

Allosterisch/orthosterische Hybridliganden des
muskarinischen Acetylcholinrezeptors:
Rezeptorbindung und -aktivierung

Dissertation

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

vorgelegt von

Kerstin Kellershohn
aus Wiesbaden

Bonn 2007

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2008

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

Erscheinungsjahr: 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2004 bis Oktober 2007 in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Instituts der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allosterie	1
1.2	Der muskarinische M ₂ -Rezeptor	2
1.3	Die allosterischen Liganden W84 und Naphmethonium.....	5
1.4	Verknüpfung allosterischer und orthosterischer Liganden des muskarinischen Acetylcholinrezeptors zu Hybridverbindungen.....	6
1.5	Fragestellung	9
2	Material und Methoden	11
2.1	Material.....	11
2.1.1	Lösungen, Puffer und Nährmedien.....	11
2.1.2	Radioliganden.....	14
2.1.3	Geräte	15
2.1.4	Verbrauchsmaterialien.....	17
2.1.5	Reagenzien	18
2.1.6	Firmen.....	20
2.2	Computerprogramme.....	21
2.3	Strukturformeln der Testsubstanzen.....	22
2.3.1	Agonisten.....	22
2.3.2	Antagonisten.....	23
2.3.3	Allosterische Liganden.....	24
2.3.4	Hybride aus W84 und Oxotremorin-M-artigen Agonisten.....	25
2.3.5	Hybride aus Naphmethonium und Oxotremorin-M-artigen Agonisten	26
2.3.6	Hybrid aus W84 und AF-DX 384	27
2.3.7	Nukleotide	27
2.3.8	Radioliganden.....	28
2.4	Membranpräparation von Herzventrikelgewebe des Hausschweins.....	29

Inhaltsverzeichnis

2.5	Zellkultur	29
2.5.1	Zelllinien	29
2.5.2	Kultivierung der CHO-Zellen	30
2.5.3	Membranpräparation der CHO-Zellen	31
2.6	Bestimmung des Proteingehalts von Membransuspensionen	32
2.7	Radioligandbindungsstudien	33
2.7.1	Massenwirkungsgesetz	33
2.7.2	Experimente im Bindungsgleichgewicht	34
2.7.2.1	Homologe Konkurrenz	35
2.7.2.1.1	Homologe Konkurrenzexperimente an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins	37
2.7.2.1.2	Homologe Konkurrenzexperimente an Membransuspensionen aus CHO-M ₂ - und CHO-M ₃ -Zellen	38
2.7.2.2	Allosterische Interaktion	40
2.7.2.2.1	Allosterische Interaktion an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins mit [³ H]NMS als Orthoster	42
2.7.3	Dissoziationskinetik	43
2.7.3.1	Dissoziationskinetik von [³ H]NMS an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins unter dem Einfluss eines Allostere - kompletter Dissoziationsverlauf	45
2.7.3.2	Dissoziationskinetik von [³ H]NMS an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins unter dem Einfluss eines Allostere - Zwei-Punkt-kinetische Versuche	46
2.8	[³⁵ S]GTPγS-Bindungsexperimente an Membransuspensionen aus CHO-M ₂ - und CHO-M ₃ -Zellen	48
2.8.1	Beeinflussung der [³⁵ S]GTPγS-Bindung durch rezeptorsättigende Konzentrationen muskarinischer Liganden	51
2.8.2	Effekt von N-Methylscopolamin auf die basale [³⁵ S]GTPγS-Bindung	51
2.8.3	Effekt eines Partial- oder Vollagonisten auf die [³⁵ S]GTPγS-Bindung im Vergleich zu Acetylcholin	52
2.8.4	Einfluss eines allosterischen oder orthosterischen Antagonisten auf die Agonist-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	52
2.8.4.1	Auswertung einer kompetitiven Interaktion	53
2.8.4.2	Auswertung einer allosterischen Interaktion	53
2.8.4.3	Test auf Parallelverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven	54

2.9	Statistik	55
3	Ergebnisse	59
3.1	Untersuchungen an M ₂ -Rezeptoren.....	59
3.1.1	Vorversuche an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins	59
3.1.1.1	[³ H]NMS-Bindungsexperiment: K _D - und B _{max} -Wert des Radioliganden	59
3.1.1.2	[³ H]NMS-Bindungsexperiment zur Analyse der Strukturidentität von Testsubstanzen.....	61
3.1.2	Vorversuche an Membransuspensionen aus CHO-M ₂ -Zellen	63
3.1.2.1	[³ H]NMS-Bindungsexperiment: K _D - und B _{max} -Wert des Radioliganden	63
3.1.2.2	Beeinflussung der [³⁵ S]GTPγS-Bindung durch rezeptorsättigende Konzentrationen muskarinischer Liganden	64
3.1.2.3	Effekt von N-Methylscopolamin auf die basale [³⁵ S]GTPγS-Bindung	65
3.1.3	Von Antagonisten abgeleitete Hybridverbindungen	68
3.1.3.1	Hybrid aus W84 und AF-DX 384: EHW412	68
3.1.3.1.1	[³ H]NMS-Bindungsexperiment: Affinität zum [³ H]NMS-besetzten Rezeptor.....	68
3.1.3.1.2	[³ H]NMS-Bindungsexperiment: Affinität zum freien Rezeptor	70
3.1.4	Orthosterische Agonisten	72
3.1.4.1	Acetylcholin-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	72
3.1.4.2	Oxotremorin-M-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	73
3.1.4.3	Iperoxo-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	74
3.1.5	Einfluss allosterischer Antagonisten auf die Iperoxo-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	77
3.1.5.1	W84	77
3.1.5.2	Naphmethonium	80
3.1.5.3	Seminaph (MM7a).....	82
3.1.6	Einfluss äquimolarer Konzentrationen Iperoxo und Seminaph (MM7a) auf die [³⁵ S]GTPγS-Bindung	85
3.1.7	Von Agonisten abgeleitete Hybridverbindungen	87
3.1.7.1	Hybride aus W84 und Oxotremorin-M-artigen Agonisten.....	88
3.1.7.1.1	DDT1-, DDT3-, und DDT4-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	88

Inhaltsverzeichnis

3.1.7.1.2	DDT5-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	90
3.1.7.1.3	DDT6-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	91
3.1.7.2	Hybride aus Naphmethonium und Oxotremorin-M-artigen Agonisten	93
3.1.7.2.1	MMH1-6-, MMH3-6- und MMH4-6-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	93
3.1.7.2.2	MMH5-6-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	94
3.1.7.2.3	[³ H]NMS-Bindungsexperiment: Affinität von MMH5-6 zum [³ H]NMS- besetzten Rezeptor.....	95
3.1.7.2.4	[³ H]NMS-Bindungsexperiment: Affinität von MMH5-6 zum freien Rezeptor	97
3.1.7.2.5	MMH6-0- und MMH5-4-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	99
3.1.8	Einfluss allosterischer Antagonisten auf die Hybrid-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	101
3.1.8.1	Interaktion von W84 mit DDT1	102
3.1.8.2	Interaktion von W84 mit DDT5	104
3.1.8.3	Interaktion von Naphmethonium mit MMH1-6.....	106
3.1.8.4	Interaktion von Naphmethonium mit MMH5-6.....	109
3.1.8.5	Interaktion von Seminaph (MM7a) mit MMH5-6	112
3.1.9	Einfluss orthosterischer Antagonisten auf die Hybrid-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	114
3.1.9.1	Interaktion von Atropin mit DDT5	115
3.1.9.2	Interaktion von N-Methylscopolamin mit DDT5.....	118
3.1.9.3	Interaktion von Atropin mit MMH5-6	120
3.2	Untersuchungen an M ₃ -Rezeptoren	123
3.2.1	Vorversuche an Membransuspensionen aus CHO-M ₃ -Zellen	123
3.2.1.1	[³ H]NMS-Bindungsexperiment: K _D - und B _{max} -Wert des Radioliganden	123
3.2.1.2	Einfluss verschiedener GDP-Konzentrationen auf die Acetylcholin-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung.....	124
3.2.1.3	Beeinflussung der [³⁵ S]GTPγS-Bindung durch rezeptorsättigende Konzentrationen muskarinischer Liganden.....	127
3.2.2	Orthosterische Agonisten	129
3.2.2.1	Iperoxo-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	129
3.2.2.2	Pilocarpin-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	130
3.2.3	Von Agonisten abgeleitete Hybridverbindungen.....	133

3.2.3.1	Hybride aus W84 und Oxotremorin-M-artigen Agonisten.....	133
3.2.3.2	Hybride aus Naphmethonium und Oxotremorin-M-artigen Agonisten	134
4	Diskussion	137
4.1	Verknüpfung allosterischer und orthosterischer Liganden des muskarinischen Acetylcholinrezeptors zu Hybridverbindungen.....	137
4.1.1	Das antagonistische AF-DX 384-Hybrid EHW412	138
4.1.2	Hybride Oxotremorin-M-artiger Agonisten	140
4.2	Interaktionsstudien der agonistischen Hybride mit allosterischen und orthosterischen Antagonisten am M ₂ -Rezeptor.....	147
4.2.1	Interaktion mit einem allosterischen Antagonisten	148
4.2.2	Interaktion mit einem orthosterischen Antagonisten.....	151
4.2.3	Erörterungen zur Topologie der Hybride hinsichtlich Rezeptorbindung und -aktivierung.....	153
4.3	Erörterungen zur M ₂ /M ₃ -Selektivität der Hybride Oxotremorin-M-artiger Agonisten.....	157
5	Zusammenfassung	163
6	Literaturverzeichnis	167
7	Anhang	175
7.1	K _D - und B _{max} -Werte des Radioliganden [³ H]NMS	175
7.2	Beeinflussung der [³⁵ S]GTPγS-Bindung durch rezeptorsättigende Konzentrationen muskarinischer Liganden.....	176
7.3	CZA-1-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	177
8	Veröffentlichungen	179

1 Einleitung

1.1 Allosterie

Der Begriff Allosterie wurde erstmals auf dem Gebiet der Enzymologie verwendet und bezeichnet die gleichzeitige Bindung zweier Liganden an unterschiedliche Bindungsstellen der gemeinsamen Zielstruktur. Durch konformative Verbindung der beiden Bindungsstellen kann eine gegenseitige Beeinflussung beider Liganden stattfinden (Monod et al., 1963). Für eine Reihe von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren konnten bereits eine oder mehrere allosterische (griechisch: andere Stelle) Bindungsstellen identifiziert werden. Dazu gehören unter anderem die Adrenorezeptor-Subtypen α_{1A} und α_{2A} (Leppik und Birdsall, 2000; Leppik et al., 2000), Adenosinrezeptoren (Kollias-Baker et al., 1997; Gao und Ijzerman, 2000), Chemokinrezeptoren (Sabroe et al., 2000) und die in Folgendem behandelten Muskarinrezeptoren. Um eine nomenklatorische Abgrenzung für die Bindungsstelle, an die der körpereigene Agonist bindet, vorzunehmen, wurde für diese der Begriff „orthosterische“ (griechisch: richtige Stelle) Bindungsstelle eingeführt (Neubig et al., 2003). Die als Kooperativität bezeichnete wechselseitige Beeinflussung eines allosterischen und orthosterischen Liganden hinsichtlich Affinität und intrinsischer Aktivität wird nicht nur von den beiden Liganden, sondern auch vom Rezeptorsubtyp bestimmt. Dabei können sich die beiden Liganden in ihren Effekten gegenseitig fördern, hemmen oder gar nicht beeinflussen (positive, negative oder neutrale Kooperativität). Aufgrund ihrer Fähigkeit, Rezeptorkonformationen in Gegenwart eines orthosterischen Liganden zu modulieren, können allosterische Liganden eine Feinabstimmung pharmakologischer Effekte hervorrufen. Dies bietet für die Wirkstoffforschung einige Vorteile:

- Der Effekt eines antagonistischen, allosterischen Modulators ist selbstlimitierend, wenn er in hohen Konzentrationen die Bindung des Agonisten stabilisiert (Lüllmann et al., 1969; Birdsall et al., 1999). Deshalb ist die Gefahr einer Intoxikation mit allosterischen Wirkstoffen reduziert (Holzgrabe und Mohr, 1998).
- Ein allosterischer Modulator, der selbst keinen Einfluss auf die Rezeptoraktivierung ausübt, aber die Bindung des endogenen Liganden fördert, entfaltet nur dort seine Wirkung, wo der endogene Ligand vorhanden ist. Deshalb

wird das physiologische Muster der Stimulation in räumlicher und zeitlicher Hinsicht aufrechterhalten. Eine Dauerstimulation, wie sie in Gegenwart eines orthosterischen Agonisten auftritt, unterbleibt.

- Die Aminosäuresequenz der orthosterischen Bindungsstellen innerhalb einer Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren weist ein hohes Maß an Konservierung auf, wodurch die Entwicklung subtypselektiver Pharmaka erschwert wird. Allosterische Liganden können potenziell selektiver sein als orthosterische Liganden, da sie an weniger stark konservierte Areale binden (Christopoulos und Kenakin, 2002). Darüber hinaus kann Subtypselektivität auch aus unterschiedlichen Kooperativitäten resultieren. Verhält sich der allosterische Ligand an allen Rezeptorsubtypen bis auf den therapeutisch angestrebten Subtyp neutral kooperativ, kann auf diese Weise absolute Subtypselektivität erlangt werden (Lazareno et al., 1998).

Das prominenteste Beispiel für allosterisch wirksame Arzneistoffe sind die Benzodiazepine, die zur Anxiolyse, aber auch zur Therapie der Epilepsie und zur Anästhesie eingesetzt werden. Diese fördern allosterisch die Bindung des inhibitorischen Neurotransmitters GABA an den GABA_A-Rezeptor, einen Ligand-gesteuerten Ionenkanal. Der erste therapeutisch genutzte allosterische Modulator an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist Cinacalcet (Mimpara[®]), ein „Calcimimetikum“, das die Empfindlichkeit des Calcium-sensitiven Rezeptors gegenüber Calcium erhöht (Block et al., 2004; Petrel et al., 2004; Nagano und Nemeth, 2005). Eingesetzt wird dieser Arzneistoff gegen sekundären Hyperparathyreoidismus sowie Hyperkalzämie bei Patienten mit Nebenschilddrüsenkarzinom.

1.2 Der muskarinische M₂-Rezeptor

In Bezug auf die allosterische Bindungsstelle G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sind muskarinische Acetylcholinrezeptoren die am besten untersuchte Rezeptor-Familie. Der M₂-Rezeptor steht im Mittelpunkt der folgenden Betrachtungen, da dieser Subtyp am empfindlichsten gegenüber einer allosterischen Modulation ist. Die Affinität allosterischer Modulatoren nimmt üblicherweise in der Reihenfolge M₂ > M₄ ≥ M₁ > M₃ > M₅ ab (Ellis et al., 1993; Jakubik et al., 1995; Ellis und Seidenberg, 2000).

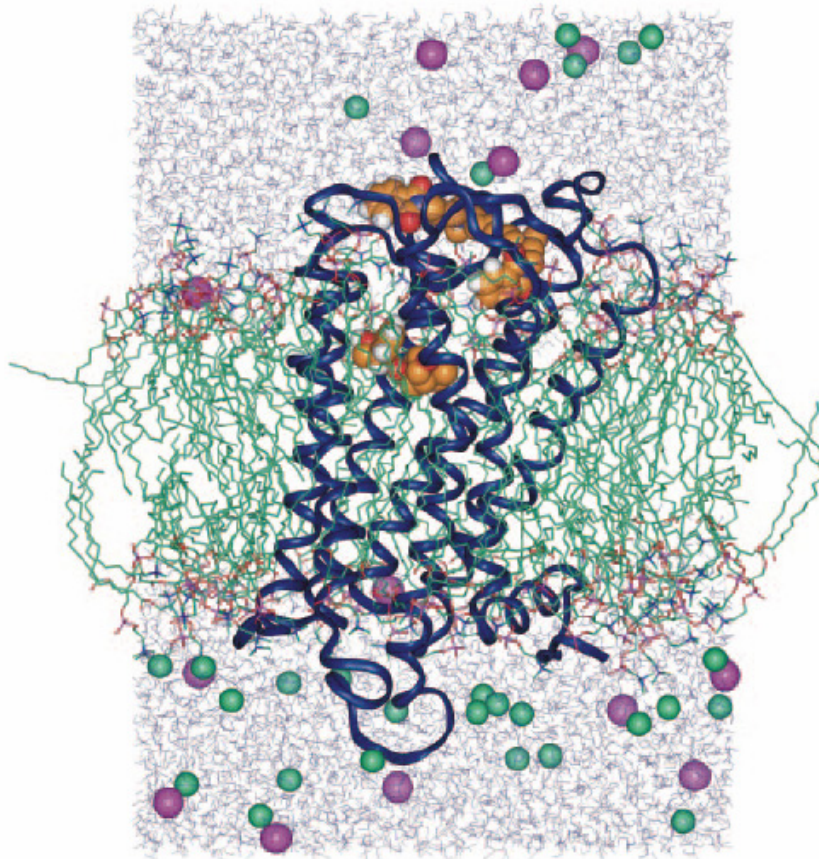


Abbildung 1: Seitenansicht des M₂-Rezeptors (blaues Band) im Komplex mit W84 (oberes Kalottenmodell, orange) und NMS (unteres Kalottenmodell, orange) in einer Phospholipid-Doppelschicht (grün). Die umgebende Wasserphase (blau) enthält Natrium-Ionen (grün) und Chlorid-Ionen (magenta). (Prilla et al., 2006)

Abbildung 1 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Molekuldynamiksimulation des M₂-Rezeptormodells für die Interaktion mit einem allosterischen und einem orthosterischen Liganden (Prilla et al., 2006). Die allosterische Bindungsstelle für viele geladene Moleküle liegt extrazellulär gerichtet in der Nähe der orthosterischen Bindungsstelle (Christopoulos und Kenakin, 2002). Da diese Bindungsstelle von mehreren strukturell sehr verschiedenen allosterischen Modulatoren wie beispielsweise Gallamin, Alcuronium und W84 benutzt wird, wird sie auch als gemeinsame Bindungsstelle („common allosteric site“) bezeichnet (Ellis und Seidenberg, 1992; Lanzafame et al., 1997; Tränkle und Mohr, 1997). Daneben gibt es Hinweise, die das Vorhandensein eines zweiten allosterischen Haftareals nahelegen (Tränkle und Mohr, 1997; Lazareno et al., 2000; Lazareno et al., 2002). Dabei bleibt zu diskutieren, ob es sich hier tatsächlich um eine zweite allosterische Bindungsstelle oder um eine Subdomäne der gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle handelt (Tränkle et al., 2005).

Eine wichtige Rolle bei der Bindung allosterischer Modulatoren an die gemeinsame allosterische Bindungsstelle spielen die zweite (e2) und die dritte (e3) extrazelluläre Schleife sowie der Beginn der siebten transmembranären Domäne (TM VII). Einer Sequenz aus vier sauren Aminosäuren in der zweiten extrazellulären Schleife (¹⁷²Glu-¹⁷³Asp-¹⁷⁴Gly-¹⁷⁵Glu, EDGE) wurde schon frühzeitig eine besondere Bedeutung bei der selektiven Bindung von positiv geladenen Allosteren an den M₂-Rezeptor, insbesondere Gallamin, beigemessen (Leppik et al., 1994; Gnagey et al., 1999). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyr in der zweiten extrazellulären Schleife und M₂⁴²³Thr am Beginn der siebten transmembranären Domäne eine Schlüsselrolle für die M₂/M₅-Selektivität von Alkan-Bisammonium-Verbindungen und Caracurin V-artigen Allosteren spielen (Buller et al., 2002; Voigtländer et al., 2003; Huang et al., 2005). Darüber hinaus konnte mit der konservierten Aminosäure M₂⁴²²Trp ein weiteres Epitop am Beginn der siebten transmembranären Domäne gefunden werden, das für die Bindung allosterischer Modulatoren von Bedeutung ist (Prilla et al., 2006). Das allosterische Haftareal liegt demnach in direkter Nachbarschaft, d.h. am Eingang der orthosterischen Bindungstasche. In Abbildung 1 wurde W84, dargestellt als orangefarbenes Kalottenmodell, von Jasmin Schrobang und Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje (Pharmazeutisches Institut, Universität Düsseldorf) in die gemeinsame allosterische Bindungsstelle eingepasst.

Die Bindungstasche für den endogenen Liganden Acetylcholin sowie orthosterische Agonisten und Antagonisten, befindet sich im oberen Drittel der transmembranären Domänen. Für die Bindung der positiven Kopfgruppe eines orthosterischen Liganden spielt die konservierte Aminosäure Aspartat in der dritten transmembranären Domäne (im Falle des M₂-Rezeptors in Position 103) eine bedeutende Rolle (Hulme et al., 1989). In der Umgebung befinden sich ebenfalls konservierte aromatische Aminosäuren (Tryptophan und Tyrosin). Diese bilden einen aromatischen Käfig und stabilisieren durch Kation- π -Wechselwirkungen den Ligand-Rezeptor-Komplex (Wess, 1993). Darüber hinaus sind in Abhängigkeit des Liganden noch weitere Aminosäuren an der Bindung beteiligt. In Abbildung 1 wurde unterhalb von W84 der Antagonist N-Methylscopolamin (orangefarbenes Kalottenmodell) in die orthosterische Bindungsstelle eingepasst. Mit einer Sequenzhomologie von 76 – 96 % (Hulme, 1990) weist die orthosterische Bindungsstelle ein hohes Maß an Konservierung auf und erschwert dadurch die Entwicklung subtypeselektiver Liganden.

1.3 Die allosterischen Liganden W84 und Naphmethonium

Auf der Suche nach Antidota gegen Vergiftungen mit Organophosphaten wurden die Alkan-Bisammonium-Verbindungen mit dem Prototyp W84 als allosterische Modulatoren identifiziert. Diese Verbindungen waren nämlich bei Mäusen in der Lage, die protektiven Eigenschaften des muskarinischen Antagonisten Atropin zu potenzieren (Kords et al., 1968). Anschließend durchgeführte Organbadexperimente mit Meerschweinchen-Herzvorhöfen ergaben, dass die Alkan-Bisammonium-Verbindungen die Aktivität muskarinischer Agonisten nicht-kompetitiv antagonisierten (Lüllmann et al., 1969; Mitchelson 1975). Verschiedene Vorteile machten W84 in der Folge zu einer vielversprechenden Leitstruktur bei der Entwicklung neuer allosterischer Modulatoren:

- In allosterisch aktiven Konzentrationen war W84 im Tierexperiment verträglich.
- Bindungsstudien ergaben eine hohe Spezifität für Muskarinrezeptoren (Franken et al., 2000; Pfaffendorf et al., 2000).
- W84 ist subtypselektiv mit einer Präferenz für den M₂-Rezeptor (Tränkle et al., 1998).
- W84 bindet an die gemeinsame allosterische Bindungsstelle (Ellis und Seidenberg, 1992; Tränkle und Mohr, 1997).
- Im Gegensatz zu anderen strukturell sehr komplexen allosterischen Modulatoren, sind bei W84 an den unterschiedlichsten Positionen chemische Modifikation möglich.

Systematische Strukturveränderungen am W84-Molekül führten zu Naphmethonium, einem allosterischen Modulator mit einer besonders hohen Affinität zum M₂-Rezeptor im Vergleich zur Muttersubstanz und einem Förderer der Bindung des antagonistischen Radioliganden [³H]N-Methylscopolamin (Muth et al., 2003). Ein Förderer der Bindung von Acetylcholin und anderer synthetischer Agonisten konnte jedoch aus dem Bereich der Alkan-Bisammonium-Verbindungen bisher nicht identifiziert werden.

1.4 Verknüpfung allosterischer und orthosterischer Liganden des muskarinischen Acetylcholinrezeptors zu Hybridverbindungen

Neben der Entwicklung allosterischer Modulatoren stellt die Konzeption bivalenter Liganden einen weiteren interessanten Ansatz auf der Suche nach subtypselektiven Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren dar (Messer, 2004). Unter einem bivalenten Liganden sind ganz allgemein Moleküle zu verstehen, die zwei eigenständige Erkennungsregionen besitzen (Portoghese 1989). Dabei können entweder zwei pharmakophore Einheiten oder ein Pharmakophor mit einer Erkennungseinheit kovalent verknüpft sein. Eine gute Veranschaulichung der hinter der Entwicklung bivalenter Liganden stehenden Idee ist das von Schwyzer (1977) für Peptidhormone postulierte „message-address-concept“. Während unter der Bezeichnung „message“ die Aminosäuren des Peptidhormons zu verstehen sind, die den Rezeptor zur Signaltransduktion veranlassen, sind die als „address“ zu bezeichnenden Aminosäuren für die selektive Bindung des Hormons an den Rezeptor zuständig.

Ein Beispiel für den Erfolg des Konzepts bivalenter Liganden ist der κ -selektive Opioidrezeptor-Antagonist Norbinaltorphimin, ein Dimer des unselektiven Naltrexons (Portoghese, 1989). Ähnliche Ansätze wurden auch auf dem Gebiet der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren verfolgt. Mit dem Ziel, M_1 -selektive Agonisten zu erhalten, wurde eine Reihe dimerer Xanomelin-Derivate synthetisiert, die tatsächlich eine gewisse Subtypselektivität aufwiesen (Messer, 2004). Da die meisten der potentesten bivalenten Liganden zwischen den Erkennungseinheiten nur sehr kurze Verbindungsgruppen besitzen, ist die Bindung an benachbarte Bindungsstellen des gleichen Rezeptors wahrscheinlicher als die Induktion von oligomeren Rezeptoren. Dabei ist die Selektivität auf die gleichzeitige Nutzung weniger konservierter Bindungsstellen neben der orthosterischen Bindungsstelle zurückzuführen.

Da muskarinische Acetylcholinrezeptoren neben der orthosterischen mindestens eine allosterische Bindungsstelle besitzen, lag es auf der Hand, in einem rationalen Ansatz das „Allosterie-Konzept“ mit dem „Konzept der bivalenten Liganden“ zu verbinden. Durch die kovalente Verknüpfung allosterischer Strukturelemente mit orthosterischen Agonisten oder Antagonisten entstehen sogenannte „Hybridverbindungen“. Aufgrund der oben genannten Vorteile sind die Alkan-Bisammonium-Verbindungen W84 und Naphmethonium besonders geeignet für die Hybridbildung.

In dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Holzgrave aus Würzburg wurde eine Reihe von Hybriden bestehend aus dem M₂-selektiven Antagonisten AF-DX 384 (Miller, 1991) und unterschiedlich großen Strukturelementen von W84 synthetisiert. Da von AF-DX 384 angenommen wird, dass es neben der orthosterischen Bindungsstelle einen kleinen Teil der allosterischen Bindungsstelle besetzt (Tränkle et al. 1998), sollte durch die Hybridformation eine bessere Ausnutzung der allosterischen Bindungsstelle und damit eine höhere Stabilität der Hybrid-Rezeptor-Komplexe erreicht werden. Die von Marion Mohr (2004) durchgeführten Radioligandbindungsstudien ließen erkennen, dass es sich bei diesen Verbindungen nicht um Hybride im Sinne einer simultanen Besetzung beider Bindungsstellen handelte. Vielmehr wurde von Mohr postuliert, dass die AF-DX 384-Hybride in der allosterischen Bindungstasche festgehalten werden und nicht in das orthosterische Haftareal vordringen können. Da als Ursache ein zu kurzer Abstand zwischen dem Trizyklus des AF-DX 384 und dem Phthalimid-Rest angenommen wurde, wurde ausgehend von dem von Mohr untersuchten Hybrid EHW141 ein neues Hybrid synthetisiert, bei dem innerhalb der AF-DX 384-Struktur die den Piperidin-Ring mit dem Ureid-Stickstoff verbindende Ethylen-Kette gegen eine Butylen-Kette ausgetauscht wurde. Da die Strukturveränderung innerhalb der AF-DX 384-Struktur erfolgte, handelt es sich bei EHW412 strenggenommen nicht mehr um ein AF-DX 384-Hybrid, sondern um eine neue Substanzklasse. Es war unter anderem Aufgabe vorliegender Arbeit dieses neue Hybrid in Radioligandbindungsstudien zu charakterisieren.

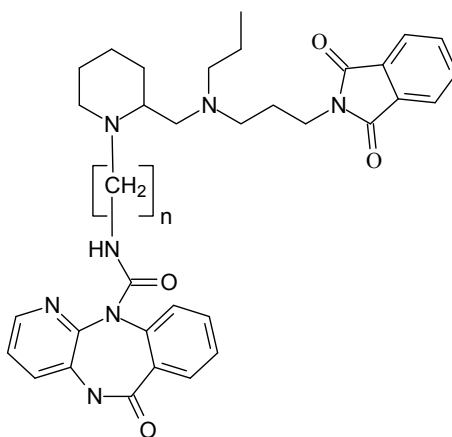


Abbildung 2: Strukturformel der AF-DX 384-Hybride EHW141 (n = 2) bzw. EHW412 (n = 4).

Im Bereich der orthosterischen Agonisten muskarinischer Acetylcholinrezeptoren konnte bisher keine Selektivität auf Rezeptorebene, sondern nur *in vivo* eine Prävalenz für die verschiedenen Subtypen erlangt werden (Eglen, 2005). Mit der Perspektive M₂-selektive Agonisten zu erhalten, wurden in dem Mailänder Arbeitskreis um Herrn Prof. Dr. De Amici Hybride bestehend aus Oxotremorin-M-artigen Agonisten und Strukturelementen der allosterischen Modulatoren W84 bzw. Naphmethonium synthetisiert. Da in diesen Hybriden ein Agonist mit einer antagonistischen Komponente, dem allosterischen Modulator, kombiniert wurde, war das Verhalten der Hybride bezüglich der Rezeptoraktivierung von besonderem Interesse. Ein Teil der Verbindungen wurde in Organbadexperimenten an Meerschweinchen-Herzvorhöfen, einem Modell für den M₂-Rezeptor, untersucht (Disingrini et al., 2006; Holzgrabe et al., 2006). Hierbei erwiesen sich zwei Hybride als Vollagonisten, wohingegen die Mehrzahl der getesteten Verbindungen in diesem Modell keine intrinsische Aktivität aufwies.

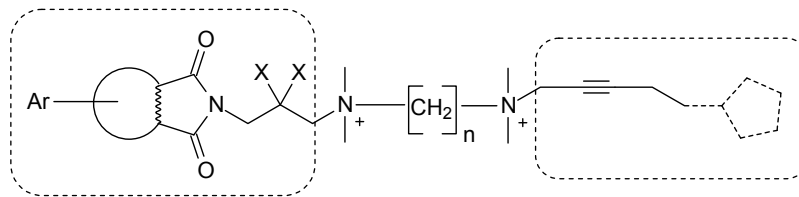


Abbildung 3: Allgemeines Bauprinzip eines Hybridmoleküls bestehend aus einem W84- bzw. Naphmethonium-Anteil (links) und einem Oxotremorin-M-artigen Agonisten (rechts). Die Länge der Zwischenkette (Mitte) der getesteten Hybridmoleküle betrug üblicherweise $n = 6$. Daneben wurden eine Verbindung mit $n = 4$ sowie zwei Verbindungen mit $n = 0$, denen zusätzlich ein quartärer Stickstoff fehlte, getestet. Die detaillierten Strukturformeln sind den Abschnitten 2.3.4 und 2.3.5 zu entnehmen.

1.5 Fragestellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die Eigenschaften eines orthosterischen Antagonisten oder Agonisten durch die Hybridbildung verändert werden. Darüber hinaus wurde die Beantwortung der Frage, ob durch die Hybride eine gleichzeitige Besetzung der allosterischen und orthosterischen Bindungsstelle des muskarinischen M₂-Rezeptors möglich ist, angestrebt. Im Einzelnen wurden folgende Ziele verfolgt:

- (I) In Radioligandbindungsstudien sollte die Affinität des AF-DX 384-abgeleiteten Hybrids EHW412 zum freien und zum [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptor untersucht werden, wobei der allosterische Modulator W84 als Vergleich diene. Die Experimente erfolgten an porcinem Herzventrikelgewebe. Da AF-DX 384 nicht zur Verfügung stand, musste für den Vergleich mit der Muttersubstanz auf Daten von M. Mohr (2004) zurückgegriffen werden.
- (II) In funktionellen Experimenten sollten die Hybride, die sich von Oxotremorin-M-artigen Agonisten ableiten, im Hinblick auf ihre intrinsische Aktivität (E_{max}) und Wirksamkeit (pEC₅₀) untersucht werden. Dabei sollten die Kenngrößen mit denen des endogenen Agonisten Acetylcholin sowie der agonistischen Muttersubstanzen, soweit vorhanden, verglichen werden. Die Rezeptor-vermittelte G-Protein-Aktivierung wurde durch Messung der [³⁵S]GTPγS-Bindung erfasst. Die Experimente erfolgten an klonierten humanen M₂-Rezeptoren, die in stabil transfizierten CHO-Zellen exprimiert wurden.
- (III) Für eine Verbindung aus der Gruppe der Agonist-abgeleiteten Hybride sollte exemplarisch in Radioligandbindungsstudien an porcinem Herzventrikelgewebe die Affinität zum freien und zum [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptor bestimmt werden.
- (IV) Um zu überprüfen, ob die Agonist-abgeleiteten Hybride die allosterische Bindungsstelle des M₂-Rezeptors besetzen, sollte der Einfluss eines allosterischen Modulators auf die Hybrid-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung untersucht werden.
- (V) Um festzustellen, ob die Agonist-abgeleiteten Hybride den M₂-Rezeptor über die orthosterische Bindungsstelle aktivieren, sollte der Einfluss eines orthosterischen Antagonisten auf die Hybrid-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung bestimmt werden.

- (VI) Um Anhaltspunkte für eine mögliche M₂/M₃-Selektivität zu erhalten, sollten ausgewählte Verbindungen aus der Reihe der Agonist-abgeleiteten Hybride in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten an humanen M₃-Rezeptoren getestet werden.

2 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden zunächst die Materialien (2.1) einschließlich der für die Erstellung dieser Arbeit verwendeten Computerprogramme (2.2) aufgeführt. Auf eine Übersicht über die Strukturformeln der Testsubstanzen (2.3) folgt schließlich eine Beschreibung der verwendeten Methoden (2.4 bis 2.9).

2.1 Material

Dieses Kapitel beginnt mit den Herstellungsanweisungen der eingesetzten Lösungen, Puffer und Nährmedien (2.1.1) sowie der Radioliganden (2.1.2). Die dazu notwendigen Reagenzien sind in Abschnitt 2.1.5 aufgelistet. Eine Auflistung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien erfolgt in den Abschnitten 2.1.3 und 2.1.4.

2.1.1 Lösungen, Puffer und Nährmedien

L1 Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (D-PBS)

Ein Originalgebinde (9,6 g) des fertigen Konzentrats (*R5*) wurde in einem Liter *Aqua destillata* gelöst. Die Lösung wurde anschließend bei 121 °C 20 min autoklaviert. Dabei ergaben sich folgende Ionenkonzentrationen: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄ sowie 1,4 mM KH₂PO₄. Die Lagerung erfolgte bei 2-8 °C.

L2 Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz

Ein Teil Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz (*R8*) wurde mit drei Teilen *Aqua destillata* versetzt und bei Raumtemperatur gelagert.

L3 G418

Da die vom Hersteller in µg/mg angegebene Wirkstärke bei jeder Charge variierte, wurde die gelieferte Menge (ca. 5 g) G418 (*R9*) genau gewogen und in einem PP-Röhrchen (*M11*) mit *Aqua destillata* gelöst. Das Lösungsvolumen wurde so gewählt, dass eine Wirkstärke von 100 mg/ml resultierte. Die G418-Lösung wurde anschließend in ein zweites PP-Röhrchen steril filtriert, zu je 1 ml in PP-Reaktionsgefäße (*M9*) aliquotiert und bei -30 °C eingefroren.

L4 GDP-Stammlösung 10 mM

GDP-Mononatriumsalz (*R11*) wurde eingewogen, in *Aqua destillata* gelöst und zu je 50 µl aliquotiert. Die Aliquote wurden bei –30 °C eingefroren.

L5 GTPγS-Stammlösung 1 mM

GTPγS-Tetralithiums Salz (*R10*) wurde eingewogen, in *Aqua destillata* gelöst und möglichst zügig zu je 50 µl aliquotiert. Die Aliquote wurden bei –80 °C eingefroren.

L6 HEPES-Stammlösung 200 mM

Ein Drittel HEPES-Natriumsalz (*R13*) und zwei Drittel HEPES-Säure (*R12*) wurden eingewogen und mit 1 M Natronlauge (*R25*) auf pH 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde bei 2-8 °C gelagert.

L7 Homogenisationspuffer (20 mM HEPES, 10 mM Na₂-EDTA)

50 ml HEPES-Stammlösung (*L6*) wurden mit 50 ml Natrium-EDTA-Lösung (*R6*) versetzt und mit *Aqua destillata* zu 500 ml ergänzt. Die Lagerung erfolgte bei 2-8 °C.

L8 Humanes Serumalbumin-Eichlösung (2 mg/ml)

Humanes Serumalbumin (*R14*) wurde eingewogen und in dem für den jeweiligen Versuchsansatz vorgesehenen Puffer gelöst.

L9 Kaliumnatriumtartrat-Lösung 2 % (m/m)

Kaliumnatriumtartrat (*R16*) wurde eingewogen, in *Aqua destillata* gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

L10 Kupfer(II)sulfat-Lösung 1 % (m/m)

Kupfersulfat (*R17*) wurde eingewogen, in *Aqua destillata* gelöst und bei Raumtemperatur gelagert.

L11 Lagerungspuffer [³⁵S]GTPγS (10 mM Tricine, 10 mM DTT)

Tricine (*R33*) und DTT (*R4*) wurden eingewogen und in *Aqua pro analysi* gelöst. Der pH-Wert dieser Lösung betrug 7,6. Die Lagerung erfolgte bei –30 °C.

L12 Natriumbutyrat-Stammlösung 100 mM

Natriumbutyrat (*R22*) wurde eingewogen und mit *Aqua destillata* zu 100 ml ergänzt. Die Lösung wurde bei 2-8 °C gelagert und kurz vor dem Gebrauch mit einem Mikrofilter (*M13*) steril filtriert.

L13 Nährmedium für CHO-M₂ und CHO-M₃-Zellen

Das Nährmedium zur Kultivierung der CHO M₂-Zellen und CHO M₃-Zellen wurde unter aseptischen Bedingungen an einer Sterilwerkbank hergestellt und bei 2-8 °C im Kühlschrank aufbewahrt. Kurz vor dem Gebrauch wurde es in einem Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Das Nährmedium hatte folgende Zusammensetzung:

Komponente	Volumen (ml)	Konzentration in der fertigen Lösung
Nutrient Mixture F-12 Ham (R26)	500	
Fetales Rinderserum (R7)	50	ca. 10 %
Penicillin-Streptomycin-Lösung (R27)	5	ca. 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin
L-Glutamin-Lösung 200 mM (R18)	3	ca. 1 mM
G418 (L3)	1	0,2 mg/ml

Tabelle 1: Nährmedium zur Kultivierung von CHO-M₂- und CHO-M₃-Zellen.

L14 Natriumcarbonat-Lösung 2 % (m/m)

Natriumcarbonat (R23) wurde eingewogen und in 0,1 M Natronlauge gelöst. Die Lösung wurde für jede Proteinbestimmung frisch hergestellt.

L15 Puffer A (4,1 mM MgHPO₄, 56,8 mM TRIS)

MgHPO₄ (R20) und TRIS (R34) wurden eingewogen und in *Aqua destillata* gelöst. Ein pH-Wert von 7,3 wurde mit 1 M Salzsäure (R31) eingestellt. Im Versuchsansatz resultierten daraus Konzentrationen von 3 mM MgHPO₄ und 50 mM TRIS. Der Puffer wurde bei 2-8 °C gelagert.

L16 Puffer B (4,3 mM MgHPO₄, 59,5 mM TRIS)

MgHPO₄ und TRIS wurden eingewogen und in *Aqua destillata* gelöst. Ein pH-Wert von 7,3 wurde mit 1 M Salzsäure eingestellt. Im Versuchsansatz resultierten daraus Konzentrationen von 3 mM MgHPO₄ und 50 mM TRIS. Der Puffer wurde bei 2-8 °C gelagert.

L17 Puffer C (3,9 mM MgHPO₄, 54,3 mM TRIS)

MgHPO₄ und TRIS wurden eingewogen und in *Aqua destillata* gelöst. Ein pH-Wert von 7,3 wurde mit 1 M Salzsäure eingestellt. Im Versuchsansatz resultierten daraus

Konzentrationen von 3 mM MgHPO₄ und 50 mM TRIS. Der Puffer wurde bei 2-8 °C gelagert.

L18 Puffer D (12,5 mM HEPES, 12,5 mM MgCl₂, 125 mM NaCl)

HEPES, zu einem Drittel als Na-Salz (R13), zu zwei Dritteln als Säure (R12), MgCl₂·6H₂O (R19) und NaCl (R24) wurden eingewogen, in *Aqua destillata* gelöst und mit 1 M Natronlauge (R25) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Im Reaktionsansatz ergaben sich daraus folgende Konzentrationen: 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl. Der Puffer wurde bei 2-8 °C gelagert.

L19 Saccharose-Lösung 0,32 M

Die Saccharose (R30) wurde eingewogen, in *Aqua destillata* gelöst und bei 2-8 °C gelagert.

L20 TRIS-Puffer 50 mM

TRIS (R34) wurde eingewogen, in *Aqua destillata* gelöst und mit 1 M Salzsäure (R31) auf pH 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde bei 2-8 °C gelagert.

L21 Zentrifugationspuffer (20 mM HEPES, 0,1 mM Na₂-EDTA)

50 ml HEPES-Stammlösung (L6) wurden mit 0,5 ml Natrium-EDTA-Lösung (R6) versetzt und mit *Aqua destillata* zu 500 ml ergänzt. Der Puffer wurde bei 2-8 °C gelagert.

2.1.2 Radioliganden

L22 [³H]N-Methylscopolamin-Chlorid

Durch Zugabe von 15 µl des vom Hersteller in Ethanol gelösten [³H]N-Methylscopolamin-Chlorids (siehe 2.3.8) in 15,0 ml *Aqua destillata* wurde eine Stammlösung hergestellt. Die Radioaktivität einer Probe von 50 µl bzw. 100 µl Stammlösung wurde mit Hilfe eines Flüssigszintillationszählers (G5) bestimmt und anhand der spezifischen Aktivität die Konzentration der Radioligand-Stammlösung ermittelt. Für die Versuche mit Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins wurde die Stammlösung mit weiterem *Aqua destillata* bis zu einer Konzentration von 3 nM verdünnt. Für die Versuche mit Membransuspensionen, die aus CHO-M₂- bzw. CHO-M₃-Zellen gewonnen wurden, wurde die Stammlösung mit Puffer D (L18) bis zu einer Konzentration von 2 nM verdünnt. Im Versuchsansatz ergab sich in beiden Fällen daraus eine Konzentration von 0,2 nM.

L23 [³⁵S]GTP γ S

20 μ l des vom Hersteller in einer Lösung aus 10 mM Tricine und 10 mM DTT gelösten [³⁵S]GTP γ S (siehe 2.3.8) wurden mit Lagerungspuffer (*LII*) zu 200 μ l ergänzt und zu je 5 μ l aliquotiert. Die Aliquote wurden bei -20 °C gelagert. DTT diente aufgrund seiner Fähigkeit Disulfid-Brücken zu reduzieren als Stabilisator des [³⁵S]GTP γ S. Tricine sorgte als Puffersubstanz für eine Aufrechterhaltung des pH-Werts. Kurz vor dem Versuch wurde ein Aliquot mit 7,0-10,0 ml Puffer D versetzt. Die Radioaktivität einer Probe von 50 μ l Radioligand-Lösung wurde mittels eines Flüssigszintillationszählers bestimmt und anhand der spezifischen Aktivität die Konzentration der Radioligand-Lösung ermittelt. Durch Zugabe weiterer Pufferlösung wurde eine Konzentration von 0,7 nM eingestellt. Im Versuchsansatz erfolgte eine Verdünnung um 1:10, sodass eine Endkonzentration von 0,07 nM erreicht wurde.

2.1.3 Geräte

Folgende Tabelle enthält eine Auflistung der verwendeten Geräte. Die in der ersten Spalte angegebenen Kürzel dienen dem leichteren Auffinden der im Text angegebenen Geräte. Die Namen der Herstellerfirmen werden in der dritten Spalte als Kurzform angegeben. Die ausführlichen Firmennamen sind dem Abschnitt 2.1.6 zu entnehmen.

Kürzel	Gerät	Firma
G1	1450 Microbeta [®] Trilux Liquid Scintillation & Luminescence Counter	Perkin
G2	Analysenwaage AG204	Mettler
G3	Avanti [®] J-20 XP Ultrazentrifuge, Rotortypen: JS 4.3 und JA 25.50	Beckman
G4	Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss
G5	Beckmann Counter LS-6000 SC (Flüssigkeits-Szintillationszähler)	Beckman
G6	Dri-Block [®] DB-2A (Heizblock)	Techne
G7	Duran [®] Erlenmeyer-Kolben weithalsig (50 ml)	Duran
G8	EH3 basic (temperiertes Rührwasserbad)	IKA
G9	Elix [®] -Wasseraufbereitungssystem	Millipore

Kürzel	Gerät	Firma
G10	Finnpipette Digital (unterschiedliche Volumina)	Thermo
G11	Finnpipette Stepper	Thermo Forma
G12	Handfiltrationsanlage	
G13	Harvester 96 [®] (Mach III M, Tomtec ; Produktnr.: 963-589)	Perkin
G14	Harvester 96 [®] (Mach III M, Tomtec ; Produktnr.: 990607010)	Perkin
G15	Herasafe Werkbank HS 15, Klasse II	Heraeus
G16	Mikrowelle R-611	Sharp
G17	Milli-Q [®] Reinstwassersystem	Millipore
G18	MS 1 Minishaker (Kleinschüttler)	IKA
G19	Neubauer Zählkammer	VWR
G20	Optima [®] LE-80K Ultrazentrifuge (Rotorty: 35)	Beckman
G21	Polytron-Homogenisator PT 10-35	Kinematica
G22	Potter-Elvehjem Glashomogenisator	Janke
G23	Präzisionsküvetten 100-QS	Hellma
G24	Präzisionswaage PB403-S	Mettler
G25	Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL
G26	Thermo Forma Series II Water Jacketed CO ₂ Incubator	Thermo Forma
G27	Ultrospec 3300 pro (UV-VIS-Spektrometer)	Biochrom
G28	Variomag Electronicrührer (Magnetrührer)	H+P
G29	Waring-Blendor-Homogenisator	Waring

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Kürzel	Material	Artikel- nummer	Firma
M1	1,2 ml Storage Plate, 96 Kavitäten („96-well“-Mikrotiterplatte)	AB-0564	Abgene
M2	Cellstar® Zellkulturschale mit Nocken, 145 x 20 mm, steril	639160	Greiner
M3	Cellstar® Zellkulturschale mit Nocken, 100 x 20 mm, steril	664160	Greiner
M4	Cryos. S, 1 ml, PP (Einfrierröhrchen)	123263	Greiner
M5	Glasfaserfilter (Durchmesser 25 mm)	10370018	Whatman
M6	Parafilm® M laboratory film	PM-996	Pechiney
M7	Pasteurpipetten aus Glas, ca. 150 mm	747715	Brand
M8	Plate Cassette	1450-105	Perkin
M9	Polypropylen-Reaktionsgefäß 1,5 ml, mit angehängtem Deckel	616201	Greiner
M10	PP-Röhrchen 15 ml, mit konischem Boden	188271	Greiner
M11	PP-Röhrchen, 50 ml, mit konischem Boden	227261	Greiner
M12	Printed Filtermat A (Glasfaser-Filtermatten)	1450-421	Perkin
M13	Qualilab® Spitzenvorsatzfilter, 0,22 µm CM-Membran, steril	5122110	Merck Lab
M14	Sample Bag	1450-432	Perkin
M15	Szintillationsflasche, HD-Polyethylen, 17,0 / 60,0 mm	619301	Greiner
M16	Zellschaber, 25 cm	83.1830	Sarstedt
M17	Zentrifugenröhrchen, Polycarbonat	3138-0050	Nalge

2.1.5 Reagenzien

Kürzel	Reagenz	Artikelnummer	Firma
R1	<i>Aqua destillata</i> (hergestellt mittels einer Elix [®] - Wasseraufbereitungsanlage)		Millipore
R2	<i>Aqua pro analysi</i> (hergestellt mittels eines Milli Q [®] -Reinstwassersystems)		Millipore
R3	Dimethylsulfoxid (DMSO; M = 78,1 g/mol)	D5879	Sigma
R4	DL-Dithiothreitol (DTT, (R*,R*)-(±)-1,4-Dimercaptobutan-2,3-diol; M = 154,3 g/mol)	D0632	Sigma
R5	Dulbeccoss phosphatgepufferte Kochsalzlösung	D5652	Sigma
R6	EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz; Na ₂ EDTA; Maßlösung; 100 mM)	20271	Grüssing
R7	Fetales Rinderserum	F7524	Sigma
R8	Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz	109001	Merck
R9	G418-Disulfat (M = 692,7 g/mol)	A1720	Sigma
R10	Guanosin-5'-[γ-thio]triphosphat-Tetralithiumsalz (GTPγS; M = 563,0 g/mol)	G8634	Sigma
R11	Guanosin-5'-diphosphat-Natriumsalz (GDP; M = 443,2 g/mol)	G7127	Sigma
R12	HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ylethansulfonsäure, M = 238,3 g/mol)	H3375	Sigma
R13	HEPES-Natriumsalz (M = 238,3 g/mol)	H7006	Sigma
R14	Humanes Serumalbumin (HSA; Fraktion V; 96-99 % Albumin)	A1653	Sigma
R15	Kaliumdihydrogenorthosphosphat (KH ₂ PO ₄ ; M = 136,09 g/mol)	P5379	Sigma
R16	Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat (C ₄ H ₄ KNaO ₆ · 4 H ₂ O; M = 282,22 g/mol)	379832	Sigma
R17	Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat (CuSO ₄ · 5H ₂ O; M = 249,7 g/mol)	102790	Merck

Material und Methoden

Kürzel	Reagenz	Artikel- nummer	Firma
R18	L-Glutamin-Lösung 200 mM (C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ ; M = 146,15 g/mol)	G7513	Sigma
R19	Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ · 6 H ₂ O; M = 302,3 g/mol)	M2670	Sigma
R20	Magnesiumhydrogenphosphat-Trihydrat (MgHPO ₄ · 3 H ₂ O; M = 174,33 g/mol)	63080	Fluka
R21	Meltilex TM A (Szintillationswachs)	1450-441	Perkin
R22	Natriumbutyrat (C ₄ H ₇ NaO ₂ ; M = 110,1 g/mol)	26319	Acros
R23	Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃ ; M = 106,0 g/mol)	106392	Merck
R24	Natriumchlorid (NaCl; M = 58,4 g/mol)	0278	Baker
R25	Natronlauge 1M (NaOH 1 M)	35256	Riedel
R26	Nutrient Mixture F-12 Ham	N4888	Sigma
R27	Penicillin-Streptomycin-Lösung (Penicillin 10.000-12.000 U/ml; Streptomycin 10-12 mg/ml)	P0781	Sigma
R28	Polyethylenimin-Lösung 50 % in Wasser (m/v) (PEI)	P3143	Sigma
R29	Ready Protein+ TM (Szintillations-Cocktail)	586604	Beckman
R30	Saccharose	107687	Merck
R31	Salzsäure 1 M (HCl 1 M)	23204	Grüssing
R32	Sigmacote [®] (chloriertes Organopolysiloxan in Heptan)	SL2	Sigma
R33	Tricine ((N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin; M = 179,2 g/mol)	T0377	Sigma
R34	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan (TRIS ; M = 121,14 g/mol)	108382	Merck
R35	Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin vom Schwein und 0,2 g/l Natrium-EDTA)	T3924	Sigma

2.1.6 Firmen

Die in den Tabellen „Geräte“, „Verbrauchsmaterialien“ und „Reagenzien“ verwendeten Firmen-Kürzel stehen jeweils in Klammern hinter der Firmen-Adresse.

