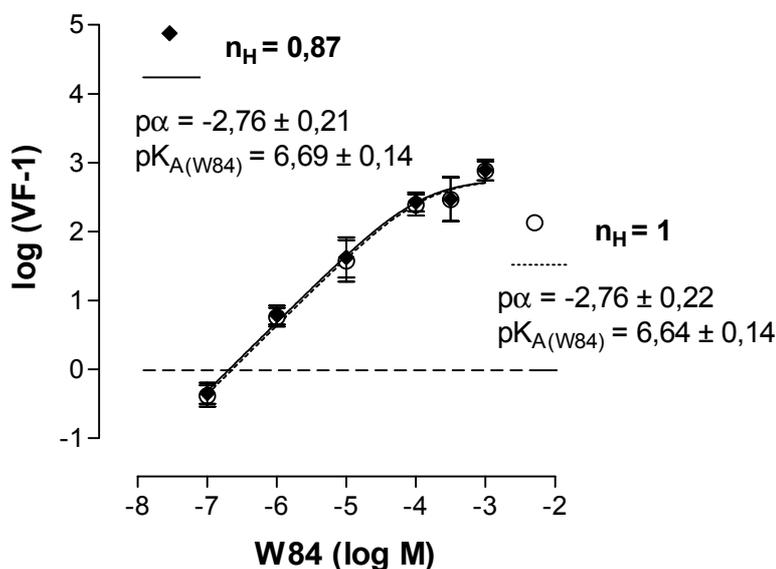


Abbildung 94: Schild-Auftragung der W84-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von W84. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (Lanzafame et al., 1996). Geschlossene Symbole: VF berechnet aus den Kurven der Einzelexperimente mit $n_H = 0,87$; offene Symbole: VF berechnet aus den Kurven der Einzelexperimente mit $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

7.4.2 Versuche mit Naphmethonium

Im Ergebnisteil wurden in der Schild-Auftragung für den Datensatz ACh/Naphmethonium (Abbildung 32) die Verschiebungsfaktoren auf der Basis von Kurven berechnet, die mit einer gemeinsamen Steigung von $n_H = 0,91$ (Mittelwert der Hill-Koeffizienten der Kurven der zusammengefassten Daten der einzelnen Konzentrationsbedingungen) angepasst worden waren. In Abbildung 95 sind diese Verschiebungsfaktoren als geschlossene Symbole dargestellt. Die als offene Symbole abgebildeten Verschiebungsfaktoren resultierten aus einer Anpassung der Kurven der Einzelexperimente mit $n_H = 1$, obwohl dieser Wert statistisch weniger geeignet ist. Die Mittelwerte der Verschiebungsfaktoren für die jeweiligen Naphmethonium-Konzentrationen und die daraus resultierenden $p\alpha$ - und pK_A -Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander (t-Test, $p > 0,05$).

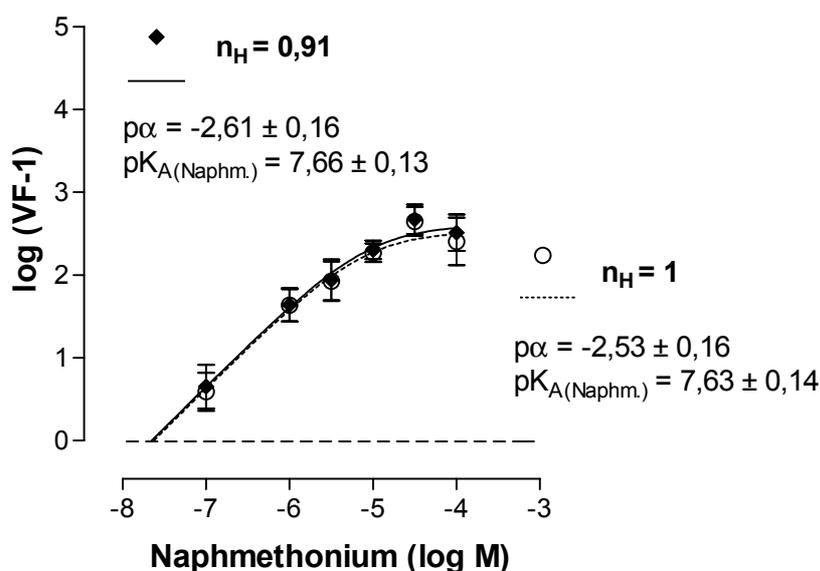


Abbildung 95: Schild-Auftragung der Naphmethonium-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Naphmethonium. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (Lanzafame et al., 1996). Geschlossene Symbole: VF berechnet aus den Kurven der Einzelexperimente mit $n_H = 0,91$; offene Symbole: VF berechnet aus den Kurven der Einzelexperimente mit $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung.

Das für die Kurvenanpassung gewählte Steigungsmaß schien demnach keinen relevanten Einfluss auf pharmakologischen Kenngrößen zu haben, die aus der

Anwendung der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 6) bzw. der Gleichung nach Lanzafame et al. (1996; Gleichung 17) resultierten.