Abgene, Hamburg, Deutschland (Abgene)

Acros Organics, Geel, Belgien (Acros)

Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland (Beckman)

Biochrom, Ltd., Cambridge, UK (Biochrom)

Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland (Brand)

Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland (Zeiss)

Duran Produktions GmbH & Co. KG, Mainz, Deutschland (Duran)

Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz (Fluka)

Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland (GFL)

Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland (Greiner)

Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland (Grüssing)

Hellma GmbH Co. KG, Mühlheim, Deutschland (Hellma)

Heraeus, Hilden, Deutschland (Heraeus)

H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland (H+K)

IKA[®] Werke GmbH Co. KG, Staufen, Deutschland (IKA)

Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland (Janke)

Kinematica AG, Littau, Schweiz (Kinematika)

Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland (Baker)

Merck Labor und Chemie Vertrieb GmbH, Bruchsal, Deutschland (Merck Lab)

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (Merck)

Mettler-Toledo AG, Giessen, Deutschland (Mettler)

Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland (Millipore)

Nalge Nunc International, Rochester, USA (Nalge)

Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA (Pechiney)

Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Rodgau-Jügesheim, Deutschland (Perkin)

Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland (Riedel)

Sarstedt AG Co., Nümbrecht, Deutschland (Sarstedt)

Sharp Electronics GmbH, Hamburg, Deutschland (Sharp)

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

Techne AG, Jahnsdorf, Deutschland (Techne)

Thermo LabSystems Oy, Helsinki, Finnland (Thermo)

Thermo Forma Scientific, Marietta, USA (Thermo Forma)

VWR International, Langenfeld, Deutschland (VWR)

Whatman GmbH, Dassel, Deutschland (Whatman)

2.2 Computerprogramme

GraphPad Prism 3.0 und 4.0, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA

GraphPad InStat 3.0, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA

Microsoft Word 2000, Microsoft Corporation, Redmont, Washington, USA

Microsoft Excel 2000, Microsoft Corporation, Redmont, Washington, USA

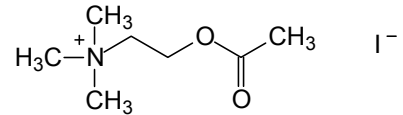
ChemWindow 6.0, Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, Pennsylvania, USA

2.3 Strukturformeln der Testsubstanzen

2.3.1 Agonisten

Acetylcholin

M = 273,1 g/mol



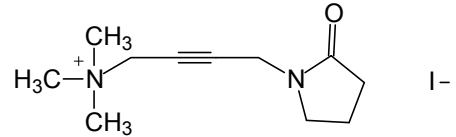
Vorkommen: Neurotransmitter im ZNS; Überträgerstoff an der motorischen Endplatte, an allen präganglionären Synapsen des vegetativen Nervensystems, an allen postganglionären Synapsen des Parasympathikus, sowie an den sympathischen Endigungen der Schweißdrüsen.

Lieferant: Sigma

Artikelnummer: A 7000

Oxotremorin-M

M = 322,2 g/mol

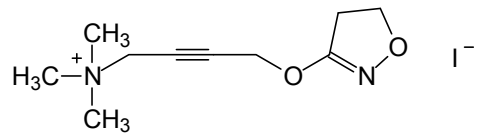


Lieferant: Sigma

Artikelnummer: O 100

Iperoxo

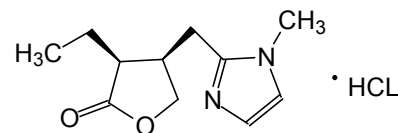
M = 324,2 g/mol



Entwicklung: Arbeitskreis Professor Dr. M. De Amici (Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi di Milano, Italien)

Pilocarpin (3S, 4R)

M = 244,7 g/mol



Vorkommen: Die freie Base ist das Hauptalkaloid aus den Blättern von Pilocarpus-Arten aus der Familie der Rutaceae.

Anwendung: In der Ophthalmologie lokal als Antiglaukomatosum; systemisch zur Behandlung der Mund- und Augentrockenheit bei Sjögren-Syndrom (Rote Liste® 2007).

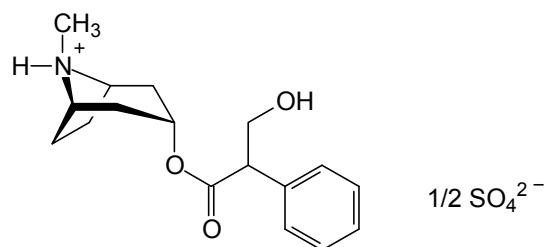
Lieferant: Fluka

Artikelnummer: 80475

2.3.2 Antagonisten

Atropin (DL-Hyoscyamin)

M = 676,8 g/mol



Vorkommen: Die freie Base ist das Racemat des nativ in Solanaceen (Atropa belladonna, Datura stramonium u.a.) vorkommenden L-Hyoscyamins.

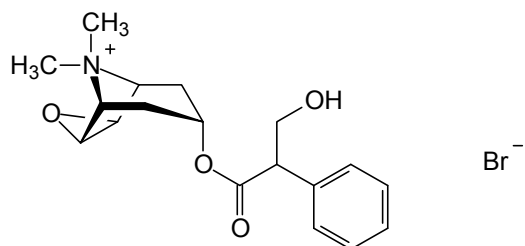
Anwendung: Parasympatholytikum in der Ophthalmologie, bei Koliken des GI-Trakts, zur Operationsvorbereitung, bei Bradyarrhythmien, sowie als Antidot bei Organophosphat-Vergiftungen (Rote Liste 2007[®]).

Lieferant: Sigma

Artikelnummer: A0257

N-Methylscopolamin

M = 398,3 g/mol



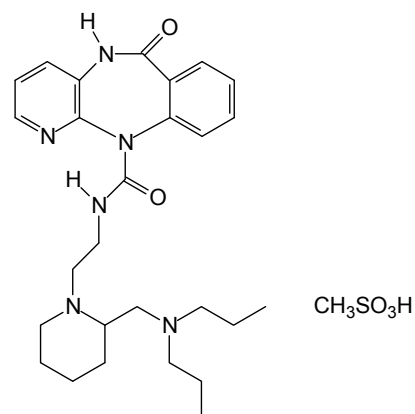
Lieferant: Fluka

Artikelnummer: 80475

AF-DX 384

freie Base: M = 478,6 g/mol

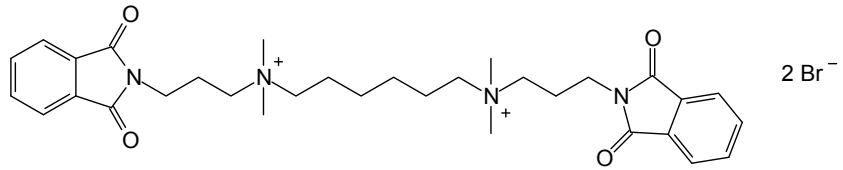
Methylsulfonat: M = 574,7 g/mol



2.3.3 Allosterische Liganden

W84

M = 708,5 g/mol

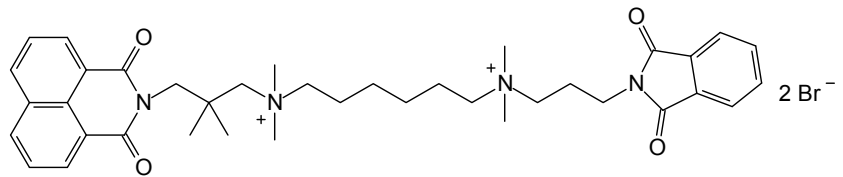


Herkunft: Dr. J. Pfeffer (Pharmakologisches Institut, Universität Kiel, Deutschland). Die Synthese-Vorschrift wurde von Wassermann (Wassermann, 1972) etabliert.

Naphmethonium

(MM3A)

M = 786,6 g/mol

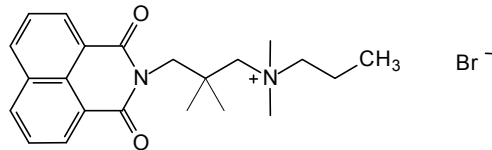


Herkunft: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, Deutschland).

Seminaph

(MM7a)

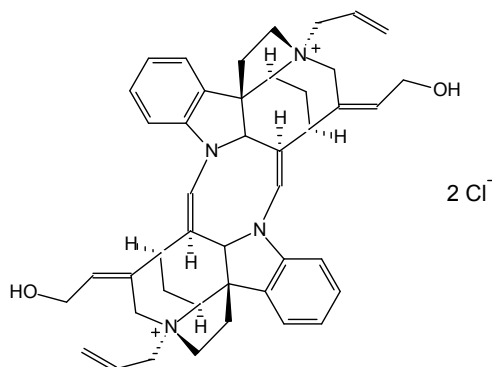
M = 737,8 g/mol



Herkunft: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, Deutschland).

Alcuronium

M = 737,8 g/mol



Anwendung: stabilisierendes Muskelrelaxanz

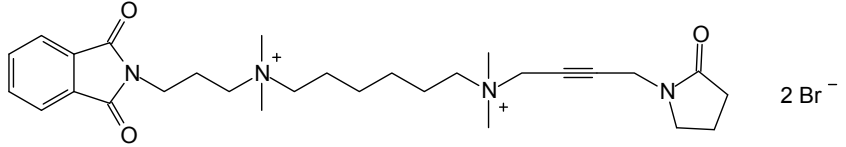
Herkunft: Die Substanz wurde uns freundlicherweise von der Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Wyhlen) überlassen.

2.3.4 Hybride aus W84 und Oxotremorin-M-artigen Agonisten

Entwicklung: Arbeitskreise Professor Dr. M. De Amici (Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi di Milano, Italien) und Professor Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, Deutschland).

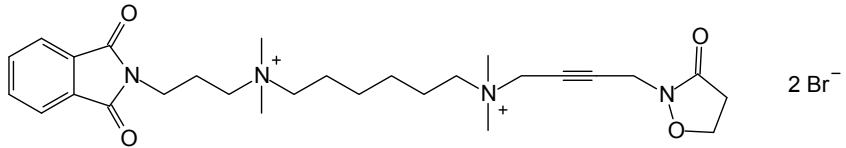
DDT1

M = 656,5 g/mol



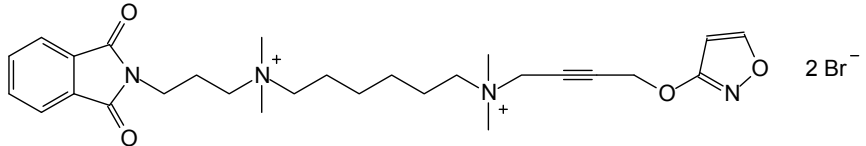
DDT3

M = 682,5 g/mol



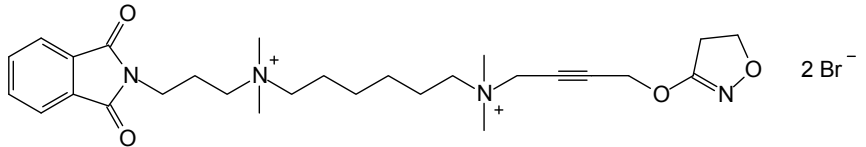
DDT4

M = 658,5 g/mol



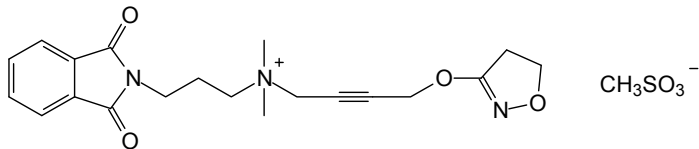
DDT5

M = 658,5 g/mol



DDT6

M = 465,5 g/mol

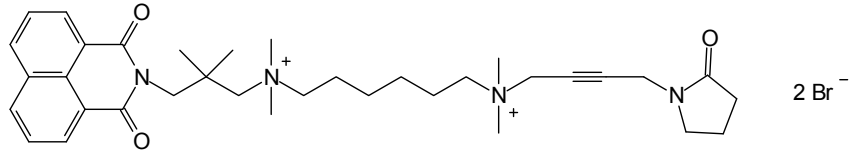


2.3.5 Hybride aus Naphmethonium und Oxotremorin-M-artigen Agonisten

Entwicklung: Arbeitskreise Professor Dr. M. De Amici (Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi di Milano, Italien) und Professor Dr. U. Holzgrave (Pharmazeutische Chemie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, Deutschland).

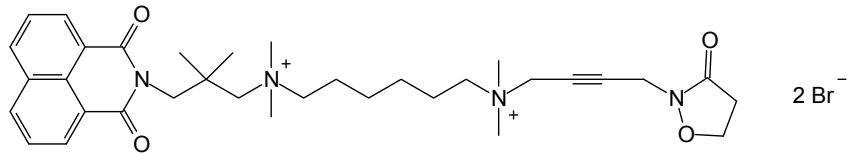
MMH1-6

M = 734,6 g/mol



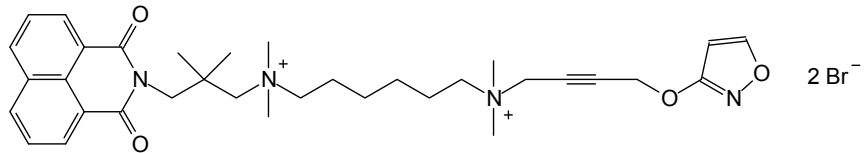
MMH3-6

M = 736,6 g/mol



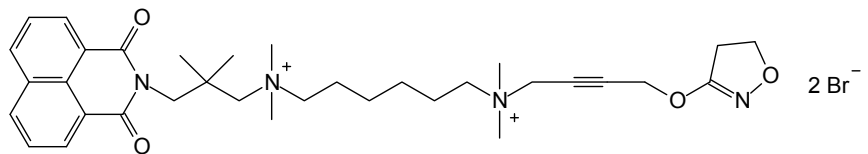
MMH4-6

M = 734,6 g/mol



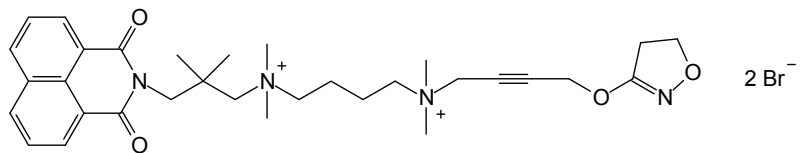
MMH5-6

M = 736,6 g/mol



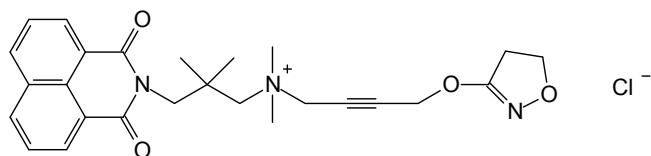
MMH5-4

M = 708,5 g/mol



MMH6-0

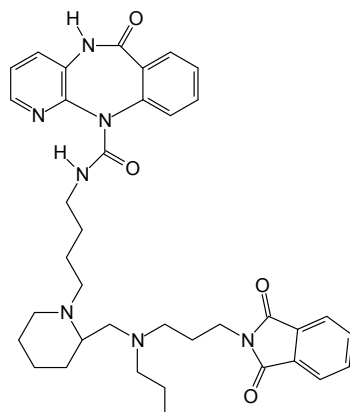
M = 486,0 g/mol



2.3.6 Hybrid aus W84 und AF-DX 384

EHW412

M = 651,7 g/mol

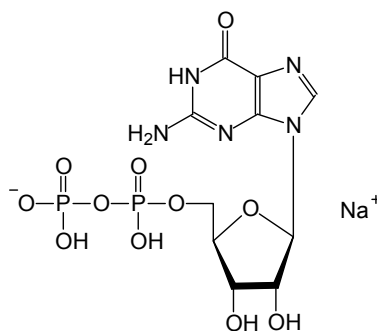


Entwicklung: Arbeitskreise Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Universität Würzburg, Deutschland) und Prof. Dr. D. Höltje (Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Institut für Pharmazie, Universität Düsseldorf, Deutschland)

2.3.7 Nukleotide

GDP

M = 465,2 g/mol

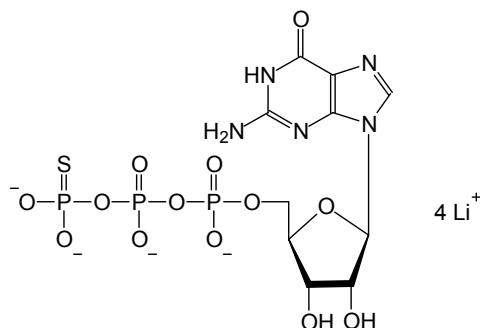


Lieferant: Sigma

Artikelnummer: G7127

GTP γ S

M = 563,0 g/mol



Lieferant: Sigma

Artikelnummer: G8634

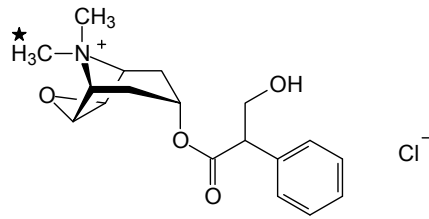
2.3.8 Radioliganden

[³H]N-Methylscopolamin

M = 353,8 g/mol

Spezifische Aktivität:

81-82 Ci/mmol, je nach Charge



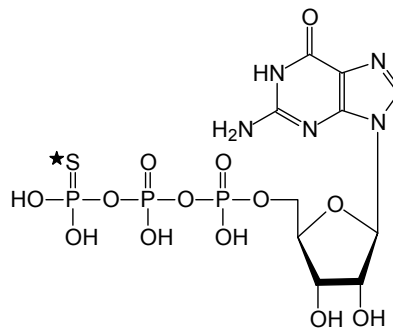
Lieferant: Perkin Elmer

Artikelnummer: NET636001MC

[³⁵S]GTP_γS

M = 539,2 g/mol

Spezifische Aktivität: 1250 Ci/mmol



Lieferant: Perkin Elmer

Artikelnummer: NEG030H250UC

2.4 Membranpräparation von Herzventrikelgewebe des Hausschweins

Der überwiegende Teil der in Radioligandbindungsstudien gewonnenen Daten wurde mit Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins erhoben. Da die Methode bereits an anderer Stelle ausführlich beschrieben wurde (Dittmann, 2003; Tränkle et al., 1996), soll hier nur auf das Wesentliche eingegangen werden. Alle Arbeitsschritte der Membranpräparation wurden in einer Kühlkammer bei 4 °C durchgeführt. Die frischen Herzen von Hausschweinen (*Sus scrofa domestica*) wurden vom Schlachthof Köln bezogen. Die Herzvorhöfe wurden von den Herzen entfernt und verworfen, anschließend wurde das Myokard in kleinere Stücke zerteilt und bis zur Weiterverarbeitung bei –80 °C eingefroren.

Am Tage der Membranpräparation wurde ein leicht aufgetautes Stück (ca. 40 g) des Ventrikelgewebes mit einem Messer zerkleinert und zur Entfernung von Blutresten mit 0,32 M Saccharose-Lösung (*L19*) gespült. Die Gewebestücke wurden in Saccharose-Lösung aufgenommen, zunächst mit einem Waring-Blendor-Homogenisator (*G29*) und anschließend mit einem Glashomogenisator (*G22*) homogenisiert. Die resultierende Suspension wurde 11 min bei 4 °C und 466-g zentrifugiert (*G20*; Rotor: 35). Die „Pellets“ wurden verworfen und die Überstände erneut für 41 min bei 4 °C und 119276-g zentrifugiert (*G20*; Rotor: 35). Die erhaltenen „Pellets“ wurden in 50 mM TRIS-Puffer (*L20*) aufgenommen, resuspendiert, zu je 1 ml in PP-Reaktionsgefäße verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zum Versuchstag wurden die Membransuspensionen bei –80 °C gelagert.

2.5 Zellkultur

2.5.1 Zelllinien

Die in vorliegender Arbeit beschriebenen [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimente wurden mit Membransuspensionen durchgeführt, die aus Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*) gewonnen wurden. Diese Zellen (CHO-K1) sind mit dem humanen Rezeptor-Gen für den muskarinischen M₂- bzw. M₃-Rezeptor stabil transfiziert und werden in Folgendem als CHO-M₂- bzw. CHO-M₃-Zellen bezeichnet. Die Zellen wurden uns dankenswerterweise von Prof. Dr. Günter Lambrecht (Abteilung Pharmakologie, Bio-

zentrum Niederursel, Universität Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt. Die CHO-M₂- und CHO-M₃-Zellen besitzen neben dem Rezeptor-Gen als dominanten Selektionsmarker das „*neo*“-Reportergen, das für eine Aminoglykosid-Phosphotransferase codiert. Durch die Zugabe des zytotoxischen G418 zum Nährmedium wird ein Selektionsdruck auf die Zellen ausgeübt, sodass nur die transfizierten Zellen überleben. CHO-K1-Wildtyp-Zellen exprimieren keine muskarinischen Rezeptoren (Eckstein, 2004). Daher ist davon auszugehen, dass alle mit diesen Zellen beobachteten Effekte nur auf einen Rezeptor-Subtyp zurückzuführen sind. Auf die Zugabe von Cholinesterase-Inhibitoren konnte verzichtet werden, da CHO-K1-Zellen keine Cholinesterase-Aktivität aufweisen (Lazareno und Birdsall, 1993).

2.5.2 Kultivierung der CHO-Zellen

Die Kultivierung der CHO-Zellen erfolgte unter aseptischen Bedingungen. Alle Arbeitsschritte mit den lebenden Zellen wurden an einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 mit laminarem Luftstrom (*G15*) durchgeführt. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen (*M2*) bei 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 96 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % in 15-18 ml des unter 2.1.1 beschriebenen Nährmediums inkubiert. Nach 2-3 Tagen hatten sich die Zellen zu einer Konfluenz von 80-90 % vermehrt. Es erfolgte eine Aufteilung im Verhältnis 1:5. Dazu wurde das alte Nährmedium einer Schale abgesaugt und die Zellen mit 10 ml D-PBS (*L1*) gespült. Durch anschließendes Einwirken (ca. 2-3 min) von 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (*R35*) bei 37 °C erfolgte die Ablösung der adhären Zellen. Hatten sich nicht alle Zellen vom Boden der Schale gelöst, wurde vorsichtig an den Rand der Schale geklopft, um die restlichen Zellen abzulösen. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml Nährmedium abgespült, die erhaltene Zellsuspension in ein PP-Röhrchen (*M11*) gegeben und 4 min bei 4 °C und 185-g zentrifugiert (*G3*, Rotor JS 4.3). Danach wurde der Trypsin-EDTA-haltige Überstand abgesaugt und das „Pellet“ mit Nährmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf 5 Platten, in die 15-18 ml Nährmedium vorgelegt worden waren, aufgeteilt.

Kryokonservierung von CHO-Zellen

Analog zu den oben erläuterten Arbeitsschritten wurde das Nährmedium einer Zellkulturschale abgesaugt, die Zellen wurden mit D-PBS (*L1*) gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA-Lösung behandelt. Nachdem sich die Zellen von der Schale abgelöst hatten, wurden diese mit Nährmedium abgespült, und die erhaltene Zellsuspension wurde

zentrifugiert. Das „Pellet“ wurde in 900 µl Nährmedium aufgenommen und in ein Einfrierröhrchen (*M4*), das zuvor mit 100 µl Dimethylsulfoxid (*R3*) beschickt worden war, gegeben. Die Zellen wurden nun möglichst zügig einer Lagerung in flüssigem Stickstoff zugeführt. Die Zugabe von Dimethylsulfoxid diente den Zellen als Gefrierschutz.

Auftauen und Revitalisieren von CHO-Zellen

Dazu wurde ein in flüssigem Stickstoff gelagertes Einfrierröhrchen vorsichtig bei Raumtemperatur aufgetaut. Der Inhalt wurde möglichst zügig in ein PP-Röhrchen (*M11*), in das zuvor 10 ml Nährmedium gegeben worden waren, überführt und 4 min bei 4 °C und 185·g zentrifugiert (*G3*, Rotor JS 4.3). Im Anschluss daran wurde der Überstand abgesaugt und das „Pellet“ in circa 2 ml Nährmedium suspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine Zellkulturschale (*M3*), in die 15 ml Nährmedium vorgelegt worden waren, gegeben. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte wie zu Beginn des Abschnittes beschrieben.

2.5.3 Membranpräparation der CHO-Zellen

Vor der Präparation der Membranen wurden die Zellen für 18-24 Stunden mit 5 mM Natriumbutyrat-haltigem Nährmedium kultiviert. Dazu wurde am Tag vor der Membranpräparation das alte Nährmedium von 20 bzw. 40 Schalen abgesaugt und durch frisches Nährmedium, dem 5 mM Natriumbutyrat (*L12*) zugesetzt wurden, ausgetauscht. Durch die Zugabe des Natriumbutyrats sollte die Expression der muskarinischen ACh-Rezeptoren gesteigert werden (Kruh, 1982).

Für die Membranräparation wurde das Nährmedium von 5 Schalen abgesaugt und jeweils 2,4 ml eisgekühlter Homogenisationspuffer (*L7*) auf die Zellkulturschalen gegeben. Mit einem Zellschaber (*M16*) wurden die Zellen vom Boden der Schalen abgelöst. Die Zellsuspensionen wurden in einem Zentrifugenröhrchen (*M17*) vereinigt. Danach wurden die Schalen jeweils mit weiteren 1,5 ml Homogenisationspuffer abgespült und die Spüllösungen ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Mit den übrigen Zellkulturschalen wurde in gleicher Weise verfahren. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden mit Hilfe eines Homogenisators (*G21*; Stufe 6) zweimal im Abstand von etwa 2 min 20 s lang homogenisiert und anschließend 10 min bei 2 °C und 40000·g zentrifugiert (*G3*; Rotor JA 25.5). Die Überstände wurden abgesaugt, die „Pellets“ in jeweils 15 ml eisgekühltem Zentrifugationspuffer (*L21*) suspendiert und erneut 10 min bei 2 °C und 40000·g zentrifugiert. Dieser Arbeitsschritt wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Im Anschluss an die letzte Zentrifugation wurden die Überstände abgesaugt und die „Pellets“

in 9 ml (20 Platten) bzw. 18 ml (40 Platten) Puffer D (L18) aufgenommen. Die Membransuspension wurde zu je 500-1000 µl auf PP-Reaktionsgefäße (M9) verteilt und bei -80 °C eingefroren.

2.6 Bestimmung des Proteingehalts von Membransuspensionen

Zur Bestimmung des Proteingehalts kam die Methode nach Lowry et al. (1951) zur Anwendung. Für die Generierung einer Eichgeraden wurde eine Eichlösung aus humanem Serumalbumin (L8) angefertigt. Durch unterschiedliches Verdünnen der Eichlösung mit Puffer wurde eine Eichreihe hergestellt. Es wurden 7 Verdünnungsstufen gewählt, deren Konzentrationen zwischen 0 und 2 mg Protein/ml lagen. Die zu untersuchende Membransuspension wurde in den Verhältnissen 1:8, 1:4 und 1:2 mit Puffer verdünnt. 200 µl der so vorbereiteten Probe wurden in ein Reagenzglas gegeben und es wurden 2,0 ml Arbeitslösung, die aus 100 Teilen 2%iger Natriumcarbonat-Lösung (L14), einem Teil 2%iger Kaliumnatriumtartrat-Lösung (L9) und einem Teil 1%iger Kupfer(II)sulfat-Lösung (L10) bestand, zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubationsphase wurden die Versuchsansätze unter Schütteln mit 200 µl Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz (L2) versetzt und für weitere 30 min unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines UV-Vis-Spektrometers (G27) die Absorption bei einer Wellenlänge von 500 nm bestimmt. Mit Hilfe des Programms Microsoft Excel[®] wurde eine Eichgerade erstellt, anhand derer die Protein-Konzentrationen der Proben bestimmt wurden. Alle Werte wurden in einer Doppelbestimmung erhoben. Die durchschnittlichen, in dieser Arbeit erhaltenen Proteinkonzentrationen sind der untenstehenden Tabelle zu entnehmen.

	HVS	CHO-M ₂	CHO-M ₃
Proteingehalt (mg/ml)	3,44; 4,61	2,05 ± 0,05	2,03 ± 0,09
n =	2	28	6

Tabelle 2: Proteingehalt in mg/ml der Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins, CHO-M₂- bzw. CHO-M₃-Zellen. **n:** Anzahl untersuchter Membransuspensionen.

2.7 Radioligandbindungsstudien

2.7.1 Massenwirkungsgesetz

Im Falle der reversiblen Bindung eines Liganden an einen Rezeptor laufen Assoziations- und Dissoziationsvorgänge gleichzeitig ab:

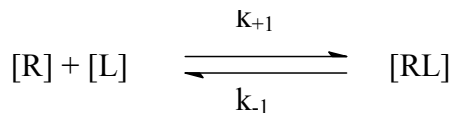


Abbildung 4: Massenwirkungsgesetz

- [R]: Rezeptor-Konzentration
- [L]: Ligand-Konzentration
- [RL] Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe
- k_{+1} : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
- k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation

Für die Geschwindigkeit der Assoziation gilt:

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

Analog dazu lässt sich für die Geschwindigkeit der Dissoziation folgende Gleichung formulieren:

$$v_{\text{rück}} = k_{-1} \cdot [RL] \quad (\text{Gleichung 2})$$

Befindet sich die Reaktion im Gleichgewicht, laufen Assoziations- und Dissoziationsprozesse mit gleicher Geschwindigkeit ab, und nach dem Massenwirkungsgesetz gilt:

$$k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] = k_{-1} [RL] \quad (\text{Gleichung 3})$$

Durch Zusammenfassen der Geschwindigkeitskonstanten erhält man die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D (Einheit: mol/l), deren Kehrwert die Gleichgewichts-Assoziationskonstante K_A darstellt.

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

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

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D gibt die Lage des Bindungsgleichgewichts an. K_D entspricht der Ligand-Konzentration, bei der die Hälfte der vorhandenen Rezeptoren besetzt sind. Der K_D -Wert wird meist als negativer dekadischer Logarithmus - pK_D - angegeben. Je größer pK_D eines Liganden ist, desto höher ist dessen Affinität zum Rezeptor.

2.7.2 Experimente im Bindungsgleichgewicht

Bei dieser Art von Experimenten werden Membransuspensionen, die den zu untersuchenden Rezeptor enthalten, mit dem Radioliganden sowie gegebenenfalls einem weiteren Liganden so lange inkubiert, bis das Bindungsgleichgewicht erreicht ist.

Generell sind hier zwei Vorgehensweisen zu unterscheiden. Bei Sättigungsexperimenten werden zu einer fixen Konzentration der Membransuspension steigende Konzentrationen des Radioliganden hinzugegeben. Da diese Versuchsart einen hohen Verbrauch an Radioligand zur Folge hat, wurde in vorliegender Arbeit darauf verzichtet. Vielmehr wurde zu der fixen Konzentration der Membransuspension eine konstante Konzentration des Radioliganden und steigende Konzentrationen eines unmarkierten Liganden, in Folgendem als Inhibitor bezeichnet, hinzugegeben. In Abhängigkeit von der Natur des Radioliganden und des Inhibitors sind unterschiedliche Arten der Wechselwirkung möglich:

- **Kompetition um die orthosterische Bindungsstelle**
- **Kompetition um die allosterische Bindungsstelle**
(in dieser Arbeit nicht untersucht)
- **Allosterische Interaktion**

Im Falle einer Kompetition konkurrieren Radioligand und Inhibitor um die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor. Sind Radioligand und Inhibitor strukturgleich, wird dies als **homologe Kompetition** bezeichnet. Die homologe Kompetition zwischen [^3H]NMS und NMS um die orthosterische Bindungsstelle wurde in vorliegender Arbeit zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften von Membransuspensionen herangezogen.

Bei der allosterischen Interaktion bindet das „Alloster“ an die allosterische Bindungsstelle und kann durch Beeinflussung der Raumstruktur des Rezeptors die Bindungseigenschaften des Radioliganden, der an die orthosterische Bindungsstelle bindet, beeinflussen.

2.7.2.1 Homologe Competition

Bevor eine Membransuspension in Versuchen eingesetzt wurde, wurde ein homologes Competitionsexperiment durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung war es, die Affinität des eingesetzten Radioliganden (K_D) und die Anzahl der Bindungsstellen (B_{max}) zu bestimmen. Wie unter 2.7.2 beschrieben, konkurriert hier der in einer fixen Konzentration eingesetzte Radioligand mit einem strukturidentischen Kompetitor, der in steigenden Konzentrationen zugegeben wird, um die orthosterische Bindungsstelle. Die Gesamtbindung des Radioliganden wird in Abwesenheit des Kompetitors ermittelt. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgt durch Zugabe eines strukturverschiedenen Inhibitors im Überschuss, der Affinität zur gleichen Bindungsstelle besitzt und den Radioliganden und seinen Kompetitor aus der spezifischen Bindung „verdrängt“. Nach Einstellung des Gleichgewichts und Abtrennung des ungebundenen Radioliganden mittels Filtration wird jeweils die Menge des gebundenen Radioliganden bestimmt. Nach der Auftragung der gebundenen Radioaktivität gegen die logarithmische Konzentration des Kompetitors wird mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Barlow und Blake, 1989) eine Kurve an die Datenpunkte angepasst, deren Verlauf einem Sigmoid entspricht. Die Steigung n dieses Sigmoids entspricht dem Hill-Koeffizienten aus der Hill-Gleichung und kann deshalb als n_H bezeichnet werden:

$$B_{ges} = MIN + \frac{MAX - MIN}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{10^{[X]}} \right)^{n_H}} \quad (Gleichung 6)$$

- B_{ges} : Gesamtbindung des Radioliganden
- MIN: unteres Plateau der Kurve
- MAX: oberes Plateau der Kurve
- IC_{50} : Konzentration des Kompetitors im Wendepunkt der Kurve
- [X]: Konzentration des Kompetitors
- n_H : Hill-Koeffizient; Maß für die Kurvensteigung

Weicht der Hill-Koeffizient nicht signifikant von eins ab, so ist davon auszugehen, dass es sich um eine homogene Rezeptorpopulation handelt und der Ligand im Verhältnis 1:1 mit dem Rezeptor interagiert. Der IC_{50} -Wert, d.h. der Wendepunkt der sigmoiden Kurve, gibt die Konzentration des Kompetitors an, bei der dieser 50 % der Rezeptoren besetzt hat.

Cheng und Prussoff (1973) entwickelten eine Gleichung, die die Beziehung zwischen dem IC_{50} -Wert und der Affinität (K_I) des Kompetitors zu den eingesetzten Rezeptoren wiedergibt:

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

[L] Konzentration des Radioliganden

[K_D] Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Radioligand-Bindung

Da bei homologen Kompetitions-Experimenten Radioligand und Kompetitor strukturgleich sind, besitzen sie infolgedessen auch die gleiche Affinität zum Rezeptor ($K_I = K_D$) und Gleichung 7 vereinfacht sich zu folgender Gleichung:

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

Unter Berücksichtigung der spezifischen Bindung des Radioliganden (B_0) lässt sich nach DeBlasi et al. (1989) aus dem Wendepunkt der Kurve (IC_{50}) zusätzlich die Anzahl an Bindungsstellen (maximale Bindung; B_{max}) der Membransuspension berechnen:

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

2.7.2.1.1 Homologe Konkurrenzexperimente an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins

In vorliegender Arbeit wurde [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS; *L22*) als Radioligand und nicht radioaktiv markiertes N-Methylscopolamin (NMS) als strukturidentischer Kompetitor eingesetzt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde Atropin im Überschuss verwendet. Es wurde bei 37 °C mit einem Puffersystem (*L15*) gearbeitet, das 3 mM MgHPO₄ und 50 mM TRIS enthielt. Die Erhebung der Datenpunkte erfolgte jeweils in Dreifachbestimmung.

Die einzelnen Komponenten wurden nach untenstehendem Schema in PP-Reaktionsgefäße (*M9*), die zuvor mit Sigmacote[®] (*R32*) silanisiert wurden, pipettiert.

Komponente (Endkonzentration im Versuchsansatz)	Gesamt- bindung	Unspezifische Bindung	NMS-Bindung
[³ H]NMS (0,2 nM)	100 µl	100 µl	100 µl
<i>Aqua destillata</i>	50 µl	-	-
Atropin (1 µM)	-	50 µl	-
NMS (aufsteigende Konzentrationen)	-	-	50 µl
Puffer A	1100 µl	1100 µl	1100 µl
Membransuspension	250 µl	250 µl	250 µl

Tabelle 3: Versuchsansatz für die homologe Konkurrenz an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins. Die Komponenten wurden gemäß der in der Tabelle dargestellten Reihenfolge in zuvor mit Sigmacote[®] silanisierte PP-Reaktionsgefäße pipettiert. Das Gesamtvolumen betrug jeweils 1,5 ml. Im fertigen Versuchsansatz ergaben sich aus Puffer A folgende Konzentrationen: 3 mM MgHPO₄ und 50 mM TRIS.

Nach Zugabe der Membransuspension, die zuvor mit 50 mM TRIS-Puffer (*L20*) auf den gewünschten Verdünnungsgrad eingestellt wurde, und gründlichem Durchmischen mit Hilfe eines Kleinschüttlers (*G18*) wurden die Versuchsansätze bei 37 °C in einem Schüttelwasserbad für 120 min inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde jedem Reaktionsansatz 1,0 ml entnommen und einzeln durch Vakuumfiltration mittels einer Handfiltrationsanlage durch mit *Aqua destillata* befeuchtete Glasfaserfilter (*M5*) filtriert. Zur Verminderung der unspezifischen Bindung wurde zweimal mit je 5 ml *Aqua destillata* (4 °C) gespült. Die Glasfaserfilter wurden jeweils in eine Szintillationsflasche (*M15*) überführt und mit 5 ml Szintillationscocktail (*R29*) versetzt. Während einer Inkubationsphase, die mindestens eine Stunde betrug, wurden Filter- bzw. Gewebebestandteile zersetzt und die enthaltene Radioaktivität konnte mittels eines Flüssigkeits-

Szintillationszählers (*G5*) bestimmt werden. Die computergestützte Datenanalyse erfolgte wie unter 2.7.2.1 beschrieben.

2.7.2.1.2 Homologe Konkurrenzexperimente an Membransuspensionen aus CHO-M₂- und CHO-M₃-Zellen

Wie schon unter 2.7.2.1.1 beschrieben, wurde auch hier [³H]NMS als Radioligand, nicht radioaktiv markiertes NMS als strukturidentischer Kompetitor, sowie Atropin zur Bestimmung der unspezifischen Bindung verwendet. Um die Inkubationsbedingungen mit denen des [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiments vergleichbar zu machen, wurde hier bei 30 °C mit einem Puffersystem (*L18*) gearbeitet, das 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl enthielt. Außerdem erfolgte hier ebenfalls eine Zugabe von GDP. Der Proteingehalt der CHO-M₂-Membransuspensionen wurde zunächst so gewählt, dass er mit 50 µg/ml dem Proteingehalt in den [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten entsprach. Wegen der sehr hohen Rezeptorkonzentration der CHO-M₃-Membransuspensionen musste hier auf einen niedrigeren Proteingehalt von 20 µg/ml ausgewichen werden. Die einzelnen Komponenten wurden nach untenstehendem Schema in eine „96-well“-Mikrotiterplatte (*M1*) pipettiert, sodass die einzelnen Kavitäten jeweils ein Gesamtvolumen von 500 µl enthielten.

Komponente (Endkonzentration im Versuchsansatz)	Gesamt- bindung	Unspezifische Bindung	NMS-Bindung
<i>Aqua destillata</i>	100 µl	50 µl	50 µl
Atropin (1 µM)	-	50 µl	-
NMS	-	-	50 µl
GDP (M ₂ : 10 µM; M ₃ : 1 µM)	50 µl	50 µl	50 µl
Membransuspension (Protein: M ₂ : 50 µg/ml; M ₃ : 20 µg/ml)	50 µl	50 µl	50 µl
Puffer D (<i>L18</i>)	250 µl	250 µl	250 µl
[³ H]NMS (0,2 nM)	50 µl	50 µl	50 µl

Tabelle 4: Versuchsansatz für die homologe Konkurrenz an Membransuspensionen aus CHO-M₂- bzw. CHO-M₃-Zellen. Die Komponenten wurden gemäß der in der Tabelle dargestellten Reihenfolge in eine „96-well“-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Herstellung der GDP-Lösung, der CHO-Membransuspension, sowie der [³H]NMS-Lösung erfolgte jeweils mit Puffer D. Im fertigen Ansatz ergaben sich aus Puffer D folgende Endkonzentrationen: 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl.

Die Versuche wurden bis auf die Gesamtbindung (Sechsfachbestimmung) als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Nach Zugabe von [³H]NMS in einer Endkonzentration von 0,2 nM und gründlichem Durchmischen auf einem Kleinschüttler wurde die „96-well“-

Mikrotiterplatte mit Parafilm[®] (M6) abgedeckt und in ein auf 30 °C vortemperiertes Schüttelwasserbad gestellt. Versuchsansätze, die CHO-M₂-Membransuspensionen enthielten, wurden eine Stunde, solche, die CHO-M₃-Membransuspensionen enthielten, wurden aufgrund der längeren Dissoziationshalbwertszeit des [³H]NMS vom CHO-M₃-Rezeptor (Sennwitz, 2006) zwei Stunden inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde der Ansatz durch Vakuumfiltration über eine Glasfaserfiltermatte, die zur Verminderung der unspezifischen Bindung vorher in 0,1%ige Polyethylenimin-Lösung eingelegt worden war, mittels eines „Harvesters“ (G13) abfiltriert. Anschließend wurde noch zweimal mit *Aqua destillata* (4 °C) gespült, was ebenfalls zur Verminderung der unspezifischen Bindung beitrug. Nach einer dreiminütigen Trocknung der Filtermatte in der Mikrowelle bei 400 W wurde mit Hilfe eines Heizblocks (G6) Szintillationswachs (R21), in das ein Feststoffszintillator eingebettet war, auf die Filtermatte aufgeschmolzen. Nachdem das Szintillationswachs erkaltet war, wurde die Filtermatte erst in eine Proben tasche (M14) und dann in eine Zählkassette (M8) überführt. Die Menge des gebundenen [³H]NMS wurde über die Messung der radioaktiven Zerfälle mit Hilfe eines Feststoff-Szintillationszählers (G1) bestimmt. Die Zähldauer je Probe betrug 3 min. Die Datenanalyse erfolgte wie unter 2.7.2.1 beschrieben.

2.7.2.2 Allosterische Interaktion

Liegt in einem Rezeptorprotein neben der orthosterischen Bindungsstelle für den physiologischen Botenstoff eine weitere Bindungsstelle vor und können die beiden Bindungsstellen einander beeinflussen, so wird dies als Allosterie bezeichnet. Binden zwei strukturell verschiedenen Liganden gleichzeitig an die orthosterische und die allosterische Bindungsstelle, kommt es zur Bildung eines ternären Komplexes aus Rezeptor, allosterischem Liganden (Alloster) und orthosterischem Liganden (Orthoster). Ein Modell, das diese Art der Interaktion beschreibt, ist das Ternäre Komplex-Modell nach Ehlert (1988).

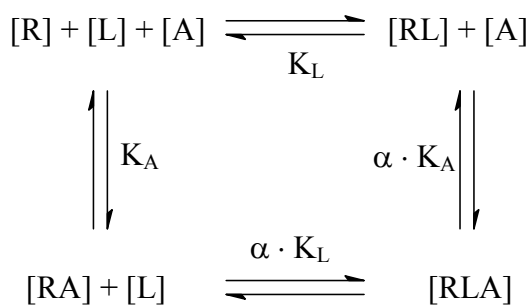


Abbildung 5: Ternäres Komplex-Modell nach Ehlert.

- [R]: Konzentration des freien Rezeptors
 - [L]: Konzentration des Orthosters
 - [A]: Konzentration des Allosters
 - K_A : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Alloster-Bindung
 - K_L : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Orthoster-Bindung
 - α : Kooperativitätsfaktor
- [RL], [RA] und [RLA] bezeichnen die entsprechenden Rezeptor-Ligand-Komplexe

Die Affinität des Allosters zum binären Komplex [RL] kann im Vergleich zu seiner Affinität zum freien Rezeptor verändert sein. Das gleiche gilt für die Affinität des Orthosters zum binären Komplex [RA]. Das Ausmaß dieser gegenseitigen Beeinflussung des Bindungsgleichgewichts von Orthoster und Alloster wird durch den Kooperativitätsfaktor α beschrieben. Der negative dekadische Logarithmus des Kooperativitätsfaktors ist negativ ($p\alpha < 0$), wenn sich die beiden Liganden zueinander bindungshemmend verhalten, er ist positiv ($p\alpha > 0$), wenn sie sich bindungsfördernd zueinander verhalten. Bei neutraler Kooperativität ($p\alpha = 0$) bleibt die Bindung unverändert.

Untenstehende, von Ehlert (1988) hergeleitete Gleichung beschreibt die mathematischen Zusammenhänge, die sich aus dem ternären Komplex-Modell ergeben:

$$B_A = B_0 \cdot \frac{[L] + K_L}{[L] + K_L \cdot \frac{K_A + \alpha}{K_A + \frac{[A]}{\alpha}}} \quad (\text{Gleichung 10})$$

B_A : Bindung von L in Gegenwart von A

B_0 : Bindung von L in Abwesenheit von A

K_A stellt die Affinität des Allosters zum freien, nicht Orthoster-besetzten Rezeptor dar. In allosterischen Interaktionsexperimenten können die Parameter K_A und α bestimmt werden. Dazu wird eine konstante Konzentration des orthosterischen Radioliganden mit steigenden Konzentrationen des Allosters inkubiert. Nach Auftragung der spezifisch gebundenen Radioaktivität gegen die logarithmische Konzentration des Allosters wird mit Hilfe der logarithmierten Ehlert-Gleichung eine nichtlineare Regressionsanalyse der Datenpunkte durchgeführt.

Um zuverlässige Aussagen über K_A und α machen zu können, muss sich die Reaktion zum Zeitpunkt der Filtration im Gleichgewicht befinden. Mit Hilfe der Gleichung nach Lazareno und Birdsall (1995) lässt sich die Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung wie folgt berechnen:

$$t_{1/2\text{obs}} = t_{1/2\text{off}} \cdot \left(1 + X \cdot \frac{1}{EC_{50\text{Diss}}} \right) \quad (\text{Gleichung 11})$$

$t_{1/2\text{obs}}$: Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung

$t_{1/2\text{off}}$: Dissoziationshalbwertszeit des Orthosters

X: Konzentration des Allosters

$EC_{50\text{Diss}}$: Konzentration des Allosters, die zu einer halbmaximalen Reduktion der Radioligand-Dissoziation führt

In dieser Arbeit wurde eine Inkubationszeit gewählt, die der fünffachen Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung entsprach.

Ist das untere Plateau der Inhibitions-Kurve signifikant verschieden von null, so bedeutet dies, dass das Alloster auch in hohen Konzentrationen nicht in der Lage ist, das Orthoster vollständig vom Rezeptor zu „verdrängen“. Dieses Phänomen ist ein charakteristischer Unterschied zwischen einer kompetitiven und einer allosterischen Hemmung der Radioligand-Bindung.

2.7.2.2.1 Allosterische Interaktion an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins mit [³H]NMS als Orthoster

Die Vorgehensweise und die Inkubationsbedingungen waren bei dieser Art des Experiments die gleichen wie unter 2.7.2.1.1 dargestellt. Die Inkubationszeit richtete sich wie unter 2.7.2.2 beschrieben nach der Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung. Die genaue Versuchsanordnung ist der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Komponente (Endkonzentration im Versuchsansatz)	Gesamt- bindung	Unspezifische Bindung	Bindung in Anwesenheit des Allosters
[³ H]N-Methylscopolamin (0,2 nM)	100 µl	100 µl	100 µl
<i>Aqua destillata</i>	50 µl		
Atropin (1 µM)		50 µl	
Alloster			50 µl
Puffer A (L15)	1100 µl	1100 µl	1100 µl
Membransuspension	250 µl	250 µl	250 µl

Tabelle 5: Versuchsansatz für die allosterische Interaktion an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins mit [³H]NMS als Orthoster. Die Komponenten wurden gemäß der in der Tabelle dargestellten Reihenfolge in zuvor mit Sigmacote[®] silanierte PP-Reaktionsgefäße pipettiert. Das Gesamtvolumen betrug jeweils 1,5 ml. Aus Puffer A ergaben sich im Versuchsansatz folgende Konzentrationen: 3 mM MgHPO₄ und 50 mM TRIS.

Die Auswertung erfolgte computergestützt unter Anwendung der Ehlert-Gleichung (siehe 2.7.2.2).

2.7.3 Dissoziationskinetik

Durch ein Alloster kann die Affinität des Orthosters zum Rezeptor erhöht, vermindert oder gar nicht beeinflusst werden. Diese Veränderung ergibt sich aus dem Einfluss des Allosters auf die Assoziations- (k_{+1}) bzw. Dissoziationsgeschwindigkeit (k_{-1}) des orthosterischen Liganden. Dabei können beide Vorgänge in unterschiedlicher Weise beeinflusst werden. Ist z.B. die Dissoziationshemmung stärker ausgeprägt als die Assoziationshemmung, wird die Affinität des Orthosters zum Rezeptor erhöht. Wird hingegen durch das Alloster die Assoziation stärker gehemmt als die Dissoziation, resultiert daraus eine Verminderung der Affinität des Orthosters zum Rezeptor. Eine Bindungshemmung könnte allerdings auch auf einen kompetitiven Antagonismus zurückgeführt werden. Um Aufschluss über die Art der Interaktion zu erhalten, wurde der Einfluss des Allosters auf die Dissoziationskinetik des Orthosters untersucht. Eine Veränderung der Dissoziationsgeschwindigkeit ist ein charakteristischer Hinweis auf einen allosterischen Mechanismus (Kostenis und Mohr, 1996).

Zur Untersuchung der Dissoziationskinetik wird nach Erreichen des Bindungsgleichgewichts von Radioligand und Rezeptor durch die Zugabe eines vom Radioliganden strukturverschiedenen Kompetitors im Überschuss die Assoziation des Radioliganden an den Rezeptor verhindert und die Geschwindigkeit der Dissoziation der Radioligand-Rezeptor-Komplexe kann ermittelt werden. Bezogen auf das Massenwirkungsgesetz gilt:

$$k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] \ll k_{-1} [RL] \quad (\text{Gleichung 12})$$

Die Kinetik der Dissoziation eines Rezeptor-Ligand-Komplexes lässt sich durch eine Reaktion erster Ordnung beschreiben. Die zugehörige Differentialgleichung lautet:

$$\frac{d[RL]}{dt} = -k_{-1} \cdot [RL] \quad (\text{Gleichung 13})$$

Durch Integrieren ergibt sich:

$$[RL]_t = [RL]_0 \cdot e^{-k_{-1} \cdot t} + u \quad (\text{Gleichung 14})$$

$[RL]_t$: Gesamtbindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t

$[RL]_0$: Spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t = 0

u: Unspezifische Bindung des Radioliganden

Mit Kenntnis der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation (k_{-1}) lässt sich die Halbwertszeit der Dissoziation wie folgt berechnen:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{-1}} \quad (\text{Gleichung 15})$$

Diese gibt die Zeit an, in der die Konzentration der Radioligand-Rezeptor-Komplexe auf die Hälfte des Ausgangswertes gesunken ist.

Werden die apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation (k_{-1}), die in Anwesenheit einer bestimmten Konzentration des Allosters ermittelt wurden, gegen den dekadischen Logarithmus der Allostere-Konzentration aufgetragen, so lässt sich an die Datenpunkte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (vgl. 2.7.2.1) eine Kurve anpassen. Der Wendepunkt dieser Kurve, der $EC_{50\text{Diss}}$ -Wert, gibt die Konzentration des Allosters an, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der Dissoziationsgeschwindigkeit der Radioligand-Rezeptor-Komplexe führt. Der $EC_{50\text{Diss}}$ -Wert beschreibt die Affinität des Allosters zum Rezeptor, dessen orthosterische Bindungsstelle durch den Radioliganden besetzt ist. Zur Abschätzung des EC_{50} -Wertes kann auch der Term

$$\alpha \cdot K_A \quad (\text{Gleichung 16})$$

herangezogen werden (Ellis, 1997), wobei die Werte für die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_A) und den Kooperativitätsfaktor (α) aus Kompetitions-Experimenten (siehe 2.7.2.2) zu entnehmen sind.

2.7.3.1 Dissoziationskinetik von [³H]NMS an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins unter dem Einfluss eines Allosters - kompletter Dissoziationsverlauf

Es wurde das gleiche Puffersystem sowie die gleiche Inkubationstemperatur gewählt wie unter 2.7.2.1.1 beschrieben. Zunächst wurde in einem Erlenmeyerkolben (G7) ein Versuchsansatz entsprechend dem Schema (I) aus Tabelle 6 angesetzt und unter ständiger Durchmischung mittels eines Magnetrührers 30 min bei 37 °C im Wasserbad (G8) inkubiert. Nach der 30-minütigen Inkubationszeit wurde die Dissoziation durch Zugabe von 1,4 ml einer Lösung (II), die Atropin sowie entweder das Alloster in der zu untersuchenden Konzentration oder zusätzliches *Aqua destillata* zur Aufnahme einer Kontrollkurve enthielt, gestartet. Damit diese Startlösung die Temperatur im Versuchsansatz nicht veränderte, wurde auch diese zur Temperierung in das Wasserbad gestellt. Die Dissoziation wurde über einen Zeitraum von zwei Stunden verfolgt. Die Messung erfolgte im Sinne eines „Ein-Topf-Verfahrens“, d.h. es wurden zu 16 vorher festgelegten Zeitpunkten Proben von jeweils 1,0 ml aus dem gleichen Versuchsansatz entnommen und die an den Rezeptor gebundene Radioaktivität nach der unter 2.7.2.1.1 erläuterten Methode bestimmt. Auf diese Weise konnten innerhalb eines Versuchsdurchlaufs eine Kontrollkurve sowie der Einfluss von bis zu vier Konzentrationen des Allosters auf den Dissoziationsverlauf bestimmt werden. Die Auswertung erfolgte computergestützt wie unter 2.7.3 beschrieben. Die Werte für die Gesamtbindung, deren Bestimmung direkt vor Zugabe der Startlösung erfolgte, wurden vor der Auswertung mit dem Faktor 0,93 multipliziert, um die durch Zugabe der Startlösung verursachte Verdünnung des Versuchsansatzes auszugleichen.

Komponente (Endkonzentration im Versuchsansatz)	[³ H]NMS- Dissoziation (Kontrolle)	[³ H]NMS- Dissoziation (mit Alloster)	
[³ H]NMS (0,2 nM)	1600 µl	1600 µl	I
<i>Aqua destillata</i>	200 µl	200 µl	
Puffer B (L16)	16800 µl	16800 µl	
Membransuspension	4000 µl	4000 µl	
30 min Inkubation, danach Zugabe der Startlösung			
Atropin (1 µM)	700 µl	700 µl	II
Alloster	-	700 µl	
<i>Aqua destillata</i>	700 µl	-	

Tabelle 6: Versuchsansatz für einen kompletten Dissoziationsverlauf an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins. Die Komponenten wurden gemäß der in der Tabelle dargestellten Reihenfolge in einen Erlenmeyerkolben pipettiert. Das Gesamtvolumen vor dem Start der Dissoziation betrug 22,6 ml. Im Versuchsansatz ergaben sich aus Puffer B folgende Konzentrationen: 3 mM MgHPO₄ und 50 mM TRIS.

2.7.3.2 Dissoziationskinetik von [³H]NMS an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins unter dem Einfluss eines Allostere - Zwei-Punkt-kinetische Versuche

Unter der Voraussetzung, dass der Zerfall der Radioligand-Rezeptor-Komplexe unter der Einwirkung eines Allostere monophasischer Art ist, sind zur Ermittlung der apparenten Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation wie von Kostenis und Mohr (1996) gezeigt wurde, nur zwei Messzeitpunkte notwendig. Dazu wird die spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt $t = 0$ min, also vor dem Beginn der Dissoziation, sowie zu einem späteren Zeitpunkt, der noch im Bereich des steilen Teils der Dissoziationskurve liegen, aber dennoch ein ausreichend großes Messfenster eröffnen soll, ermittelt. Auf diese Weise kann die Bestimmung des EC₅₀-Wertes des Allostere im Hinblick auf Zeit- und Materialverbrauch ökonomisiert werden. In Validierungsexperimenten, die von Raasch (2003) durchgeführt wurden, erwies sich für die Untersuchung der [³H]NMS-Dissoziation in Mg, P_i, TRIS-Puffer bei 37 °C ein zweiter Zeitpunkt von $t = 10$ min als günstig.

Die in vorliegender Arbeit angewandten Versuchsbedingungen entsprachen den unter 2.7.2.1.1 genannten. Es wurde ein „Mehr-Topf-Verfahren“ angewendet, d.h. für die Gesamtbindung, die unspezifische Bindung und die Bindung nach 10 min wurden getrennte Versuchsansätze hergestellt. Alle Werte wurden in einer Dreifachbestimmung erhoben. Die einzelnen Komponenten wurden gemäß dem Schema (I) aus Tabelle 7 in PP-Reaktionsgefäße (M9), die zuvor mit Sigmacote[®] silanisiert wurden, pipettiert.

Material und Methoden

Komponente (Endkonzentration im Versuchsansatz)	Bindung t = 0 min	Unspezifische Bindung	Bindung t = 10 min (Kontrolle)	Bindung t = 10 min (mit Alloster)	
Puffer C	1100 µl	1100 µl	1150 µl	1150 µl	I
<i>Aqua destillata</i>	50 µl	-	-	-	
Atropin (1 µM)	-	50 µl	-	-	
Membransuspension	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl	
[³ H]NMS (0,2 nM)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	
30 min Inkubation					
Atropin (1 µM)	Filtration		50 µl	50 µl	II
Alloster			-	50 µl	
<i>Aqua destillata</i>			50 µl	-	

Tabelle 7: Versuchsansatz für Zwei-Punkt-kinetische Versuche an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins. Im Versuchsansatz ergaben sich aus Puffer C folgende Konzentrationen: 3 mM MgHPO₄ und 50 mM TRIS. Die Komponenten wurden gemäß der in der Tabelle dargestellten Reihenfolge in zuvor mit Sigmacote[®] silanisierte PP-Reaktionsgefäße pipettiert. Das Gesamtvolumen zu Beginn der Inkubationsphase betrug jeweils 1,5 ml.

Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wurde den Ansätzen für die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung Proben von jeweils 1,0 ml entnommen und die an den Rezeptor gebundene Radioaktivität nach der unter 2.7.2.1.1 erläuterten Methode bestimmt. Zu den Ansätzen für die Bindung zum Zeitpunkt t = 10 min wurden 100 µl einer Startlösung (**II**), die Atropin sowie entweder das Alloster in der zu untersuchenden Konzentration oder zusätzliches *Aqua destillata* zur Bestimmung der [³H]NMS-Dissoziation unter Kontrollbedingungen enthielt, zugegeben und es wurde für weitere 10 min inkubiert. Damit diese Startlösung die Temperatur im Versuchsansatz nicht veränderte, wurde sie zur Temperierung zuvor in das Wasserbad gestellt. Nach Ablauf der zweiten Inkubationsphase wurden auch diese Reaktionsansätze vermessen. Die Auswertung erfolgte computer-gestützt wie unter 2.7.3 beschrieben. Die Werte für die Gesamtbindung wurden vor der Auswertung mit dem Faktor 0,94 multipliziert, um die durch Zugabe der Startlösung verursachte Verdünnung der Versuchsansätze zur Bestimmung der Bindung zum Zeitpunkt t = 10 min auszugleichen.

2.8 [³⁵S]GTP_γS-Bindungsexperimente an Membransuspensionen aus CHO-M₂- und CHO-M₃-Zellen

Die Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, sei sie spontan oder durch einen Agonisten ausgelöst, verursacht in der α -Untereinheit des G-Proteins einen Nukleotidaustausch, wobei GDP gegen GTP ausgetauscht wird. Der Rezeptor fungiert dabei als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (Milligan und Kostenis, 2006). Die mit dem Nukleotidaustausch verbundene Konformationsänderung des G-Proteins zieht die Dissoziation der α -Untereinheit von der $\beta\gamma$ -Untereinheit nach sich. Diese Komponenten interagieren anschließend mit Effektor-Systemen, wozu „second messenger“-produzierende Enzyme, sowie verschiedene Arten von Ionenkanälen gehören. Die α -Untereinheit stellt eine intrinsische GTPase dar, die durch Hydrolyse des terminalen Phosphat-Restes GTP in GDP umwandelt. Dies erlaubt eine Reassoziierung der α -Untereinheit mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit und damit die Terminierung der G-Protein-Aktivierung.

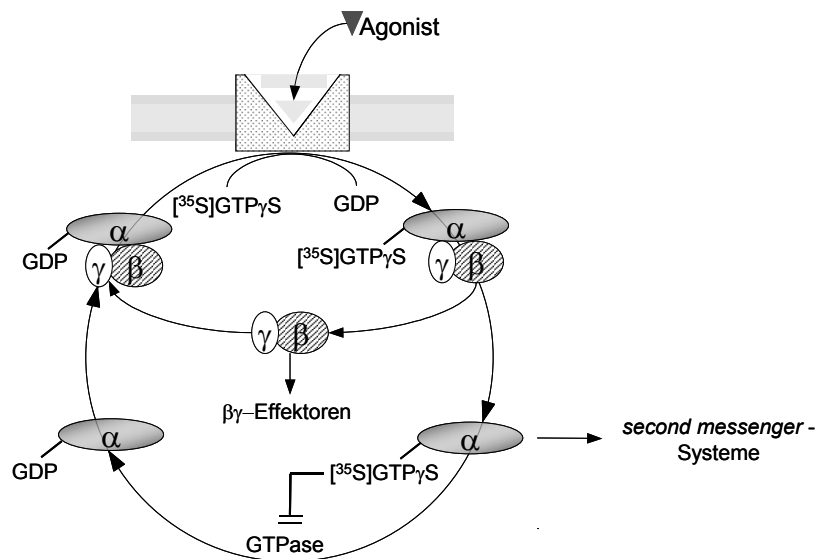


Abbildung 6: Rezeptor-vermittelte G-Protein-Aktivierung; modifiziert nach Milligan und Kostenis (2006); Erläuterungen siehe Text.

[³⁵S]GTP_γS ist ein Nukleotid-Analogon, in dessen γ -ständigem Phosphat-Rest ein Sauerstoffatom gegen das Isotop 35 des Schwefels ausgetauscht ist. Im Gegensatz zu GTP ist das Analogon hydrolysestabil. Dadurch ist die [³⁵S]GTP_γS-Bindung an die α -Untereinheit irreversibel und es kommt zu einer Daueraktivierung des G-Proteins. [³⁵S]GTP_γS akkumuliert in der Membran und über die Messung der radioaktiven Zerfälle kann die Menge des gebundenen [³⁵S]GTP_γS bestimmt werden. Das Ausmaß der Steigerung der [³⁵S]GTP_γS-Bindung spiegelt die Fähigkeit wieder, mit der eine Substanz den Rezeptor zu aktivieren vermag.

Da es bei [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten nicht zu einer Gleichgewichtseinstellung kommt, ist der Zeitpunkt der Messung von besonderer Bedeutung und sollte, um vergleichende Aussagen machen zu können, bei allen Experimenten gleich gewählt werden. Eine Inkubationszeit von 60 min erwies sich bei Klemt (2005) als optimal, da hier sowohl der Quotient aus Agonist-induzierter und basaler [³⁵S]GTPγS-Bindung, als auch die absolute Menge an gebundenem [³⁵S]GTPγS hoch waren.

Der Zusatz von GDP sorgt für eine optimale Agonist-vermittelte [³⁵S]GTPγS-Bindung (Harrison und Traynor, 2003). Durch GDP werden leere Nukleotid-Bindungsstellen im Bereich der α-Untereinheit aufgefüllt, wodurch die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung erniedrigt wird. Außerdem konkurriert GDP mit [³⁵S]GTPγS um diese Bindungsstellen, wobei seine Affinität zur nicht-Rezeptor-aktivierten α-Untereinheit höher ist. Folglich resultiert aus der GDP-Zugabe eine stärkere Senkung der basalen als der Agonist-vermittelten [³⁵S]GTPγS-Bindung. Die optimale GDP-Konzentration ist System-abhängig und variiert in Abhängigkeit vom G-Protein-Subtyp und dessen Konzentration in der Membran. In Anlehnung an frühere Arbeiten (Eckstein, 2004; Klemt, 2005; Schmalenbach, 2005) wurde in vorliegender Arbeit für die Untersuchungen an CHO-M₂-Rezeptoren 10 μM GDP eingesetzt. Wie zuvor schon von Lazareno und Birdsall (1993) bzw. Lazareno et al. (1993) beschrieben, wurde für Untersuchungen an CHO-M₃-Rezeptoren eine zehnfach niedrigere GDP-Konzentration, gewählt. Durch die Gegenwart von Mg²⁺-Ionen werden sowohl die basale, als auch die Agonist-vermittelte [³⁵S]GTPγS-Bindung erhöht, wobei der Effekt auf letztere stärker ausgeprägt ist. Na⁺-Ionen üben den gleichen Effekt wie Mg²⁺-Ionen aus, sind im Gegensatz zu diesen aber kein absolutes Erfordernis für die Messung der Agonist-vermittelten [³⁵S]GTPγS-Bindung (Harrison und Traynor, 2003).

Versuchsdurchführung

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten sollte der Einfluss von Testsubstanzen entweder auf die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung oder auf die durch eine andere Testsubstanz stimulierte [³⁵S]GTPγS-Bindung untersucht werden. Es wurde bei 30 °C mit einem Puffersystem gearbeitet, das 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl enthielt. Der Verdünnungsgrad der CHO-M₂- bzw. CHO-M₃-Membransuspensionen wurde so gewählt, dass sich im fertigen Versuchsansatz eine Proteinkonzentration von 50 μg/ml ergab. Die einzelnen Komponenten wurden in eine „96-well“-Mikrotiterplatte (MI) pipettiert. Dabei wurden GDP, die Membransuspension, sowie [³⁵S]GTPγS vorher in Puffer D (L18) verdünnt. Das Gesamtvolumen in den einzelnen Kavitäten betrug 500 μl.

Komponente (Endkonzentration im Versuchsansatz)	Basale [³⁵ S]GTPγS- Bindung	Unspezifische [³⁵ S]GTPγS-Bindung	Agonist-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	Einfluss eines Antagonisten auf die Agonist-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	Einfluss eines Antagonisten auf die basale [³⁵ S]GTPγS- Bindung
<i>Aqua destillata</i>	100 μl	50 μl	50 μl	-	50 μl
Agonist	-	-	50 μl	50 μl	-
allosterischer oder orthosterischer Antagonist	-	-	-	50 μl	50 μl
GTPγS (10 μM)	-	50 μl	-	-	-
GDP (M ₂ : 10 μM; M ₃ : 1 μM)	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
Membransuspension (50 μg Protein/ml)	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
[³⁵ S]GTPγS (0,07 nM)	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl	50 μl
Puffer D (<i>L18</i>)	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl	250 μl

Tabelle 8: Versuchsansatz für [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente an Membransuspensionen aus CHO-M₂- und CHO-M₃-Zellen. Die Komponenten wurden gemäß der in der Tabelle dargestellten Reihenfolge in eine „96-well“-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Herstellung der GDP-Lösung, der CHO-Membransuspension, sowie der [³H]NMS-Lösung erfolgte jeweils mit Puffer D. Aus Puffer D ergaben sich im Versuchsansatz folgende Konzentrationen: 10 mM HEPES, 10 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl.

Die Experimente wurden als Vierfachbestimmungen durchgeführt. Die Inkubationsphase von 60 min begann mit der Zugabe von [³⁵S]GTPγS in einer Endkonzentration von 0,07 nM. (*L23*). Nach der Zugabe des [³⁵S]GTPγS wurde der mit Parafilm® (*M6*) abgedeckte Versuchsansatz mit Hilfe eines Kleinschüttlers (*G18*) gründlich durchmischt und zur Inkubation in ein auf 30 °C vortemperiertes Schüttelwasserbad (*G25*) gestellt. Nach 60 min wurde die Reaktion durch Vakuumfiltration mittels eines „Harvesters“ (*G13*) über eine vorher mit *Aqua destillata* benetzte Glasfaser-Filtermatte (*M12*) beendet. Die weitere Behandlung der Filtermatte erfolgte wie unter 2.7.2.1.2 beschrieben.

Auswertung

Um Einzelexperimente zusammenzufassen und vergleichen zu können, wurden alle Rohdaten, abhängig von der Art des Versuchsansatzes, nach dem Schema entsprechend Tabelle 9 normalisiert.

Versuchsart	0 %	100 %
2.8.1	-	basale [³⁵ S]GTP γ S-Bindung
2.8.2	-	basale [³⁵ S]GTP γ S-Bindung
2.8.3	unteres Plateau der ACh-Kurve	oberes Plateau der ACh-Kurve
2.8.4	unteres Plateau der Kontrollkurve	oberes Plateau der Kontrollkurve

Tabelle 9: Schema zur Normalisierung von [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimenten in Abhängigkeit der Versuchsart.

Die nichtlineare Regressionsanalyse der Datenpunkte erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 6). Dabei wurde mittels eines F-Tests bei jeder Kurve überprüft, ob die Kurve mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ ausreichend beschrieben werden konnte, oder ob ein nicht auf eins festgelegter Hill-Koeffizient die Kurve signifikant besser beschrieb. Als weitere charakteristische Parameter konnten der sigmoidalen Konzentrations-Effekt-Kurve der Wendepunkt (EC_{50}), der die Konzentration der Testsubstanz angibt, die einen halbmaximalen Effekt auslöst, und das obere Plateau (E_{max}) als ein Maß für die intrinsische Aktivität einer Testsubstanz entnommen werden.

2.8.1 Beeinflussung der [³⁵S]GTP γ S-Bindung durch rezeptorsättigende Konzentrationen muskarinischer Liganden

Bevor die Membransuspensionen in weiteren Versuchen zum Einsatz kamen, wurde in einer Achtfachbestimmung der Einfluss sättigender Konzentrationen bereits bekannter Testsubstanzen untersucht. Eingesetzt wurden der Vollagonist Oxotremorin-M (0,1 mM), der Partialagonist Pilocarpin (1 mM), der orthosterische Antagonist Atropin (0,001 mM) und der allosterische Antagonist Alcuronium (0,1 mM). Die Rohdaten wurden wie unter 2.8 beschrieben normalisiert.

2.8.2 Effekt von N-Methylscopolamin auf die basale [³⁵S]GTP γ S-Bindung

In diesem Versuch sollte das Ausmaß der Absenkung der basalen [³⁵S]GTP γ S-Bindung durch steigende Konzentrationen des muskarinischen Antagonisten N-Methylscopolamin getestet werden. Alle Daten wurden in einer Achtfachbestimmung erhoben. Die unspezifische [³⁵S]GTP γ S-Bindung wurde mit 10 μ M unmarkiertem GTP γ S (*L5*) ermittelt. Normalisierung und nichtlineare Regressionsanalyse erfolgten computergestützt wie unter

2.8 beschrieben. Der pEC_{50} -Wert gibt diejenige NMS-Konzentration an, bei der die Senkung der basalen Bindung halbmaximal ist.

2.8.3 Effekt eines Partial- oder Vollagonisten auf die [35 S]GTP γ S-Bindung im Vergleich zu Acetylcholin

Bei dieser Art des Versuchs sollte die Testsubstanz auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden, die basale [35 S]GTP γ S-Bindung zu erhöhen. Dabei interessierten sowohl der durch den Agonisten ausgelöste Maximaleffekt (E_{max}) als auch die Konzentration (pEC_{50}) des Agonisten, die zu einem halbmaximalen Effekt führt. Wegen der starken Abhängigkeit des Ergebnisses von den Versuchsbedingungen wurde bei allen Versuchen auf der gleichen „96-well“-Mikrotiterplatte neben der Konzentrations-Effekt-Kurve der Testsubstanz eine Konzentrations-Effekt-Kurve des physiologischen Vollagonisten Acetylcholin als interner Standard aufgenommen. Normalisierung und nichtlineare Regressionsanalyse erfolgten computergestützt wie unter 2.8 beschrieben.

2.8.4 Einfluss eines allosterischen oder orthosterischen Antagonisten auf die Agonist-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung

In diesem Versuchsansatz sollte der Effekt eines allosterischen oder orthosterischen Antagonisten auf die Konzentrations-Effekt-Kurve eines Partial- bzw. Vollagonisten untersucht werden. Dazu wurden Konzentrations-Effekt-Kurven des Partial- bzw. Vollagonisten jeweils in An- und Abwesenheit (Kontrollkurve) einer bestimmten Konzentration des Antagonisten auf einer „96-well“-Mikrotiterplatte aufgenommen. Normalisierung und nichtlineare Regressionsanalyse erfolgten wie unter 2.8 beschrieben.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Antagonisten führten zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve des Agonisten. Um diesen Effekt quantifizieren zu können, wurden zunächst Verschiebefaktoren (dose ratios, DR) berechnet, d.h. der Quotient aus den EC_{50} -Werten der Konzentrations-Effekt-Kurven des Partial- bzw. Vollagonisten in An- und Abwesenheit des Antagonisten gebildet.

$$DR = \frac{EC_{50\text{Antagonist}}}{EC_{50\text{Kontrolle}}} \quad (\text{Gleichung 17})$$

Der dekadische Logarithmus aus der Differenz „DR – 1“ wurde gegen den dekadischen Logarithmus der Antagonist-Konzentration aufgetragen. An die Datenpunkte wurde im Falle eines kompetitiven Antagonismus nach Arunlakshana und Schild (1959) eine Gerade, im Falle einer allosterischen Interaktion gemäß Lanzafame et al. (1996) eine Kurve angepasst.

2.8.4.1 Auswertung einer kompetitiven Interaktion

Bei Vorliegen eines kompetitiven Antagonismus werden die Konzentrations-Effekt-Kurven durch den Antagonisten parallel nach rechts verschoben. Voraussetzung dafür, dass eine Kurve gegenüber der Kontrollkurve parallel verschoben ist, sind eine Übereinstimmung in der Kurvensteilheit (Hill-Koeffizient) und ein identischer Maximaleffekt. Die Geradenanpassung erfolgt in einem solchen Fall mit der Gleichung nach Arunlakshana und Schild (1959):

$$\log(\text{DR} - 1) = \text{pK}_B + s \cdot \log[\text{B}] \quad (\text{Gleichung 18})$$

DR: dose ratio, Quotient aus den EC₅₀-Werten der Konzentrations-Effekt-Kurven des Partial- oder Vollagonisten in An- und Abwesenheit des Antagonisten

pK_B: negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten der Bindung des Antagonisten

[B] Konzentration des Antagonisten

s: Steigung der Regressionsgeraden

Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse (pA₂) entspricht dem negativen dekadischen Logarithmus der Antagonist-Konzentration, die zu einer Verschiebung des Wendepunktes der Konzentrations-Effekt-Kurve um den Faktor 2 führt. Bei einem kompetitiven Antagonismus hat die Schild-Gerade eine Steigung von s = 1 und es gilt:

$$\text{pA}_2 = \text{pK}_B \quad (\text{Gleichung 19})$$

pK_B repräsentiert die Affinität des Antagonisten zum unbesetzten Rezeptor und bezeichnet die Konzentration, bei der 50 % der Rezeptoren mit dem Antagonisten besetzt sind.

2.8.4.2 Auswertung einer allosterischen Interaktion

Im Falle einer allosterischen Interaktion strebt das Ausmaß der Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven durch einen allosterischen Antagonisten einem Maximum entgegen, d.h. der Effekt des Allostere ist sättigbar. In der Auftragung nach Arunlakshana

und Schild (1959) beschreiben die Datenpunkte im Anfangsteil zwar eine Gerade, im Bereich hoher Alloster-Konzentrationen bilden diese jedoch ein Plateau. Die Auswertung der Datenpunkte einer allosterischen Interaktion erfolgt, unter der Voraussetzung einer parallelen Verschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven, mit Hilfe der Gleichung nach Lanzafame et al. (1996). Anhand dieser Gleichung zur nichtlinearen Regressionsanalyse, die das von Ehlert (1988) beschriebene ternäre Modell allosterischer Interaktion berücksichtigt, können der Kooperativitätsfaktor α und die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_A des Allosters berechnet werden.

$$\log(\text{DR} - 1) = \log \left(\frac{(\alpha - 1)}{\frac{\alpha K_A}{[A]} + 1} \right) \quad (\text{Gleichung 20})$$

- DR: dose ratio, Quotient aus den EC_{50} -Werten der Konzentrations-Effekt-Kurven des Partial- oder Vollagonisten in An- und Abwesenheit des Antagonisten
- K_A : negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten der Bindung des Allosters
- [A]: Konzentration des Allosters
- α : Kooperativitätsfaktor

Der Schnittpunkt der Kurve mit der Abszisse stellt eine Annäherung an den pK_A -Wert dar. Das Maximum, dem die Kurve entgegenstrebt, erlaubt eine Abschätzung der Kooperativität zwischen Alloster und Agonist.

Liegt bei einem Alloster eine stark negative Kooperativität mit seinem Interaktionspartner vor, so ergibt sich für den untersuchten Konzentrationsbereich das Bild eines kompetitiven Mechanismus (Ehlert, 1988), der in Folgendem als pseudokompetitiv bezeichnet wird.

2.8.4.3 Test auf Parallelverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven

Sowohl die lineare Regressionsanalyse nach Arunlakshana und Schild (1959) als auch die nichtlineare Regressionsanalyse nach Lanzafame et al. (1996) setzen eine parallele Verschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven voraus. Dies ist dann gegeben, wenn alle Kurven das gleiche Maximum erreichen und mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ ausreichend beschrieben werden können. War dies in vorliegender Arbeit nicht der Fall, d.h. einige Kurven besaßen eine Steilheit, die signifikant von $n_H = 1$ abwich, wurde nach der von Lew und Angus (1995) beschriebenen Methode überprüft, ob die gesamte Kurvenschar mit einem gemeinsamen Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ ausreichend

beschrieben werden konnte. Dazu erfolgte die Kurvenanpassung einerseits mit dem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ und andererseits mit den freien Hill-Koeffizienten. Die Summen der Fehlerquadrate und die Freiheitsgrade aller Kurven wurden für beide Varianten der Kurvenanpassung jeweils addiert und es wurde ein F-Test durchgeführt. Der errechnete F-Wert wurde mit einem tabellierten Wert bei einer vorgegebenen Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 5\%$ verglichen. War der berechnete F-Wert größer als der tabellierte Wert, zeigte dies an, dass die Kurven durch den gemeinsamen Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ nicht ausreichend beschrieben wurden. In diesem Fall wurde der Mittelwert aus den individuellen Hill-Koeffizienten aller Kurven gebildet und erneut ein F-Test durchgeführt, indem nun eine Kurvenanpassung mit dem von 1 abweichenden Mittelwerts-Hill-Koeffizienten und eine Kurvenanpassung mit den individuellen Hill-Koeffizienten verglichen wurden. War bei diesem zweiten F-Test der berechnete F-Wert kleiner als der tabellierte F-Wert, war davon auszugehen, dass es sich um eine Parallelverschiebung der Kurven handelte.

2.9 Statistik

In vorliegender Arbeit wurde als Lagemaß der **arithmetische Mittelwert** (\bar{x}) verwendet. Voraussetzung ist eine Normalverteilung der einzelnen Messwerte.

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (\text{Gleichung 21})$$

Die **Varianz** (s^2) ist ein Maß für die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert.

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2 \quad (\text{Gleichung 22})$$

Die **Standardabweichung** (s) gibt die mittlere Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert an. Dabei handelt es sich um die Quadratwurzel der Varianz (s^2).

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (\text{Gleichung 23})$$

Bei allen in dieser Arbeit angegebenen Streuungen handelt es sich um den **Standardfehler des Mittelwerts** (SEM / standard error of the mean). Dieser ist ein Maß für die Genauigkeit des Mittelwerts und gibt an, wie weit der Mittelwert vom wahren Mittelwert

der Gesamtheit entfernt ist. Er errechnet sich gemäß Gleichung 24 aus der Standardabweichung.

$$\text{SEM} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{Gleichung 24})$$

Vergleich unterschiedlicher Modelle zur Kurvenanpassung

Die Anpassung einer Kurve an die gemessenen Datenpunkte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism[®] basiert auf der nichtlinearen Regressionsanalyse, deren Ziel die Minimierung der **Summe der Fehlerquadrate** (SS / sum of squares) ist. Dabei werden die Variablen des gewählten Modells so lange variiert, bis die Summe der Fehlerquadrate das Minimum erreicht hat.

$$\text{SS} = \sum (y_{\text{Mess}} - y_{\text{Kurve}})^2 \quad (\text{Gleichung 25})$$

y_{Mess} : gemessener Wert

y_{Kurve} : durch Regressionsanalyse ermittelter Wert

Um unterschiedliche Kurvenanpassungen miteinander vergleichen zu können, wurde der in das Programm GraphPad Prism[®] integrierte **F-Test** verwendet. Dieser basiert auf der Differenz der Summen der Fehlerquadrate zwischen dem einfacheren und dem komplexeren, mehr Variablen enthaltenden Modell.

Außerdem wird die Anzahl der **Freiheitsgrade** (DF / degrees of freedom) berücksichtigt, die sich aus der Anzahl der Messpunkte (n) sowie der Anzahl der Variablen (v) in der Kurvengleichung ergibt und ein Maß für die Komplexität des Modells darstellt (Motulsky, 2003).

$$\text{DF} = n - v \quad (\text{Gleichung 26})$$

Beim F-Test wird die relative Differenz der Fehlerquadrate durch die relative Differenz der Freiheitsgrade dividiert.

$$F = \frac{(SS_1 - SS_2) / SS_2}{(DF_1 - DF_2) / DF_2} \quad (\text{Gleichung 27})$$

SS₁: Summe der Fehlerquadrate des einfacheren Modells

SS₂: Summe der Fehlerquadrate des komplexeren Modells

DF₁: Anzahl der Freiheitsgrade des einfacheren Modells

DF₂: Anzahl der Freiheitsgrade des komplexeren Modells

Aus dem F-Wert sowie der Differenz der Freiheitsgrade (DF₁-DF₂) und der Anzahl der Freiheitsgrade des komplexeren Modells (DF₂) kann anhand der F-Verteilung ein p-Wert ermittelt werden. Ist dieser größer als p = 0,05, ist davon auszugehen, dass das einfachere Modell ausreicht, die Datenpunkte korrekt zu beschreiben.

Vergleich von Kenngrößen aus unterschiedlichen Kurvenanpassungen

Um die aus Regressionsanalysen erhaltenen Kenngrößen miteinander vergleichen zu können, wurde mit Hilfe des Programms GraphPad InStat[®] ein ungepaarter zweiseitiger **t-Test** durchgeführt. Dazu wird zunächst ein t-Wert berechnet, indem die Differenz der Mittelwerte durch den Standardfehler der Mittelwertsdifferenz (SE / standard error) geteilt wird (Motulsky, 1995).

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{SE} \quad (\text{Gleichung 28})$$

Ausgehend von „t“ wird ein p-Wert ermittelt. Dieser beantwortet die Frage, ob der Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten zufällig ist, d.h. ob beide Werte der gleichen Grundgesamtheit entstammen. Dies ist der Fall bei einem kleinen t-Wert, aus dem sich ein großer p-Wert (p > 0,05) ergibt. Für den umgekehrten Fall, d.h. bei großem t-Wert, wird „p“ klein (p < 0,05) und der Unterschied der beiden Mittelwerte ist statistisch signifikant. Voraussetzung für die Anwendbarkeit des t-Tests ist, dass die Varianz der beiden Populationen gleich ist. War dies nicht gegeben, wurde der nach Welch modifizierte t-Test angewandt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen an M₂-Rezeptoren

Der überwiegende Teil der in dieser Arbeit erhobenen Daten stammte aus Experimenten an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren des Subtyps M₂. Diesem Subtyp kommt eine besondere Bedeutung zu, da allosterische Modulatoren üblicherweise zu diesem Subtyp die höchste Affinität aufweisen (Ellis et al., 1991; Jakubík et al., 1995; Sennwitz, 2006). Wesentliche Strukturelemente der beiden aus der Reihe der Alkan-Bisammonium-Verbindungen stammenden allosterischen Modulatoren W84 bzw. Naphmethonium sind Bestandteil der hier untersuchten Hybrid-Verbindungen. Daher ist davon auszugehen, dass auch die Hybride die höchste Affinität zu M₂-Rezeptoren besitzen.

3.1.1 Vorversuche an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins

3.1.1.1 [³H]NMS-Bindungsexperiment: K_D- und B_{max}-Wert des Radioliganden

Da zur Auswertung von Kompetitions-Experimenten an einer bestimmten Membransuspension die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (pK_D) des Radioliganden [³H]NMS bekannt sein muss, wurden für jede der beiden Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins homologe Kompetitions-Experimente mit nicht markiertem NMS durchgeführt. Abbildung 7 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Experiments.

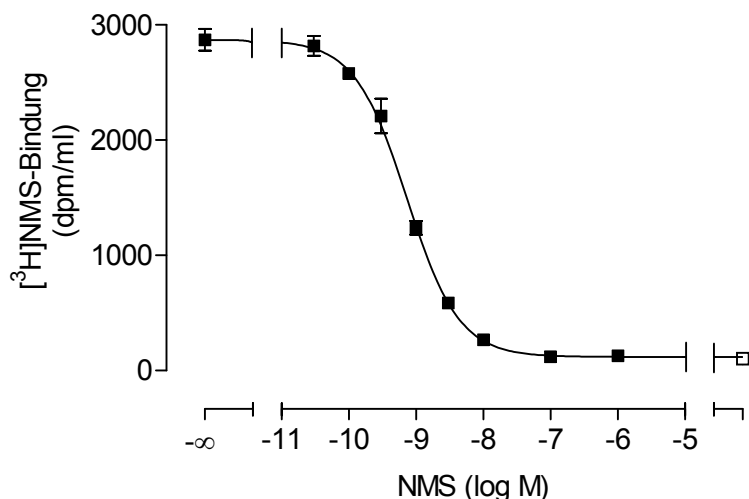


Abbildung 7: Repräsentatives Ergebnis einer homologen Konkurrenz von [³H]NMS (0,2 nM) mit nicht markiertem NMS an einer Membransuspension aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins. **Ordinate:** [³H]NMS-Bindung in dpm/ml. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der NMS-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler eines in Dreifachbestimmung durchgeführten Experiments. Das offene Quadrat stellt die unspezifische Bindung dar, die mit 1 μ M Atropin bestimmt wurde.

Die unspezifische Bindung in Gegenwart von 1 μ M Atropin betrug bei dem in Abbildung 7 dargestellten Versuch 3,7 % der Gesamtbindung. Der Hill-Koeffizient unterschied sich nicht signifikant von eins, sodass davon auszugehen ist, dass es sich um eine 1:1-Interaktion des Liganden mit dem Rezeptorprotein handelte (Monod, 1965). Durch Anwendung der Gleichung von Cheng und Prussoff (Gl. 7) wurde in vorliegendem Fall eine Gleichgewichts-Dissoziationskonstante von $pK_D = 9,37$ ermittelt. Als weiterer charakteristischer Parameter wurde die Anzahl der Bindungsstellen nach DeBlasi et al. (Gl. 8) berechnet. Diese betrug 118 fmol/mg Protein. Tabelle 10 zeigt die Mittelwerte der charakteristischen Kenngrößen für die beiden in dieser Arbeit untersuchten Membransuspensionen.

	pK_D	B_{max} (fmol/mg Protein)	n
Homogenat A	$9,42 \pm 0,08$	121 ± 8	3
Homogenat B	$9,28 \pm 0,08$	115 ± 10	3

Tabelle 10: pK_D - und B_{max} -Werte des Radioliganden [³H]NMS basierend auf den in Abbildung 7 dargestellten homologen Wettbewerbs-Experimenten an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins. **pK_D :** Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Radioliganden. **B_{max} :** Anzahl der Bindungsstellen. **n :** Anzahl der Wiederholungen.

3.1.1.2 [³H]NMS-Bindungsexperiment zur Analyse der Strukturidentität von Testsubstanzen

Es wurde eine AF-DX 384-artige Verbindung untersucht, für die aus ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen nicht eindeutig hervorging, ob es sich um AF-DX 384 handelte, oder um eine strukturverschiedene Substanz. AF-DX 384 ist ein Antagonist an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren mit Selektivität für die Subtypen M₂ und M₄ (Miller et al., 1991). In Radioligandbindungsstudien konnte gezeigt werden, dass AF-DX 384 neben der orthosterischen Bindungsstelle auch Teile der allosterischen Bindungsstelle belegt (Tränkle et al., 1998; Mohr et al., 2004).

Abbildung 8 zeigt die Kompetitions-Kurven der AF-DX 384-artigen Verbindung, die sowohl als freie Base als auch als Methylsulfonat zur Verfügung stand. Die Daten für AF-DX 384 wurden dankenswerterweise von Dr. Marion Mohr-Andrä zur Verfügung gestellt und sind als gestrichelte Kurve abgebildet. Die pK_A-Werte der Testsubstanzen sind in Tabelle 11 zusammengefasst worden.

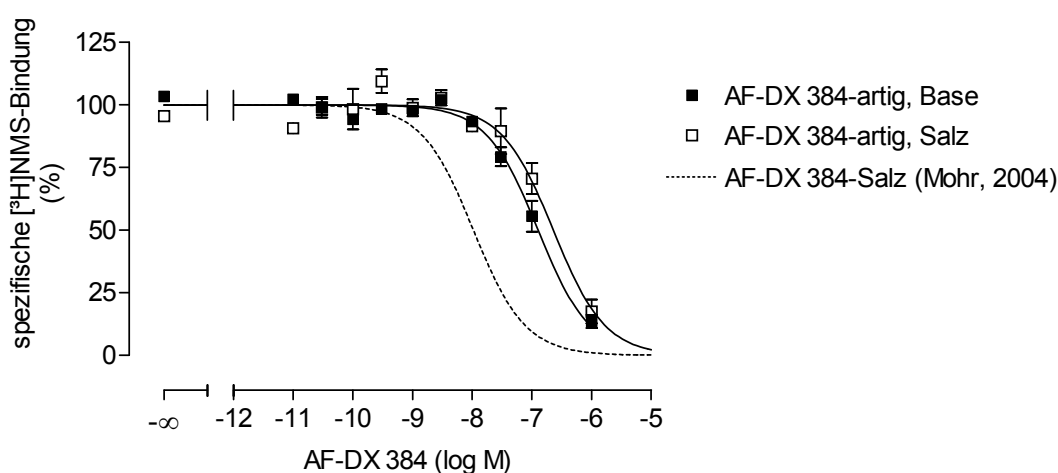


Abbildung 8: Einfluss von AF-DX 384-artigen Substanzen auf die Gleichgewichtsbindung des Radioliganden [³H]NMS (0,2 nM) an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins. **Ordinate:** Spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent der Gesamtbindung. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der AF-DX 384-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

	AF-DX 384-artig Base	AF-DX 384-artig Salz	<i>AF-DX 384</i> (<i>Mohr, 2004</i>)
pK_A	7,11 ± 0,11*	6,85 ± 0,12*	8,14 ± 0,09
n	3	3	3

Tabelle 11: Kenngrößen ± Standardfehler der in Abbildung 8 dargestellten Kompetitions-Kurven der AFDX 384-artigen Substanzen. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem konstanten Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der in der Literatur (Mohr, 2004) angegebenen Kenngröße für AF-DX 384 (t-Test, $p < 0,05$)

Zwischen dem pK_A-Wert der AF-DX 384-artigen freien Base und des Methylsulfonats gibt es keinen signifikanten Unterschied, wohingegen sich beide signifikant um etwa eine Dekade von dem pK_A-Wert des AF-DX 384 unterscheiden (t-Test, $p < 0,05$), was ein Beleg dafür ist, dass es sich bei den Testsubstanzen nicht um AF-DX 384 handelte. Somit wies der Radioligandbindungsversuch in diesem Fall eine weit höhere Sensitivität zur Erfassung von Strukturveränderungen auf als die NMR-Spektroskopie.

3.1.2 Vorversuche an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen

3.1.2.1 [³H]NMS-Bindungsexperiment: K_D- und B_{max}-Wert des Radioliganden

Homologe Kompletions-Experimente, auf deren Basis die Parameter pK_D und B_{max} des Radioliganden [³H]NMS errechnet wurden, dienten der Charakterisierung der Bindungseigenschaften der verwendeten Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. Im Unterschied zu den unter 3.1.1.1 beschriebenen Experimenten an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins, wurde in vorliegenden Versuchen nur jeweils ein Experiment je Membransuspension durchgeführt, da hier die Kenngrößen pK_D und B_{max} weniger zur Bestimmung der einzelnen Membransuspension, als vielmehr der gesamten Zelllinie herangezogen wurden.

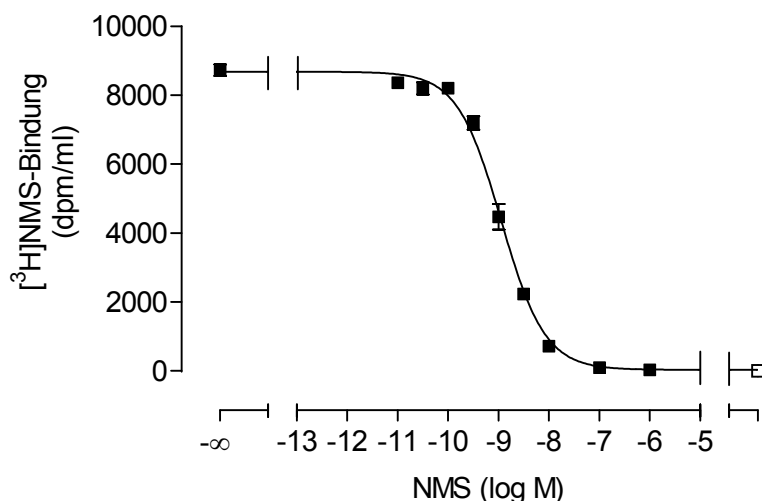


Abbildung 9: Repräsentatives Ergebnis einer homologen Kompetition mit [³H]NMS (0,2 nM) und nicht markiertem NMS an einer Membransuspension aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** [³H]NMS-Bindung in dpm/ml. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der NMS-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler eines in Dreifachbestimmung durchgeführten Experiments. Das offene Quadrat stellt die unspezifische Bindung dar, die mit 1 μM Atropin bestimmt wurde.

Abbildung 9 zeigt ein repräsentatives Ergebnis eines homologen Kompletions-Experiments. Die unspezifische Bindung betrug bei diesem Versuch 0,3 % der Gesamtbindung. Es wurde ein pK_A-Wert von 9,02 und ein B_{max}-Wert von 5,65 pmol/mg Protein errechnet. Insgesamt wurden 25 CHO-M₂-Membransuspensionen getestet. Durch Zusammenfassen aller Experimente wurde eine mittlere Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (pK_D) für [³H]NMS von 9,07 ± 0,02 gefunden. Die durchschnittliche Anzahl an Bindungsstellen (B_{max}) betrug 6,07 ± 0,57 pmol/mg Protein.

3.1.2.2 Beeinflussung der [³⁵S]GTP_γS-Bindung durch rezeptorsättigende Konzentrationen muskarinischer Liganden

Neben den Experimenten zur homologen Konkurrenz diente die Untersuchung rezeptorsättigender Konzentrationen bereits bekannter und eingehend an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren getesteter Liganden der näheren Charakterisierung der Membransuspensionen. Dabei wurden die Konzentrationen so gewählt, dass davon auszugehen war, dass durch eine weitere Erhöhung der Konzentration keine Verstärkung des Effekts mehr erreicht werden konnte. Zum Einsatz kamen der Vollagonist Oxotremorin-M (0,1 mM; siehe 3.1.4.2), der Partialagonist Pilocarpin (1 mM; Klemm, 2005), der allosterische Modulator Alcuronium (0,1 mM; Jakubik et al., 1998) und der inverse Agonist Atropin (0,001 mM; Hilf und Jakobs, 1992). Die Ergebnisse aus Untersuchungen an 22 CHO-M₂-Membransuspensionen sind in Abbildung 10 bzw. Tabelle 12 dargestellt.

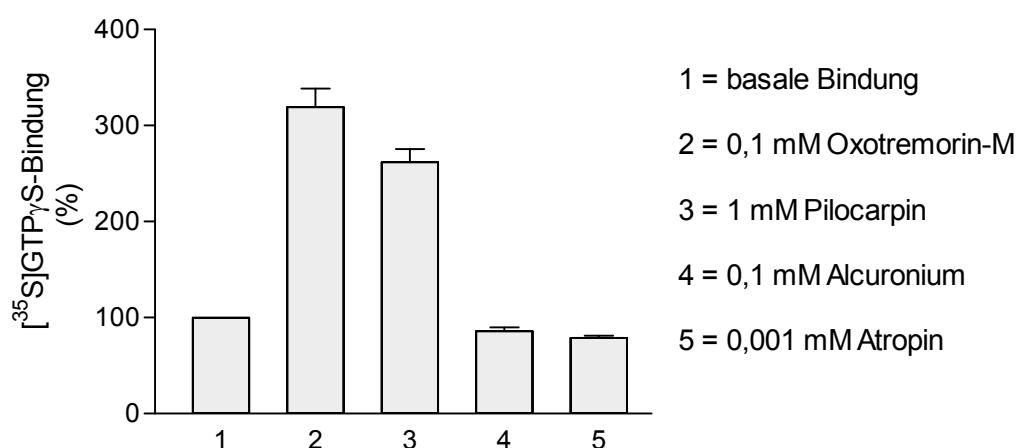


Abbildung 10: Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden auf die [³⁵S]GTP_γS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** [³⁵S]GTP_γS-Bindung in Prozent der basalen Bindung. **Abszisse:** Testsubstanzen. **Balken:** Mittelwerte ± Standardfehler aus 22 voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Achtfachbestimmung durchgeführt wurden.

Basale Bindung	Oxotremorin-M (0,1 mM)	Pilocarpin (1 mM)	Alcuronium (0,1 mM)	Atropin (0,001 mM)
100	319 ± 19*	262 ± 13*#	86 ± 4*	79 ± 2*
-	n = 22	n = 22	n = 22	n = 22

Tabelle 12: Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden auf die [³⁵S]GTP_γS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler. **n:** Anzahl getesteter Membransuspensionen.

* signifikanter Unterschied zur basalen [³⁵S]GTP_γS-Bindung (100 %, t-Test, p < 0,05)

signifikanter Unterschied zur Oxotremorin-M-induzierten [³⁵S]GTP_γS-Bindung (t-Test, p < 0,05)

In den vorliegenden [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten konnte das partialagonistische Verhalten des Pilocarpins im Vergleich zum Oxotremorin-M bestätigt werden. Sowohl Atropin als auch Alcuronium führten zu einer signifikanten Senkung der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung, verhielten sich also als inverse Agonisten. Dabei war dieser Effekt bei Atropin stärker ausgeprägt als bei Alcuronium.

Unter der Annahme, dass Atropin zu einer maximalen Senkung der M₂-Rezeptor-vermittelten basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung führte, kann aus dessen Messwert geschlossen werden, dass 21 % der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung auf eine spontane Aktivität des M₂-Rezeptors zurückzuführen waren. Wird berücksichtigt, dass durch den Vollagonisten Oxotremorin-M die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung um durchschnittlich 219 % erhöht wurde, hatte die spontane Aktivität des M₂-Rezeptors einen Anteil von 9 % und die durch Agonisten induzierbare [³⁵S]GTPγS-Bindung einen Anteil von 91 % am gesamten Messfenster der M₂-Rezeptor-vermittelten G-Protein-Aktivierung.

3.1.2.3 Effekt von N-Methylscopolamin auf die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung

Da der invers-agonistische Effekt des Atropins am M₂-Rezeptor bereits bekannt war (Eckstein, 2004), sollte überprüft werden, ob dies für das quartäre Tropan-Alkaloid N-Methylscopolamin auch zutrifft. Dazu wurde der Einfluss steigender Konzentrationen NMS auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung am nicht Agonist-aktivierten M₂-Rezeptor untersucht.

Der pEC₅₀-Wert der in Abbildung 11 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurve betrug $8,53 \pm 0,20$ (n = 5). Der Unterschied zu dem in der Promotionsschrift von Eckstein mit $9,01 \pm 0,10$ (n = 2) gefundenen Wert für Atropin am CHO-M₂-Rezeptor war statistisch nicht signifikant (t-Test, p > 0,05). Das untere Plateau der NMS-Konzentrations-Effekt-Kurve, für das ein Wert von $83 \% \pm 2 \%$ ermittelt wurde, unterschied sich jedoch signifikant von dem von Eckstein mit $64 \% \pm 1 \%$ gefundenen Wert (t-Test, p < 0,05). Offenbar war die basale Aktivität des Testsystems in der Arbeit von Eckstein höher als in der vorliegenden Arbeit.

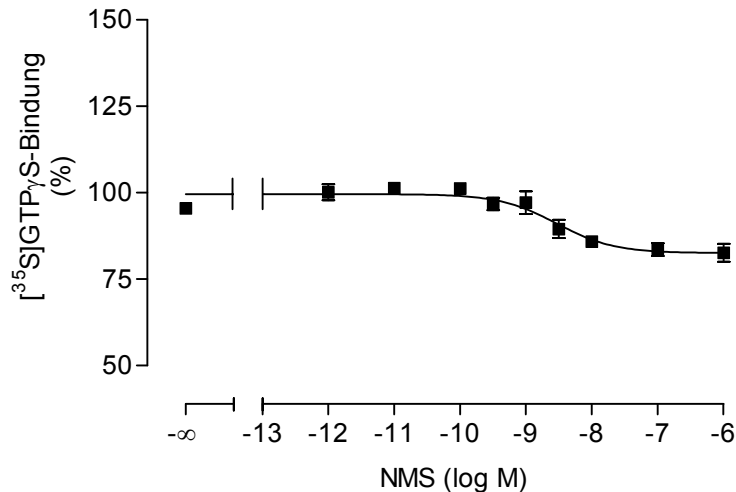


Abbildung 11: Senkung der basalen [³⁵S]GTP_γS-Bindung durch NMS an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** G-Protein-vermittelte [³⁵S]GTP_γS-Bindung in Prozent der basalen Bindung. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der NMS-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = -1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Achtfachbestimmung ausgeführt wurden.

Um die basale [³⁵S]GTP_γS-Bindung weiter zu charakterisieren, wurde bei jedem Experiment die unspezifische [³⁵S]GTP_γS-Bindung unter Zugabe von 10 μM unmarkiertem GTP_γS bestimmt. In Abbildung 12 sind basale, unspezifische sowie Muskarinrezeptor-unabhängige (Niveau der Bindung in Gegenwart von 1 μM NMS) [³⁵S]GTP_γS-Bindung einander gegenübergestellt.