7.5 Vergleich von Schild-Auftragungen auf der Basis der Verschiebungsfaktoren aus Einzelexperimenten sowie der Verschiebungsfaktoren aus gemittelten Kurven einer Versuchsreihe

In Abbildung 96 sind zusätzlich zu den in Abbildung 95 gezeigten Werten die Verschiebungsfaktoren enthalten, die sich ergaben, wenn nicht die Kurvenverschiebungen der einzelnen Versuchstage ausgewertet wurden, sondern die gemittelten Kurven aller Versuchstage (Abbildung 31) zur Berechnung von Verschiebungsfaktoren herangezogen wurden. Die Steigung dieser Kurven war auf $n_H = 0,91$ festgesetzt worden. Sowohl die Verschiebungsfaktoren als auch der $p\alpha$ -Wert ($-2,53 \pm 0,16$) und der pK_A -Wert ($7,63 \pm 0,14$) waren nicht signifikant verschieden von den jeweiligen Werten, die auf der Basis der Einzelkurven ermittelt wurden (Werte: siehe Abbildung 96). Im Ergebnisteil dieser Arbeit wurde jedoch die Bestimmung, die auf den Verschiebungsfaktoren der Kurven der einzelnen Versuchstage beruhte, bevorzugt, da dadurch die experimentellen Streuungen in die Schild-Auftragung eingehen konnten.

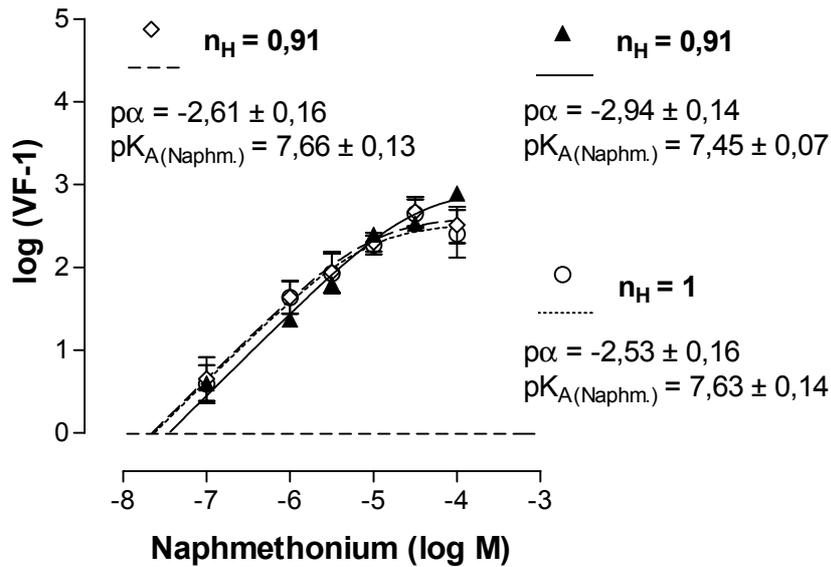


Abbildung 96: Schild-Auftragung der Naphmethonium-induzierten Rechtsverschiebung der ACh-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus dem jeweiligen Verschiebungsfaktor (VF) und 1. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration von Naphmethonium. **Kurvenanpassung:** Gleichung 17 (Lanzafame et al., 1996). Geschlossene Dreiecke: VF berechnet aus den Kurven der zusammengefassten Daten einer Konzentrationsbedingung aus Tabelle 25 ($n_H = 0,91$); offene Rauten: VF berechnet aus den Kurven der Einzelexperimente mit $n_H = 0,91$; offene Kreise: VF berechnet aus den Kurven der Einzelexperimente mit $n_H = 1$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung (offene Symbole) bzw. Einzelwerte ohne Standardfehler (geschlossene Symbole).

8 Veröffentlichungen

Abstrakta/Kongressmitteilungen

Schmalenbach C, Muth M, Tränkle C, Holzgrave U, and Mohr K (2003) Effect of the muscarinic alloster naphmethonium on acetylcholine induced G protein activation. *DPhG-Jahrestagung 2003*, Würzburg.

Schmalenbach C, Heller E, Muth M, Daiß JO, Tacke R, Holzgrave U, and Mohr K (2004) Muscarinic allosteric modulators as conformational selective ligands. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **369** (Suppl 1):79.

Schmalenbach C, Klemm D, Muth M, Zlotos D, Holzgrave U, and Mohr K (2005) Muscarinic receptor mediated G protein activation: differential sensitivities of acetylcholine and pilocarpine to allosteric modulation. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **371** (Suppl 1):85.

Kellershohn K, Schmalenbach C, Muth M, De Amici M, Holzgrave U, and Mohr K (2005) Allosteric/orthosteric hybrid compounds with agonist activity at muscarinic M₂-receptors. *DPhG-Jahrestagung 2005*, Mainz.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Seine Unterstützung und seine wissenschaftlichen Ratschläge haben entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Eberhard Schlicker danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Gerd Bendas und Herrn Prof. Dr. Volkmar Gieselmann möchte ich für ihre Mitwirkung in der Prüfungskommission herzlich danken.

Allen Arbeitskollegen der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die gute Zusammenarbeit. Die hilfsbereite und freundschaftliche Atmosphäre wird mir in bester Erinnerung bleiben.