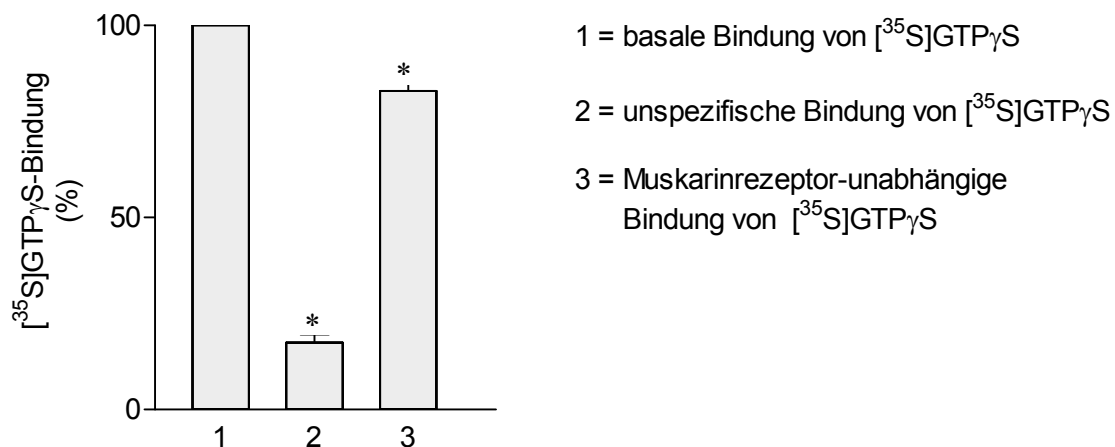


Abbildung 12: Vergleich von basaler, unspezifischer und der in Gegenwart von NMS verbleibenden, basalen [³⁵S]GTP_γS-Bindung. **Ordinate:** [³⁵S]GTP_γS-Bindung in Prozent der basalen Bindung. **Abszisse:** Zielgröße. **Balken:** Mittelwerte ± Standardfehler aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Achtfachbestimmung durchgeführt wurden.

* signifikanter Unterschied zur basalen [³⁵S]GTP_γS-Bindung (t-Test, p < 0,05)

Die unspezifische [³⁵S]GTPγS-Bindung betrug 17 % der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung, während durch NMS die basale Bindung nur auf 83 % reduziert wurde. Durch den inversen Agonisten NMS konnte demnach die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung bei weitem nicht auf das Niveau der unspezifischen Bindung gesenkt werden. Die Differenz zwischen unspezifischer [³⁵S]GTPγS-Bindung und dem unteren Plateau der NMS-beeinflussten [³⁵S]GTPγS-Bindung ist wohl auf eine Muskarinrezeptor-unabhängige G-Proteinaktivität, z.B. von G-Proteinen, die an andere Rezeptoren als die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren gekoppelt sind, zurückzuführen.

3.1.3 Von Antagonisten abgeleitete Hybridverbindungen

3.1.3.1 Hybrid aus W84 und AF-DX 384: EHW412

Die Hybridverbindung EHW412 leitet sich von AF-DX 384 und einem wesentlichen Strukturelement des allosterischen Modulators W84 ab, wobei im AF-DX 384-Anteil des Hybrids die Ethyl-Zwischenkette, die den Piperidinring mit dem Ureid-Stickstoff verbindet, durch eine Butyl-Kette ersetzt wurde. Da aus [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperimenten bereits ein invers-agonistischer Effekt des AF-DX 384 dokumentiert ist (Hilf und Jakobs, 1992), der sich in einer Absenkung der basalen [^{35}S]GTP γ S-Bindung äußerte, wurde im Falle der Hybridverbindung auf [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperimente verzichtet. Die Annahme eines antagonistischen Verhaltens der Hybridverbindung wird ebenfalls dadurch gestützt, dass es sich bei der zweiten Muttersubstanz, dem W84, ebenfalls um einen Antagonisten handelt. In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse aus Radioligandbindungsstudien dargestellt, die an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins durchgeführt wurden.

3.1.3.1.1 [^3H]NMS-Bindungsexperiment: Affinität zum [^3H]NMS-besetzten Rezeptor

Um die Affinität der Hybridverbindung zum [^3H]NMS-besetzten Rezeptor mit der Muttersubstanz W84 vergleichen zu können, wurde der Einfluss der beiden Substanzen auf die Dissoziationskinetik von [^3H]NMS untersucht. Dazu wurden komplette Dissoziationskurven über einen Zeitraum von 120 min jeweils in An- und Abwesenheit der Testsubstanzen gemäß der unter 2.7.3.1 beschriebenen Methode aufgenommen. Abbildung 13 zeigt exemplarisch den Effekt dreier unterschiedlicher Konzentrationen EHW412 auf den Verlauf der [^3H]NMS-Dissoziationskurve.

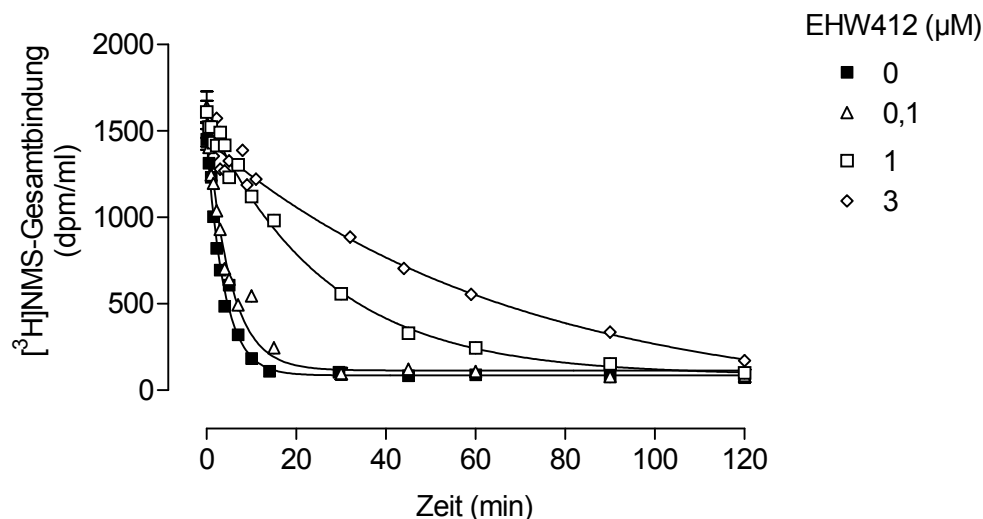


Abbildung 13: Repräsentatives Experiment zur Verzögerung der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation unter dem Einfluss steigender Konzentrationen von EHW412 an einer Membransuspension aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins. **Ordinate:** $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gesamtbindung in dpm/ml. **Abszisse:** Zeit in min. **Kurvenanpassung:** Gleichung zur Beschreibung einer Reaktion erster Ordnung (Gl. 14).

Die durchschnittliche Geschwindigkeitskonstante der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation unter Kontrollbedingungen betrug $0,27 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$ ($n = 12$), woraus sich eine Halbwertszeit von $2,69 \pm 0,51 \text{ min}$ ($n = 12$) ergab. Die Konzentrationsabhängigkeit des dissoziationsverzögernden Effekts von EHW412 ist in Abbildung 14 im Vergleich zu der von W84 gezeigt. Das obere Plateau der beiden Kurven wurde auf 100 % konstant gesetzt.

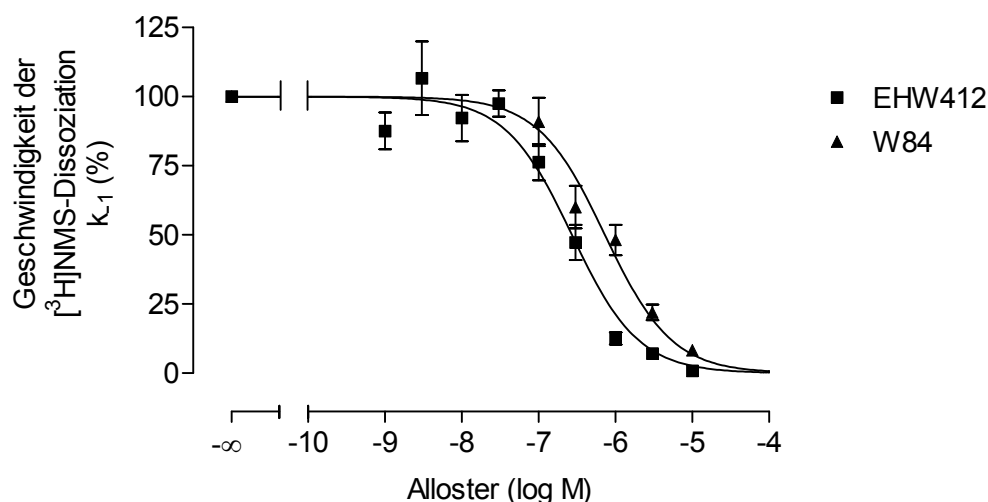


Abbildung 14: Konzentrations-Effekt-Kurven der EHW412- und W84-induzierten Verzögerung der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation von Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins. **Ordinate:** Apparente Geschwindigkeitskonstanten der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation in Prozent der Kontrolle. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Alloster-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 3 - 6$ voneinander unabhängigen Experimenten.

	pEC_{50Diss}	E_{min} (%)	n_H (frei)
EHW412	$6,57 \pm 0,10$	-5 ± 8^{ns}	$-1,29 \pm 0,30$
W84	$6,14 \pm 0,07$	5 ± 6^{ns}	$-0,87 \pm 0,13$

Tabelle 13: Kenngrößen der EHW412- und W84-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 14; die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. pEC_{50} : Konzentration, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [3H]NMS-Dissoziation führt. E_{min} : unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve. n_H : Freier Hill-Koeffizient.
^{ns} nicht signifikant verschieden von 0 (F-Test, $p > 0,05$)

Beide Konzentrations-Effekt-Kurven konnten mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$ angepasst werden, was darauf schließen lässt, dass es sich um eine 1:1 Interaktion von Ligand und Rezeptor handelte. Der pEC_{50Diss} -Wert des EHW412 war signifikant größer als der des W84 (t-Test, $p < 0,05$). Das Hybrid hat somit eine höhere Affinität zum [3H]NMS-besetzten Rezeptor als W84. Die von Null nicht signifikant verschiedenen unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven (F-Test, $p > 0,05$) zeigen an, dass die Testsubstanzen in der Lage waren, die [3H]NMS-Dissoziation vollständig zu unterbinden.

3.1.3.1.2 [3H]NMS-Bindungsexperiment: Affinität zum freien Rezeptor

In Gleichgewichtsbindungsexperimenten wurde die Affinität des Hybrids zum freien Rezeptor untersucht. Die Versuche wurden wie unter 2.7.2.2.1 beschrieben durchgeführt. Da die in 3.1.3.1.1 gezeigte dissoziationsverzögernde Wirkung der Hybridsubstanz zu einer Verzögerung der Gleichgewichtseinstellung führte, wurde die benötigte Inkubationszeit gemäß der Gleichung von Lazareno und Birdsall (*Gl. 11*) berechnet. Die benötigte Inkubationszeit betrug sechs Stunden. In Abbildung 15 ist die mit Hilfe des ternären Komplex-Modells nach Ehlert (*Gl. 10*) an die Datenpunkte angepasste Inhibitionskurve dargestellt.

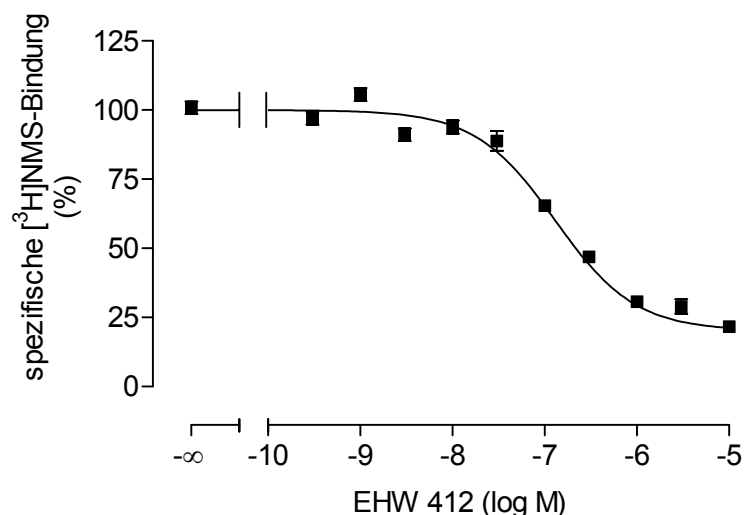


Abbildung 15: Effekt von EHW412 auf die Gleichgewichtsbindung des Radioliganden [³H]NMS (0,2 nM) an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins. **Ordinate:** Spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent der [³H]NMS-Bindung in Abwesenheit von EHW412. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der EHW412-Konzentration. **Kurvenanpassung:** Gleichung zur Beschreibung des ternären Komplex-Modells nach Ehlert (Gl. 10). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 1 μ M Atropin bestimmt.

Wie aus der Inhibitionskurve ersichtlich ist, war das Hybrid nicht in der Lage, die Bindung des Radioliganden vollständig zu hemmen (unteres Plateau unterscheidet sich signifikant von null; F-Test, $p < 0,05$). Diese submaximale Hemmwirkung ist ein Beleg für eine allosterische Interaktion des Hybrids mit dem Radioliganden und rechtfertigt zusammen mit der in 3.1.3.1.1 gefundenen dissoziationsverzögernden Wirkung die Auswertung der Inhibitionskurve nach dem ternären Komplex-Modell nach Ehlert (Gl. 11). Es wurde ein pK_A -Wert von $7,01 \pm 0,05$ und eine negative Kooperativität mit [³H]NMS von $p\alpha = -0,81 \pm 0,05$ gefunden. Der pK_A -Wert ist signifikant größer als der unter 3.1.3.1.1 gefundene pEC_{50Diss} -Wert von $6,57 \pm 0,10$ (t-Test, $p < 0,05$). Somit besaß EHW412 eine größere Affinität zum freien als zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor. Der $p(\alpha \cdot K_A)$ -Wert wurde mit $6,20 \pm 0,14$ berechnet und unterschied sich damit nicht signifikant von dem in den Dissoziationsexperimenten gefundenen pEC_{50} -Wert (t-Test, $p > 0,05$).

3.1.4 Orthosterische Agonisten

3.1.4.1 Acetylcholin-induzierte [³⁵S]GTP_γS-Bindung

Acetylcholin, der endogene Agonist an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren, diente als Referenzsubstanz in Experimenten, in denen der Effekt von Testsubstanzen auf die [³⁵S]GTP_γS-Bindung untersucht werden sollte. In Abbildung 16 sind alle Konzentrations-Effekt-Kurven des Acetylcholins zu einer Mittelwertskurve zusammengefasst.

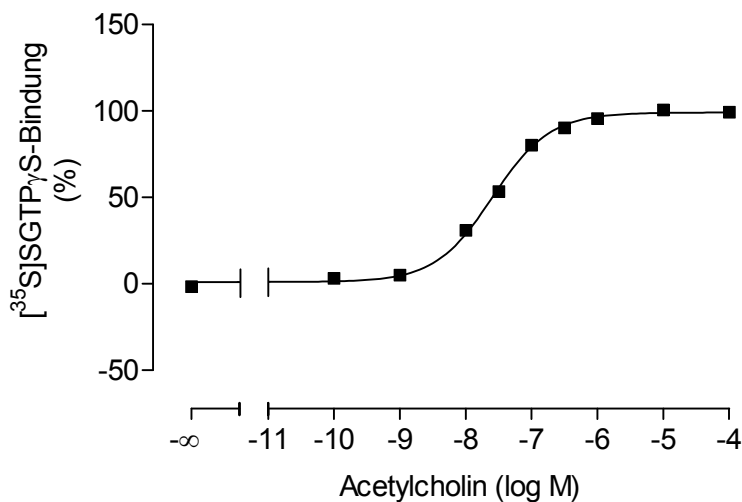


Abbildung 16: Acetylcholin-induzierte [³⁵S]GTP_γS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP_γS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau (basale [³⁵S]GTP_γS-Bindung) und 100 % dem oberen Plateau (maximal induzierbarer Acetylcholin-Effekt) der Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus 52 voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Der pEC₅₀-Wert wurde mit $7,60 \pm 0,03$ ($n = 52$) ermittelt und stimmt mit dem von Lazareno und Birdsall (1993) ermittelten Wert überein. Der von Schmalenbach (2005) gefundene Wert liegt mit $7,69 \pm 0,03$ ($n = 27$) in der gleichen Größenordnung, unterscheidet sich allerdings signifikant von dem in dieser Arbeit gefundenen Wert (t-Test, $p < 0,05$).

Die Steigung der Mittelwertskurve wich nicht signifikant von eins ab, so dass der Hill-Koeffizient auf $n_H = 1$ konstant gesetzt werden konnte. Bei Betrachtung der Einzelkurven kam es jedoch vor, dass der Hill-Koeffizient einzelner Kurven signifikant verschieden von eins war. Dies war der Fall bei den in Abschnitt 3.1.4.3 gezeigten Versuchen, in denen der Acetylcholin-Effekt mit dem des Iperoxo verglichen werden sollte. Dabei ist anzumerken, dass davon zwar die Mittelwertskurve mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 0,76 \pm 0,05$

betroffen war, aber nur zwei der drei Einzelkurven. Weiterhin wurden von eins abweichende Hill-Koeffizienten bei den unter 3.1.7.1 genannten Versuchen festgestellt, wobei nur 5 der insgesamt 22 Einzelkurven betroffen waren, so dass bei der hier dargestellten Mittelung aller Kurven dieses Phänomen unbeachtet blieb und tendenziell nicht so stark ausgeprägt war wie von Schmalenbach (2005) beobachtet wurde.

3.1.4.2 Oxotremorin-M-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung

Die Experimentalsubstanz Oxotremorin-M ist wie Acetylcholin ein Vollagonist an muskarinischen Rezeptoren. In vorliegender Arbeit spielt diese Verbindung eine Schlüsselrolle, da der für den agonistischen Effekt verantwortliche Anteil der Hybride auf Oxotremorin-M bzw. dessen Derivate zurückzuführen ist.

In folgendem Abschnitt sollte der Effekt dieser Substanz auf die [^{35}S]GTP γ S-Bindung untersucht und anschließend mit Literaturdaten verglichen werden. In Abbildung 17 ist die Konzentrations-Effekt-Kurve von Oxotremorin-M im Vergleich zur Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve, die bei jedem Experiment als Kontrolle mitgeführt wurde, dargestellt. Die Kenngrößen sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

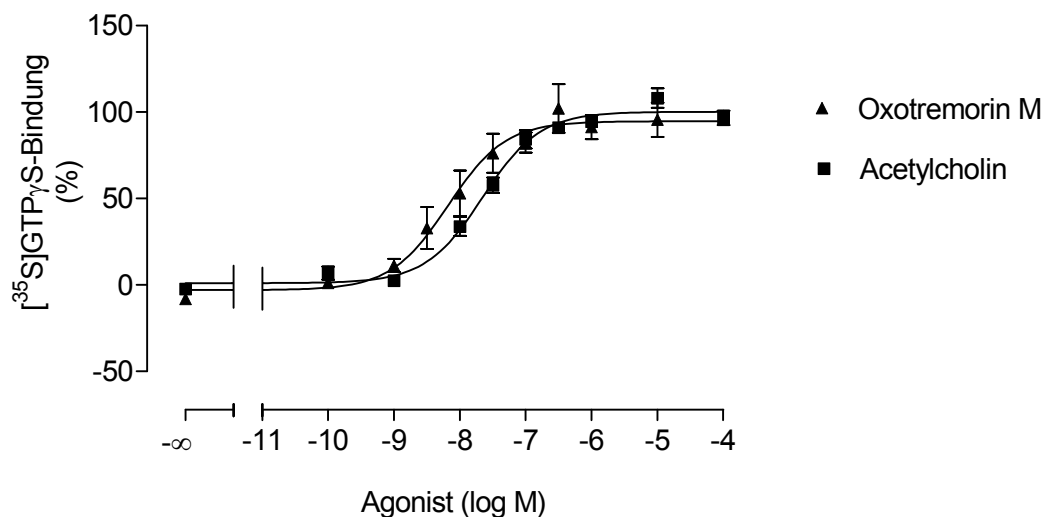


Abbildung 17: Vergleich von Oxotremorin-M- und Acetylcholin-induzierter [^{35}S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [^{35}S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC₅₀	E_{min} (%)	E_{max} (%)	n_H (frei)	n
Oxotremorin-M	8,18 ± 0,09	-3 ± 4	95 ± 3	0,80 ± 0,13	4
Acetylcholin	7,66 ± 0,07*	1 ± 3	100 ± 3	0,95 ± 0,17	4

Tabelle 14: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Oxotremorin-M- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 17. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC₅₀**: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **E_{min}**: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}**: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei)**: Freier Hill-Koeffizient. **n**: Anzahl unabhängiger Experimente.
* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

Der vollagonistische Effekt des Oxotremorin-M konnte durch die vorliegenden Experimente bestätigt werden. Oxotremorin-M besaß eine um etwa eine halbe Dekade höhere Wirksamkeit (pEC₅₀) als Acetylcholin. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu dem von Schmalenbach (2005) mit $8,13 \pm 0,11$ ($n = 2$) ermittelten pEC₅₀-Wert (t-Test, $p > 0,05$). Wird der in vorliegender Arbeit erhobene Wert mit Daten aus anderen funktionellen Experimenten als dem [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment verglichen, ergeben sich signifikante Unterschiede (t-Test, $p < 0,05$). In Experimenten, in denen die Hemmung der cAMP-Akkumulation bestimmt wurde, wurden Werte von pEC₅₀ = $6,87 \pm 0,03$ (Michal et al., 2007) und pEC₅₀ = $7,32 \pm 0,07$ (Griffin et al., 2007) erhoben. Die Literaturrecherche zeigte, dass der Versuch eines Vergleichs mit Daten aus anderen funktionellen Experimenten schwierig ist. Die beste Übereinstimmung zeigte sich mit Befunden aus Organbadversuchen an Meerschweinchen-Herzvorhöfen, die einen pD₂-Wert von $7,94 \pm 0,03$ (Dallanoce et al., 1999) ergeben haben.

3.1.4.3 Iperoxo-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung

Iperoxo ist ein Derivat des Vollagonisten Oxotremorin-M, wobei der Pyrrolidin-2-on-Rest des Oxotremorin-M gegen einen Isoxazolinyli-Ether-Rest ausgetauscht wurde. In Organbadexperimenten mit Meerschweinchen-Herzvorhöfen wies Iperoxo eine außerordentlich hohe Wirksamkeit auf (Dallanoce et al., 1999), die sich in einem pD₂-Wert* von $10,10 \pm 0,13$ relativ zu dem von Oxotremorin-M mit $7,94 \pm 0,03$ gefundenen Wert zeigte. Dies entspricht einer Differenz der pD₂-Werte („potency ratio“) von 1,3. In vorliegendem Versuch sollte in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten die Wirksamkeit im Vergleich zu dem parallel getesteten Acetylcholin bestimmt werden.

* pD₂: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. Die Bestimmung erfolgte mittels linearer Regressionsanalyse (Dallanoce et al., 1999).

Iperoxo wies einen um mehr als zwei Dekaden signifikant größeren pEC₅₀-Wert auf als Acetylcholin (t-Test, p < 0,05). Um das Ergebnis mit dem aus den bereits erwähnten Organbadversuchen vergleichen zu können, wurde aus dem pEC₅₀-Wert des Iperoxo und dem des Oxotremorin-M (siehe 3.1.4.2) ebenfalls eine „potency ratio“ berechnet. Diese betrug 1,2 und lag damit in einer ähnlichen Größenordnung wie die, die aus den Ergebnissen der Organbadversuche (Dallanoce et al., 1999) berechnet wurde.

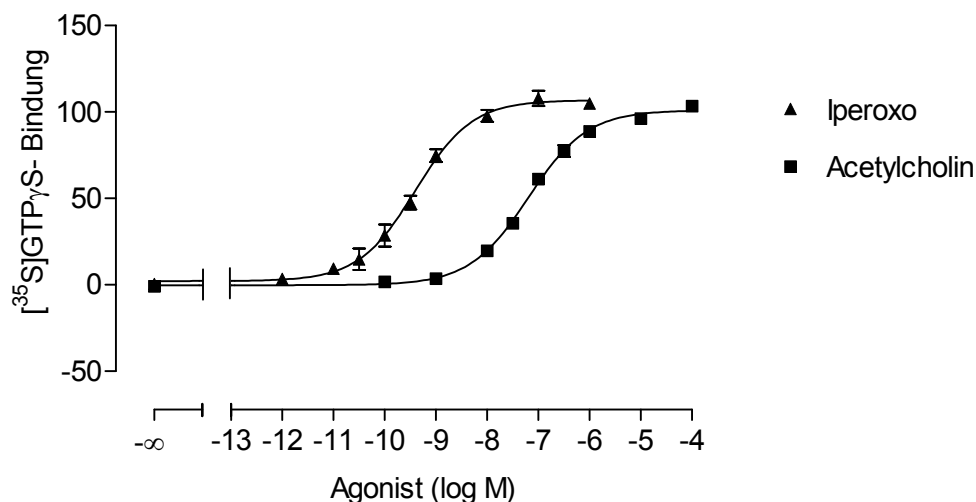


Abbildung 18: Vergleich von Iperoxo- und Acetylcholin-induzierter [³⁵S]GTP_γS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP_γS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), signifikanter Unterschied der Hill-Koeffizienten von n_H = 1 (F-Test, p < 0,05), Iperoxo: n_H = 0,79 ± 0,05, Acetylcholin: n_H = 0,76 ± 0,05. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	E _{min} (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Iperoxo	9,40 ± 0,04*	2 ± 1	107 ± 1	0,79 ± 0,05 [#]	3
Acetylcholin	7,20 ± 0,04	0 ± 1	101 ± 2	0,76 ± 0,05 [#]	3

Tabelle 15: Kenngrößen ± Standardfehler der gemittelten Iperoxo- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 18. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit freiem Hill-Koeffizienten. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 14.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)
[#] signifikant bessere Anpassung mit freiem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05)

Mit Hilfe eines F-Tests wurde festgestellt, dass sich die Hill-Koeffizienten beider Konzentrations-Effekt-Kurven signifikant von eins unterscheiden (p < 0,05). Bezüglich des Acetylcholins wurde dieser Befund bereits in Abschnitt 3.1.4.1 diskutiert. Die Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven wiesen auch in anderen Experimenten einen numerisch kleineren Hill-Koeffizienten als eins auf, wobei dieser Befund ebenfalls bei dem

Interaktionsexperiment mit Naphmethonium (siehe 3.1.5.2) und dem Experiment zur Untersuchung äquimolarer Konzentrationen Iperoxo und Seminaph (siehe 3.1.6) statistisch signifikant war (F-Test, $p < 0,05$). Daher ist davon auszugehen, dass vorliegendes Ergebnis die Charakteristik des Iperoxo repräsentiert und es sich nicht um ein Artefakt handelt.

3.1.5 Einfluss allosterischer Antagonisten auf die Iperoxo-induzierte [³⁵S]GTP_γS-Bindung

In den folgenden drei Abschnitten wurden die Effekte verschiedener allosterischer Modulatoren auf die Wirkung des Vollagonisten Iperoxo, der für drei der untersuchten Hybridverbindungen strukturgebend war, untersucht. Als allosterische Modulatoren wurden die Alkan-Bisammonium-Verbindungen W84 und Naphmethonium gewählt, da die Alloster-Anteile der Hybride auf wesentlichen Strukturelemente dieser Verbindungen zurückzuführen sind. Des Weiteren kam ein Fragment des Naphmethoniums, Seminaph (MM7a), zum Einsatz, welches im Hybrid MMH5-4 mit Iperoxo verbunden ist.

3.1.5.1 W84

Abbildung 19 zeigt den Einfluss steigender Konzentrationen W84 auf die Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve. Die entsprechenden Kenngrößen sind in Tabelle 16 widergegeben.

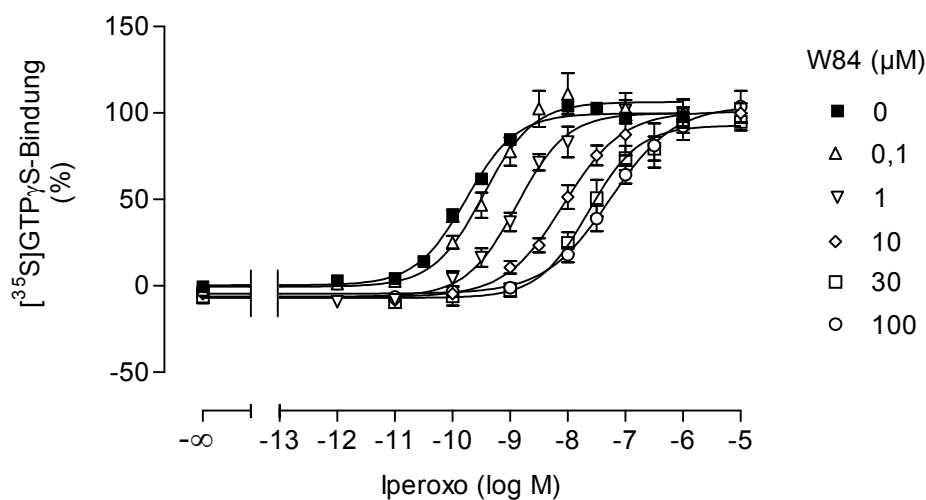


Abbildung 19: Einfluss von W84 auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP_γS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Iperoxo-Kontrollkurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2 - 4 (Kontrollkurve: n = 16) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	Kontrolle	W84 0,1 μM	W84 1 μM	W84 10 μM	W84 30 μM	W84 100 μM
pEC₅₀	9,76 \pm 0,05	9,46 \pm 0,07*	8,88 \pm 0,05*	8,07 \pm 0,04*	7,64 \pm 0,05	7,32 \pm 0,05*
E_{min} (%)	0 \pm 2	0 \pm 3	-6 \pm 2	-5 \pm 2	-7 \pm 2	-3 \pm 2
E_{max} (%)	100 \pm 2	106 \pm 3	100 \pm 2	99 \pm 2	93 \pm 2	99 \pm 2
n_H (frei)	0,98 \pm 0,10	1,12 \pm 0,18	0,912 \pm 0,09	0,85 \pm 0,05 [#]	0,85 \pm 0,05	0,78 \pm 0,05 [#]
n	16	4	3	3	2	4

Tabelle 16: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 19 unter Kontrollbedingungen sowie unter dem Einfluss von W84. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung hervorruft. **E_{min}:** Minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Freier Hill-Koeffizient. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Kontrollkurve (t-Test, $p < 0,05$)

signifikant bessere Anpassung mit freiem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$)

W84 rief eine konzentrationsabhängige Rechtsverschiebung des Wendepunktes der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve hervor. Obwohl die Kurven in Gegenwart von 10 μM und 100 μM W84 mit einem freien Hill-Koeffizienten signifikant besser beschrieben wurden, zeigte der nach Lew und Angus (1995) durchgeführte F-Test, dass die gesamte Kurvenschar ausreichend mit einem konstanten Hill-Koeffizienten von eins beschrieben wurde. Alle Kurven erreichten ein oberes Plateau. Unteres und oberes Plateau der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve erfuhren durch die Zugabe des allosterischen Modulators W84 keine Beeinflussung.

Zur Quantifizierung der W84-induzierten Rechtsverschiebung der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve wurden gemäß Abschnitt (2.8.4) Verschiebefaktoren berechnet. Es erfolgte eine Auftragung der errechneten Verschiebefaktoren gegen die logarithmische Konzentration von W84. Ein F-Test ($p < 0,05$) ergab, dass die Datenpunkte bei einer Anpassung mit der Gleichung nach Lanzafame et al. (Gl. 20) signifikant besser beschrieben wurden als bei einer Anpassung mit der Gleichung nach Arunlakshana und Schild (Gl. 18).

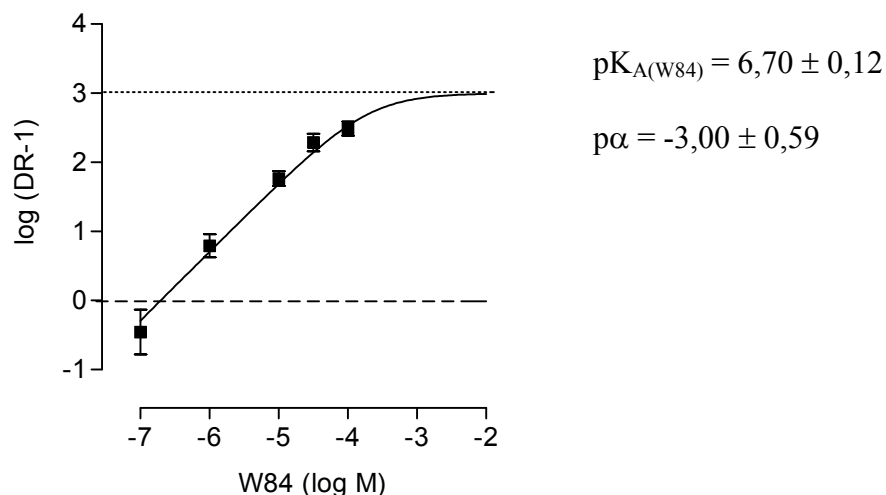


Abbildung 20: W84-induzierte Rechtsverschiebung der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve.
Ordinate: Dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktor (dose ratio, DR) und eins.
Abszisse: Dekadischer Logarithmus der W84-Konzentration.

Aus der nichtlinearen Regressionsanalyse resultierte für die Substanz W84 ein pK_A -Wert von $6,70 \pm 0,12$. Dieser stimmt gut mit den pK_A -Werten, die in Interaktionsexperimenten mit DDT5 bzw. DDT1 ermittelt wurden (siehe 3.1.8.1 bzw. 3.1.8.2), überein. Es zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zu dem von Schmalenbach (2005) in Interaktionsexperimenten mit Acetylcholin gefundenen pK_A -Wert von $6,64 \pm 0,22$ (t-Test, $p > 0,05$). Der Kooperativitätsfaktor für die Interaktion mit Iperoxo wurde mit $p\alpha = -3,00 \pm 0,59$ erhalten. Dabei handelt es sich um den Wert, dem die Kurve aus Abbildung 20 asymptotisch entgegenstrebt (gepunktete Linie).

3.1.5.2 Naphmethonium

In Abbildung 21 ist der Einfluss steigender Konzentrationen Naphmethonium auf die Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt. Die entsprechenden Kenngrößen sind der Tabelle 17 zu entnehmen.

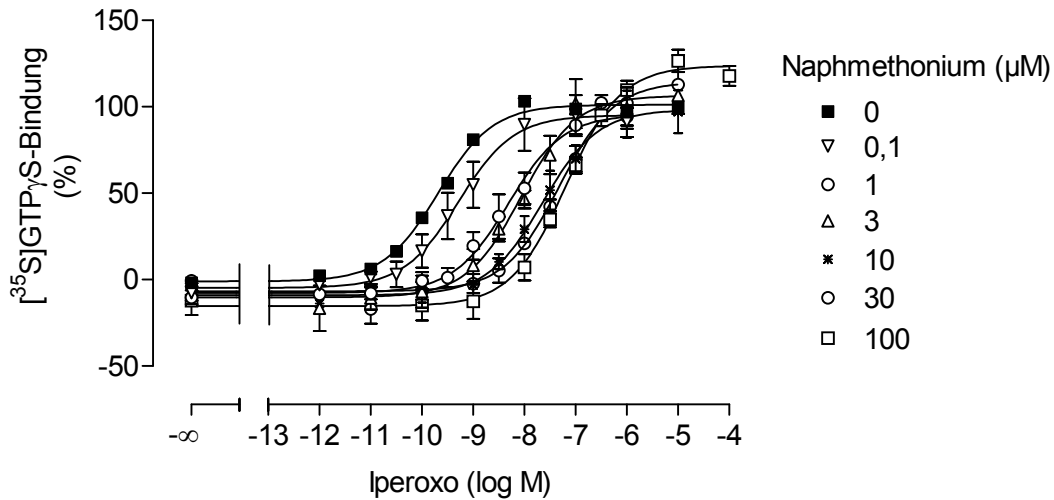


Abbildung 21: Einfluss von Naphmethonium auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP_γS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Iperoxo-Kontrollkurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 0,81. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 3 – 6 (Kontrollkurve: n = 28) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	Kontrolle	Naphm. 0,1 µM	Naphm. 1 µM	Naphm. 3 µM	Naphm. 10 µM	Naphm. 30 µM	Naphm. 100 µM
pEC₅₀	9,68 ± 0,06	9,28* ± 0,05	8,31* ± 0,07	8,06* ± 0,09	7,64* ± 0,04	7,32* ± 0,07	7,19* ± 0,05
E_{min} (%)	-1 ± 2	-5 ± 1	-8* ± 2	-10 ± 3	-9* ± 1	-7 ± 2	-15* ± 2
E_{max} (%)	101 ± 2	95* ± 2	96 ± 3	107 ± 4	98 ± 2	115* ± 3	124* ± 2
n_H (frei)	0,89 ± 0,09	0,80 ± 0,08	0,68 ± 0,07	0,80 ± 0,12	0,77 ± 0,05	0,84 ± 0,11	0,88 ± 0,07
n	28	5	6	3	4	4	6

Tabelle 17: Kenngrößen ± Standardfehler der in Abbildung 21 dargestellten gemittelten Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen sowie unter dem Einfluss von Naphmethonium. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 0,81. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 16.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Kontrollkurve (t-Test, p < 0,05)

Naphmethonium führte zu einer konzentrationsabhängigen Rechtsverschiebung der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve. Mit einem konstanten Hill-Koeffizienten von eins konnte die gesamte Kurvenschar nur unzureichend beschrieben werden (F-Test nach Lew und Angus, 1995). Ein erneuter F-Test ergab, dass der Mittelwert aller individuellen Hill-Koeffizienten von $n_H = 0,81$ ausreichte, die Gesamtheit der Kurven zu beschreiben.

Naphmethonium führte in Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ zu einer signifikanten Senkung des unteren Plateaus (t-Test, $p < 0,05$). Die beiden höchsten Naphmethonium-Konzentrationen verursachten eine deutliche Erhöhung des oberen Plateaus. Dieser Effekt des Naphmethoniums konnte auch an anderer Stelle beobachtet werden, so z.B. bei der Interaktion mit MMH5-6 (siehe 3.1.8.4) sowie bei der von Schmalenbach (2005) untersuchten Interaktion mit Oxotremorin und Oxotremorin-M. Die Annahme, dass es sich dabei nicht um Artefakte handelte, wird durch die von Schmalenbach gemachte Beobachtung gestützt, dass die Naphmethonium-induzierte Steigerung des Oxotremorin-Maximaleffekts durch W84 vollständig antagonistisch war.

Zur Quantifizierung der Naphmethonium-verursachten Rechtsverschiebung der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve wurden in Abbildung 22 die Verschiebefaktoren gegen die logarithmische Konzentration von Naphmethonium aufgetragen. Da die Datenpunkte einem Maximalwert entgegenstrebten, erfolgte eine Kurvenanpassung mit der Gleichung nach Lanzafame et al. (Gl. 20).

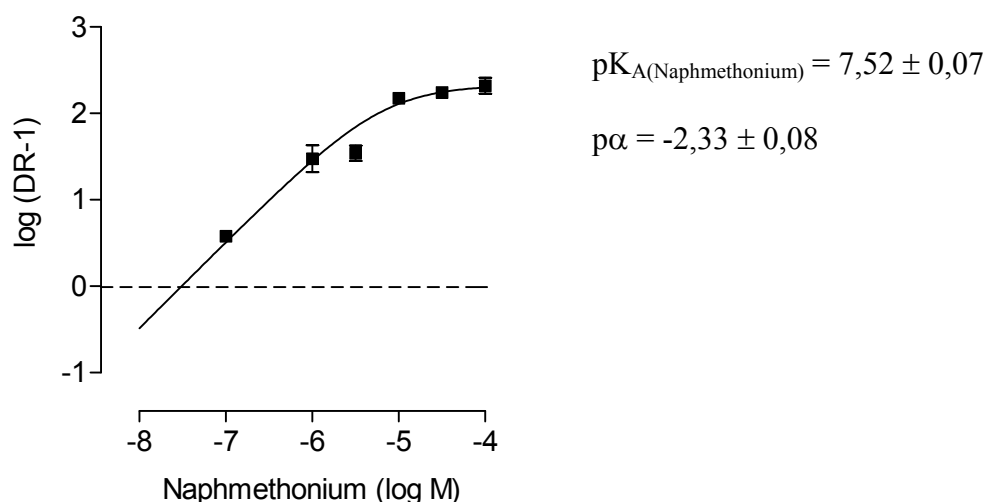


Abbildung 22: Naphmethonium-induzierte Rechtsverschiebung der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktor (dose ratio, DR) und eins. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Naphmethonium-Konzentration.

Aus der nichtlinearen Regressionsanalyse resultierte für Naphmethonium ein pK_A -Wert von $7,52 \pm 0,07$ und ein Kooperativitätsfaktor für die Interaktion mit Iperoxo von $\rho\alpha = -2,33 \pm 0,08$. Der von Schmalenbach (2005) beschriebene pK_A -Wert lag mit $7,66 \pm 0,13$ in der gleichen Größenordnung.

3.1.5.3 Seminaph (MM7a)

Abbildung 23 zeigt den Einfluss steigender Konzentrationen Seminaph auf die Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve. Die entsprechenden Kenngrößen sind der Tabelle 18 zu entnehmen.

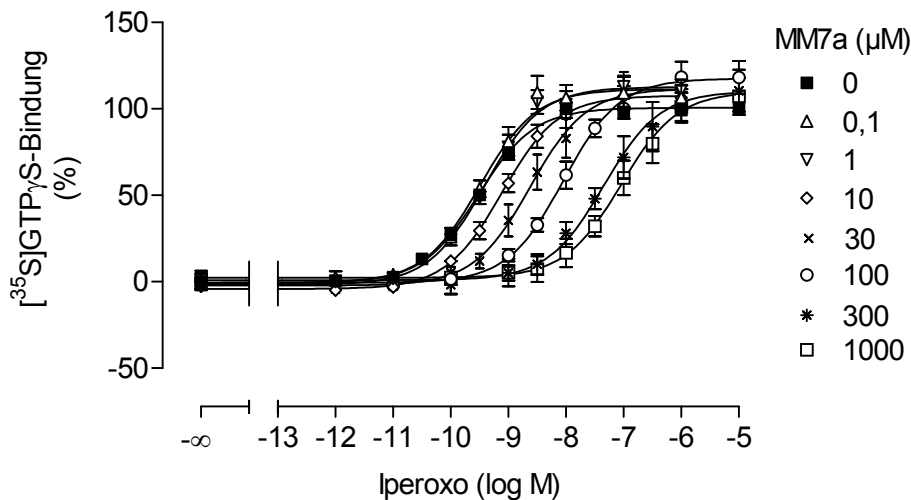


Abbildung 23: Einfluss von Seminaph (MM7a) auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Iperoxo-Kontrollkurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 0,89$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 2 - 5$ (Kontrollkurve: $n = 25$) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Seminaph rief eine konzentrationsabhängige Rechtsverschiebung des Wendepunkts der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve hervor. Der nach Lew und Angus (1995) durchgeführte Test auf Parallelverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven ergab, dass ein konstanter Hill-Koeffizient von eins die gesamte Kurvenschar nicht ausreichend beschrieb. Aus der Mittelung der individuellen Hill-Koeffizienten resultierte ein Wert von $n_H = 0,89$. Ein erneuter F-Test zeigte, dass dieser gemittelte Hill-Koeffizient die Gesamtheit der Kurven ausreichend beschrieb. Die Beeinflussung des unteren Plateaus durch W84 war nur bei einer W84-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ signifikant (t-Test, $p < 0,05$). Daher war hier nicht von einem konzentrationsabhängigen Effekt auszugehen. Anders verhielt es sich mit

dem oberen Plateau. Alle Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven wiesen ein signifikant von der Kontrollkurve verschiedenes oberes Plateau auf. Allerdings schien es nicht zu einem Anstieg des Plateaus in Abhängigkeit von der Seminaph-Konzentration zu kommen, vielmehr war mit der niedrigsten hier eingesetzten Konzentration bereits eine Sättigung dieses Phänomens erreicht.

	Kontrolle	MM7a 0,1 µM	MM7a 1 µM	MM7a 10 µM
pEC₅₀	9,52 ± 0,03	9,50 ± 0,07	9,41 ± 0,05*	9,11 ± 0,02*
E_{min} (%)	-1 ± 1	-1 ± 3	-2 ± 2	-4 ± 1*
E_{max} (%)	101 ± 1	111 ± 3*	113 ± 2*	108 ± 0,8*
n_H (frei)	0,90 ± 0,06	1,088 ± 0,13	0,98 ± 0,09	0,91 ± 0,3
n	25	5	5	4
	MM7a 30 µM	MM7a 100 µM	MM7a 300 µM	MM7a 1000 µM
pEC₅₀	8,62 ± 0,04*	8,04 ± 0,03*	7,34 ± 0,05*	7,04 ± 0,03*
E_{min} (%)	-2 ± 1	-1 ± 1	1 ± 2	2 ± 1
E_{max} (%)	112 ± 2*	118 ± 1*	110 ± 2*	110 ± 1*
n_H (frei)	0,85 ± 0,06	0,82 ± 0,04	0,73 ± 0,03 [#]	0,86 ± 0,05
n	2	3	3	3

Tabelle 18: Kenngrößen ± Standardfehler der in Abbildung 23 dargestellten gemittelten Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen sowie unter dem Einfluss von Seminaph (MM7a). Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 0,89$. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 16.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Kontrollkurve (t-Test, $p < 0,05$)

signifikant bessere Anpassung mit freiem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$)

In Abbildung 24 sind die Rechtsverschiebungen des Wendepunkts der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve, ausgedrückt als Verschiebefaktoren, in Abhängigkeit von der Seminaph-Konzentration dargestellt. Im untersuchten Konzentrationsbereich strebten die Verschiebefaktoren keinem Maximalwert entgegen. Ein F-Test ($p < 0,05$) ergab daher, dass in vorliegendem Fall die lineare Regression nach Arunlakshana und Schild (Gl. 18) einer nichtlinearen Regression nach Lanzafame et al. (Gl. 20) nicht unterlegen war. Die Gerade konnte ausreichend mit einer Steigung von eins beschrieben werden. Für Seminaph resultierte ein pK_A -Wert von $5,47 \pm 0,06$. Dieser Wert stimmt mit dem von Sennwitz (2006) aus Radioligandbindungsstudien mit [³H]NMS beschriebenen Wert von $5,50 \pm 0,01$ ($n = 4$) überein. Die Tatsache, dass die Datenpunkte eine Gerade beschreiben, könnte vermuten lassen, dass es sich bei der Interaktion von Iperoxo und Seminaph um eine kompetitive Interaktion handelte. Sennwitz konnte aber auch in Radioligandbindungs-

studien eine dissoziationsverzögernde Wirksamkeit des Seminaphs feststellen. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass Seminaph an einer anderen Stelle als der orthosterischen Bindungsstelle binden muss und das antagonistische Verhalten als „pseudokompetitiv“ zu bezeichnen ist. Der Kooperativitätsfaktor konnte mit $p\alpha \leq -2,33$ aus dem maximalen Verschiebefaktor abgeschätzt werden.

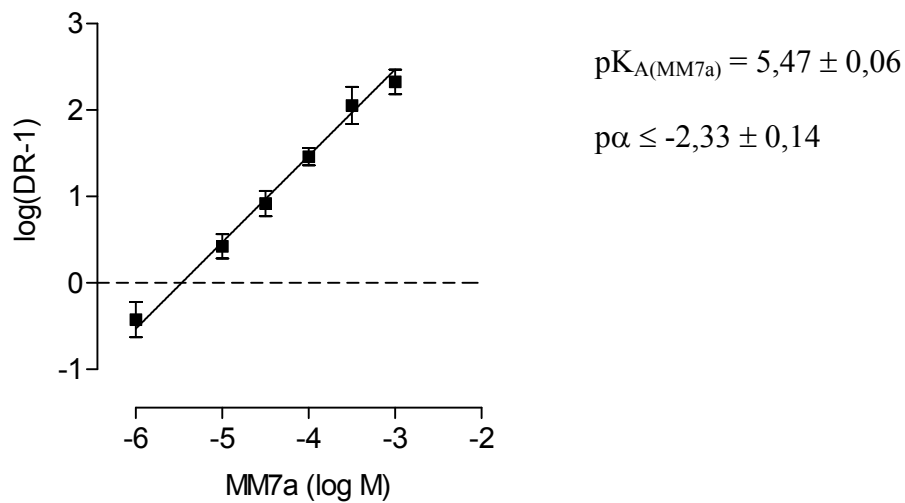


Abbildung 24: Seminaph-induzierte Rechtsverschiebung der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve.
Ordinate: Dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktor (dose ratio, DR) und eins.
Abszisse: Dekadischer Logarithmus der MM7a-Konzentration.

3.1.6 Einfluss äquimolarer Konzentrationen Iperoxo und Seminaph (MM7a) auf die [³⁵S]GTP γ S-Bindung

Um festzustellen, ob der Hybrid-Effekt an die kovalente Verbindung der beiden Teilstrukturen (Agonist-Struktur und Alloster-Struktur) gebunden ist, wurde exemplarisch für das Hybrid MMH5-4 untersucht, wie sich die beiden Teilstrukturen, sind sie nicht kovalent miteinander verbunden, beeinflussen. Dazu wurde der Einfluss äquimolarer Konzentrationen der beiden Hybridfragmente auf die [³⁵S]GTP γ S-Bindung getestet. In Abbildung 25 ist einerseits der Einfluss von Iperoxo alleine und andererseits der Einfluss von Iperoxo und Seminaph auf die [³⁵S]GTP γ S-Bindung dargestellt. Die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven sind der Tabelle 19 zu entnehmen.

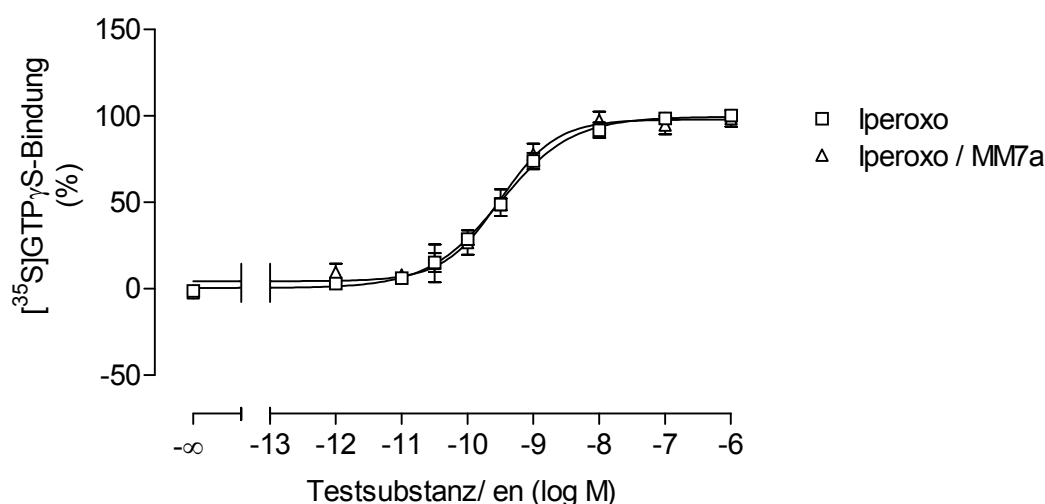


Abbildung 25: Einfluss äquimolarer Konzentrationen Iperoxo und Seminaph (MM7a) auf die [³⁵S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanzen. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), freie Hill-Koeffizienten, Iperoxo: $n_H = 0,80$, Iperoxo/MM7a: $n_H = 1,02$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	E _{min} (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Iperoxo	9,51 \pm 0,03	0 \pm 1	100 \pm 1	0,80 \pm 0,05	3
Iperoxo / MM7a äquimolar	9,51 \pm 0,06	4 \pm 2	98 \pm 2	1,02 \pm 0,14 [#]	3

Tabelle 19: Kenngrößen \pm Standardfehler der in Abbildung 25 dargestellten gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Iperoxo sowie äquimolarer Konzentrationen Iperoxo und Seminaph (MM7a). Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit freien Hill-Koeffizienten. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung hervorruft. **E_{min}:** Minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Freier Hill-Koeffizient. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

[#] ausreichende Anpassung mit einem Hill-Koeffizienten von eins (F-Test, $p > 0,05$)

In Bezug auf den pEC_{50} -Wert und den E_{max} -Wert zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Konzentrations-Effekt-Kurven (t-Test, $p > 0,05$). Allerdings wiesen die beiden Kurven unterschiedliche Hill-Koeffizienten auf. Während Iperoxo analog dem unter 3.1.4.3 gezeigten Befund einen signifikant niedrigeren Hill-Koeffizienten als eins besaß, führte die Zugabe äquimolarer Konzentrationen Seminaph zu einer Zunahme der Kurvensteilheit, so dass sich der Hill-Koeffizient nun nicht mehr signifikant von eins unterschied (F-Test, $p > 0,05$).

Der ausbleibende Effekt von Seminaph auf den pEC_{50} - und E_{max} -Wert überraschte nicht, da Seminaph in diesem Experiment in einer Konzentration von maximal $1 \mu\text{M}$ ($pK_A = 5,47 \pm 0,06$, vgl. 3.1.5.3) eingesetzt wurde. In Interaktionsexperimenten von Seminaph mit Iperoxo führte diese Konzentration nur zu einer marginalen Rechtsverschiebung der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve von 0,11 Dekaden (siehe 3.1.5.3). Daher ist es wahrscheinlich, dass der Befund bezüglich der Kurvensteilheit zufällig und nicht von biologischer Bedeutung ist.

3.1.7 Von Agonisten abgeleitete Hybridverbindungen

Die Agonist-Teilstruktur der Hybride leitet sich von Oxotremorin-M bzw. Derivaten des Oxotremorin-M ab. Bei diesen wurde der heterozyklische Rest des Oxotremorin-M durch einen Isoxazolidin-3-on-, Isoxazolyl-Ether- oder einen Isoxazolinyli-Ether-Rest (= Iperoxo) ersetzt. Diese Derivate des Oxotremorin-M erwiesen sich in funktionellen Experimenten wie die Muttersubstanz als potente, jedoch nicht selektive Agonisten an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (Dallanoce et al., 1999; Barocelli et al., 2000). Die allosterische Teilstruktur der Hybridverbindungen leitet sich entweder von dem M₂-subtypselektiven allosterischen Antagonisten W84 (Mohr et al., 2003) oder von Naphmethonium, einem hochaffinen Derivat des W84 (Muth et al., 2003), ab. In Folgendem sind die Effekte der Hybride auf die [³⁵S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen dargestellt. Anhand des Hybrids MMH5-6 wurde exemplarisch in Radioligandbindungsstudien an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins untersucht, wie sich die Affinitäten des Naphmethoniums zur freien und zur [³H]NMS-besetzten Bindungsstelle durch die Hybridformation verändert haben.

3.1.7.1 Hybride aus W84 und Oxotremorin-M-artigen Agonisten

3.1.7.1.1 DDT1-, DDT3-, und DDT4-induzierte [³⁵S]GTP_γS-Bindung

In Abbildung 26 sind die Konzentrations-Effekt-Kurven der Hybride DDT1, DDT3 und DDT4 im Vergleich zur Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt. Die Kenngrößen sind der Tabelle 20 zu entnehmen.

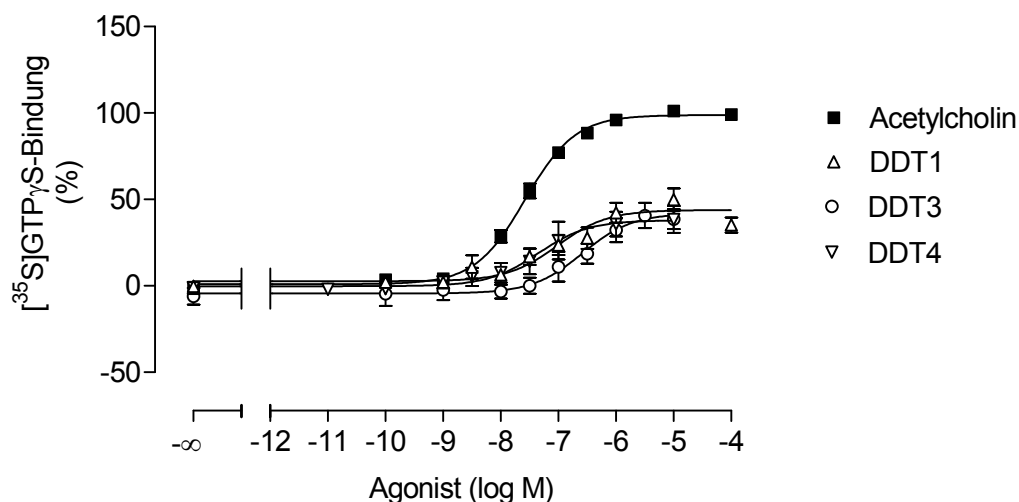


Abbildung 26: DDT1-, DDT3- und DDT4-induzierte [³⁵S]GTP_γS-Bindung im Vergleich zur Acetylcholin-induzierten [³⁵S]GTP_γS-Bindung. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP_γS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 3 - 7$ (Acetylcholin-Kontrolle, $n = 14$) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC₅₀	E_{min} (%)	E_{max} (%)	n_H (frei)	n
Acetylcholin	7,58 \pm 0,03	1 \pm 1	99 \pm 1	0,90 \pm 0,06	14
DDT1	7,02 \pm 0,18*	3 \pm 2	44 \pm 3*	0,74 \pm 0,26	7
DDT3	6,58 \pm 0,08*	-4 \pm 1	42 \pm 2*	0,95 \pm 0,16	4
DDT4	7,35 \pm 0,07*	0 \pm 1	38 \pm 1*	0,75 \pm 0,10	3

Tabelle 20: Kenngrößen \pm Standardfehler der in Abbildung 26 dargestellten gemittelten Hybrid- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP_γS-Bindung hervorruft. **E_{min}:** Minimale [³⁵S]GTP_γS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTP_γS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Freier Hill-Koeffizient. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

Alle Konzentrations-Effekt-Kurven konnten mit einem Hill-Koeffizienten von eins ausreichend beschrieben werden (F-Test, $p > 0,05$). Die Hybride unterschieden sich von Acetylcholin sowohl hinsichtlich des pEC_{50} -Wertes als auch des E_{max} -Wertes. Für beide Parameter führten die Hybride zu signifikant kleineren Werten als Acetylcholin. Demnach handelte es sich bei diesen Verbindungen um schwache Partialagonisten mit einer relativ geringen Wirksamkeit. In Organbadversuchen an Meerschweinchen-Herzvorhöfen verhielten sich die Hybride als reine Antagonisten (Disingrini et al., 2006). Die Ursache für diese abweichenden Befunde liegt möglicherweise in einer unterschiedlichen Sensitivität der beiden Testsysteme. Bekanntlich spielt bei funktionellen Experimenten die Rezeptordichte eine entscheidende Rolle. Wei und Sulakhe (1978) fanden an Meerschweinchen-Herzvorhöfen für den Radioliganden [3 H]3-Chinuclidinylbenzilat eine Anzahl an Bindungsstellen, die $170,7 \pm 1,9$ pmol/g Protein betrug, während für die in vorliegender Arbeit verwendeten CHO-M₂-Membransuspensionen mit [3 H]NMS ein B_{max} -Wert von 6069 ± 571 pmol/g Protein ermittelt wurde.

3.1.7.1.2 DDT5-induzierte [³⁵S]GTP_γS-Bindung

Der Agonist-Anteil des DDT5 leitet sich von Iperoxo ab, das sich sowohl in [³⁵S]GTP_γS-Bindungsexperimenten (siehe 3.1.4.3) als auch in Organbadversuchen (Dallanocce et al., 1999) als Vollagonist mit hoher Wirksamkeit erwiesen hatte. In Abbildung 27 ist die DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve im Vergleich zur Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt. Die Kenngrößen beider Kurven sind in Tabelle 21 wiedergegeben.

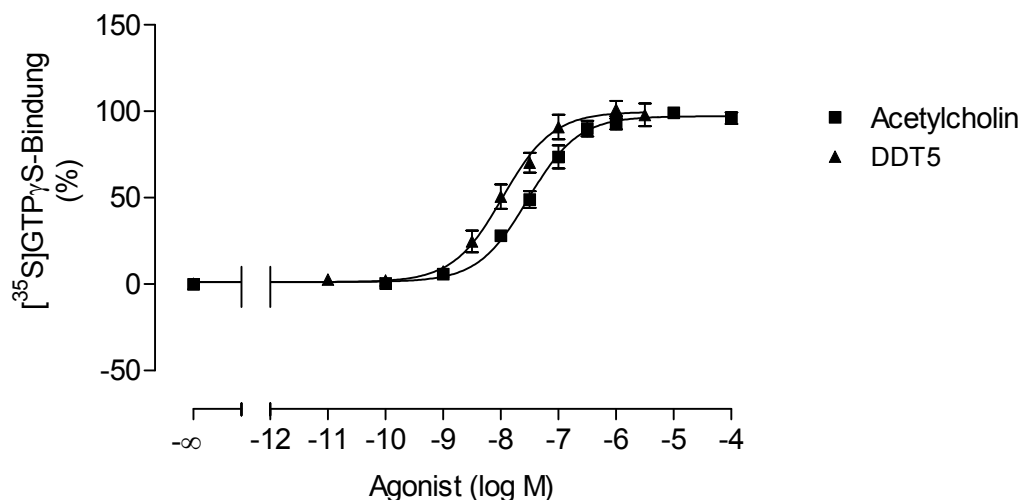


Abbildung 27: Vergleich von DDT5- und Acetylcholin-induzierter [³⁵S]GTP_γS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP_γS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameterlogistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus fünf voneinander unabhängigen Experimenten, die als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	E _{min} (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Acetylcholin	7,52 ± 0,03	1 ± 1	97 ± 1	0,91 ± 0,05	5
DDT5	7,96 ± 0,04*	1 ± 1	100 ± 2	0,95 ± 0,08	5

Tabelle 21: Kenngrößen ± Standardfehler der in Abbildung 27 dargestellten gemittelten DDT5- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 20.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

Beide Konzentrations-Effekt-Kurven konnten ausreichend mit einem Hill-Koeffizienten von eins beschrieben werden. DDT5 wies eine vollagonistische Aktivität auf. Mit einem pEC₅₀-Wert von 7,96 ± 0,04 besaß DDT5 eine um eine halbe Dekade signifikant höhere Wirksamkeit als Acetylcholin (t-Test, p < 0,05). Im Vergleich zur Muttersubstanz Iperoxo, deren pEC₅₀-Wert 9,40 ± 0,04 (n = 3) betrug, führte die Hybridformation zu einer signifikanten Abnahme der Wirksamkeit (t-Test, p < 0,05). In der Dissertationsschrift von

Schmalenbach (2005) ist für DDT5 ein in [^{35}S]GTP γ S-Bindungsexperimenten erhaltener pEC_{50} -Wert von $8,05 \pm 0,12$ ($n = 2$) beschrieben worden, der sich nicht signifikant von dem in dieser Arbeit gefundenen Wert unterscheidet. In Übereinstimmung mit vorliegendem Befund wird von Schmalenbach ebenfalls von einem vollagonistischen Effekt des DDT5 berichtet. Ebenso charakterisierten Disingrini et al. (2006) dieses Hybrid an Meerschweinchen-Herzvorhöfen als Vollagonisten.

3.1.7.1.3 DDT6-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung

Um zu überprüfen, welche Bedeutung das Vorhandensein eines zweiten quartären Stickstoffs sowie einer Alkyl-Zwischenkette auf den pEC_{50} - und den E_{max} -Wert des Hybrids DDT5 haben, wurde das Hybrid DDT6 untersucht. Dabei handelte es sich um ein stark verkürztes Derivat von DDT5. In Abbildung 28 ist die Konzentrations-Effekt-Kurve des DDT6 der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve gegenübergestellt. Die Kenngrößen sind der Tabelle 22 zu entnehmen. Um einen Vergleich mit der Muttersubstanz zu erlauben, wurde die bereits unter 3.1.7.1.2 dargestellte DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve als gestrichelte Linie eingefügt.

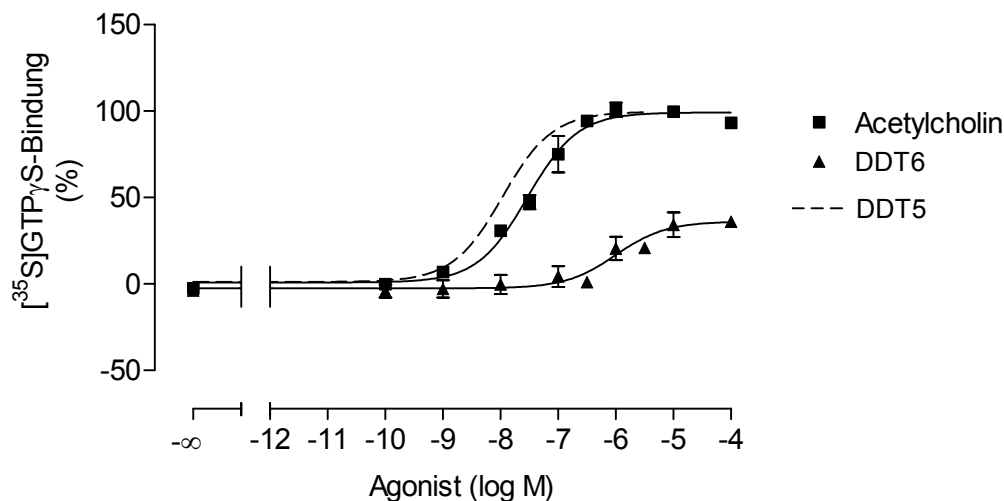


Abbildung 28: Vergleich von DDT6- und Acetylcholin-induzierter [^{35}S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M $_2$ -Zellen. Die gestrichelte Linie dient dem Vergleich mit der DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve aus 3.1.7.1.2. **Ordinate:** Prozentuale [^{35}S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC₅₀	E_{min} (%)	E_{max} (%)	n_H (frei)	n
Acetylcholin	7,53 ± 0,07	1 ± 3	99 ± 2	0,93 ± 0,15	3
DDT6	5,60 ± 0,16*	-3 ± 2	36 ± 3*	0,82 ± 0,3	3

Tabelle 22: Kenngrößen ± Standardfehler der in Abbildung 28 dargestellten gemittelten DDT6- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 20.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

Alle dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven konnten ausreichend mit einem Hill-Koeffizienten von eins beschrieben werden. Die Testsubstanz DDT6 unterschied sich hinsichtlich des pEC₅₀-Wertes sowie des E_{max}-Wertes signifikant von der Vergleichssubstanz Acetylcholin (t-Test, $p < 0,05$). Bei einem Vergleich mit der Muttersubstanz DDT5 führt das Fehlen des zweiten quartären Stickstoffs sowie der Hexyl-Zwischenkette, wie es beim DDT6 der Fall ist, zu einer statistisch signifikanten Rechtsverschiebung des Wendepunkts und einer Absenkung des Maximaleffekts der Konzentrations-Effekt-Kurve (t-Test, $p < 0,05$).

3.1.7.2 Hybride aus Naphmethonium und Oxotremorin-M-artigen Agonisten

3.1.7.2.1 MMH1-6-, MMH3-6- und MMH4-6-induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung

In Abbildung 29 sind die Konzentrations-Effekt-Kurven der Hybride MMH1-6, MMH3-6 und MMH4-6 im Vergleich zur Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt. Hierbei handelte es sich um Analoge zu den W84-Hybriden DDT1, DDT3 und DDT4. Die Kenngrößen sind der Tabelle 23 zu entnehmen.

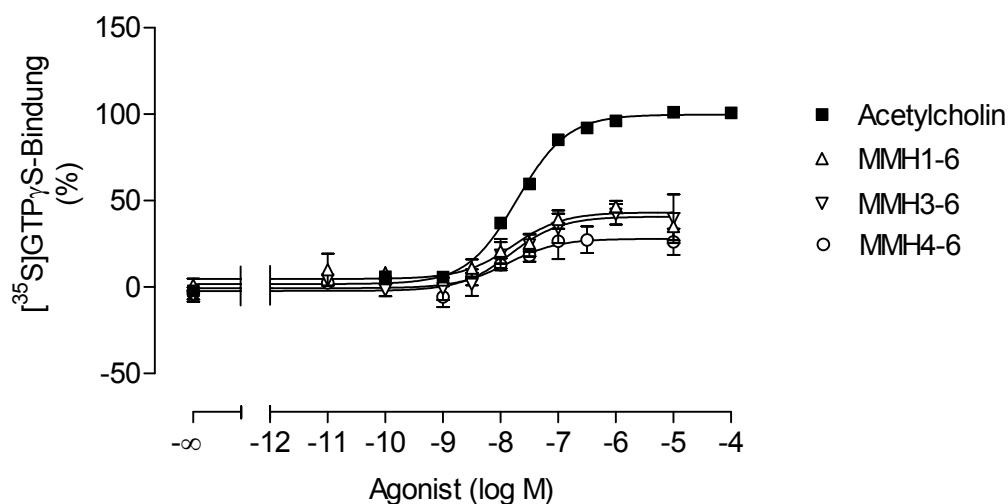


Abbildung 29: MMH1-6-, MMH3-6- und MMH4-6-induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung im Vergleich zur Acetylcholin-induzierten [³⁵S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 4 - 6$ (Acetylcholin-Kontrolle, $n = 14$) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	E _{min} (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Acetylcholin	7,71 \pm 0,04	2 \pm 2	100 \pm 1	0,92 \pm 0,09	14
MMH1-6	7,72 \pm 0,18	5 \pm 2	43 \pm 3*	1,03 \pm 0,42	4
MMH3-6	7,82 \pm 0,13	-2 \pm 2	41 \pm 2*	0,97 \pm 0,27	6
MMH4-6	7,88 \pm 0,22	-1 \pm 2	28 \pm 3*	1,27 \pm 0,62	4

Tabelle 23: Kenngrößen \pm Standardfehler der in Abbildung 29 dargestellten gemittelten MMH1-6-, MMH3-6-, MMH4-6- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 20.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

Alle Konzentrations-Effekt-Kurven konnten ausreichend mit einem Hill-Koeffizienten von eins beschrieben werden. Im Gegensatz zu den entsprechenden W84-Hybriden (siehe 3.1.7.1.1) unterschieden sich die Naphmethonium-Hybride nur in Bezug auf den Maximaleffekt (E_{\max}) statistisch signifikant von Acetylcholin (t-Test, $p < 0,05$). Bezüglich der Wendepunkte der Konzentrations-Effekt-Kurven konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zur Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve festgestellt werden. In allen Fällen wiesen die Hybride einen deutlich kleineren E_{\max} -Wert als Acetylcholin auf, was diese Verbindungen als Partialagonisten identifizierte. Wie schon bei den analogen Hybriden der W84-Reihe konnten Disingrini et al. (2006) auch bei diesen Verbindungen keine intrinsische Aktivität feststellen.

3.1.7.2.2 MMH5-6-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung

Entsprechend der Hybridverbindung DDT5 (3.1.7.1.2) leitet sich der Agonist-Anteil des MMH5-6 ebenfalls von Iperoxo ab. In Abbildung 30 ist die Konzentrations-Effekt-Kurve des MMH5-6 im Vergleich zur Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt. Die entsprechenden Kenngrößen sind der Tabelle 24 zu entnehmen.

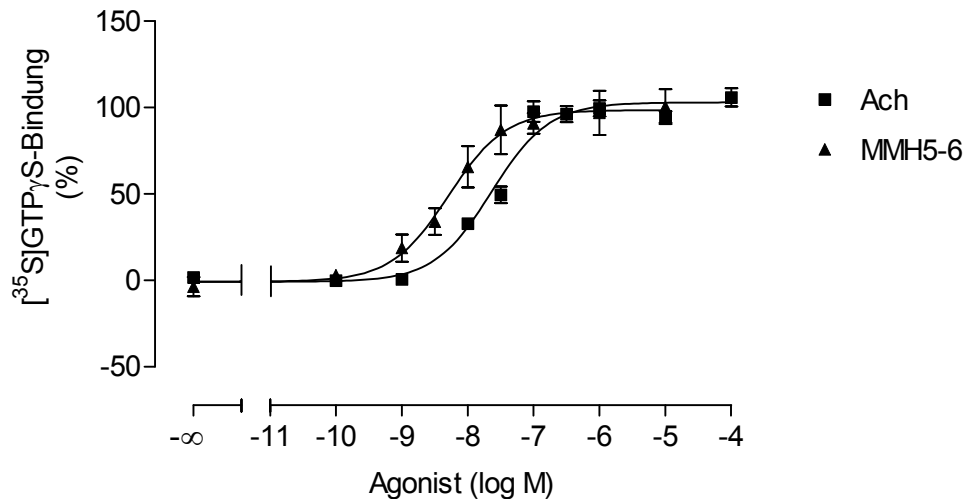


Abbildung 30: Vergleich von MMH5-6- und Acetylcholin-induzierter [35 S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [35 S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 5$ voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	pEC ₅₀	E _{min} (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Acetylcholin	7,64 ± 0,11	-1 ± 5	103 ± 4	1,25 ± 0,33	5
MMH5-6	8,29 ± 0,05*	-1 ± 2	99 ± 2	0,97 ± 0,10	5

Tabelle 24: Kenngrößen ± Standardfehler der in Abbildung 30 dargestellten gemittelten MMH5-6- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 20.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

Die Anpassung der beiden Konzentrations-Effekt-Kurven konnte jeweils mit einem Hill-Koeffizienten von eins erfolgen. Wie schon bei dem analogen W84-Hybrid DDT5 (3.1.7.1.2) blieb auch bei MMH5-6 der vollagonistische Effekt des Agonist-Anteils Iperoxo erhalten. Die Hybrid-Bildung führte auch hier mit einem pEC₅₀-Wert von 8,29 ± 0,05 zu einer signifikanten Abnahme der Wirksamkeit im Vergleich zu Iperoxo (t-Test, p < 0,05). Im hier dargestellten Vergleich mit der Referenzsubstanz Acetylcholin wies MMH5-6 einen signifikant größeren pEC₅₀-Wert auf (t-Test, p < 0,05). Der in vorliegender Arbeit gefundene pEC₅₀-Wert des MMH5-6 stimmt mit dem von Schmalenbach (2005) ebenfalls in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten erhobenen Wert überein. Von Disingrini et al. (2006) wurde MMH5-6 ebenfalls als Vollagonist identifiziert.

3.1.7.2.3 [³H]NMS-Bindungsexperiment: Affinität von MMH5-6 zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor

Um die Affinität der Hybridverbindung zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor mit der der Muttersubstanz Naphmethonium vergleichen zu können, wurde der Einfluss der beiden Substanzen auf die Dissoziationskinetik von [³H]NMS untersucht. Dazu wurden in Zweipunkt-kinetischen Untersuchungen Dissoziationskurven des Radioliganden [³H]NMS jeweils in An- und Abwesenheit der Testsubstanzen gemäß der unter 2.7.3.2 beschriebenen Methode aufgenommen. Abbildung 31 zeigt exemplarisch den Effekt unterschiedlicher Konzentrationen MMH5-6 auf den Verlauf der [³H]NMS-Dissoziationskurve.

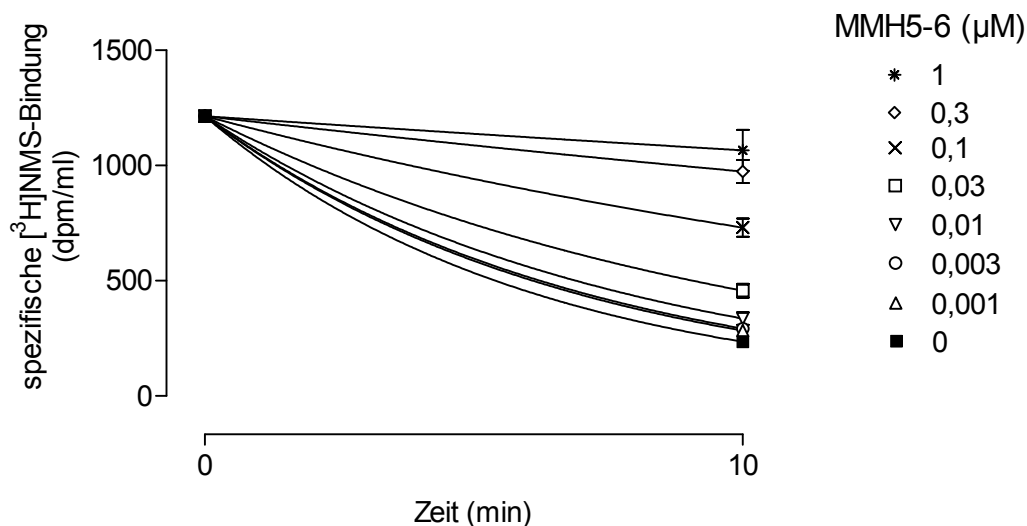


Abbildung 31: Repräsentatives Experiment zur Verzögerung der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation unter dem Einfluss steigender Konzentrationen von MMH5-6 an einer Membransuspension aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins. **Ordinate:** Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in dpm/ml. **Abszisse:** Zeit in min. **Kurvenanpassung:** Gleichung zur Beschreibung einer Reaktion erster Ordnung (Gl. 14). Die unspezifische Bindung wurde unter Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Atropin ermittelt. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus einer Dreifachbestimmung.

Die durchschnittliche Geschwindigkeitskonstante der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation (k_{-1}) unter Kontrollbedingungen betrug $0,17 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$ ($n = 8$), woraus sich eine Halbwertszeit der Dissoziation von $4,43 \pm 0,48 \text{ min}$ ($n = 8$) ergab. Die Geschwindigkeitskonstanten in Anwesenheit der Testsubstanzen, die in Prozent der Geschwindigkeitskonstanten der Kontrolle ausgedrückt wurden, sind in Abbildung 32 zu Konzentrations-Effekt-Kurven zusammengefasst worden.

Beide Konzentrations-Effekt-Kurven konnten ausreichend mit einem Hill-Koeffizienten von eins beschrieben werden (F-Test, $p > 0,05$). Die oberen Plateaus unterschieden sich in beiden Fällen nicht signifikant von 100 % (F-Test, $p > 0,05$), was ein Konstantsetzen auf diesen Wert zuließ. Sowohl die Muttersubstanz Naphmethonium als auch das Hybrid MMH5-6 vermochten in hohen Konzentrationen die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation komplett zu unterbinden (unteres Plateau nicht signifikant verschieden von 0 %; F-Test, $p > 0,05$).

Der $\text{pEC}_{50\text{Diss}}$ -Wert des MMH5-6 war signifikant kleiner als der des Naphmethoniums (t-Test, $p < 0,05$). Somit besitzt MMH5-6 eine geringere Affinität zum $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptor als die Muttersubstanz Naphmethonium.

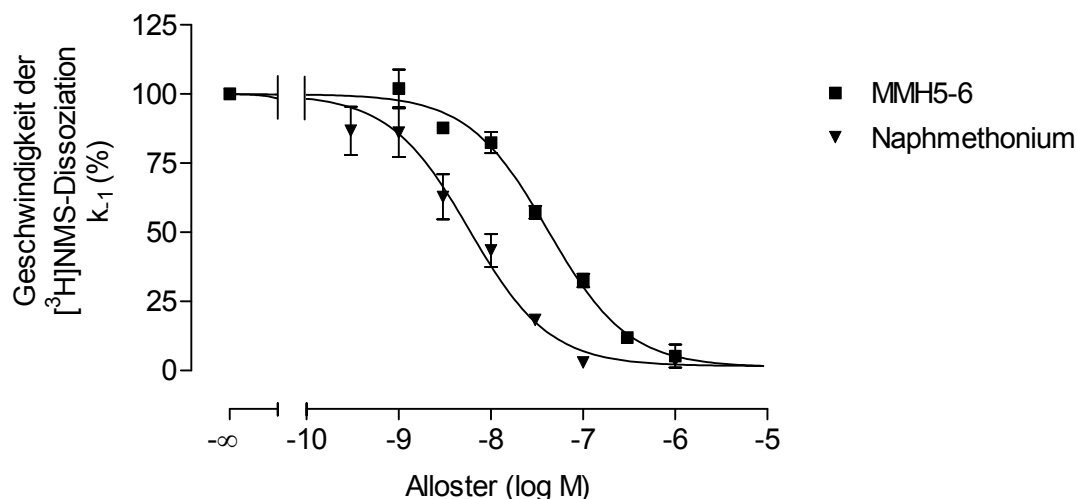


Abbildung 32: Konzentrations-Effekt-Kurve der MMH5-6- und Naphmethonium-induzierten Verzögerung der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation von Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins. **Ordinate:** Apparente Geschwindigkeitskonstanten der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation in Prozent der Kontrolle. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Alloster-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 3 - 4$ voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC_{50Diss}	$E_{min} (\%)$	n_H (frei)	n
MMH5-6	$7,38 \pm 0,06$	1 ± 3^{ns}	$-0,95 \pm 0,12$	3
Naphmethonium	$8,23 \pm 0,09$	2 ± 4^{ns}	$-0,86 \pm 0,14$	4

Tabelle 25: Kenngrößen der MMH5-6- und Naphmethonium-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 32. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC_{50} :** Konzentration, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation führt. **E_{min} :** Unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve. **n_H :** Freier Hill-Koeffizient. **n :** Anzahl der Versuche. ^{ns} nicht signifikant verschieden von 0 (F-Test, $p > 0,05$).

3.1.7.2.4 $[^3\text{H}]$ NMS-Bindungsexperiment: Affinität von MMH5-6 zum freien Rezeptor

In Gleichgewichtsbindungsexperimenten, die gemäß der unter 2.7.2.2.1 beschriebenen Methode durchgeführt wurden, wurden die Affinitäten von MMH5-6 und der Muttersubstanz Naphmethonium zum freien Rezeptor untersucht. Da beide Substanzen zu einer Verzögerung der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation führten, errechneten sich die benötigten Inkubationszeiten bis zur Gleichgewichtseinstellung gemäß der Gleichung von Lazareno und Birdsall (Gl.11). Die Versuchsansätze beider Substanzen wurden sechs Stunden inkubiert. In Abbildung 33 sind die mit Hilfe des ternären Komplex-Modells nach Ehlert (Gl. 10) an die Datenpunkte angepassten Inhibitionskurven dargestellt.

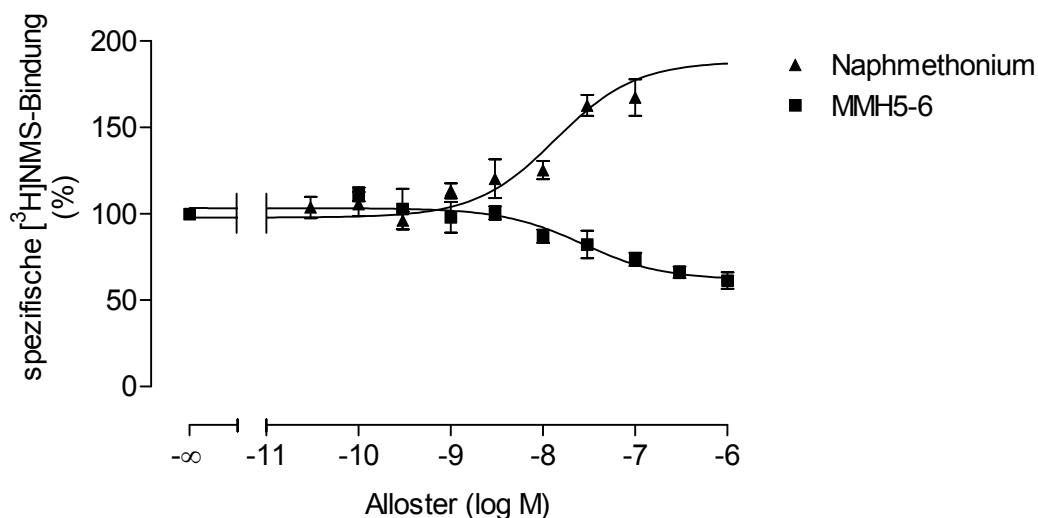


Abbildung 33: Effekte von MMH5-6 und Naphmethonium auf die Gleichgewichtsbindung des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (0,2 nM) an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins. **Ordinate:** Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Abwesenheit des Allosters. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Alloster-Konzentration. **Kurvenanpassung:** Gleichung zur Beschreibung des ternären Komplex-Modells nach Ehlert (Gl. 10). **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

	pK_A	$\text{p}\alpha$	$\text{p}(\alpha \cdot \text{K}_A)$	n
MMH5-6	$7,63 \pm 0,14$	$-0,28 \pm 0,04$	$7,34 \pm 0,11$	3
Naphmethonium	$7,73 \pm 0,02$	$0,37 \pm 0,04$	$8,09 \pm 0,03$	3

Tabelle 26: Kenngrößen der in Abbildung 33 dargestellten Gleichgewichtsbindungsexperimente von MMH5-6 und Naphmethonium. pK_A : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Allosters. $\text{p}\alpha$: Kooperativitätsfaktor. **n**: Anzahl der Versuche.

MMH5-6 führte zu einer Inhibition der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung, die auch bei hohen MMH5-6-Konzentrationen unvollständig war. Diese submaximale Inhibition äußerte sich bei einer Auswertung mit Hilfe der Gleichung nach Ehlert in einem Kooperativitätsfaktor von $\text{p}\alpha = -0,28 \pm 0,04$. Wie der schwach negative Kooperativitätsfaktor andeutet, war mit einem pK_A -Wert von $7,63 \pm 0,14$ die Affinität zum freien Rezeptor nur geringfügig größer als zum $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptor (vgl. 3.1.7.2.3). Dieser numerische Unterschied war statistisch allerdings nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$). Während die Hybridbildung zu einer negativen Kooperativität mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ führte, konnte in vorliegender Arbeit für die Muttersubstanz Naphmethonium, die bereits schon in der Literatur (Muth et al., 2003) dokumentierte positive Kooperativität gezeigt werden. Diese mit $\text{p}\alpha = 0,37 \pm 0,04$ gefundene positive Kooperativität äußerte sich in einer aufstrebenden Kurve. Wie erwartet war die Affinität von Naphmethonium zum freien Rezeptor mit einem pK_A -Wert von $7,73 \pm 0,02$ signifikant kleiner als die mit einem pEC_{50} -Wert von $8,23 \pm 0,09$ gefundene

Affinität zum [^3H]NMS-besetzten Rezeptor. Zwischen den pK_A -Werten von MMH5-6 und Naphmethonium bestand kein signifikanter Unterschied (t-Test, $p > 0,05$). Die $\text{p}(\alpha \cdot \text{K}_A)$ -Werte für MMH5-6 und Naphmethonium wurden mit $7,34 \pm 0,11$ und $8,09 \pm 0,03$ berechnet und unterschieden sich damit nicht signifikant von den in den Dissoziations-experimenten gefundenen pEC_{50} -Werten (t-Test, $p > 0,05$).

3.1.7.2.5 MMH6-0- und MMH5-4-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung

Analog der unter 3.1.7.1.3 beschriebenen Experimente wurde untersucht, wie sich eine Verkürzung des Hybrids MMH5-6 um einen quartären Stickstoff und die Alkyl-Zwischenkette zum MMH6-0 auf die G-Protein-Aktivierung auswirken würde. Außerdem wurde mit dem Hybrid MMH5-4 ein Hybrid getestet, dessen Alkyl-Zwischenkette im Vergleich zu der des MMH5-6 um zwei Methylen-Gruppen verkürzt war. In Abbildung 34 sind die Konzentrations-Effekt-Kurven von MMH6-0 und MMH5-4 der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve gegenübergestellt. Die Kenngrößen sind der Tabelle 27 zu entnehmen. Um einen Vergleich mit der Muttersubstanz zu erlauben, wurde die bereits unter 3.1.7.2.2 dargestellte MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve als gestrichelte Linie eingefügt.

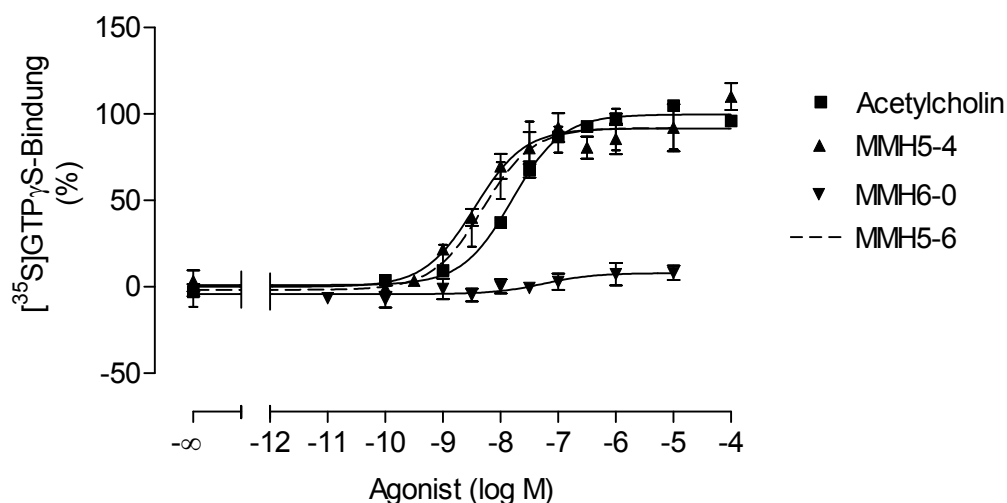


Abbildung 34: Vergleich von MMH5-4-, MMH6-0- und Acetylcholin-induzierter [^{35}S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M $_2$ -Zellen. Die gestrichelte Linie zeigt die bereits in Abbildung 30 dargestellte MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Prozentuale [^{35}S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 2 - 4$ (Acetylcholin-Kontrolle, $n = 6$) voneinander unabhängigen Experimenten, die als Vierfachbestimmungen durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	E _{min} (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Acetylcholin	7,80 ± 0,05	1 ± 2	100 ± 2	0,96 ± 0,12	6
MMH6-0	7,24 ± 0,31	-4 ± 1	8 ± 2*	0,61 ± 0,41	2
MMH5-4	8,45 ± 0,12*	0 ± 4	92 ± 3*	1,06 ± 0,25	4

Tabelle 27: Kenngrößen ± Standardfehler der in Abbildung 34 dargestellten gemittelten MMH5-4-, MMH6-0- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 20.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

Alle Konzentrations-Effekt-Kurven konnten mit einem Hill-Koeffizienten von eins ausreichend beschrieben werden. Der Wendepunkt der MMH6-0-Konzentrations-Effekt-Kurve unterschied sich zwar nicht signifikant von dem der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve (t-Test, $p > 0,05$), allerdings wies diese Substanz nur einen geringen Maximaleffekt (E_{max}) auf. Bei einem Vergleich mit der Muttersubstanz MMH5-6 führte das Fehlen des zweiten quartären Stickstoffs und der Alkyl-Zwischenkette demnach zu einem starken Verlust der Fähigkeit, den Rezeptor zu aktivieren. Die MMH5-4-Konzentrations-Effekt-Kurve wies einen im Vergleich zu Acetylcholin signifikant größeren pEC₅₀-Wert auf (t-Test, $p < 0,05$). Der Unterschied zu dem pEC₅₀-Wert des MMH5-6 (vgl. 3.1.7.2.2) war statistisch nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$). Der E_{max} -Wert war mit 92 ± 3 zwar signifikant verschieden von dem des Acetylcholins (t-Test, $p < 0,05$), bei einem Vergleich mit MMH5-6 ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied.

3.1.8 Einfluss allosterischer Antagonisten auf die Hybrid-induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung

In Interaktions-Experimenten sollte der Einfluss allosterischer Antagonisten auf die Hybrid-induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung getestet werden. Dabei wurden aus dem Bereich der Hybride sowohl vollagonistische (DDT5 und MMH5-6) als auch partialagonistische (DDT1 und MMH1-6) Verbindungen eingesetzt. Als allosterische Antagonisten wurden entweder W84 oder Naphmethonium verwendet, je nachdem von welchem Alloster sich die zu untersuchende Hybridverbindung ableitete.

Unter der Voraussetzung, dass die allosterischen Anteile der Hybride die gleiche Bindungstopologie aufweisen wie der strukturgebende allosterische Modulator, war davon auszugehen, dass der allosterische Modulator den Hybrid-Effekt kompetitiv antagonisieren würde. Diese Hypothese wurde dadurch gestützt, dass in Mutagenese-Studien eine Abhängigkeit der Bindung der Hybride DDT5 und MMH5-6 von den Epitopen M₂¹⁷⁷Tyr, M₂⁴²²Trp und M₂⁴²³Thr gezeigt werden konnte (Antony, mündliche Mitteilung). Dabei handelt es sich um Epitope der allosterischen Bindungsstelle, die für die M₂/M₅-Subtypselektivität (Voigtländer et al., 2003) sowie im Falle der konservierten Aminosäure M₂⁴²²Trp für eine Basisaffinität (Prilla et al., 2006) der allosterischen Antagonisten W84 und Naphmethonium verantwortlich sind.

Alternativ zu dieser Hypothese ist auch ein kooperativer Antagonismus denkbar, indem das Hybrid zwar mit seinem Alloster-Anteil die allosterische Bindungsstelle besetzt, aber noch ausreichend Raum in der allosterischen Bindungstasche lässt, in dem sich das reine Alloster zumindest teilweise anlagern kann. In einem solchen Fall käme es zur Bildung ternärer Komplexe aus Hybrid, Alloster und Rezeptor. Dass eine gleichzeitige Besetzung der allosterischen Bindungsstelle durch zwei Moleküle desselben allosterischen Modulators möglich ist, konnten Tränkle et al. (2005) für den atypischen Modulator Tacrin belegen.

Falls das allosterische Haftareal tatsächlich gleichzeitig durch den Alloster-Anteil des Hybrids und einen allosterischen Modulator besetzt werden könnte, müsste dies bei einem strukturell kleineren Alloster leichter der Fall sein. Daher wurde zusätzlich die Interaktion von MMH5-6 mit dem Naphmethonium-Fragment Seminaph untersucht.

3.1.8.1 Interaktion von W84 mit DDT1

In Abbildung 35 ist der Einfluss steigender Konzentrationen W84 auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von DDT1 dargestellt. Die entsprechenden Kenngrößen sind der Tabelle 28 zu entnehmen.

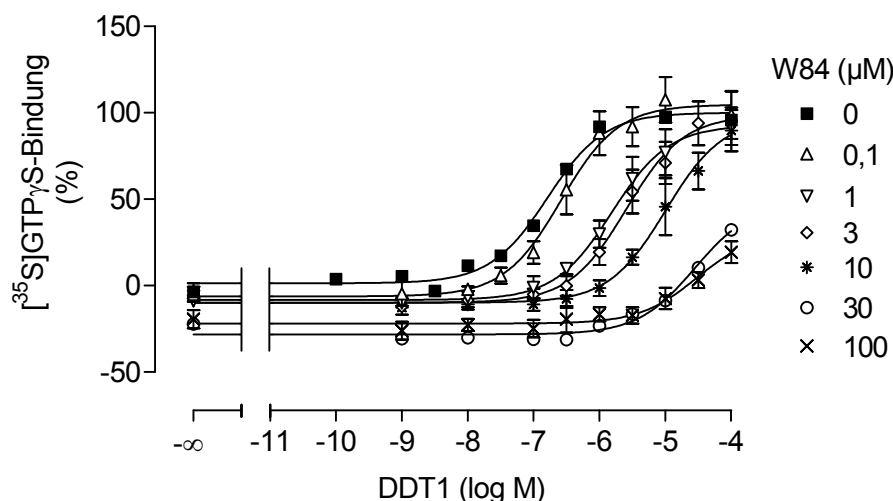


Abbildung 35: Einfluss von W84 auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von DDT1 an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der DDT1-Kontrollkurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der DDT1-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2 – 4 (Kontrollkurve: n = 19) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	Kontrolle	W84 0,1 µM	W84 1 µM	W84 3 µM	W84 10 µM	W84 30 µM	W84 100 µM
pEC₅₀	6,79 ± 0,07	6,59 ± 0,07	5,82* ± 0,03	5,59* ± 0,05	4,99* ± 0,07	4,53* ± 0,05	4,52* ± 0,15
E_{min} (%)	1 ± 2	-6 ± 3	-8 ± 1	-10 ± 2	-10 ± 2	-16* ± 1	-2* ± 1
E_{max} (%)	100 ± 3	105 ± 3	93 ± 2	99 ± 3	97 ± 5	70* ± 39	31* ± 7
n_H (frei)	1,14 ± 0,16	1,26 ± 0,17	0,96 ± 0,06	1,02 ± 0,12	0,95 ± 0,16	0,77# ± 0,06	0,61 ± 0,25
n	19	3	2	3	3	4	4

Tabelle 28: Kenngrößen ± Standardfehler der in Abbildung 35 dargestellten gemittelten DDT1-Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen sowie unter dem Einfluss von W84. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **E_{min}:** Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Freier Hill-Koeffizient. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Kontrollkurve (t-Test, p < 0,05)

signifikant bessere Anpassung mit freiem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05)

W84 führte zu einer konzentrationsabhängigen Rechtsverschiebung der DDT1-Konzentrations-Effekt-Kurve. Nicht alle der dargestellten Kurven erreichten ein oberes Plateau. Dazu gehörten die Kurven unter dem Einfluss von 30 μM und 100 μM W84. Diese Kurven wurden deshalb nicht in die weitere Auswertung einbezogen. Die Möglichkeit des Erreichens eines oberen Plateaus durch den Einsatz noch höherer DDT1-Konzentrationen war nicht gegeben, da hier einerseits mit unspezifischer Membranbindung zu rechnen gewesen wäre und andererseits die benötigten DDT1-Einwaagen nicht zur Verfügung standen. Alle Kurven, die bei einer niedrigeren W84-Konzentration als 30 μM generiert wurden, konnten ausreichend mit einem Hill-Koeffizienten von eins beschrieben werden (F-Test, $p > 0,05$). W84 führte hier zu keiner signifikanten Beeinflussung des unteren und oberen Plateaus (t-Test, $p > 0,05$).

In Abbildung 36 wurden die Verschiebefaktoren gegen die logarithmischen Konzentrationen des W84 aufgetragen. Die offenen Quadrate symbolisieren die bei der Auswertung nicht berücksichtigten Verschiebefaktoren bei 30 μM bzw. 100 μM W84. Im für die Auswertung relevanten Konzentrationsbereich des W84 strebten die Verschiebefaktoren keinem Maximalwert entgegen. Ein F-Test ergab daher, dass die lineare Regression nach Arunlakshana und Schild (Gl. 18) die Datenpunkte ausreichend beschrieb und einer nichtlinearen Regression mit der Gleichung von Lanzafame et al. (Gl. 20) nicht unterlegen war.

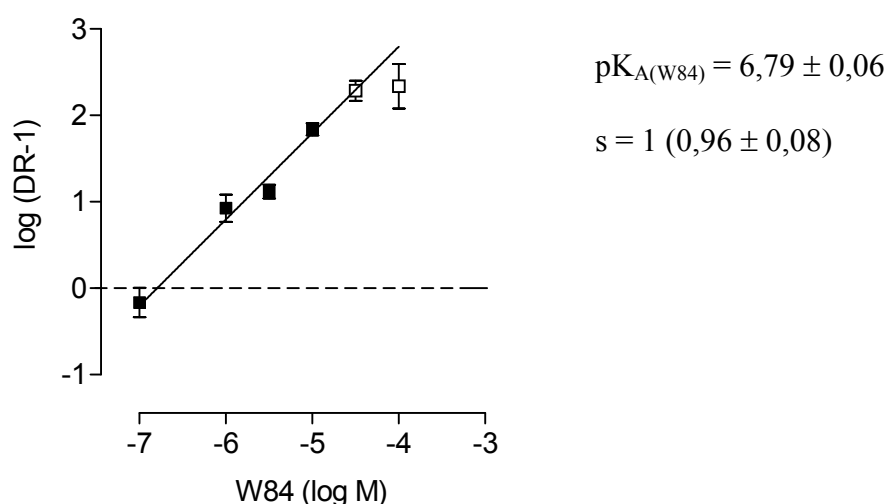


Abbildung 36: W84-induzierte Rechtsverschiebung der DDT1-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktor (dose ratio, DR) und eins. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der W84-Konzentration. Die offenen Quadrate stellen die durch 30 μM bzw. 100 μM W84 verursachten Rechtsverschiebungen dar, welche nicht in die Auswertung einbezogen wurden.

Die Steigung der Geraden wich mit $s = 0,96 \pm 0,08$ nicht signifikant von eins ab (F-Test, $p > 0,05$), sodass hier ein kompetitiver Mechanismus angenommen werden konnte. Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse konnte ein pK_A -Wert für W84 bestimmt werden. Dieser betrug $6,79 \pm 0,06$ und stimmt damit, wie bereits unter 3.1.5.1 diskutiert, gut mit den restlichen in dieser Arbeit für W84 gefundenen pK_A -Werten überein.

3.1.8.2 Interaktion von W84 mit DDT5

Abbildung 37 zeigt den Einfluss steigender Konzentrationen W84 auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von DDT5. Die daraus sich ergebenden Kenngrößen sind der Tabelle 29 zu entnehmen.

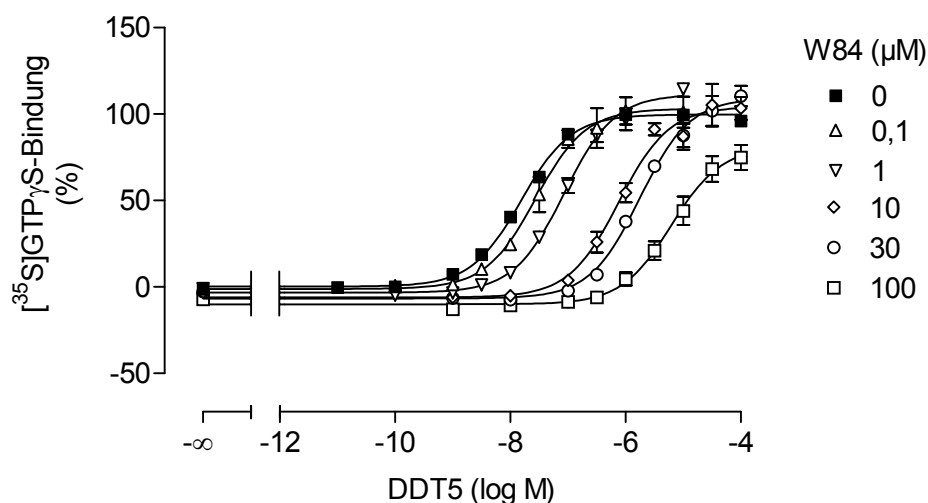


Abbildung 37: Einfluss von W84 auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von DDT5 an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP_γS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der DDT5-Kontrollkurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der DDT5-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 3$ (Kontrollkurve: $n = 15$) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	W84 0,1 μ M	W84 1 μ M	W84 10 μ M	W84 30 μ M	W84 100 μ M
pEC₅₀	7,81 \pm 0,03	7,56 \pm 0,04*	7,07 \pm 0,04*	6,12 \pm 0,08*	5,75 \pm 0,05*	5,21 \pm 0,04*
E_{min} (%)	0 \pm 1	-1 \pm 1	-3 \pm 1	-6 \pm 3*	-7 \pm 2*	-10 \pm 1*
E_{max} (%)	100 \pm 1	103 \pm 2	111 \pm 2*	104 \pm 3	109 \pm 2*	81 \pm 2*
n_H (frei)	0,94 \pm 0,06	1,12 \pm 0,09	0,92 \pm 0,08	1,13 \pm 0,19	1,02 \pm 0,11	0,95 \pm 0,10
n	15	3	3	3	3	3

Tabelle 29: Kenngrößen \pm Standardfehler der in Abbildung 37 dargestellten, gemittelten DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen sowie unter dem Einfluss von W84. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 28.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Kontrollkurve (t-Test, $p < 0,05$)

W84 führte zu einer konzentrationsabhängigen Rechtsverschiebung der DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve. Alle Kurven konnten ausreichend mit einem Hill-Koeffizienten von eins beschrieben werden (F-Test, $p > 0,05$). Ab einer Konzentration von 30 μ M verursachte W84 eine signifikante Senkung des unteren Plateaus der DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve. Eine Verminderung der basalen [³⁵S]GTP γ S-Bindung durch W84 wurde bereits in der Literatur beschrieben. Hilf und Jakobs (1992) fanden an Membransuspensionen aus kardialem Atriumgewebe des Hausschweins einen halbmaximalen Effekt bereits bei 0,3 μ M W84. Bei W84-Konzentrationen von 1 μ M und 30 μ M wurde eine signifikante Erhöhung des oberen Plateaus beobachtet (Tabelle 29). Ein konzentrationsabhängiger Effekt war allerdings unwahrscheinlich, da die dazwischenliegende W84-Konzentration von 10 μ M das obere Plateau unbeeinflusst ließ. Darüber hinaus kam es bei 100 μ M zu einer signifikanten Senkung des oberen Plateaus (t-Test, $p < 0,05$).

Zur Quantifizierung der W84-induzierten Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve von DDT5 wurden die errechneten Verschiebefaktoren gegen die logarithmische Konzentration von W84 aufgetragen (Abbildung 38). Im untersuchten Konzentrationsbereich strebten die Verschiebefaktoren ganz offensichtlich keinem Maximalwert entgegen. Daher war die lineare Regression nach Arunlakshana und Schild (Gl. 18) einer nichtlinearen Regression nach Lanzafame et al. (Gl. 20) vorzuziehen. Die Steigung der Regressionsgeraden wich mit $s = 0,92 \pm 0,05$ nicht signifikant von eins ab (F-Test, $p > 0,05$). Demnach war W84 auch hier offenbar in der Lage, das Hybrid kompetitiv aus seiner Rezeptorbindung zu verdrängen. In guter Übereinstimmung mit anderen Interaktionsexperimenten (3.1.5.1 und 3.1.8.1), in denen W84 als allosterischer Antagonist eingesetzt wurde, wurde hier für W84 ein pK_A -Wert von $6,68 \pm 0,06$ ermittelt.

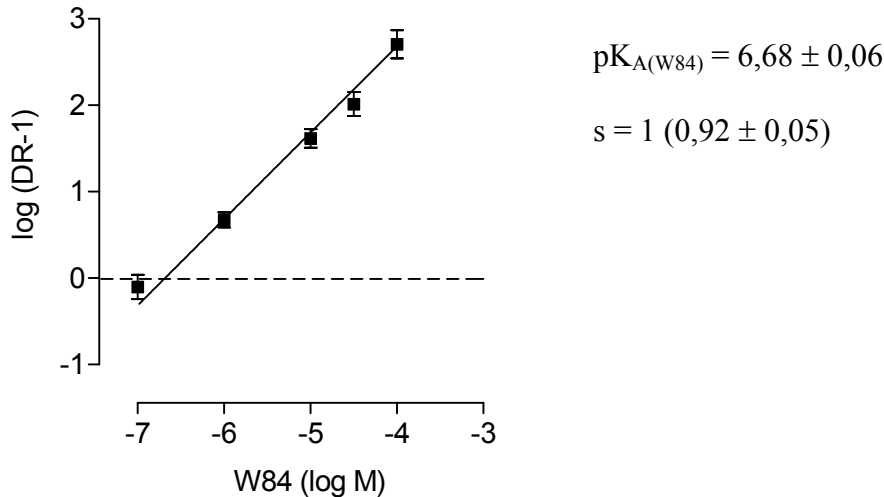


Abbildung 38: W84-induzierte Rechtsverschiebung der DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktor (dose ratio, DR) und eins. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der W84-Konzentration.

3.1.8.3 Interaktion von Naphmethonium mit MMH1-6

Abbildung 39 zeigt den Einfluss steigender Konzentrationen von Naphmethonium auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von MMH1-6. Die entsprechenden Kenngrößen sind der Tabelle 30 zu entnehmen.

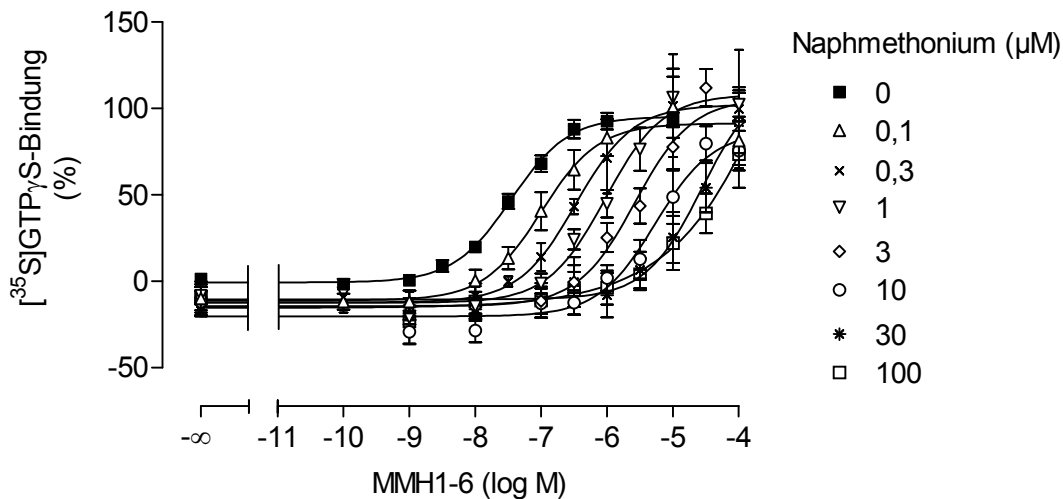


Abbildung 39: Einfluss von Naphmethonium auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von MMH1-6 an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP_γS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der MMH1-6-Kontrollkurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der MMH1-6-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_{\text{H}} = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 2 - 4$ (Kontrollkurve: $n = 24$) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Ergebnisse

	Kontrolle	Naphm. 0,1 μ M	Naphm. 0,3 μ M	Naphm. 1 μ M
pEC₅₀	7,46 \pm 0,03	7,00 \pm 0,09*	6,47 \pm 0,04*	6,03 \pm 0,09*
E_{min} (%)	-1 \pm 1	-11 \pm 3*	-12 \pm 1*	-12 \pm 3*
E_{max} (%)	95 \pm 1 ⁺	91 \pm 4	102 \pm 2	108 \pm 5*
n_H (frei)	1,01 \pm 0,07	0,99 \pm 0,18	0,94 \pm 0,08	0,98 \pm 0,20
n	24	4	2	4
	Naphm. 3 μ M	Naphm. 10 μ M	Naphm. 30 μ M	Naphm. 100 μ M
pEC₅₀	5,58 \pm 0,12*	5,27 \pm 0,14*	4,55 \pm 0,100*	4,62 \pm 0,16*
E_{min} (%)	-14 \pm 4*	-20 \pm 4*	-10 \pm 2*	-11 \pm 3*
E_{max} (%)	106 \pm 7	87 \pm 8	118 \pm 11	90 \pm 13
n_H (frei)	0,96 \pm 0,27	0,99 \pm 0,32	0,67 \pm 0,17	0,45 \pm 0,17 [#]
n	3	4	3	4

Tabelle 30: Kenngrößen \pm Standardfehler der in Abbildung 39 dargestellten gemittelten MMH1-6-Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen sowie unter dem Einfluss von Naphmethonium. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 28.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Kontrollkurve (t-Test, $p < 0,05$)

+ signifikanter Unterschied zu 100 % (t-Test, $p < 0,05$)

signifikant bessere Anpassung mit freiem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$)

Naphmethonium verursachte eine konzentrationsabhängige Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve von MMH1-6. Die Kurven, die bei Naphmethonium-Konzentrationen von 30 μ M bzw. 100 μ M erhalten wurden, erreichten kein oberes Plateau und wurden deshalb nicht in die weiteren Betrachtungen einbezogen. Die Kontrollkurve sowie alle Kurven, die unter Zugabe von Naphmethonium bis einschließlich einer Konzentration von 10 μ M erhalten wurden, konnten ausreichend mit einem Hill-Koeffizienten von eins beschrieben werden (F-Test, $p > 0,05$). Naphmethonium verursachte in allen Konzentrationen eine signifikante Senkung des unteren Plateaus (t-Test, $p < 0,05$). Eine quantitative Betrachtung dieses Phänomens war nicht möglich, da für das nur sehr kleine Messfenster von maximal 20 % die Streuung der unteren Plateaus sehr groß war.

Da es sich bei dem Hybrid MMH1-6 um einen partiellen Agonisten handelte (vgl. 3.1.7.2.1), war das Messfenster der Agonist-vermittelten [³⁵S]GTP γ S-Bindung sehr klein, wodurch sich die Streuung des Testsystems deutlich bemerkbar machte. Von dem oberen Plateau der Kontrollkurve wäre zu erwarten, dass es 100 % beträgt, da es bei der Normalisierung als Maßstab angenommen wird. In dem vorliegenden Fall wich das obere

Plateau der Kontrolle mit 95 ± 1 allerdings signifikant von eins ab (t-Test, $p < 0,05$). Dabei handelt es sich um ein durch die Auswertung bedingtes Artefakt. Bei der Zusammenfassung der Einzelerperimente werden die einzelnen, bereits normalisierten Datenpunkte gemittelt, wobei an diese Mittelwertdaten erneut eine Kurve angepasst wird. Je nach Lage der Datenpunkte kann es passieren, dass das obere Plateau nun nicht mehr bei 100 % liegt. Da dies definitionsgemäß nicht sein kann, wurden in vorliegendem Fall die oberen Plateaus der MMH1-6-Konzentrations-Effekt-Kurven unter dem Einfluss verschiedener Konzentrationen Naphmethonium mit dem 100 %-Niveau verglichen. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (t-Test, $p > 0,05$).

Die in Abbildung 40 dargestellte Analyse der Verschiebefaktoren erfolgte unter Auslassung der mit $30 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ Naphmethonium erhaltenen Verschiebefaktoren (offene Quadrate; oberes Kurvenplateau unbestimmt). Da die Verschiebefaktoren im Bereich der untersuchten W84-Konzentrationen keinem Maximalwert zustrebten, erfolgte eine lineare Regression der Datenpunkte gemäß der Gleichung nach Arunlakshana und Schild (Gl. 18).

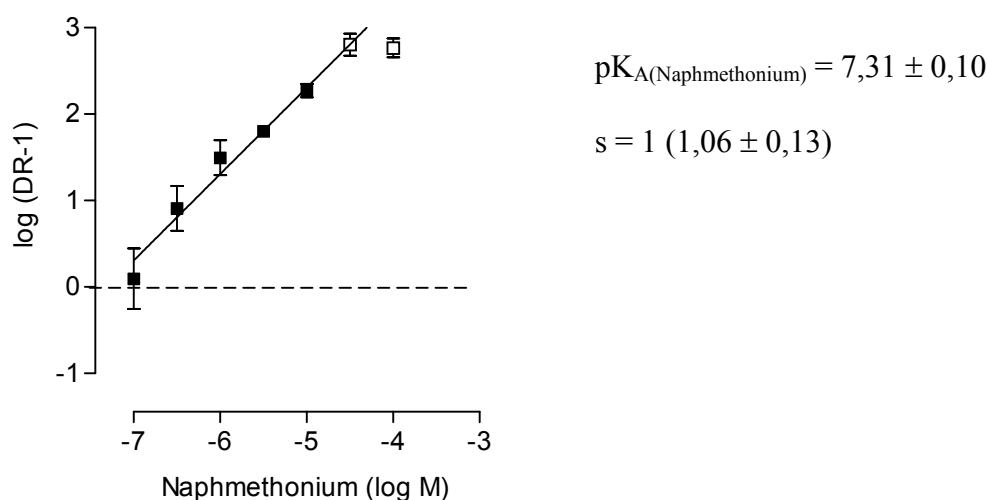


Abbildung 40: Naphmethonium-induzierte Rechtsverschiebung der MMH1-6-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktor (dose ratio, DR) und eins. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Naphmethonium-Konzentration. Die offenen Quadrate stellen die durch $30 \mu\text{M}$ bzw. $100 \mu\text{M}$ Naphmethonium verursachten Rechtsverschiebungen dar, die nicht in die Auswertung einbezogen wurden.

Die Regressionsgerade konnte ausreichend mit einer Steigung von eins beschrieben werden (F-Test, $p > 0,05$), wobei für die freie Steigung ein Wert von $s = 1,06 \pm 0,13$ gefunden wurde. Demnach war für den untersuchten Konzentrationsbereich von einem kompetitiven Mechanismus auszugehen. Der für Naphmethonium aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ermittelte pK_A -Wert betrug $7,31 \pm 0,10$ und unterschied sich

nicht signifikant von dem Wert, der aus der Interaktion mit Iperoxo resultierte (siehe 3.1.5.2; t-Test, $p > 0,05$).

3.1.8.4 Interaktion von Naphmethonium mit MMH5-6

In Abbildung 41 ist der Einfluss steigender Konzentrationen Naphmethonium auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von MMH5-6 dargestellt. Die entsprechenden Kenngrößen sind der Tabelle 31 zu entnehmen.

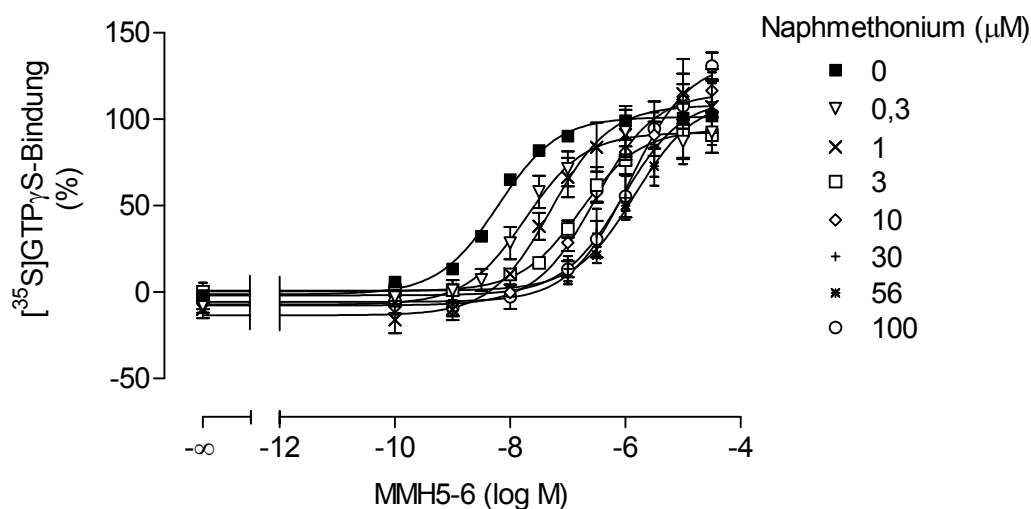


Abbildung 41: Einfluss von Naphmethonium auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von MMH5-6 an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP_γS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der MMH5-6-Kontrollkurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der MMH5-6-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 0,84$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 3 - 5$ (Kontrollkurve: $n = 29$) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Der Wendepunkt der MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve wurde in Abhängigkeit von der Naphmethonium-Konzentration nach rechts verschoben. Alle Kurven erreichten ein oberes Plateau. Der F-Test nach Lew und Angus (1995) ergab, dass die Kurvenschar nicht ausreichend durch einen konstanten Hill-Koeffizienten von eins beschrieben wurde. Daher wurden alle individuellen Hill-Koeffizienten gemittelt. Es resultierte ein Wert von $n_H = 0,84$, wobei ein erneuter F-Test ergab, dass dieser Mittelwert genügte, die komplette Kurvenschar zu beschreiben. Naphmethonium führte in vorliegenden Experimenten zu keiner signifikanten Beeinflussung des unteren Plateaus (t-Test, $p > 0,05$). Bei Zugabe von 0,3 μ M Naphmethonium kam es zu einer signifikanten Senkung des oberen Plateaus der MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve. Konzentrationen von 10 μ M und 100 μ M Naphmethonium erhöhten hingegen das obere Plateau. Eine mögliche Konzentrations-abhängigkeit dieses Effekts wurde bereits in Abschnitt 3.1.5.2 angesprochen.

	Kontrolle	Naphm. 0,3 μM	Naphm. 1 μM	Naphm. 3 μM
pEC₅₀	8,21 \pm 0,06	7,73 \pm 0,06*	7,30 \pm 0,07*	6,77 \pm 0,04*
E_{min} (%)	-1 \pm 2	-7 \pm 2	-13 \pm 3	1 \pm 1
E_{max} (%)	101 \pm 2	92 \pm 2*	108 \pm 3	94 \pm 1
n_H (frei)	0,97 \pm 0,09	0,97 \pm 0,11	0,76 \pm 0,10	0,88 \pm 0,06
n	29	5	4	3
	Naphm. 10 μM	Naphm. 30 μM	Naphm. 56 μM	Naphm. 100 μM
pEC₅₀	6,52 \pm 0,07*	6,04 \pm 0,06*	5,84 \pm 0,04*	5,92 \pm 0,06*
E_{min} (%)	-8 \pm 2	-2 \pm 2	1 \pm 1	-6 \pm 2
E_{max} (%)	115 \pm 3*	112 \pm 3	111 \pm 2	134 \pm 4*
n_H (frei)	0,70 \pm 0,09	0,78 \pm 0,10	0,90 \pm 0,06	0,73 \pm 0,09
n	4	3	3	4

Tabelle 31: Kenngrößen \pm Standardfehler der in Abbildung 41 dargestellten gemittelten MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen sowie unter dem Einfluss von Naphmethonium. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 0,84$. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 28.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Kontrollkurve (t-Test, $p < 0,05$)

Abbildung 42 zeigt die Auftragung der Verschiebefaktoren gegen die logarithmische Naphmethonium-Konzentration. Da die Datenpunkte einem Maximalwert entgegenstrebten, ergab ein F-Test, dass die nichtlineare Regression nach Lanzafame et al. (Gl. 20) einer linearen Regression nach Arunlakshana und Schild (Gl. 18) vorzuziehen war.

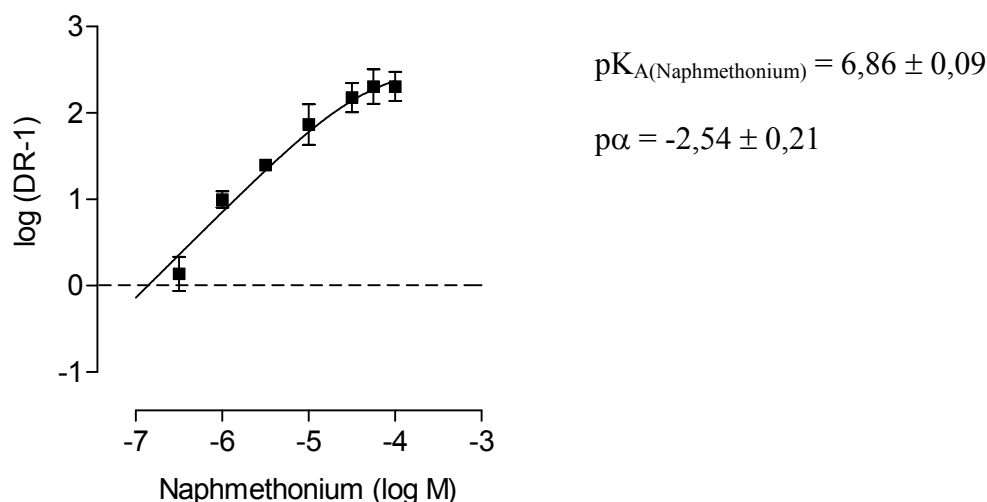


Abbildung 42: Naphmethonium-induzierte Rechtsverschiebung der MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktor (dose ratio, DR) und eins. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Naphmethonium-Konzentration.

Aus der nichtlinearen Regressionsanalyse resultierte für Naphmethonium ein pK_A -Wert von $6,86 \pm 0,09$ und ein Kooperativitätsfaktor für die Interaktion mit MMH5-6 von $\rho\alpha = -2,54 \pm 0,21$. Vorliegender Befund deutet darauf hin, dass es zu einer gleichzeitigen Anlagerung von Hybrid und allosterischem Modulator an den Rezeptor und somit zu einer Formation ternärer Komplexe kam.

Der hier gefundene pK_A -Wert unterschied sich signifikant von den in Interaktionsexperimenten mit Iperoxo sowie MMH1-6 erhaltenen Werten von $pK_A = 7,52 \pm 0,07$ und $pK_A = 7,31 \pm 0,10$ (t-Test, $p < 0,05$). Diese Abweichung kann teilweise durch die relativ große Streuung des mit $0,3 \mu\text{M}$ Naphmethonium erhaltenen Verschiebefaktors erklärt werden. Bei Auslassung dieses Wertes resultierte ein pK_A -Wert von $7,00 \pm 0,11$, der mit dem pK_A -Wert aus der Interaktion mit MMH1-6 übereinstimmt. Der Unterschied zu dem aus der Interaktion mit Iperoxo resultierenden pK_A -Wert ist auch nach dieser anderen Art der Auswertung signifikant (t-Test, $p < 0,05$). Der Kooperativitätsfaktor erfuhr mit $\rho\alpha = -2,45 \pm 0,21$ durch diese modifizierte Analyse keine signifikante Veränderung (t-Test, $p > 0,05$). Der pK_A -Wert stellt die Affinität des Allosters zum freien Rezeptor dar und ist somit unabhängig von dem eingesetzten Agonisten. Daher ist anzunehmen, dass es sich bei der hier gefundenen Abweichung des pK_A -Wertes um ein Messsystem-bedingtes Artefakt handelte.

3.1.8.5 Interaktion von Seminaph (MM7a) mit MMH5-6

Abbildung 43 zeigt den Einfluss steigender Konzentrationen Seminaph (MM7a) auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von MMH5-6. Die entsprechenden Kenngrößen sind der Tabelle 32 zu entnehmen.

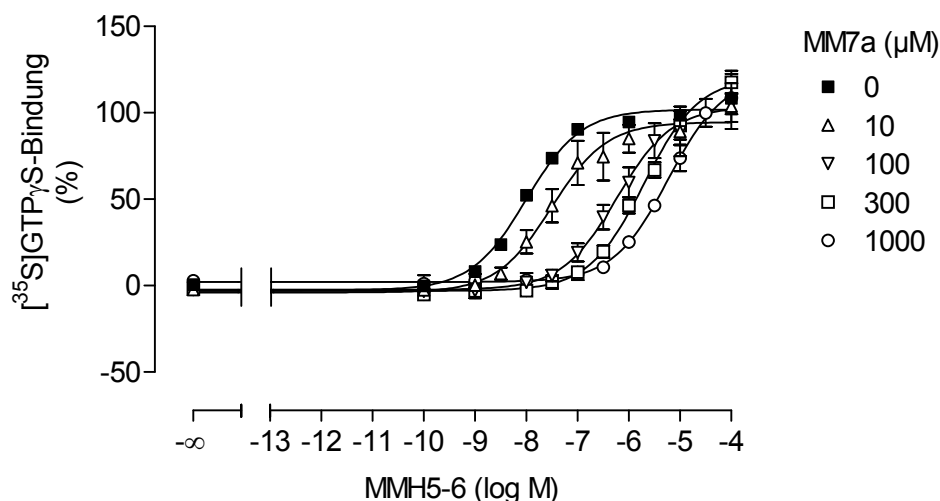


Abbildung 43: Einfluss von Seminaph (MM7a) auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von MMH5-6 an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP_γS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der MMH5-6-Kontrollkurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der MMH5-6-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 0,81$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 3 - 4$ (Kontrollkurve: $n = 14$) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	Kontrolle	MM7a 10 μ M	MM7a 100 μ M	MM7a 300 μ M	MM7a 1000 μ M
pEC₅₀	8,00 \pm 0,07	7,51 \pm 0,09*	6,23 \pm 2*	5,70 \pm 0,04*	5,23 \pm 0,03*
E_{min} (%)	-3 \pm 3	-4 \pm 3	-2 \pm 1	-3 \pm 1	2 \pm 1
E_{max} (%)	102 \pm 2	95 \pm 3	104 \pm 2	121 \pm 2*	121 \pm 2*
n_H (frei)	0,95 \pm 0,11	0,76 \pm 0,12	0,74 \pm 0,06	0,72 \pm 0,04	0,86 \pm 0,04
n	14	4	3	3	4

Tabelle 32: Kenngrößen \pm Standardfehler der in Abbildung 43 dargestellten gemittelten MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen sowie unter dem Einfluss von Seminaph (MM7a). Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 0,81$. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 28.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Kontrollkurve (t-Test, $p < 0,05$)

Seminaph führte erst ab einer Konzentration von 10 μ M zu einer detektierbaren Rechtsverschiebung der MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve, während dies bei Naphmethonium bereits bei einer 30-fach niedrigeren Konzentration von 0,3 μ M der Fall war (siehe 3.1.8.4). Durch einen gemeinsamen Hill-Koeffizienten von $n_H = 0,81$ wurde die gesamte Kurvenschar ausreichend beschrieben (F-Test nach Lew und Angus, 1995). Bei

allen Kurven wurde ein oberes Plateau gefunden. Dieses war im Falle der MMH5-6-Konzentrations-Effek-Kurven unter dem Einfluss von 300 μM bzw. 1000 μM Seminaph signifikant größer als das der MMH5-6-Kontrollkurve (t-Test, $p < 0,05$). Hiermit deutete sich zwar ein konzentrationsabhängiger Effekt von Seminaph auf das obere Plateau an, eine weiterführende Untersuchung erschien in diesem Fall allerdings nicht sinnvoll, da mit 1000 μM schon eine sehr hohe Konzentration erreicht wurde. Das untere Plateau der MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve hingegen erfuhr durch Seminaph keine signifikante Veränderung.

In Abbildung 44 sind die Verschiebefaktoren in Abhängigkeit von der logarithmischen Seminaph-Konzentration dargestellt. Ein F-Test ergab, dass eine lineare Regression der Datenpunkte nach Arunlakshana und Schild (Gl. 18) einer nichtlinearen Regression nach Lanzafame et al. (Gl. 20) vorzuziehen war.

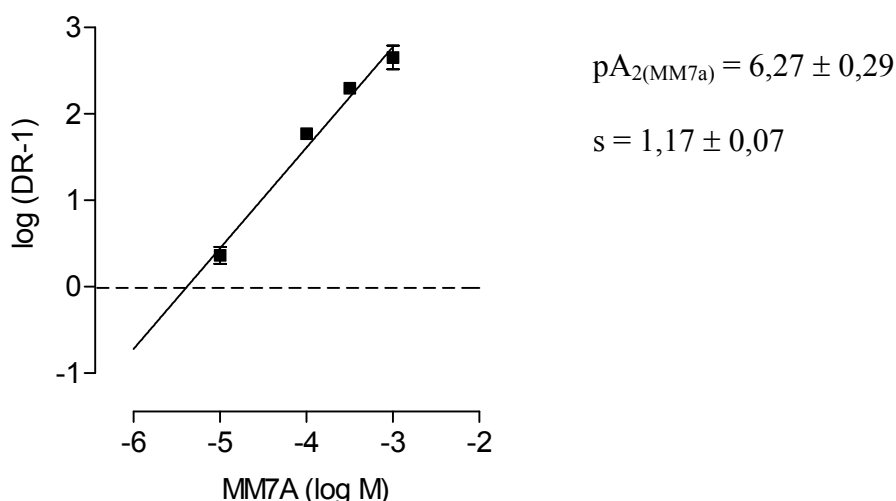


Abbildung 44: Seminaph-(MM7a)-induzierte Rechtsverschiebung der MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktor (dose ratio, DR) und eins. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der MM7a-Konzentration.

Die Steigung der Regressionsgeraden war mit $1,17 \pm 0,07$ signifikant verschieden von eins (F-Test, $p < 0,05$). Somit konnte aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse kein pK_A -Wert für Seminaph abgelesen werden. Vielmehr wurde mit $pA_2 = 6,27 \pm 0,29$ diejenige Seminaph-Konzentration erhalten, die zu einer Verschiebung des Wendepunkts der MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve um den Faktor zwei führte. Die von eins signifikant abweichende Steigung der Geraden bedeutet, dass es sich in vorliegendem Fall formal nicht um eine einfache 1:1-Kompetition im engeren Sinne handelte. Ob dem Befund eine biologische Bedeutung zukommt, ist unklar.

3.1.9 Einfluss orthosterischer Antagonisten auf die Hybrid-induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung

In den folgenden Interaktions-Experimenten sollte der Einfluss eines orthosterischen Antagonisten auf die Konzentrations-Effekt-Kurven der beiden vollagonistischen Hybride DDT5 und MMH5-6 untersucht werden. Als orthosterischer Antagonist wurde Atropin gewählt. Um Hinweise zu erhalten, ob die in Folgendem beobachteten Effekte an die Struktur des Atropins gebunden waren, oder ob es sich um einen generellen Effekt handelte, wurde exemplarisch der Einfluss von NMS in einer einzelnen Konzentration auf die DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve untersucht.

Unter der Voraussetzung, dass das Hybrid seinen agonistischen Effekt über die orthosterische Bindungsstelle vermittelt, war davon auszugehen, dass eine Aktivierung des Rezeptors nicht mehr möglich wäre, wenn der Antagonist den agonistischen Anteil der Hybride aus der orthosterischen Bindungstasche „verdrängt“. Es wäre allerdings denkbar, dass im Falle des Antagonist-besetzten Rezeptors das Hybrid immer noch mit seinem allosterischen Anteil an das allosterische Haftareal binden kann. In einem solchen Fall käme es zur Bildung ternärer Komplexe aus Antagonist, Alloster-Anteil des Hybrids und Rezeptor.

3.1.9.1 Interaktion von Atropin mit DDT5

In Abbildung 45 ist der Einfluss des orthosterischen Antagonisten Atropin auf die DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt. Die entsprechenden Kenngrößen sind in Tabelle 33 wiedergegeben.

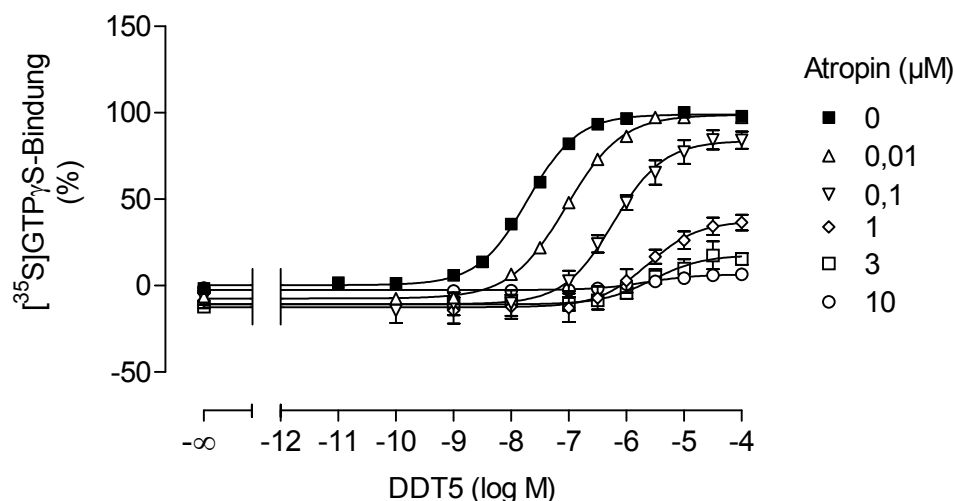


Abbildung 45: Einfluss von Atropin auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von DDT5 an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der DDT5-Kontrollkurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der DDT5-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 2 - 5 (Kontrollkurve: n = 20) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	Kontrolle	Atropin 0,01 µM	Atropin 0,1 µM	Atropin 1 µM	Atropin 3 µM	Atropin 10 µM
pEC₅₀	7,71 ± 0,02	7,05 ± 0,03*	6,22 ± 0,04*	5,62 ± 0,08*	5,54 ± 0,09*	5,64 ± 0,11*
E_{min} (%)	0 ± 1	-6 ± 1*	-11 ± 1*	-12 ± 1*	-11 ± 1*	-3 ± 1
E_{max} (%)	99 ± 1	98 ± 1	83 ± 2*	37 ± 2*	18 ± 1*	7 ± 1*
n_H (frei)	0,93 ± 0,03	0,90 ± 0,04 [#]	0,90 ± 0,07	1,02 ± 0,15	1,13 ± 0,24	0,89 ± 0,22
n	20	5	5	5	2	3

Tabelle 33: Kenngrößen ± Standardfehler der in Abbildung 45 dargestellten gemittelten DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen sowie unter dem Einfluss von Atropin. Die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1. **pEC₅₀**: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTPγS-Bindung hervorruft. **E_{min}**: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}**: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei)**: Freier Hill-Koeffizient. **n**: Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Kontrollkurve (t-Test, p < 0,05)

[#] signifikant bessere Anpassung mit freiem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05)

Der nach Lew und Angus (1995) durchgeführte F-Test ergab, dass trotz des von eins signifikant abweichenden Hill-Koeffizienten bei einer Atropin-Konzentration von 0,01 µM die

gesamte Kurvenschar durch einen Hill-Koeffizienten von eins ausreichend beschrieben wurde. Die bei Zugabe von 10 μM Atropin erhaltene DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve wurde in die weiteren Betrachtungen nicht einbezogen, da diese unter anderen Laborbedingungen aufgenommen wurde. Bis auf den abweichenden Befund bezüglich des unteren Plateaus (nicht signifikant verschieden von dem der Kontroll-Kurve) wurde allerdings auch hier die durch die anderen Kurven gelegte Tendenz fortgesetzt.

Atropin führte in allen eingesetzten Konzentrationen zu einer signifikanten Rechtsverschiebung des Wendepunkts (pEC_{50}) der DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve und ab einer Konzentration von 0,1 μM auch zu einer signifikanten Senkung des Maximaleffekts (E_{max}) (t-Test, $p < 0,05$). Darüber hinaus wurde bis zu einer Atropin-Konzentration von einschließlich 3 μM eine signifikante Senkung des unteren Plateaus der DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve beobachtet.

Zur Quantifizierung des Atropin-Effekts bezüglich des Wendepunkts der DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve wurden in Abbildung 46 die bei einer bestimmten Atropin-Konzentration erhaltenen Verschiebefaktoren gegen die logarithmische Atropin-Konzentration aufgetragen.

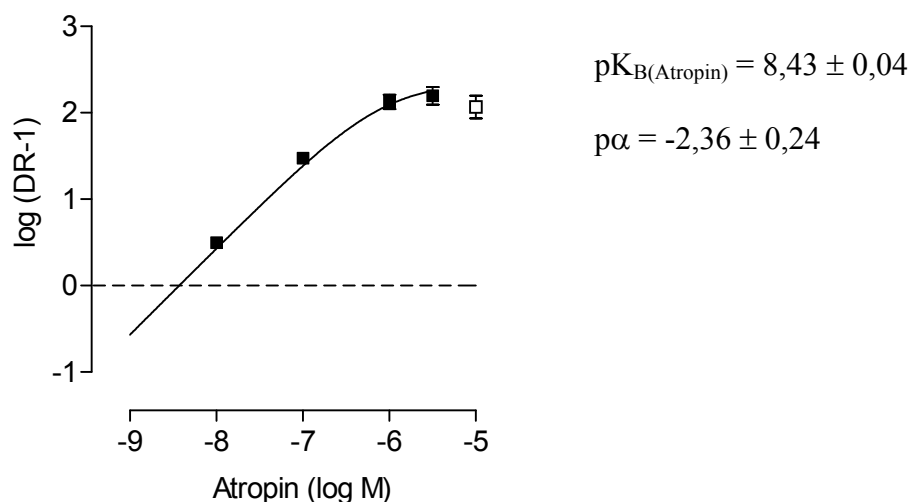


Abbildung 46: Atropin-induzierte Rechtsverschiebung der DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktor (dose ratio, DR) und eins. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration. Das offene Quadrat stellt die durch 10 μM Atropin verursachte Rechtsverschiebung dar, welche nicht in die Auswertung einbezogen wurde.

Da die Verschiebefaktoren einem Maximum entgegenstrebten, erfolgte eine nichtlineare Regression der Datenpunkte mittels der Gleichung nach Lanzafame et al. (Gl. 20). Daraus resultierte für Atropin ein pK_{B} -Wert von $8,43 \pm 0,04$. Der Kooperativitätsfaktor für die Interaktion von Atropin mit DDT5 wurde mit $\text{p}\alpha = -2,36 \pm 0,24$ ermittelt.

Um den Einfluss des Atropins auf den DDT5-Maximaleffekt zu quantifizieren, wurden weitere Experimente durchgeführt, in denen zu einer konstanten Konzentration DDT5 steigende Konzentrationen Atropin zugegeben wurden. Dabei wurde mit 100 μM eine DDT5-Konzentration gewählt, die auch bei Anwesenheit hoher Atropin-Konzentrationen im oberen Plateau der jeweiligen Kurve lag (Abbildung 45). Die Ergebnisse sind in Abbildung 47 als geschlossene Quadrate dargestellt. Zusätzlich wurden die Werte für die Maximaleffekte (E_{max}) aus Tabelle 33 aufgetragen (offene Quadrate).

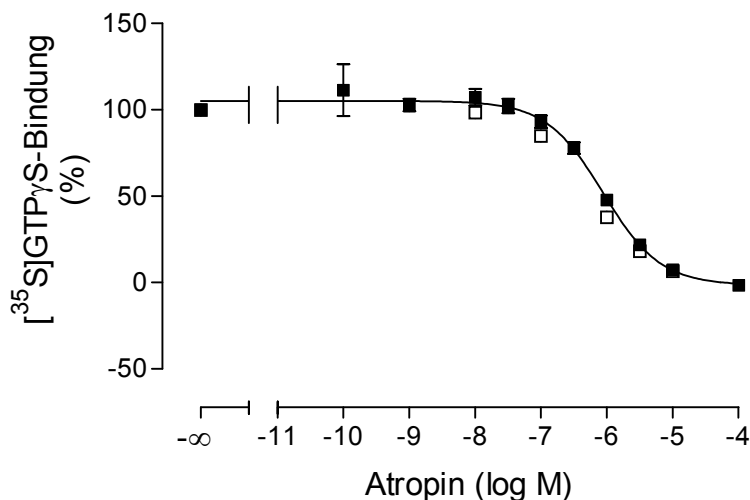


Abbildung 47: Einfluss von Atropin auf den Effekt einer maximal wirksamen Konzentration (100 μM) DDT5. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht der basalen [³⁵S]GTP γ S-Bindung und 100 % dem maximal induzierbaren DDT5-Effekt. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = -1$. **Datenpunkte:** Geschlossene Symbole: Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten; offene Symbole: E_{max} -Werte aus Tabelle 33.

Die Datenpunkte beschrieben ein Sigmoid, an das mittels der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gl. 6) eine Kurve angepasst wurde. Ein F-Test ergab, dass ein Hill-Koeffizient von $n_H = -1$ die Datenpunkte ausreichen beschrieb ($p > 0,05$). Im Falle der geschlossenen Quadrate betrug die Atropin-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Senkung des DDT5-Maximaleffektes führte, $\text{pIC}_{50} = 6,05 \pm 0,05$ ($n = 3$), wobei es bei hohen Atropin-Konzentrationen zu einer vollständigen Aufhebung des DDT5-Effektes bis auf das Niveau der basalen [³⁵S]GTP γ S-Bindung kam (F-Test, $p > 0,05$). An die durch offene Quadrate dargestellten E_{max} -Werte aus Tabelle 33 erfolgte aufgrund der nur fragmentarischen Kurvenbeschreibung keine Kurvenanpassung.

Aus den oben dargestellten Befunden bezüglich des Einflusses von Atropin auf den Wendepunkt der DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve (vgl. Abbildung 46) ließ sich ein $\text{p}(\alpha \cdot K_B)$ -Wert von 6,07 berechnen, der die Affinität des Atropins zu Hybrid-besetzten

Rezeptoren darstellt. Der $p(\alpha \cdot K_B)$ -Wert unterscheidet sich nicht signifikant von dem zuvor erwähnten pIC_{50} -Wert (t-Test, $p > 0,05$). Dieses lässt darauf schließen, dass die Senkung des DDT5-Maximaleffekts auf die Bildung ternärer Komplexe aus Atropin, Alloster-Anteil des Hybrids und Rezeptor zurückzuführen war.

3.1.9.2 Interaktion von N-Methylscopolamin mit DDT5

In Abbildung 48 ist der Effekt von $0,3 \mu\text{M}$ N-Methylscopolamin (NMS) auf die DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt. Die entsprechenden Kenngrößen sind der Tabelle 34 zu entnehmen.

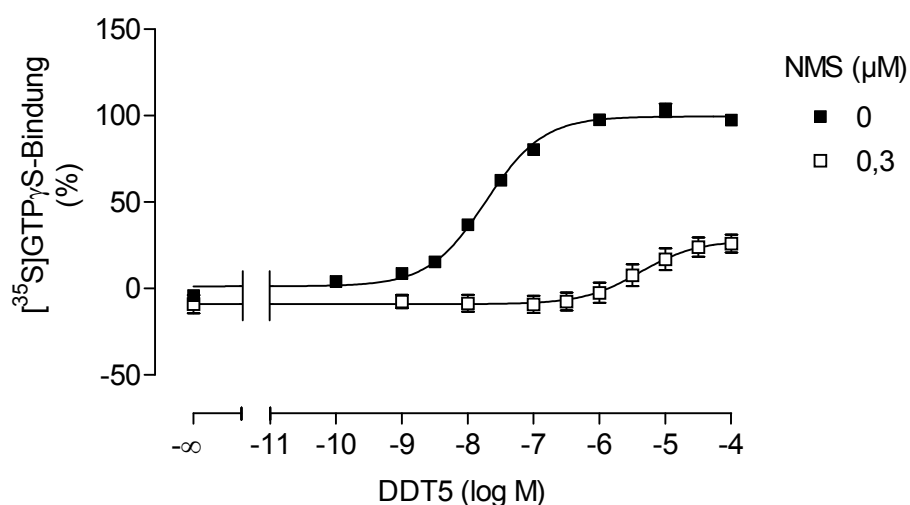


Abbildung 48: Einfluss von NMS ($0,3 \mu\text{M}$) auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von DDT5 an Membransuspensionen aus CHO- M_2 -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der DDT5-Kontrollkurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der DDT5-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC_{50}	E_{\min} (%)	E_{\max} (%)	n_H (frei)	n
Kontrolle	$7,73 \pm 0,05$	1 ± 2	100 ± 2	$0,85 \pm 0,08$	3
$0,3 \mu\text{M}$ NMS	$5,39 \pm 0,04^*$	$-9 \pm 1^*$	$28 \pm 1^*$	$1,14 \pm 0,10$	3

Tabelle 34: Kenngrößen \pm Standardfehler der in Abbildung 48 dargestellten, gemittelten DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen sowie unter dem Einfluss von NMS. Die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 33.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Kontrollkurve (t-Test, $p < 0,05$)

Beide DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurven konnten mit einem Hill-Koeffizienten von eins beschrieben werden. Wie zuvor schon für den Antagonisten Atropin gezeigt wurde (siehe 3.1.9.1), führte auch NMS sowohl zu einer Rechtsverschiebung des Wendepunkts

der DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve, als auch zu einer Senkung des Maximaleffekts. In beiden Fällen waren die Veränderungen gegenüber der Kontrollkurve signifikant (t-Test, $p < 0,05$). Darüber hinaus verursachte NMS eine statistisch signifikante Senkung der basalen [^{35}S]GTP γ S-Bindung (t-Test, $p < 0,05$).

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss von NMS auf den DDT5-Maximaleffekt untersucht. Hierzu wurden zu einer konstanten Konzentration von 100 μM DDT5 steigende Konzentrationen NMS gegeben. Dabei wurde mit 100 μM eine DDT5-Konzentration gewählt, die auch unter dem Einfluss von 0,3 μM NMS im Bereich des oberen Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurve lag.

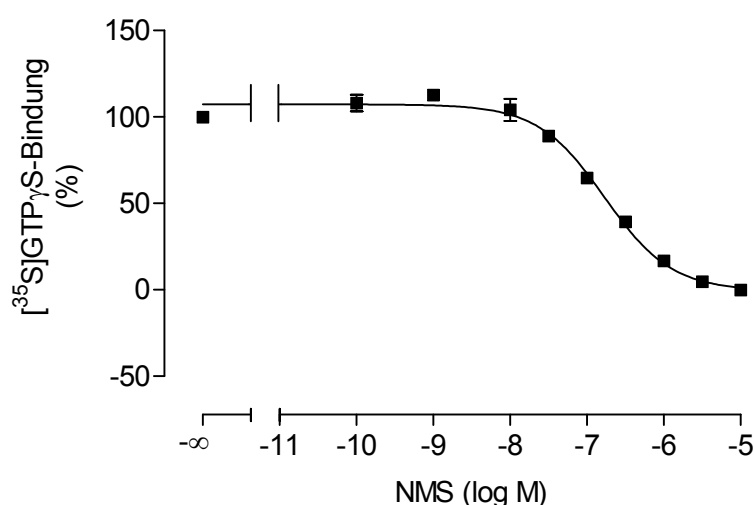


Abbildung 49: Einfluss von NMS auf den Effekt einer maximal wirksamen Konzentration (100 μM) DDT5. **Ordinate:** Prozentuale [^{35}S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht der basalen [^{35}S]GTP γ S-Bindung und 100 % dem maximal induzierbaren DDT5-Effekt. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der NMS-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = -1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die als Vierfachbestimmungen durchgeführt wurden.

Die Datenpunkte beschrieben ein Sigmoid, an das mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gl. 6) eine Kurve angepasst wurde. Es wurde ein Wendepunkt von $\text{pIC}_{50} = 6,77 \pm 0,06$ ($n = 3$) ermittelt. Bei einem Vergleich mit dem Befund aus der Interaktion von Atropin mit DDT5 (siehe 3.1.9.1) lässt sich feststellen, dass der hier gefundene pIC_{50} -Wert des NMS signifikant größer ist als der pIC_{50} -Wert des Atropins (t-Test, $p < 0,05$). Folglich hat NMS eine höhere Affinität zum DDT5-besetzten Rezeptor als Atropin.

3.1.9.3 Interaktion von Atropin mit MMH5-6

Abbildung 50 zeigt den Einfluss von Atropin auf die MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve. Die Kenngrößen sind der Tabelle 35 zu entnehmen.

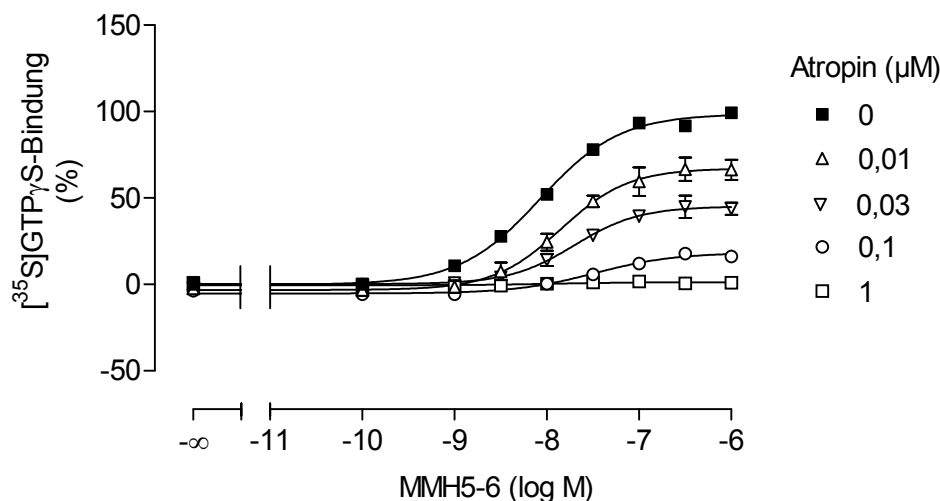


Abbildung 50: Einfluss von Atropin auf die Konzentrations-Effekt-Kurve von MMH5-6 an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTPγS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der MMH5-6-Kontrollkurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der MMH5-6-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus drei (Kontrollkurve: n = 12) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	Kontrolle	Atropin 0,01 µM	Atropin 0,03 µM	Atropin 0,1 µM	Atropin 1 µM
pEC ₅₀	8,08 ± 0,04	7,83 ± 0,04*	7,68 ± 0,05*	7,48 ± 0,11*	7,92 ± 0,65
E _{min} (%)	0 ± 1	-4 ± 1	-1 ± 1	-5 ± 1	0 ± 1
E _{max} (%)	99 ± 1	69 ± 1*	47 ± 1*	18 ± 1*	1 ± 1
n _H (frei)	0,99 ± 0,08	1,183 [#]	1,23 ± 0,09 [#]	1,14 ± 0,30	n.d.
n	12	3	3	3	3

Tabelle 35: Kenngrößen ± Standardfehler der in Abbildung 50 dargestellten gemittelten MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurven unter Kontrollbedingungen sowie unter dem Einfluss von Atropin. Die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 33.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Kontrollkurve (t-Test, p < 0,05)

signifikant bessere Anpassung mit freiem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05)

Aufgrund der durch Atropin induzierten starken Absenkung des oberen Plateaus der MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve konnte der Atropin-Effekt nur über eine Dekade untersucht werden. An die unter dem Einfluss von 1 µM Atropin erhaltenen Datenpunkte konnte zwar noch eine Kurve angepasst werden, allerdings führte der extrem flache Verlauf zu einem recht großen Standardfehler (SEM) bezüglich des Wendepunkts (pEC₅₀),

sodass diese Kurve bei der Betrachtung der Atropin-induzierten Rechtsverschiebung des Wendepunkts ausgeschlossen wurde. Zwei der dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven wiesen einen signifikant von eins abweichenden Hill-Koeffizienten auf (F-Test, $p < 0,05$). Dennoch ergab der nach Lew und Angus (1995) durchgeführte F-Test, dass ein Hill-Koeffizient von eins die Kurvenschar ausreichend beschrieb.

Zur Quantifizierung des Atropin-Effekts bezüglich der Verschiebung des Wendepunkts der MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve wurden in Abbildung 51 die Verschiebefaktoren gegen die logarithmische Atropin-Konzentration aufgetragen.

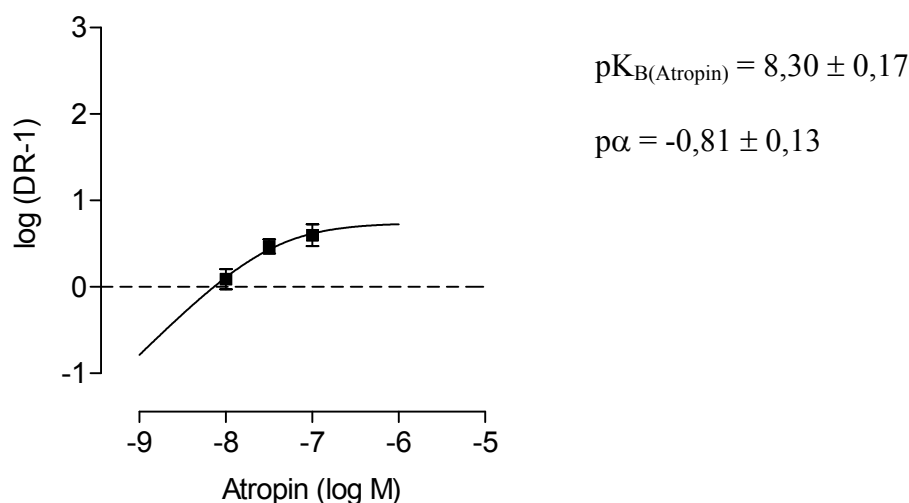


Abbildung 51: Atropin-induzierte Rechtsverschiebung der MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Ordinate:** Dekadischer Logarithmus der Differenz aus Verschiebungsfaktor (dose ratio, DR) und eins. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration.

Die Rechtsverschiebung der MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve strebte einem Maximalwert entgegen. Daher ergab ein F-Test, dass die nichtlineare Regression nach Lanzafame et al. (Gl. 20) der linearen Regression nach Arunlakshana und Schild (Gl. 18) vorzuziehen war. Der für Atropin gefundene pK_B -Wert betrug $8,30 \pm 0,17$ und stimmte damit gut mit dem aus der Interaktion von Atropin mit DDT5 gefundenen pK_B -Wert von $8,43 \pm 0,04$ überein (t-Test, $p > 0,05$). Die negative Kooperativität der Interaktion von Atropin mit MMH5-6 ist mit einem Kooperativitätsfaktor von $p\alpha = -0,81 \pm 0,13$ viel schwächer ausgeprägt als bei einer Interaktion von Atropin mit DDT5, für die ein Kooperativitätsfaktor von $p\alpha = -2,36 \pm 0,24$ erhalten wurde.

In separaten Experimenten wurde der Einfluss des Atropins auf den MMH5-6-Maximaleffekt untersucht. Dazu wurden zu einer konstanten Konzentration von 3 μM MMH5-6 steigende Konzentrationen Atropin gegeben. Zusätzlich wurden in Abbildung 52 die E_{max} -Werte aus der Tabelle 35 aufgenommen.

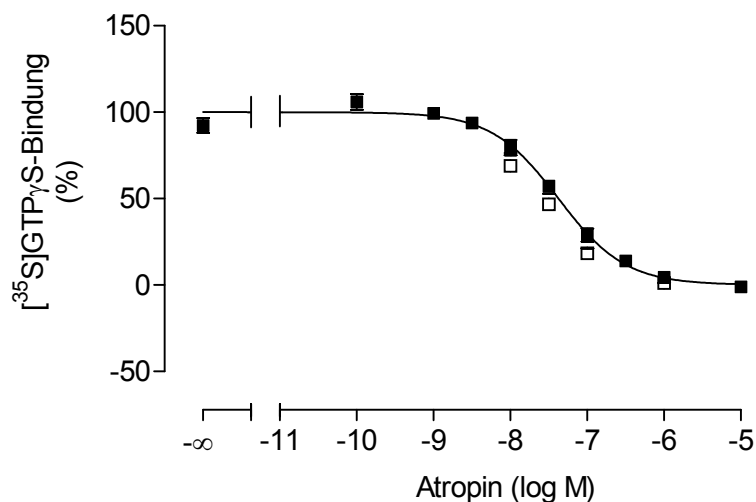


Abbildung 52: Einfluss von Atropin auf den Effekt einer maximal wirksamen Konzentration (3 μM) MMH5-6. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht der basalen [³⁵S]GTP γ S-Bindung und 100 % dem maximal induzierbaren MMH5-6-Effekt. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = -1$. **Datenpunkte:** Geschlossene Symbole: Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Offene Symbole: E_{max} -Werte aus Tabelle 35.

Die Kurvenanpassung an die Datenpunkte erfolgt mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6). Durch Atropin konnte die MMH5-6-induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung bis auf das Niveau der basalen Bindung gesenkt werden (F-Test, $p > 0,05$). Die Atropin-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Senkung des MMH5-6-Maximaleffekts führte lag bei $\text{pIC}_{50} = 7,32 \pm 0,05$. Demnach war MMH5-6 empfindlicher gegenüber einer Atropin-induzierten Senkung des Maximaleffekts als DDT5 (siehe 3.1.9.1). Analog dem Befund aus 3.1.9.1 lag auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen dem mit 7,49 errechneten $\text{p}(\alpha \cdot K_B)$ -Wert und dem pIC_{50} -Wert vor (t-Test, $p > 0,05$), was die Annahme zulässt, dass auch hier die Atropin-induzierte Abnahme des MMH5-6-Maximaleffekts auf die Bildung ternärer Komplexe zurückzuführen war. Demnach bildet MMH5-6 mit größerer Affinität als DDT5 ternäre Komplexe mit Atropin-besetzten Rezeptoren.

3.2 Untersuchungen an M₃-Rezeptoren

Für einige ausgewählte Verbindungen sollte in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten die Wirksamkeit (pEC₅₀) sowie die Effektivität (E_{max}) bezüglich der Rezeptoraktivierung an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren des Subtyps M₃ bestimmt werden, um Hinweise über die M₂/M₃-Selektivität der Substanzen zu erhalten.

Während der M₂-Rezeptor bevorzugt an G-Proteine des Subtyps G_{i/o} koppelt, vermittelt der M₃-Rezeptor sein Signal primär über G-Proteine des Subtyps G_{q/11} (Caulfield und Birdsall, 1998; Eglén, 2005).

3.2.1 Vorversuche an Membransuspensionen aus CHO-M₃-Zellen

3.2.1.1 [³H]NMS-Bindungsexperiment: K_D- und B_{max}-Wert des Radioliganden

Zur Charakterisierung der Zelllinie wurden homologe Kompetitions-Experimente durchgeführt, auf deren Basis die Parameter K_D und B_{max} bestimmt wurden. In Abbildung 53 ist ein repräsentatives Ergebnis eines solchen Experiments dargestellt.

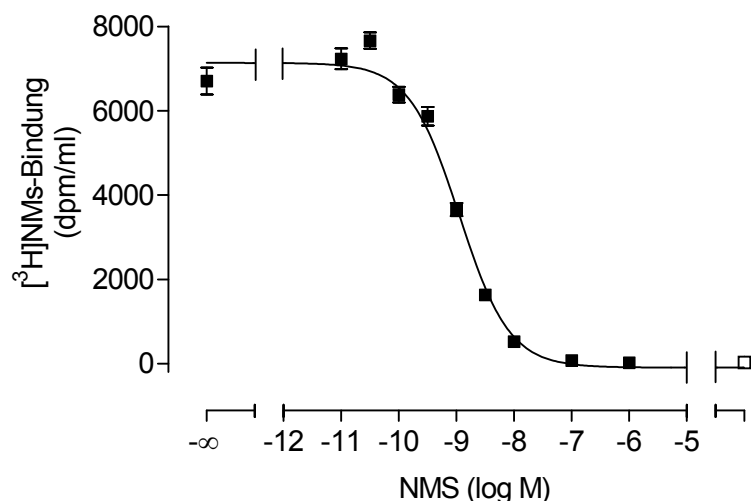


Abbildung 53: Repräsentatives Ergebnis einer homologen Kompetition mit [³H]NMS (0,2 nM) und nicht markiertem NMS an Membransuspensionen aus CHO-M₃-Zellen. **Ordinate:** [³H]NMS-Bindung in dpm/ml. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der NMS-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = -1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler eines in Dreifachbestimmung durchgeführten Experiments. Das offene Quadrat stellt die mit 1 μM Atropin bestimmte unspezifische Bindung dar.

Die unspezifische Bindung betrug bei diesem Experiment 0,4 % der Gesamtbindung. Aus dem Wendepunkt der Kurve wurde mittels der Gleichung nach Cheng und Prussoff (Gl. 7) ein pK_D-Wert von 9,03 berechnet. Der nach DeBlasi et al. (Gl. 9) ermittelte B_{max}-Wert

betrug 10,89 pmol/mg Protein. Insgesamt wurden fünf CHO-M₃-Membransuspensionen getestet. Durch Zusammenfassen aller Experimente wurde eine mittlere Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (pK_D) für [³H]NMS von $8,95 \pm 0,02$ gefunden. Die durchschnittliche Anzahl an Bindungsstellen (B_{max}) betrug $16,51 \pm 1,52$ pmol/mg Protein und war damit fast dreimal so hoch wie für den CHO-M₂-Rezeptor mit $B_{max} = 6,07 \pm 0,57$ pmol/mg Protein (siehe 3.1.2.1) gefunden wurde. Die gleichen Zelllinien wurden von Sennwitz (2006) in Mg, P_i, TRIS-Puffer untersucht. Dabei ergab sich für [³H]NMS an Membransuspensionen aus CHO-M₃-Zellen ein 4,8-fach höherer B_{max} -Wert als an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen.

3.2.1.2 Einfluss verschiedener GDP-Konzentrationen auf die Acetylcholin-induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung

Die Kopplung des M₃-Rezeptors an G-Proteine des Subtyps G_{q/11} stellt für [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimente eine Schwierigkeit dar, da das Signal-Rausch-Verhältnis bei der Untersuchung von G_{q/11}-gekoppelten Rezeptoren sehr ungünstig ist (Milligan, 2003). In der Literatur wird berichtet, dass für eine optimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung an G_{q/11}- und G_{i/o}-Proteine unterschiedliche GDP-Konzentrationen notwendig sind (Lazareno et al., 1993; Breivogel et al., 1998; DeLapp et al., 1999; Akam et al., 2001). Dabei wurden zur Testung der bevorzugt an G_{q/11}-Proteine koppelnden ungeradzahigen muskarinischen Acetylcholinrezeptoren zehnfach niedrigere GDP-Konzentrationen verwendet als für die an G_{i/o}-Proteine koppelnden geradzahigen muskarinischen Acetylcholinrezeptoren.

Um auch hier eine Optimierung der GDP-Konzentration vorzunehmen, wurde anhand von Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven der Einsatz von 10 μ M GDP gegen den Einsatz von 1 μ M GDP getestet. In Abbildung 54 ist ein repräsentatives Ergebnis eines solchen Experiments dargestellt, wobei die [³⁵S]GTP γ S-Bindung in Form der nicht normalisierten Rohdaten gegen die logarithmische Acetylcholin-Konzentration aufgetragen wurde.

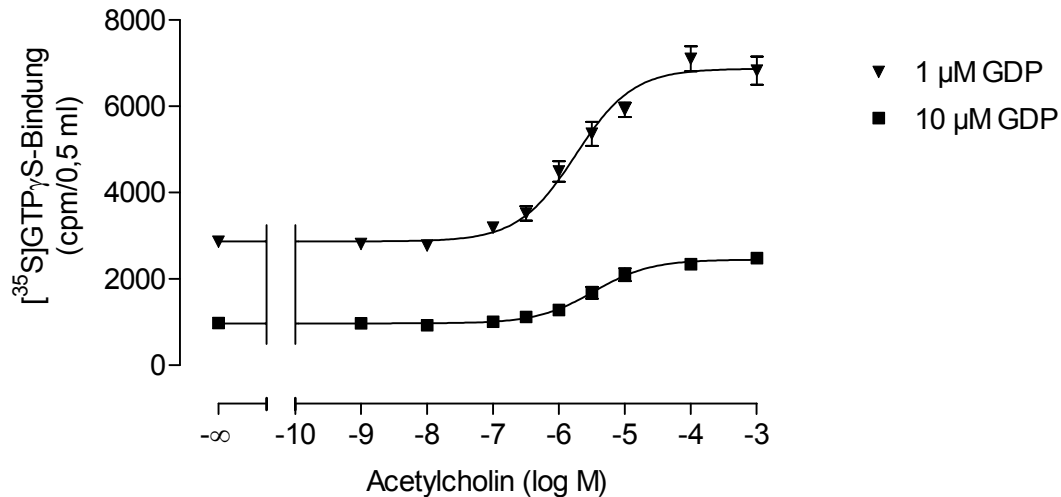


Abbildung 54: Ergebnis eines repräsentativen Experiments von insgesamt vier zur Untersuchung des Einflusses verschiedener GDP-Konzentrationen auf die Acetylcholin-induzierte [³⁵S]GTP_γS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₃-Zellen. **Ordinate:** [³⁵S]GTP_γS-Bindung in cpm/0,5 ml. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus einer Vierfachbestimmung.

Beide Konzentrations-Effekt-Kurven konnten ausreichend mit einem Hill-Koeffizienten von eins beschrieben werden. Wie Abbildung 54 veranschaulicht, verläuft die mit 10 μ M GDP erhaltene Kurve auf einem deutlich niedrigeren Niveau als die mit 1 μ M GDP resultierende Kurve. Die absolute Auslenkung der Kurven betrug in vorliegendem Fall bei 10 μ M GDP 1481 cpm/0,5 ml und bei 1 μ M GDP 4003 cpm/0,5 ml.

Um den Einfluss der GDP-Konzentration auf die Lage des Wendepunkts der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve zu testen, wurden Konzentrations-Effekt-Kurven aus vier voneinander unabhängigen Experimenten normalisiert und anschließend zu Mittelwertskurven zusammengefasst. Die aus Abbildung 55 sich ergebenden Kenngrößen sind in Tabelle 36 zusammengefasst worden. Zusätzlich zu den an dieser Stelle erhobenen Daten wurden in diese Tabelle die Befunde aufgenommen, die mit Acetylcholin am CHO-M₂-Rezeptor erhalten wurden (vgl. 3.1.4.1).

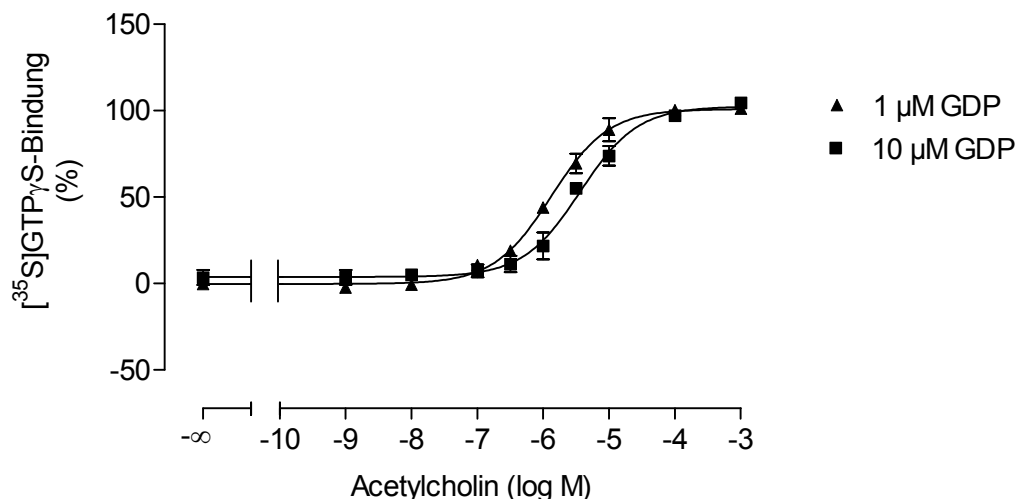


Abbildung 55: Einfluss verschiedener GDP-Konzentrationen auf die Acetylcholin-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M $_3$ -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [^{35}S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_{\text{H}} = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	M $_3$ -Rezeptor		M $_2$ -Rezeptor
	10 μM GDP	1 μM GDP	10 μM GDP
pEC$_{50}$	5,44 \pm 0,04 [#]	5,88 \pm 0,03* [#]	7,60 \pm 0,03
n$_H$ (frei)	1,00 \pm 0,10	0,91 \pm 0,05	0,92 \pm 0,03
n	4	4	52

Tabelle 36: Kenngrößen \pm Standardfehler der in Abbildung 16 und Abbildung 55 dargestellten gemittelten Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_{\text{H}} = 1$. **pEC $_{50}$:** Negativer dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration, die eine halbmaximale [^{35}S]GTP γ S-Bindung hervorruft. **n $_H$ (frei):** Freier Hill-Koeffizient. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Acetylcholin-Kurve unter Zusatz von 10 μM GDP (t-Test, $p < 0,05$)

[#] signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Kenngröße der Acetylcholin-Kurve am M $_2$ -Rezeptor (t-Test, $p < 0,05$)

Bei Betrachtung der am M $_3$ -Rezeptor erhaltenen Ergebnisse ist festzustellen, dass sich die Hill-Koeffizienten beider Mittelwertskurven nicht signifikant voneinander unterscheiden (F-Test, $p > 0,05$). Bei Einsatz von 1 μM GDP wies Acetylcholin einen geringfügig, aber signifikant größeren pEC $_{50}$ -Wert auf als bei Verwendung von 10 μM GDP.

Aufgrund der Vergrößerung des absoluten Acetylcholin-Maximaleffekts durch eine Verringerung der GDP-Konzentration von 10 μM auf 1 μM und der nur geringfügigen Beeinflussung des Wendepunkts der Konzentrations-Effekt-Kurve wurde bei allen

weiteren Experimenten an Membransuspensionen aus CHO-M₃-Zellen GDP in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt. Im Vergleich zum M₂-Rezeptor war die Wirksamkeit des Acetylcholins am M₃-Rezeptor um etwa zwei Dekaden signifikant vermindert (t-Test, $p < 0,05$).

3.2.1.3 Beeinflussung der [³⁵S]GTP_γS-Bindung durch rezeptorsättigende Konzentrationen muskarinischer Liganden

Zur weiteren Charakterisierung der Membransuspensionen wurde der Einfluss sättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden auf die [³⁵S]GTP_γS-Bindung getestet und in Relation zur basalen [³⁵S]GTP_γS-Bindung gesetzt. Analog der Untersuchungen an CHO-M₂-Membransuspensionen (vgl. 3.1.2.2) kamen der Vollagonist Oxotremorin-M (0,1 mM), der Partialagonist Pilocarpin (1 mM), der allosterische Modulator Alcuronium (0,1 mM) und der inverse Agonist Atropin (0,001 mM) zum Einsatz. Die Ergebnisse aus Untersuchungen an sechs CHO-M₃-Membransuspensionen sind in Abbildung 56 bzw. Tabelle 37 dargestellt.

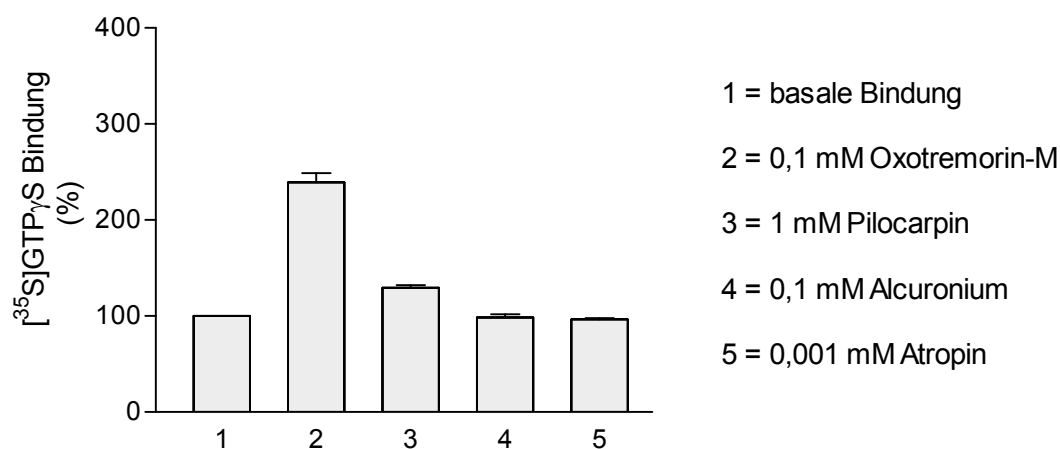


Abbildung 56: Effekte rezeptortsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden auf die [³⁵S]GTP_γS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₃-Zellen. **Ordinate:** [³⁵S]GTP_γS-Bindung in Prozent der basalen Bindung. **Abszisse:** Testsubstanzen. **Balken:** Mittelwerte ± Standardfehler aus 6 voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Achtfachbestimmung durchgeführt wurden.

Basale Bindung	Oxotremorin-M (0,1 mM)	Pilocarpin (1 mM)	Alcuronium (0,1 mM)	Atropin (0,001 mM)
100	239 ± 10* (319 ± 19*)	129 ± 3*# (262 ± 13*#)	98 ± 3 (86 ± 4*)	97 ± 1 (79 ± 2*)
-	n = 6 (n = 22)	n = 6 (n = 22)	n = 6 (n = 22)	n = 6 (n = 22)

Tabelle 37: Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₃-Zellen. Die Ergebnisse aus Experimenten an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen stehen in Klammern darunter. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler.

* signifikanter Unterschied zur basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung (100 %, t-Test, p < 0,05)

signifikanter Unterschied zur Oxotremorin-M-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung (t-Test, p < 0,05)

Am M₃-Rezeptor wurde die [³⁵S]GTPγS-Bindung durch Oxotremorin-M nur um 139 %-Punkte erhöht, während dieser Agonist am M₂-Rezeptor eine 219 %ige Steigerung der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung bewirkte. Die Fähigkeit des Partialagonisten Pilocarpin, den Rezeptor zu aktivieren, war am M₃-Subtyp relativ zum M₂-Subtyp sehr stark vermindert. Weiterhin war der am M₂-Rezeptor beobachtete invers agonistische Effekt der muskarinischen Liganden Atropin und Alcuronium am M₃-Rezeptor nicht zu beobachten.

3.2.2 Orthosterische Agonisten

3.2.2.1 Iperoxo-induzierte [³⁵S]GTP γ S-Bindung

In Abbildung 57 ist die Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve gegenübergestellt. Die Kenngrößen beider Kurven sind der Tabelle 38 zu entnehmen.

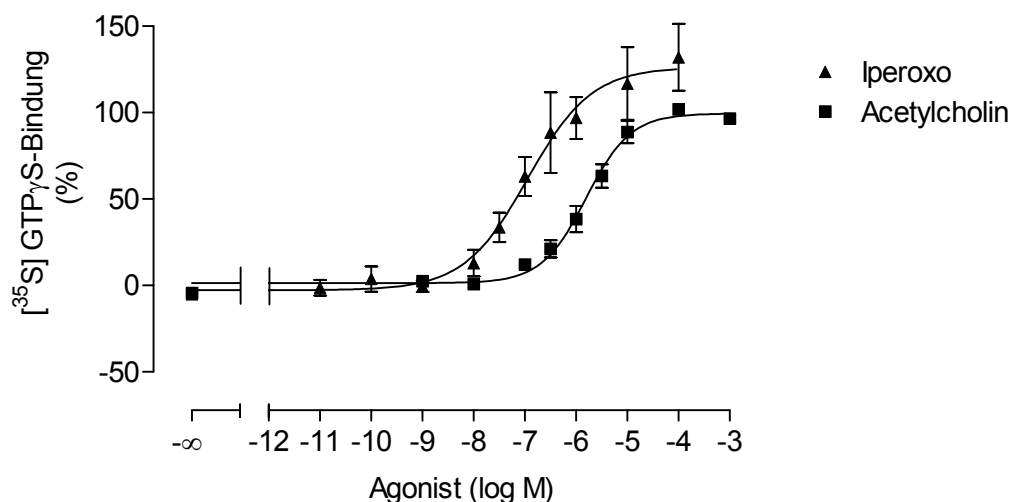


Abbildung 57: Vergleich von Iperoxo- und Acetylcholin-induzierter [³⁵S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₃-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP γ S-Bindung. Dabei entsprach 0 % dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6); Iperoxo: Hill-Koeffizient signifikant verschieden von eins (F-Test, $p < 0,05$), $n_H = 0,70 \pm 0,09$; Acetylcholin: konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	E _{min} (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Iperoxo	7,03 \pm 0,09*	0 \pm 3	118 \pm 5*	0,70 \pm 0,09 [#]	3
Acetylcholin	5,80 \pm 0,06	1 \pm 2	100 \pm 3	0,89 \pm 0,11	3

Tabelle 38: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten Iperoxo- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 57. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung hervorruft. **E_{min}:** Minimale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTP γ S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Freier Hill-Koeffizient. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

[#] signifikant bessere Anpassung mit freiem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$)

Während die Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve ausreichend mit einem Hill-Koeffizienten von eins beschrieben werden konnte, führte ein freier Hill-Koeffizient bei der Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo zu einem signifikant besseren Ergebnis (F-

Test, $p < 0,05$). Weiterhin war zu beobachten, dass Iperoxo mit $E_{\max} = 118 \pm 5$ zu einem signifikant größeren Maximaleffekt führte als Acetylcholin (t-Test, $p < 0,05$). Diese Steigerung der intrinsischen Aktivität wurde am M_2 -Rezeptor nicht beobachtet. Mit $pEC_{50} = 7,03 \pm 0,09$ war die Wirksamkeit des Iperoxo relativ zum endogenen Agonisten Acetylcholin am M_3 -Rezeptor nur um 1,2 Dekaden vergrößert, während Iperoxo am M_2 -Rezeptor mit $pEC_{50} = 9,40 \pm 0,04$ eine um 2,2 Dekaden höhere Wirksamkeit als Acetylcholin aufwies.

Bei einem direkten Vergleich der Iperoxo- Wirksamkeiten zwischen dem M_2 - und M_3 -Rezeptor ist ein Unterschied von mehr als zwei Dekaden zwischen den pEC_{50} -Werten festzustellen. Dallanoce et al. (1999) fanden hingegen in Organbadexperimenten am isolierten Meerschweinchen-Ileum ($pD_2 = 9,78 \pm 0,10$) nur einen geringfügigen Unterschied von 0,3 Dekaden zu Experimenten an Meerschweinchen-Herzvorhöfen ($pD_2 = 10,10 \pm 0,13$).

3.2.2.2 Pilocarpin-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung

Wie für Acetylcholin und Iperoxo dargelegt wurde, wiesen diese Agonisten im [35 S]GTP γ S-Bindungsexperiment am M_3 -Rezeptor eine erheblich kleinere Wirksamkeit (pEC_{50}) auf als am M_2 -Rezeptor. In 3.2.1.3 wurde für Pilocarpin nur ein schwach partialagonistischer Effekt festgestellt. Um auszuschließen, dass in diesem Experiment mit 1 mM Pilocarpin eine Konzentration gewählt wurde, bei der noch keine Sättigung des Effekts auftritt, wurde eine komplette Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve aufgenommen. In Abbildung 58 ist die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve im Vergleich zur Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt. Die Kenngrößen beider Kurven sind der Tabelle 39 zu entnehmen.

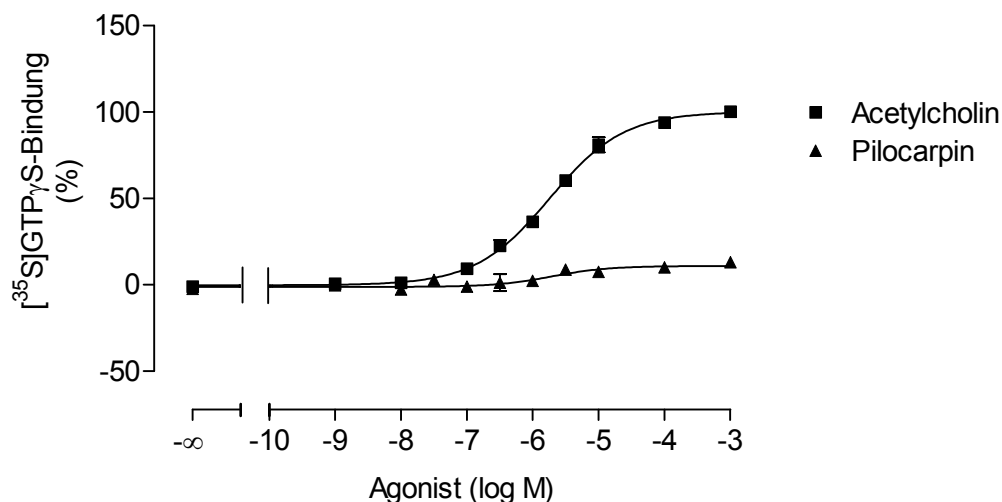


Abbildung 58: Vergleich von Pilocarpin- und Acetylcholin-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus CHO- M_3 -Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	E _{min} (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
Pilocarpin	5,71 \pm 0,24	-1 \pm 1	11 \pm 1*	0,62 \pm 0,29	4
Acetylcholin	5,76 \pm 0,06	2 \pm 2	97 \pm 2	0,77 \pm 0,04 [#]	4

Tabelle 39: Kenngrößen \pm Standardfehler der in Abbildung 58 dargestellten gemittelten Pilocarpin- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 38.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

[#] signifikant bessere Anpassung mit freiem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$)

Eine Anpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 0,77$ führte bei der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve zu einem signifikant besseren Ergebnis (F-Test, $p < 0,05$). Aufgrund des flachen Verlaufs und eines daraus resultierenden großen Standardfehlers des Hill-Koeffizienten konnte die Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve mit einem konstanten Hill-Koeffizienten von eins angepasst werden, obwohl der freie Hill-Koeffizient numerisch kleiner war als der, der für die Acetylcholin-Kurve beobachtet wurde. Zwischen den pEC₅₀-Werten von Pilocarpin und Acetylcholin konnte keine signifikante Abweichung gefunden werden (t-Test, $p > 0,05$). Das obere Plateau der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve unterschied sich mit $E_{max} = 11 \pm 1$ signifikant von dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve.

Der hier dargelegte Befund bestätigt, dass in den Experimenten zur Beeinflussung der [³⁵S]GTP γ S-Bindung durch rezeptorsättigende Konzentrationen muskarinischer Liganden (vgl. 3.2.1.3) mit 1 mM Pilocarpin eine Konzentration gewählt wurde, die im Bereich des oberen Plateaus der Pilocarpin-Konzentrations-Effekt-Kurve lag.

3.2.3 Von Agonisten abgeleitete Hybridverbindungen

3.2.3.1 Hybride aus W84 und Oxotremorin-M-artigen Agonisten

Aus der Reihe der W84-Hybride wurde mit DDT5 einerseits ein Hybrid ausgewählt, das sich am M₂-Rezeptor als Vollagonist erwies, während mit DDT1 ein am M₂-Rezeptor partialagonistisches Hybrid gewählt wurde. In Abbildung 59 sind die DDT1- und DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurven im Vergleich zur Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt.

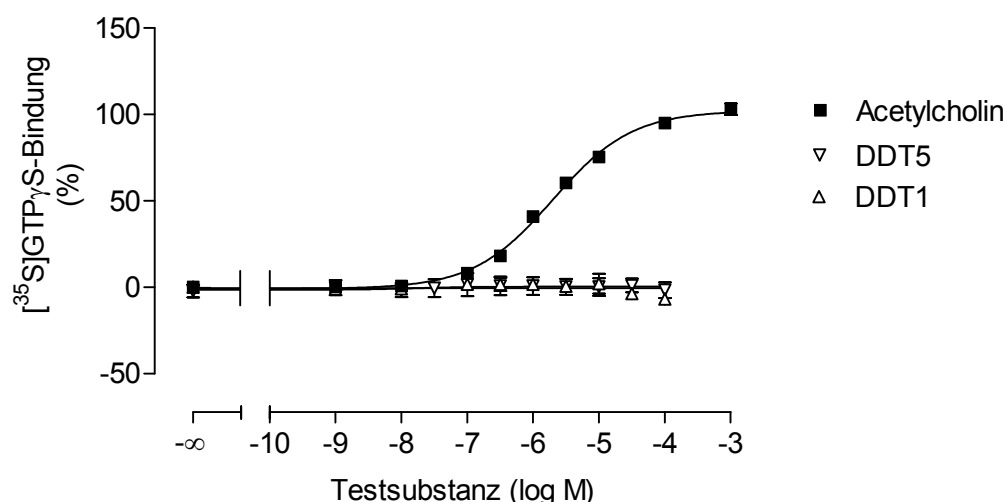


Abbildung 59: Vergleich von DDT1-, DDT5- und Acetylcholin-induzierter [³⁵S]GTP γ S-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₃-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP γ S-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), Hill-Koeffizient von Acetylcholin signifikant verschieden von eins (F-Test, $p < 0,05$), $n_H = 0,72$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus $n = 2 - 3$ (Kontrollkurve: $n = 5$) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Aus der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve, deren Anpassung mit einem freien Hill-Koeffizienten von $n_H = 0,72$ erfolgte, resultierte ein pEC_{50} -Wert von $5,70 \pm 0,05$ ($n = 5$). Die [³⁵S]GTP γ S-Bindung, die in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der Hybride bestimmt wurde, unterschied sich nicht signifikant von der basalen [³⁵S]GTP γ S-Bindung. Im untersuchten Konzentrationsbereich besaßen die beiden Hybride demnach keine agonistische Aktivität am M₃-Rezeptor. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu Befunden, die aus Organbadexperimenten resultierten (Disingrini et al., 2006). Am isolierten Meerschweinchen-Ileum zeigte DDT1 einen partialagonistischen und DDT5 einen vollagonistischen Effekt, jeweils in Verbindung mit einer schwachen Affinität ($pK_{B(DDT1)} = 4,57 \pm 0,03$) bzw. Wirksamkeit ($pEC_{50(DDT5)} = 4,32 \pm 0,25$).

3.2.3.2 Hybride aus Naphmethonium und Oxotremorin-M-artigen Agonisten

In Folgendem wurden zwei Naphmethonium-Hybride getestet. Dabei handelte es sich einerseits um die Verbindung MMH5-6, die am M₂-Rezeptor einen vollagonistischen Effekt aufwies und andererseits um MMH1-6, ein am M₂-Rezeptor partialagonistisches Hybrid. Die Konzentrations-Effekt-Kurven beider Substanzen sind in Abbildung 60 im Vergleich zur Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt. Die jeweiligen Kenngrößen sind der Tabelle 40 zu entnehmen.

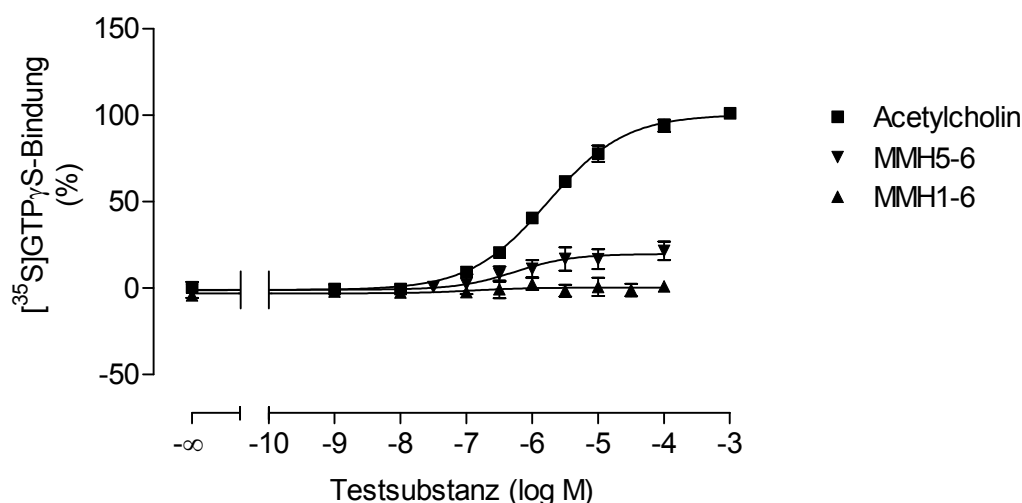


Abbildung 60: Vergleich von MMH1-6-, MMH5-6- und Acetylcholin-induzierter [³⁵S]GTP_γS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₃-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale [³⁵S]GTP_γS-Bindung. 0 % entspricht dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Tests substanz-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), konstanter Hill-Koeffizient von n_H = 1. **Datenpunkte:** Mittelwerte ± Standardfehler aus n = 3 - 4 (Kontrollkurve: n = 7) voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC ₅₀	E _{min} (%)	E _{max} (%)	n _H (frei)	n
MMH5-6	6,27 ± 0,10*	-1 ± 1	20 ± 1*	0,73 ± 0,12	3
Acetylcholin	5,80 ± 0,06	1 ± 2	96 ± 3	0,74 ± 0,04 [#]	7

Tabelle 40: Kenngrößen ± Standardfehler der in Abbildung 60 dargestellten gemittelten MMH5-6- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von n_H = 1. Zur Definition der Kenngrößen siehe Tabelle 38.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

[#] signifikant bessere Anpassung mit freiem Hill-Koeffizienten (F-Test, p < 0,05)

Aus der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve, deren Anpassung mit einem freien Hill-Koeffizienten von n_H = 0,74 erfolgte, resultierte ein pEC₅₀-Wert von 5,80 ± 0,06 (n = 7). Während MMH1-6 in vorliegendem Versuch keine agonistische Aktivität aufwies, wurde MMH5-6 als schwacher Partialagonist mit einem signifikant größeren pEC₅₀-Wert

als Acetylcholin identifiziert (t-Test, $p < 0,05$). In Bezug auf die Referenzsubstanz Acetylcholin war die MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve am M_3 -Rezeptor um etwa 0,5 Dekaden nach links verschoben. Dies lag in einer ähnlichen Größenordnung wie die am M_2 -Rezeptor mit 0,7 Dekaden beobachtete Linksverschiebung der MMH5-6-Kurve relativ zur Acetylcholin-Kurve.

4 Diskussion

4.1 Verknüpfung allosterischer und orthosterischer Liganden des muskarinischen Acetylcholinrezeptors zu Hybridverbindungen

Das Konzept der Hybrid-Substanzen beinhaltet die kovalente Verknüpfung eines allosterischen Strukturelements mit einem orthosterischen Antagonisten (AF-DX 384-Hybride) oder Agonisten (Hybride Oxotremorin-M-artiger Agonisten). Ziel dieser Hybridbildung ist einerseits eine Stabilisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes durch eine simultane Besetzung beider Haftareale des Rezeptors und andererseits eine erhöhte M₂-Selektivität durch Ausnutzung der M₂-Subtyp-Prävalenz allosterischer Modulatoren.

Aufgrund ihrer einfachen Struktur scheinen die Alkan-Bisammonium-Verbindungen W84 und Naphmethonium, deren Kenngrößen in Bezug auf den freien Rezeptor der Tabelle 41 zu entnehmen sind, besonders geeignet zu sein für eine Hybrid-Bildung. Während die Affinität von W84 im sub-mikromolaren Bereich liegt, weist Naphmethonium eine um etwa eine Dekade höhere Affinität auf. Selbst bei einer Reduktion des Naphmethonium-Moleküls zu dem relativ kleinen Molekül Seminaph (MM7a) konnte eine Affinität zum M₂-Rezeptor im mikromolaren Bereich beobachtet werden.

Die betrachteten Allosterie wiesen mit [³H]NMS eine nahezu neutrale Kooperativität auf. Diese reichte von schwach negativ für W84 bis schwach positiv für Naphmethonium. Im Gegensatz dazu verhielten sich die Allosterie mit den Agonisten Oxotremorin-M und Iperoxo stark negativ kooperativ bezüglich der Affinität. Die Beobachtung, dass Allosterie eine höhere Affinität zu Antagonist-besetzten Rezeptoren aufweisen als zu solchen deren orthosterisches Haftareal mit Vollagonisten besetzt ist, wurde bereits von Schmalenbach (2005) bzw. Großmüller et al. (2006) gemacht.

	$[^3\text{H}]\text{NMS}^1$		Oxotremorin- M^2		Iperoxo 2	
	pK_A	$\text{p}\alpha$	pK_A	$\text{p}\alpha$	pK_A	$\text{p}\alpha$
W84	6,43 $\pm 0,16$ (M. Mohr, 2004)	-0,45 $\pm 0,04$	6,79 $\pm 0,09$ (Schmalenbach, 2005)	-3,13 $\pm 0,08$	6,70 $\pm 0,12$ (diese Arbeit)	-3,00 $\pm 0,59$
Naphmethonium	7,73 $\pm 0,02$ (diese Arbeit)	0,37 $\pm 0,04$	7,30 $\pm 0,04$ (Schmalenbach, 2005)	-2,93 $\pm 0,07$	7,52 $\pm 0,07$ (diese Arbeit)	-2,33 $\pm 0,08$
Seminaph	5,50 $\pm 0,01$ (Sennwitz, 2006)	-0,02 $\pm 0,01$	-	-	5,47 $\pm 0,06$ (diese Arbeit)	$\leq -2,33$ $\pm 0,14$

Tabelle 41: Kenngrößen für die Interaktion der allosterischen Modulatoren W84, Naphmethonium und Seminaph mit unterschiedlichen orthosterischen Liganden. pK_A : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten des Allostere. $\text{p}\alpha$: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors.

1 Die Kenndaten resultierten aus Gleichgewichtsbindungsexperimenten mit dem Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins in Mg, Pi, TRIS-Puffer.

2 Die Kenndaten ergaben sich aus der „Schild-Analyse“ der Alloster-verursachten Rechtsverschiebung der Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurve im $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsexperiment. Die Untersuchungen wurden an Membransuspensionen aus CHO- M_2 -Zellen in HEPES-Puffer durchgeführt.

4.1.1 Das antagonistische AF-DX 384-Hybrid EHW412

Tränkle et al. (1998) fanden Hinweise, dass der M_2 -selektive Antagonist AF-DX 384 neben der orthosterischen Bindungsstelle auch Teile der allosterischen Bindungsstelle besetzt. Daraus resultierte die Annahme, dass sich die Subtyp-Prävalenz aus der besonderen Art der Interaktion ergibt. Gestützt wurde diese Vermutung durch Mutagenese-Studien (Marion Mohr, 2004). Diese ergaben, dass ein gewisser Anteil der M_2/M_5 -Selektivität von AF-DX 384 am freien Rezeptor auf die Aminosäure $\text{M}_2^{423}\text{Thr}$ sowie auf die konservierte Aminosäure $\text{M}_2^{22}\text{Glu}$, die beide Bestandteil der allosterischen Bindungsstelle sind, zurückgeführt werden kann.

AF-DX 384 lässt offensichtlich noch so viel Platz in der allosterischen Bindungsstelle, dass etwa ein halbes Molekül W84 binden kann (Ataie-Ghassemi, 2000). Mit dem Ziel einer besseren Nutzung der allosterischen Bindungsstelle und einer daraus resultierenden hohen Stabilität der Hybrid-Rezeptor-Komplexe wurden in unserem Arbeitskreis drei verschiedene Hybridmoleküle getestet. Diese enthielten das AF-DX 384-Strukturelement, das kovalent mit unterschiedlich langen W84-Fragmenten verbunden war. In Radioligand-bindungsstudien (M. Mohr, 2004), die analog zu dieser Arbeit an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins in einem Mg, Pi, Tris-Puffer durchgeführt

wurden, zeigte sich, dass die Affinität der Hybride zum freien Rezeptor im Vergleich zur Muttersubstanz AF-DX 384 statistisch signifikant vermindert war. Der pK_A -Wert von AF-DX 384 wurde von M. Mohr mit $pK_A = 8,14 \pm 0,09$ gefunden. Die pK_A -Werte der Hybride nahmen mit kürzer werdendem W84-Anteil von $pK_A = 6,83 \pm 0,10$ zu $pK_A = 5,89 \pm 0,05$ ab. Von M. Mohr wurde daher postuliert, dass die Hybride durch den W84-Rest gewissermaßen in der allosterischen Bindungsstelle festgehalten wurden, sodass der AF-DX 384-Anteil nicht sein orthosterisches Haftareal erreichen konnte.

In Fortführung dieser Arbeiten wurde hier mit EHW412 ein weiteres Hybrid getestet. Dieses stellt eine Strukturvariante des von M. Mohr getesteten Hybrids EHW141 dar, in der der Abstand zwischen dem Trizyklus und dem Piperidin-Ring um zwei Methylen-Gruppen erweitert wurde. Dadurch sollte eine bessere Überbrückung der beiden Bindungsstellen erreicht werden. Da die Strukturmodifikation innerhalb des AF-DX 384-Anteils erfolgte, stellt Hybrid EHW412 im engeren Sinne kein AF-DX 384-Derivat dar, sondern gehört zu einer neuen Substanzgruppe.

In vorliegender Arbeit wurde für EHW412 mit $pK_A = 7,01 \pm 0,05$ eine signifikant höhere Affinität zum M_2 -Rezeptor gefunden, als für das Hybrid EHW141, für das M. Mohr ein pK_A -Wert von $5,89 \pm 0,05$ ermittelte. Somit wurde durch das neue Hybrid zwar nicht die Affinität von AF-DX 384 erreicht, jedoch war der Affinitätsgewinn von über einer Dekade gegenüber EHW141 sehr deutlich. Dieser Befund bestätigte, dass die Verlängerung der AF-DX 384-Zwischenkette ein vielversprechender Ansatz ist, um zu antagonistischen Verbindungen zu gelangen, die sowohl Hybride bezüglich ihrer Struktur als auch der Bindungstopologie sind. Die hier dargestellten experimentellen Befunde konnten teilweise auch in moleküldynamischen Untersuchungen am dreidimensionalen Modell des M_2 -Rezeptors nachvollzogen werden (Jöhren, 2004). Dabei erwies sich eine Besetzung beider Bindungsstellen durch EHW141 als energetisch ungünstig gegenüber der alleinigen Besetzung der allosterischen Bindungsstelle. Ein Hybrid, das ähnlich dem EHW412 eine verlängerte AF-DX 384-Zwischenkette besaß, darüber hinaus aber noch ein längeres W84-Teilstück mit einem quartären Stickstoff sowie einem daran angeschlossenen Ethyl-Rest, lieferte das gegenteilige Resultat, nämlich eine energetisch günstigere Positionierung bei Belegung beider Bindungsstellen. Ein solches Hybrid konnte jedoch bisher nicht hergestellt werden.

4.1.2 Hybride Oxotremorin-M-artiger Agonisten

Die zweite Versuchsreihe wandte sich Hybriden zu, die aus einem Alkan-Bisammonium-Fragment sowie Oxotremorin-M bzw. davon abgeleiteten Agonisten bestanden. In diesem Fall sind neben der gegenseitigen Bindungshemmung der Einzelsubstanzen, noch die gegensätzlichen Eigenschaften bezüglich der Rezeptoraktivierung - bei den Allosteren handelt es sich um inverse Agonisten, bei den Orthosteren um Agonisten - zu beachten. [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperimente, in denen die funktionelle Konsequenz der Rezeptorbesetzung auf der ersten Ebene der Signaltransduktion gemessen wird, waren daher ein geeignetes Versuchssystem, um die Veränderungen der Rezeptoraktivierung durch die Hybrid-Bildung zu untersuchen.

Oxotremorin-M und seine Derivate besitzen zwar eine hohe Agonist-Aktivität, zeigen jedoch in funktionellen Untersuchungen an isolierten Organen keine Selektivität bezüglich der fünf Rezeptor-Subtypen des muskarinischen Acetylcholinrezeptors (Dallanoce et al., 1999; Barocelli et al., 2000). Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die besonders hohe Wirksamkeit des Oxotremorin-M-Derivats Iperoxo. Bei dieser Verbindung wurde der Pyrrolidin-2-on-1-yl-Rest des Oxotremorin-M gegen einen Isoxazolinyliether-Rest ausgetauscht. Im [³⁵S]GTP γ S-Bindungsexperiment an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen wurde für Iperoxo bei einem Maximaleffekt, der dem des Acetylcholins entsprach, ein pEC₅₀-Wert von $9,40 \pm 0,04$ gefunden. Für Oxotremorin-M wurde hingegen ein pEC₅₀-Wert von $8,18 \pm 0,09$ ermittelt. Dies entspricht einer „potency ratio“ von 1,2. Dieser Befund steht in Analogie zu Befunden aus Organbadexperimenten am isolierten Meerschweinchen-Herzvorhof, in denen aus den pD₂-Werten* eine „potency ratio“ von 1,3 berechnet werden konnte (Dallanoce et al., 1999).

Zunächst wurden zwei Hybrid-Reihen getestet, die analoge Anteile der W84- oder Naphmethonium-Struktur besaßen und sich jeweils nur im Agonist-Anteil unterschieden. Die beiden quartären Stickstoff-Atome des Moleküls waren dabei durch eine Hexyl-Zwischenkette verbunden (siehe Abbildung 61).

* pD₂: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. Die Bestimmung erfolgte mittels linearer Regression (Dallanoce et al., 1999).

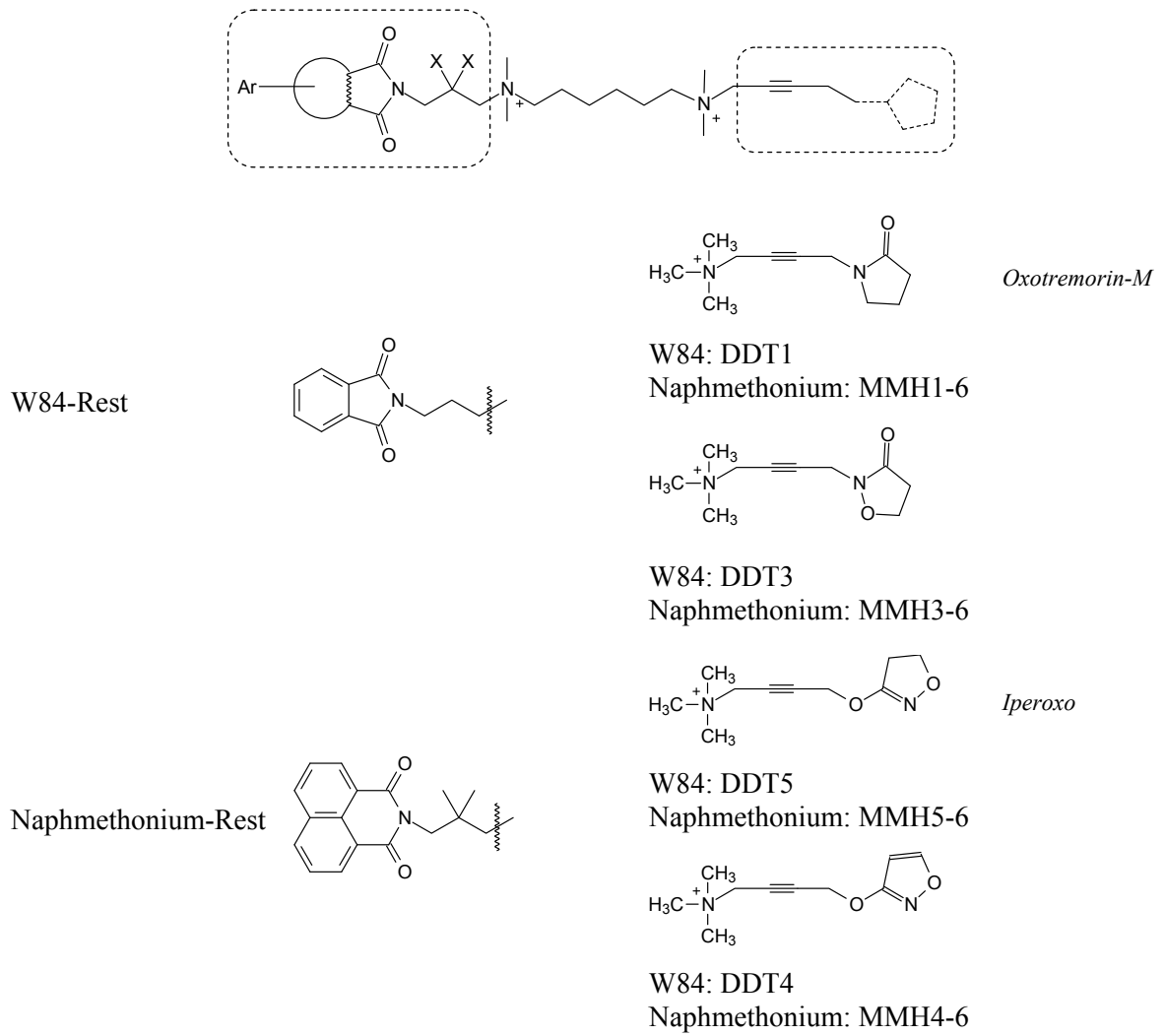
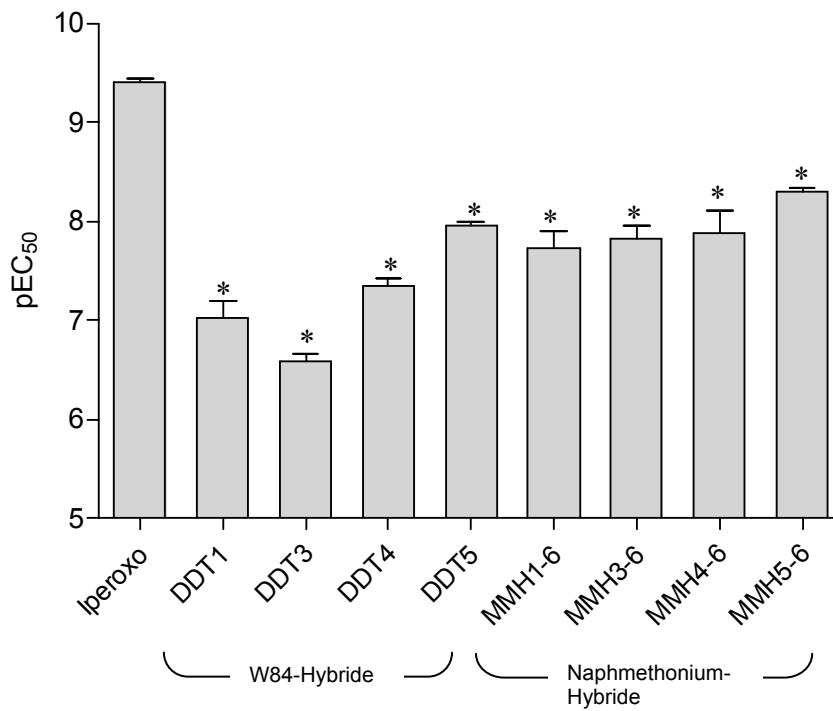


Abbildung 61: Schematische Übersicht über die W84- und Naphmethonium-abgeleiteten Hybride Oxotremorin-M-artiger Agonisten.

A



B

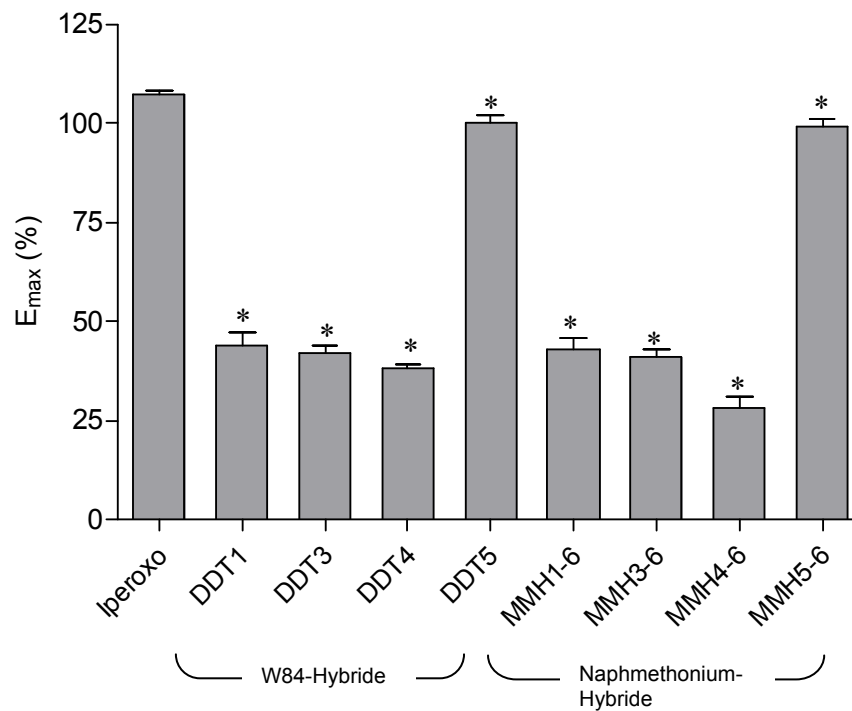


Abbildung 62: Vergleich der pEC₅₀- (A) und E_{max}-Werte (B) der W84- bzw. Naphmethonium-Hybride mit unterschiedlicher Agonist-Struktur. Die Kenngrößen stammten aus [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Iperoxo-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

Mit DDT5 und MMH5-6 konnte aus jeder der beiden Reihen ein Vollagonist identifiziert werden, also eine Substanz, die den gleichen Maximaleffekt (E_{max}) wie Acetylcholin aufwies. Dabei handelte es sich jeweils um Hybride, die die sehr aktive Iperoxo-Struktur enthielten. DDT5 und MMH5-6 erreichten zwar nicht die Wirksamkeit (pEC_{50}) der Muttersubstanz Iperoxo, dennoch wiesen sie einen um etwa eine halbe Dekade größeren pEC_{50} -Wert auf als der endogene Agonist Acetylcholin.

Bei den übrigen Hybriden, die entweder die Oxotremorin-M-Struktur selbst (DDT1, MMH1-6) oder eine damit verwandte Agonist-Struktur, die statt des Pyrrolidin-2-on-1-yl-Restes von Oxotremorin-M einen Isoxazolidin-3-on- (DDT3, MMH3-6) oder Isoxazolyl-Ether-Rest (DDT4, MMH4-6) besaß, enthielten, handelte es sich um schwache Partialagonisten. Während im Falle der W84-abgeleiteten Hybride die Wirksamkeit signifikant kleiner als die des Acetylcholins war, unterschied sich die Wirksamkeit der Naphmethonium-abgeleiteten Hybride nicht von der des Acetylcholins. Genauso wie die vollagonistischen Hybride, erreichten auch die partialagonistischen Verbindungen bei weitem nicht die Wirksamkeit von Iperoxo.

Im Hinblick auf die zwei unterschiedlichen Alloster-Strukturen lässt sich feststellen, dass die Naphmethonium-Hybride eine im Durchschnitt um 0,7 Dekaden höhere Wirksamkeit als die entsprechenden W84-Hybride aufwiesen. Somit findet sich der Affinitätsunterschied zwischen den beiden Allostereen (siehe Tabelle 41) bei den Hybriden in etwas abgeschwächter Form wieder. Interessanterweise kam es bei keinem der untersuchten Hybride zu einer vollständigen Auslöschung der intrinsischen Aktivität durch die kovalente Verknüpfung eines Agonisten mit einem Teil der allosterischen Antagonisten W84 bzw. Naphmethonium. Dies lässt darauf schließen, dass die Neigung der Hybride, eine aktive Rezeptorkonformation zu stabilisieren, größer ist, als die durch den Alloster-Anteil determinierte Eigenschaft zur Stabilisierung inaktiver Rezeptorkonformationen.

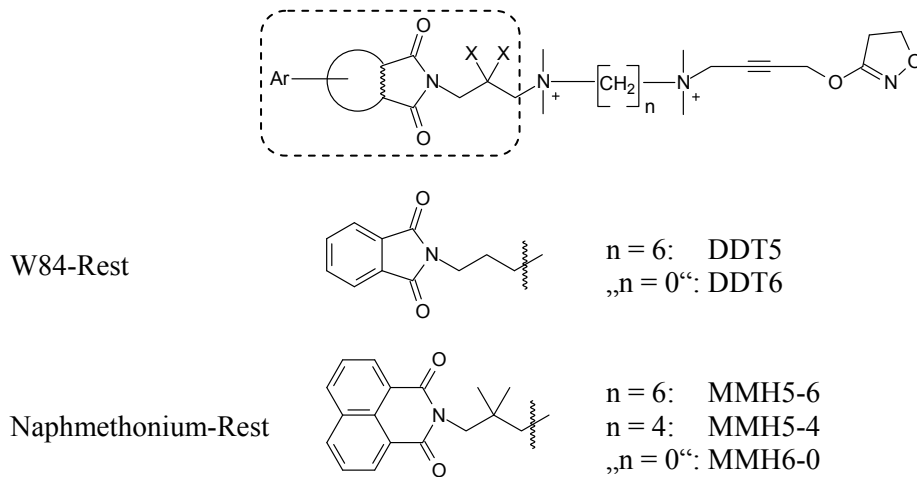


Abbildung 63: Schematische Übersicht über die W84- und Naphmethonium-abgeleiteten Iperoxo-Hybride mit unterschiedlich langer Zwischenkette. Der mit „n = 0“ bezeichneten Struktur fehlt zusätzlich ein quartärer Stickstoff.

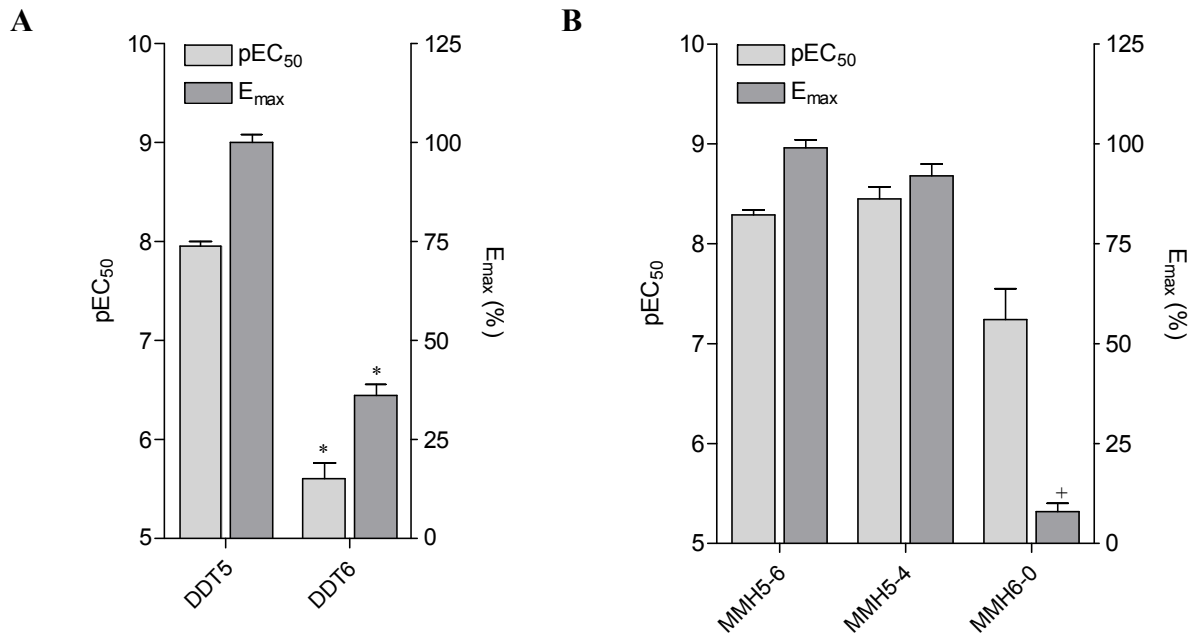


Abbildung 64: Vergleich der pEC₅₀- und E_{max}-Werte der W84- (**A**) bzw. Naphmethonium-Hybride (**B**) mit unterschiedlich großem Alloster-Anteil. Die Kenngrößen stammten aus [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden DDT5-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

+ signifikant Unterschied zu der entsprechenden MMH5-6-Kenngröße (t-Test, p < 0,05)

Bei einer Verkürzung der beiden vollagonistischen Iperoxo-abgeleiteten Hybride um einen quartären Stickstoff und die Hexyl-Zwischenkette (DDT6, MMH6-0) kam es zu einer drastischen Verminderung der intrinsischen Aktivität (E_{\max}) verbunden mit einer Abnahme der Wirksamkeit (pEC_{50} ; siehe Abbildung 64). Dabei wies das Naphmethonium-Hybrid wiederum einen höheren pEC_{50} -Wert auf als das W84-Hybrid. Hinsichtlich des Maximaleffekts ergab sich ein umgekehrter Befund. Während DDT6 noch einen moderaten Maximaleffekt zeigte, war der des MMH6-0 nur noch marginal. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die beiden Hybride in der allosterischen Bindungsstelle festgehalten wurden und wegen der starken Verkürzung des Moleküls die orthosterische Bindungsstelle nur noch eingeschränkt erreichten. Dies würde auch die unterschiedlichen Befunde in Bezug auf die intrinsische Aktivität erklären. Aufgrund der höheren Affinität der Muttersubstanz würde das Naphmethonium-Hybrid MMH6-0 stärker in der allosterischen Bindungsstelle zurückgehalten werden als das W84-Hybrid DDT6 und die intrinsische Aktivität wäre demzufolge geringer.

Aus der Reihe der Naphmethonium-Hybride stand mit der Verbindung MMH5-4 zusätzlich eine Substanz zur Verfügung, die im Vergleich zum MMH5-6 anstatt der Hexyl-Zwischenkette eine Butyl-Zwischenkette besaß. Bezogen auf MMH5-6 war der pEC_{50} -Wert zwar numerisch größer und der E_{\max} -Wert kleiner, jedoch waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$), sodass durch die Zwischenketten-Verkürzung die Charakteristik des MMH5-6 nicht verloren ging.

Um festzustellen, ob die Hybride weiterhin allosterische Eigenschaften besitzen, wurde im Rahmen dieser Arbeit in Radioligandbindungsstudien beispielhaft die Affinität des Hybrids MMH5-6 zum freien und zum [3 H]NMS-besetzten Rezeptor bestimmt. Dabei zeigte sich, dass das Hybrid wie die Muttersubstanz Naphmethonium in der Lage war, die [3 H]NMS-Dissoziation vollständig zu unterbinden, wobei die Affinität zum [3 H]NMS-besetzten Rezeptor im Vergleich zu Naphmethonium um etwa eine Dekade vermindert war. Dieser Befund ist ein Beleg dafür, dass das Hybrid in der Lage ist, die allosterische Bindungsstelle zu besetzen. Hinsichtlich der Affinität zum freien Rezeptor zeigte sich zwischen dem Hybrid und Naphmethonium kein signifikanter Unterschied. Im Gegensatz zu Naphmethonium besaß das Hybrid eine höhere Affinität zum freien als zum [3 H]NMS-besetzten Rezeptor, wodurch die für Naphmethonium gefundene schwach positive Kooperativität bei der Hybridbildung in eine schwach negative Kooperativität umgekehrt wurde. Interessant ist in diesem Zusammenhang die mit $pK_A = 7,63 \pm 0,14$ relativ hohe Affinität des Hybrids zum freien Rezeptor. Es ist anzunehmen, dass der Iperoxo-Anteil

einen wesentlichen Beitrag zur Affinität des Hybrids zum Rezeptor leistet, da der Alloster-Anteil im Hybrid nur ein Teilstück des Naphmethoniums darstellt. Bei einer Halbierung des Naphmethonium-Moleküls zum Seminaph, das dem Naphmethonium-Fragment im Hybrid recht nahe kommt, resultierte nämlich ein um etwa zwei Dekaden kleinerer pK_A -Wert (siehe Tabelle 41, Seite 138).

4.2 Interaktionsstudien der agonistischen Hybride mit allosterischen und orthosterischen Antagonisten am M₂-Rezeptor

Die in Abschnitt 4.1 beschriebenen Hinweise auf eine simultane Besetzung des allosterischen und orthosterischen Haftareals durch die agonistischen Hybride sollten noch weiter verifiziert werden. Dazu wurde der Einfluss allosterischer und orthosterischer Antagonisten auf die Konzentrations-Effekt-Kurven der Hybride im [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment untersucht. Die Art der Interaktion sollte Aufschluss über die Bindungstopologie bzw. die Art der Rezeptoraktivierung der Hybride geben.

Bei einem klassischen kompetitiven Antagonismus, d.h. Agonist und Antagonist konkurrieren um die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor, wird die Konzentrations-Effekt-Kurve eines Agonisten durch einen Antagonisten in der Weise parallel nach rechts verschoben, dass die Rechtsverschiebung proportional zur logarithmisch steigenden Konzentration des Antagonisten zunimmt. Die von Gaddum bzw. Schild Mitte des 20. Jahrhunderts entwickelten Verfahren zur Quantifizierung dieses Verhaltens sind heute noch ein gebräuchliches Mittel, um Antagonisten, Agonisten und Rezeptoren in funktionellen Experimenten zu klassifizieren (Gaddum, 1955; Arunlakshana und Schild, 1959). Bei einem kompetitiven Antagonismus resultiert aus der Schild-Auftragung eine Gerade mit einer Steigung von eins. Abweichungen hinsichtlich der Linearität oder der Steigung können unterschiedliche Ursachen haben, wobei eine davon das Vorliegen eines allosterischen Antagonismus ist (Kenakin, 1982; Kenakin, 1992; Christopoulos und Kenakin, 2002). Die ersten Belege eines allosterischen Mechanismus in Bezug auf muskarinische Acetylcholinrezeptoren beruhten auf dieser Art der Beweisführung (Lüllmann et al., 1969; Clark und Mitchelson, 1976). Aufgrund der Sättigbarkeit des Effekts eines allosterischen Modulators erreicht die Verschiebung der Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurve in Abhängigkeit vom Kooperativitätsfaktor α ein Maximum. Die Auswertung der Verschiebefaktoren erfolgt in einem solchen Fall unter Berücksichtigung des Ternären Komplex-Modells (Ehlert, 1988; Lanzafame et al., 1996).

Neben der oben beschriebenen Beeinflussung der Affinität orthosterischer Liganden, können Allosterie auch Einfluss auf die intrinsische Aktivität von Agonisten nehmen. Ist dies der Fall, kommt es zu einer Veränderung des oberen Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurve des Agonisten. Dabei kann die Kooperativität bezüglich der intrinsischen Aktivität sowohl positiver (Urwyler et al., 2001) als auch negativer (Litschig et al., 1999) Art sein.

4.2.1 Interaktion mit einem allosterischen Antagonisten

In der ersten Versuchsreihe wurde der Effekt allosterischer Antagonisten auf die Hybrid-vermittelte [³⁵S]GTPγS-Bindung untersucht. Mit DDT5 und MMH5-6 wurden die beiden Iperoxo-abgeleiteten vollagonistischen Hybride, mit DDT1 und MMH1-6 zwei von Oxotremorin-M abgeleitete partialagonistische Hybride für diese Untersuchungen gewählt. Als allosterische Interaktionspartner kamen entweder W84 (DDT1 und DDT5) oder Naphmethonium (MMH1-6 und MMH5-6) zum Einsatz, je nachdem von welchem Alloster sich die Hybride ableiteten. Darüber hinaus wurde der Effekt des stark verkürzten allosterischen Modulators Seminaph auf MMH5-6 untersucht. In allen Fällen bewirkte das Alloster eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurven der Hybride, ohne das obere Plateau maßgeblich zu beeinflussen. Dabei verhielten sich Alloster und Hybrid bezüglich der Affinität entweder stark negativ kooperativ oder sogar kompetitiv zueinander.

W84		
	pK_A	pα
DDT1 (Partialagonist)	6,79 ± 0,06	≤ -1,84 ± 0,07*
DDT5 (Vollagonist)	6,86 ± 0,06	≤ -2,71 ± 0,16*
Naphmethonium		
	pK_A	pα
MMH1-6 (Partialagonist)	7,31 ± 0,10	≤ -2,27 ± 0,08*
MMH5-6 (Vollagonist)	6,86 ± 0,09	-2,54 ± 0,21
Seminaph		
	pA₂	pα
MMH5-6	6,27 ± 0,29 (s = 1,17 ± 0,07)	≤ -2,65 ± 0,14*

Tabelle 42: Kenngrößen der Interaktion der allosterischen Modulatoren W84, Naphmethonium und Seminaph mit unterschiedlichen agonistischen Hybriden. **pK_A**: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten des Allosters. **pα**: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors. Bei den mit * gekennzeichneten Werten handelt es sich um den größten Verschiebefaktor aus der Schild-Auswertung, der eine Annäherung an pα darstellt. **pA₂**: Negativer dekadischer Logarithmus der Alloster-Konzentration, die eine Verschiebung der Agonist-Konzentrations-Effekt-Kurve um den Faktor zwei bewirkt. **s**: Steigung der Regressionsgeraden.

W84 schien den Effekt des vollagonistischen Hybrids DDT5 über den kompletten Konzentrationsbereich kompetitiv zu antagonisieren. Dies bedeutet, dass beide Verbindungen um die allosterische Bindungsstelle konkurrierten und eine Bildung ternärer Komplexe aus Hybrid, Alloster und Rezeptor ausblieb. Ein etwas anderes Bild ergab sich aus den Interaktionsexperimenten des allosterischen Modulators Naphmethonium mit dem zweiten vollagonistischen Hybrid MMH5-6. An dieser Stelle wurde eine stark negative Kooperativität zwischen Hybrid und Alloster beobachtet. Demnach kam es hier in Anwesenheit hoher Alloster-Konzentrationen zur Bildung ternärer Komplexe, bestehend aus MMH5-6, Naphmethonium und Rezeptor.

Bei der Untersuchung des Alloster-Effekts auf die Konzentrations-Effekt-Kurven der partialagonistischen Hybride DDT1 und MMH1-6 ergab sich aufgrund der geringeren Wirksamkeit (pEC_{50}) der Partialagonisten im Vergleich zu den oben beschriebenen vollagonistischen Hybriden das Problem, dass bei hohen Konzentrationen des Allosters das obere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve nicht erreicht wurde. Die Konzentrations-Effekt-Kurven der Hybride, die bei Alloster-Konzentrationen von 30 μ M und 100 μ M erhalten wurden, mussten daher von der Schild-Auswertung ausgeschlossen werden. In dem betrachteten Konzentrationsbereich resultierte bei der Interaktion von W84 mit DDT1 und Naphmethonium mit MMH1-6 jeweils das Bild eines kompetitiven Antagonismus, wobei die für W84 und Naphmethonium erhaltenen pK_A -Werte gut mit den von Schmalenbach (2005) in Interaktionsexperimenten mit Oxotremorin-M - der agonistischen Muttersubstanz der beiden Hybride - erhobenen Werten übereinstimmen (siehe Tabelle 41, Seite 138). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es auch hier bei Einsatz hoher Konzentrationen des Allosters zur Bildung ternärer Komplexe kommen würde.

Die von Seminaph verursachte Rechtsverschiebung der MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve zeigte ebenfalls keinen Sättigungseffekt. Die Schild-Gerade besaß allerdings eine Steigung, die signifikant größer als eins war (t-Test, $p < 0,05$), sodass aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse nicht der pK_A -Wert abgelesen werden konnte. Das bedeutet, dass Seminaph die MMH5-6-Konzentrations-Effekt-Kurve hier stärker nach rechts verschob als ein klassischer kompetitiver Antagonismus erwarten ließe. Ein solches Phänomen könnte beispielsweise durch eine kooperative Interaktion erklärt werden. Es ist jedoch nicht ganz auszuschließen, dass dieser Befund auf die Streuung des Messsystems zurückzuführen ist. Die schwache Affinität von Seminaph ($pK_A = 5,47 \pm 0,06$; vgl. 4.1) zu M_2 -Rezeptoren und eine stark negative Kooperativität mit MMH5-6 könnten den ausbleibenden Sättigungseffekt bei der Rechtsverschiebung der MMH5-6-Konzentrations-

Effekt-Kurve erklären. Durch eine stark negative Kooperativität würde es erst bei sehr hohen, hier nicht untersuchten Seminaph-Konzentrationen, zur Bildung ternärer Komplexe kommen. Die Befunde aus den Interaktionsexperimenten konnten zeigen, dass die Allosterie nur eine geringe Affinität zu Hybrid-besetzten M_2 -Rezeptoren aufweisen. Dies rechtfertigt die Annahme, dass die Hybride zusätzlich zur orthosterischen Bindungsstelle das allosterische Haftareal besetzten.

Allerdings fand Schmalenbach (2005) bei der Interaktion allosterischer Modulatoren mit orthosterischen Vollagonisten unabhängig von deren Struktur ebenfalls eine stark negative Kooperativität bezüglich der Affinität. Dabei korrelierten die mit dem Agonisten Acetylcholin erhaltenen Kooperativitäten nicht mit denen, die aus Interaktionsexperimenten mit [3 H]NMS resultierten. Daher wurde von Schmalenbach postuliert, dass die Konformation der allosterischen Bindungsstelle zwischen dem Acetylcholin- und dem NMS-besetzten Rezeptor sehr verschieden sein muss. Die in vorliegender Arbeit aus Interaktionsversuchen mit dem Vollagonisten Iperoxo erhaltenen Befunde knüpfen ebenfalls an die von Schmalenbach gemachte Beobachtung an (vgl. 4.1). Hinweise auf eine unterschiedliche räumliche Anordnung der allosterischen Bindungsstelle fanden auch Großmüller et al. (2006) in Radioligandbindungsstudien. Hier wiesen W84 und seine verkürzten Derivate divergierende Struktur-Wirkungs-Beziehungen zwischen dem [3 H]NMS- und dem [3 H]Oxo-M-besetzten Rezeptor auf.

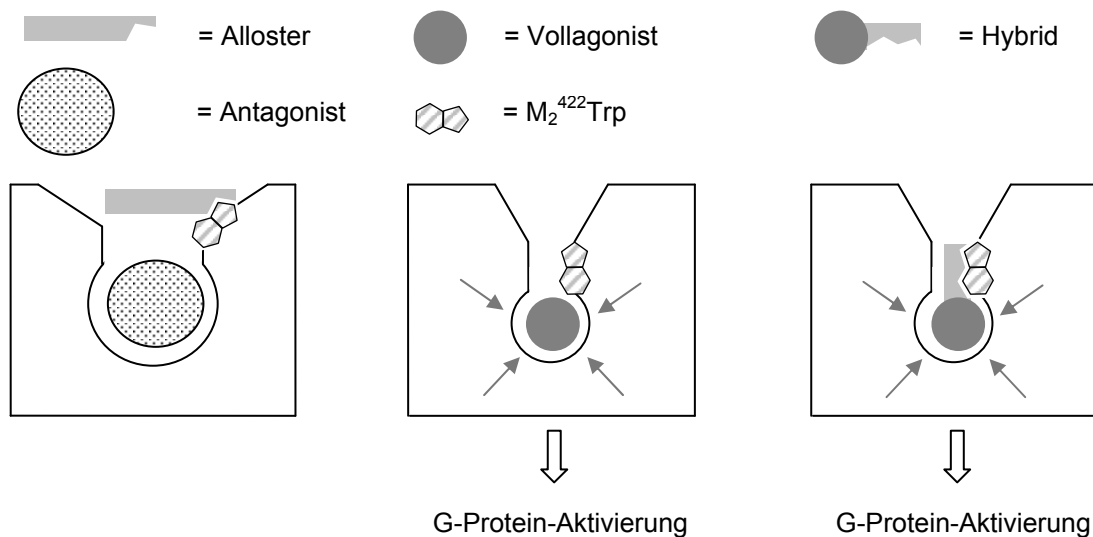


Abbildung 65: Hypothese zur räumlichen Lage allosterischer Epitope in Abhängigkeit von der Rezeptoraktivität. Alloster- und Antagonist-besetzter, inaktiver Rezeptor (links); Vollagonist-besetzter, aktivierter Rezeptor (Mitte); Hybrid-besetzter, aktivierter Rezeptor (rechts).

Es wird angenommen, dass es bei Eintritt eines Agonisten in seine orthosterische Bindungsstelle, die reich an hydrophoben aromatischen Aminosäuren ist, zu einem Zusammenziehen des „hydrophoben Käfigs“ kommt (Lu et al., 2002; vgl. Abbildung 65, Mitte). Die am Übergang von der allosterischen zur orthosterischen Bindungsstelle gelegene, konservierte Aminosäure $M_2^{422}\text{Trp}$ vermittelt eine Basisaffinität allosterischer Modulatoren am inaktiven Rezeptor (Prilla et al., 2006, vgl. Abbildung 65, links). Aktuelle Untersuchungen (Jäger et al., 2007) zeigen, dass die gleiche Aminosäure aber auch die Bindung des Vollagonisten Acetylcholin an den Rezeptor fördert. Bei dem Austausch $M_2^{422}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ verlieren sowohl Naphmethonium als auch Acetylcholin an Affinität. Darüber hinaus bewirkt diese Mutation eine Abschwächung der stark negativen Kooperativität zwischen diesen beiden Liganden. Die Autoren schlussfolgern daher, dass $M_2^{422}\text{Trp}$ infolge der Bindung eines Vollagonisten der allosterischen Bindungsstelle „entzogen“ und diese dadurch in ihrer Konformation verändert wird. Daher kann hier nicht sicher resümiert werden, dass die starke Bindungshemmung zwischen Alloster und Hybrid tatsächlich auf der Konkurrenz um das allosterische Haftareal beruht. Möglicherweise stellt die „Zerstörung“ der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ durch den Hybrid-Agonisten die eigentliche Ursache für die niedrige Affinität der Allosteren zum Hybrid-besetzten Rezeptor dar. Das heißt aber auch, dass es den Hybriden besser als reinen Allosteren gelingen müsste, allosterische Epitope zu erreichen. Durch die kovalente Verknüpfung mit dem Agonisten kann der Alloster-Anteil der Hybride das allosterische Haftareal gewissermaßen vom Inneren des Rezeptors her tangieren und dem Agonisten auf diese Weise zu Subtypselektivität verhelfen (vgl. Abbildung 65, rechts).

4.2.2 Interaktion mit einem orthosterischen Antagonisten

In der zweiten Versuchsreihe wurde die Interaktion von Atropin mit den vollagonistischen Hybriden DDT5 und MMH5-6 untersucht. Atropin ist ein kompetitiver Antagonist an der orthosterischen Bindungsstelle, der die Konzentrations-Effekt-Kurven konventioneller orthosterischer Agonisten parallel ohne Auftreten eines Sättigungseffekts nach rechts verschiebt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei der Interaktion von Atropin mit den Hybriden zur Bildung ternärer Komplexe, bestehend aus Atropin, Hybrid und Rezeptor, kam. Daraus resultierte eine negative Kooperativität sowohl hinsichtlich der intrinsischen Aktivität als auch der Affinität der Hybride.

	Atropin			
	pK_B	pα	p(α·K_B)	pIC₅₀
DDT5	8,43 ± 0,04	-2,36 ± 0,24	6,07	6,05 ± 0,05
MMH5-6	8,30 ± 0,17	-0,81 ± 0,13	7,49	7,32 ± 0,05

Tabelle 43: Kenngrößen des orthosterischen Antagonisten Atropin, die aus der Interaktion mit unterschiedlichen agonistischen Hybriden resultierten. **pK_B**: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von Atropin. **pα**: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors. **p(α·K_B)**: Affinität von Atropin zum Hybrid-besetzten Rezeptor. **pIC₅₀**: Negativer dekadischer Logarithmus der Atropin-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Reduktion des Agonist-Maximaleffekts führt.

Die sich in einer Abnahme des Hybrid-induzierten Maximaleffekts (E_{max}) bis auf das Niveau der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung äußernde negative Kooperativität der Aktivierung resultierte wahrscheinlich aus einer Konkurrenz zwischen Atropin und dem Agonist-Anteil der Hybride um die orthosterische Bindungsstelle. Die Atropin-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Reduktion des Hybrid-Maximaleffekts führte, konnte als pIC₅₀-Wert angegeben werden. Da die allosterische Bindungsstelle im Atropin-gebundenen Rezeptor frei ist, ist es möglich, dass die Hybride mit ihrem allosterischen Anteil an den Rezeptor binden. Eine negative Kooperativität der Bindung zwischen dem Alloster-Anteil des Hybrids und Atropin erklärt, warum die Atropin-induzierte Rechtsverschiebung der Hybrid-Konzentrations-Effekt-Kurve einen Sättigungseffekt aufwies. Der Term p(α·K_B) gibt die Atropin-Konzentration an, bei der die Konzentration ternärer Komplexe halbmaximal ist. Die Werte, die sich bei den Interaktionsexperimenten beider Hybride ergaben, stimmen gut mit dem jeweiligen pIC₅₀-Wert zur Aufhebung der intrinsischen Aktivität überein. Damit konnte der Beleg erbracht werden, dass die Senkung des Hybrid-Maximaleffekts tatsächlich auf die Bildung ternärer Komplexe zurückzuführen war.

Die Datenanalyse der Verschiebefaktoren gemäß dem Ternären Komplex-Modell ließ erkennen, dass das Naphmethonium-Hybrid MMH5-6 eine höhere Affinität zum Atropin-besetzten Rezeptor aufwies als das W84-Hybrid DDT5. Dieser Befund ähnelt der Interaktion der allosterischen Muttersubstanzen mit dem Atropin-ähnlichen Antagonisten N-Methylscopolamin. Naphmethonium wies in Radioligandbindungsstudien eine um zwei Dekaden höhere Affinität zu NMS-besetzten Rezeptoren auf als W84.

Um festzustellen, ob NMS einen ähnlichen Einfluss auf den Hybrid-Effekt hat wie Atropin, wurde exemplarische der Einfluss von NMS in einer einzelnen Konzentration auf die DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve getestet. Es zeigte sich, dass auch NMS sowohl zu

einer Rechtsverschiebung als auch zu einer Senkung des oberen Plateaus der DDT5-Konzentrations-Effekt-Kurve führte. Darüber hinaus wurde die NMS-Konzentration bestimmt, die zu einer halbmaximalen Reduktion des Effekts einer sättigenden Konzentration des Hybrids führte. Da die vorherigen Versuche eine gute Übereinstimmung zwischen dem pIC_{50} - und dem $p(\alpha \cdot K_B)$ -Wert zeigten, wurde auch hier der mit $6,77 \pm 0,06$ gefundene pIC_{50} -Wert als Maß für die Affinität von NMS zum Hybrid-besetzten Rezeptor angenommen. Somit wies NMS eine geringfügig aber signifikant größere Affinität zum DDT5-besetzten Rezeptor auf als Atropin.

4.2.3 Erörterungen zur Topologie der Hybride hinsichtlich Rezeptorbindung und -aktivierung

Die in vorliegender Arbeit erhaltenen Befunde zur Interaktion der Hybride mit einem orthosterischen Antagonisten fügen sich gut in ein von May et al. (2007) entwickeltes Modell zur Beschreibung der Hybridbindung an den Rezeptor ein. Dabei handelt es sich um eine Erweiterung des Ternären Komplex-Modells nach Ehlert (1988).

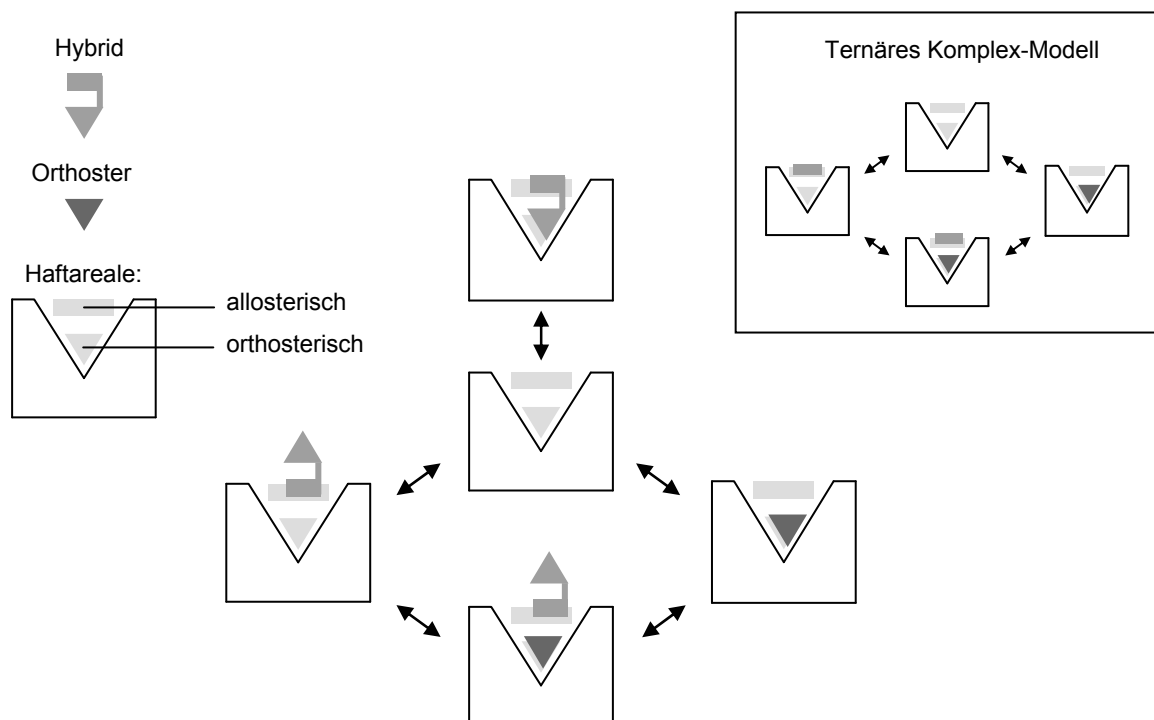


Abbildung 66: Erweiterung des Ternären Komplex-Modells gemäß der Darstellung nach Mohr et al., 2003 (Kasten) um den dualen Bindungsmodus der Hybride (May et al., 2007).

Das Modell umfasst anstatt der von Ehlert beschriebenen vier Rezeptorbesetzungszustände noch einen weiteren, dualen Besetzungszustand, in dem das Hybrid neben der allosterischen Bindungsstelle auch die orthosterische Bindungsstelle besetzt. Über den Zwischenschritt des freien Rezeptors wird der Orthoster-Anteil des Hybrids durch einen orthosterischen Liganden aus der orthosterischen Bindungsstelle „verdrängt“, wodurch es zur Bildung ternärer Komplexe aus Alloster-Anteil des Hybrids, Orthoster und Rezeptor kommt.

Gemäß der Hybrid-Theorie – Agonist-vermittelte intrinsische Aktivität und Alloster-vermittelte Subtypselektivität – ist nur über den dualen Bindungsmodus eine Rezeptoraktivierung möglich. Die Beobachtung, dass die Verdrängung der Hybride aus der orthosterischen Bindungsstelle durch den Antagonisten Atropin zu einem Verlust der intrinsischen Aktivität führte, kann zu einer Abgrenzung der Hybride von allosterischen Agonsiten herangezogen werden. Langmead et al. (2006) beobachteten nämlich bei der Interaktion von Atropin mit AC-42, einem M₁-selektiven allosterischen Agonisten, zwar eine negative Kooperativität hinsichtlich der Bindung, aber nicht bezüglich der Aktivität. Es bleibt jedoch zu diskutieren, inwieweit der von Langmead et al. erhobene Befund mit aktuellen Vorstellungen zur Rezeptoraktivierung in Einklang zu bringen ist. Es wird angenommen, dass es bei der Rezeptoraktivierung zu einer Bewegung der transmembranären Domänen TM VI und TM VII relativ zu TM III kommt, wobei sich die transmembranären Domänen im extrazellulären Bereich aufeinander zu bewegen (Schwartz et al., 2006). Während Agonisten die aktive Rezeptorkonformation stabilisieren, wirken Antagonisten stabilisierend auf inaktive Rezeptorkonformationen. Bei gleichzeitiger Bindung des Antagonisten Atropin und des Agonisten AC-42 ist eine ungehinderte Rezeptoraktivierung eher unwahrscheinlich. Ein weiterer Befund, der einen allosterischen Agonismus der Hybride ausschließt, ist der, der aus dem Interaktionsexperiment des Naphmethonium-Hybrids MMH5-6 mit dem allosterischen Modulator Naphmethonium resultierte. Im Falle eines allosterischen Agonismus des Hybrids wäre ein kompetitiver Antagonismus zu erwarten gewesen. Die Interaktion war hier jedoch kooperativer Art.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Befunde lassen eine Rezeptoraktivierung über die orthosterische Bindungsstelle naheliegender erscheinen als eine Aktivierung über die allosterische Bindungsstelle. Zur weiteren Absicherung dieser Hypothese könnten [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente an M₂-Rezeptormutanten beitragen. Spalding et al.

(2006) stellten in funktionellen Experimenten fest, dass die Aktivierung des M₁-Rezeptors durch allosterische Agonisten nicht von Aminosäuren abhängig ist, über die Carbachol, ein orthosterischer Agonist, die Rezeptoraktivierung vermittelt. In Umkehrung der von Spalding et al. gemachten Beobachtung wäre eine Beeinträchtigung der Hybrid-vermittelten Rezeptoraktivierung bei Mutation orthosterischer Epitope ein weiterer Beweis dafür, dass die Hybride keine allosterischen Agonisten sind. Für diese Untersuchungen würde sich beispielsweise die Mutation der in der dritten transmembranären Domäne gelegenen Aminosäure M₂ Tyrosin¹⁰⁴ anbieten, die an der Ausbildung des aromatischen Käfigs für Acetylcholin und Oxotremorin-M beteiligt ist (Jöhren, 2004).

May et al. (2007) diskutieren außerdem einige allgemeine Aspekte, die bei der Konzeption von Hybriden zu beachten sind. Sie postulieren, dass der duale Bindungsmodus der Hybride im Allgemeinen eine höhere Affinität zum Rezeptor aufweist als die alleinige Besetzung der allosterischen Bindungsstelle. Dabei stützen sich die Autoren auf Überlegungen von Portoghese (1989) bezüglich bivalenter Liganden. Dieser geht davon aus, dass die Bindung eines bivalenten Liganden an zwei benachbarte Bindungsstellen als ein Prozess angesehen werden kann, bei dem zunächst die Anheftung eines Bindungselements an nur ein Haftareal erfolgt. Dadurch wird das andere Bindungselement in die Nähe des zweiten Haftareals gebracht, was als eine lokale Konzentrationserhöhung des freien Bindungselements zu betrachten ist. In der Folge kommt es zu einer Bevorzugung des dualen Bindungsmodus. May et al. geben zu bedenken, dass eine stark positive Kooperativität des Hybrids mit einem orthosterischen Liganden jedoch dazu führen kann, dass das Hybrid bevorzugt im allosterischen Bindungsmodus an den Orthoster-besetzten Rezeptor bindet. Unter der Voraussetzung, dass das Ziel der Hybridbildung eine Ansteuerung der orthosterischen Bindungsstelle ist, während über die allosterische Bindungsstelle Selektivität erreicht werden soll, sprechen sie die Empfehlung aus, dass für die allosterische Komponente des Hybrids entweder eine negative, neutrale oder nur eine schwach positive Kooperativität zu fordern ist. Die Autoren berücksichtigen jedoch nicht, dass zwischen der artifiziellen Situation eines Radioantagonist-Bindungsversuches und der physiologischen Situation in Gegenwart von Acetylcholin zu unterscheiden ist. Wie bereits dargestellt wurde, interagierten selbst Förderer der Antagonistbindung stark negativ kooperativ mit Vollagonisten wie Acetylcholin. Eine entsprechende Hybrids substanz würde dementsprechend wenig Neigung haben, ternäre Komplexe mit Acetylcholin-besetzten Rezeptoren zu bilden und somit nur allosterisch zu binden. Auf der anderen Seite würde die negative Kooperativität zwischen antagonistischen Allosteren und agonistischen

Orthosteren erklären, weshalb entsprechende Hybride gegenüber dem orthosterischen „Mutteragonisten“ an Affinität einbüßen. Deshalb ist es auch nicht weiter verwunderlich, dass die Hybride eine im Vergleich zu den Oxotremorin-M-artigen Agonisten verminderte Wirksamkeit (pEC_{50}) aufwiesen.

4.3 Erörterungen zur M₂/M₃-Selektivität der Hybride Oxotremorin-M-artiger Agonisten

Die Aktivität der Hybride am M₃-Rezeptor unterschied sich deutlich von der am M₂-Rezeptor beobachteten Hybrid-Aktivität. Als einzige der vier untersuchten Verbindungen führte MMH5-6 zu einer signifikanten Erhöhung der [³⁵S]GTPγS-Bindung über das basale Niveau. Allerdings betrug der MMH5-6-induzierte Maximaleffekt nur 20 %, während diese Verbindung ein Vollagonist am M₂-Rezeptor war. Der pEC₅₀-Wert war ebenfalls zu dem am M₂-Rezeptor erhaltenen pEC₅₀-Wert signifikant vermindert (t-Test, p < 0,05). MMH5-6 verhielt sich somit am M₃-Rezeptor als schwacher Partialagonist. DDT1, DDT5 sowie MMH1-6 waren hingegen nicht in der Lage die [³⁵S]GTPγS-Bindung zu erhöhen.

Allerdings werfen die mit den Agonisten Acetylcholin und Iperoxo erhaltenen Unterschiede der pEC₅₀-Werte von etwa zwei Dekaden zwischen dem M₂- und M₃-Rezeptor die Frage auf, ob [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente an Membranen von transfizierten CHO-Zellen einen direkten Vergleich von Agonist-Aktivitäten zwischen M₂- und M₃-Rezeptoren erlauben. Während der M₂-Rezeptor bevorzugt an G-Proteine des Subtyps G_{i/o} koppelt, vermittelt der M₃-Rezeptor sein Signal primär über G-Proteine des Subtyps G_{q/11} (Caulfield und Birdsall, 1998; Eglén, 2005). Es ist bekannt, dass G-Proteine vom Subtyp G_{q/11} einen geringeren basalen GTP-Umsatz haben als der Subtyp G_{i/o} (Smrcka et al., 1991; Cussac et al., 2002; Milligan, 2003). Akam et al. (2001) konnten zeigen, dass CHO-Zellen alle vier G-Protein-Subtypen in ähnlichen Konzentrationen exprimieren. Das bedeutet, dass im [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment an M₃-Rezeptoren das schwache Signal der G_{q/11}-Proteine durch die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung an G_{i/o}-Proteine überdeckt werden kann und es dadurch zu einer Verschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve kommen könnte, die so an einem isolierten Organ nicht beobachtet wird.

Darüber hinaus spielt bei funktionellen Experimenten die Stöchiometrie zwischen Rezeptoren und G-Proteinen eine bedeutende Rolle (Kenakin, 1997). Jakubík et al. (1998) testeten die Carbachol-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung an künstlichen Membranen mit verschiedenen M₂-Rezeptor / G_o-Protein-Mengenverhältnissen. Dabei zeigte sich, dass mit steigender Rezeptordichte der pEC₅₀-Wert bzw. die Wirksamkeit abnahm. Die Rezeptordichte war bei den hier verwendeten Membransuspensionen aus CHO-M₃-Zellen fast dreimal so hoch wie bei Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. Da wie oben erläutert in CHO-Zellen alle vier G-Protein-Subtypen in ähnlichen Konzentrationen vorliegen, ist es

möglich, dass hier der Quotient aus M₃-Rezeptor und G_{q/11}-Protein viel größer war als der Quotient aus M₂-Rezeptor und G_{i/o}-Protein.

Da eine Messsystem-bedingte Ursache für die Unterschiede der pEC₅₀-Werte an M₂- und M₃-Rezeptoren nicht auszuschließen ist, erschien es daher sinnvoll, nicht nur den Maximaleffekt (E_{max}), sondern auch den pEC₅₀-Wert auf den Standardagonisten Acetylcholin zu beziehen, um einen Vergleich zwischen den beiden Rezeptor-Subtypen vorzunehmen. Dies erfolgte in Form der Berechnung der sogenannten „potency ratio’s“ (Δ). Diese sind für das Hybrid MMH5-6 der untenstehenden Tabelle zu entnehmen.

	M ₂			M ₃		
	pEC ₅₀	Δ(pEC ₅₀)	E _{max}	pEC ₅₀	Δ(pEC ₅₀)	E _{max}
Acetylcholin	7,64 ± 0,11	0,65	103 ± 4	5,80 ± 0,06	0,47	96 ± 3
MMH5-6	8,29 ± 0,05		99 ± 2	6,27 ± 0,10		20 ± 1

Tabelle 44: Vergleich der am CHO-M₂- und CHO-M₃-Rezeptorsystem erhaltenen pEC₅₀-Werte für Acetylcholin und MMH5-6. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration, die zu einer halbmaximalen [³⁵S]GTPγS-Bindung führt. **Δ(pEC₅₀):** Differenz aus den pEC₅₀-Werten von MMH5-6 und Acetylcholin. **E_{max}:** Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve).

Der Wirksamkeitsunterschied zwischen MMH5-6 und Acetylcholin ist am M₂- und M₃-Rezeptor nahezu gleich, während sich die E_{max}-Werte erheblich unterscheiden. Offenbar wies diese Verbindung in den [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten an CHO-Membranen eine M₂/M₃-Subtypselektivität bezüglich der intrinsischen Aktivität auf.

In dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Elisabetta Barocelli aus Parma (Italien) wurden die Hybride an isolierten Organen untersucht. Während als Modellsystem für den M₂-Rezeptor Herzvorhöfe von Meerschweinchen verwendet wurden, kam als Modell für den M₃-Rezeptor das Meerschweinchen-Ileum zum Einsatz. In Tabelle 45 sind die Befunde, die aus den Organbadexperimenten resultierten, für vier Hybride zusammengefasst und den in dieser Arbeit in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten an Membransuspensionen aus CHO-M₂- und CHO-M₃-Zellen erhobenen Daten gegenübergestellt worden.

	M₂		M₃	
	Disingrini et al., 2006 bzw. mündliche Mitteilung Prof. Dr. Barocelli	diese Arbeit	Disingrini et al., 2006 bzw. mündliche Mitteilung Prof. Dr. Barocelli	diese Arbeit
DDT1	$pK_B = 6,31 \pm 0,24$ i.a. = 0	$pEC_{50} = 7,02 \pm 0,18$ $E_{max} = 44 \pm 3$	$pK_B = 4,57 \pm 0,03$ i.a. = 29 ± 6	keine Aktivität
DDT5	$pEC_{50} = 7,16 \pm 0,10$ i.a. = 87 ± 4	$pEC_{50} = 7,52 \pm 0,03$ $E_{max} = 100 \pm 2$	$pEC_{50} = 5,81 \pm 0,08$ i.a. = 99 ± 5	keine Aktivität
MMH1-6	$pK_B = 6,80 \pm 0,12$ i.a. = 0	$pEC_{50} = 7,72 \pm 0,18$ $E_{max} = 43 \pm 3$	$pEC_{50} = 6,25 \pm 0,07$ i.a. = 45 ± 5	keine Aktivität
MMH5-6	$pEC_{50} = 8,39 \pm 0,42$ i.a. = 99 ± 1	$pEC_{50} = 8,29 \pm 0,05$ $E_{max} = 99 \pm 2$	$pEC_{50} = 7,58 \pm 0,14$ i.a. = 81 ± 7	$pEC_{50} = 6,27 \pm 0,10$ $E_{max} = 20 \pm 1$

Tabelle 45: Gegenüberstellung der Befunde aus Organbadexperimenten (Disingrini et al., 2006 bzw. mündliche Mitteilung von Prof. Dr. Barocelli, Parma) an Meerschweinchen-Herzvorhöfen als Modell für den M₂-Rezeptor bzw. Meerschweinchen-Ileum als Modell für den M₃-Rezeptor und [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten an Membransuspensionen aus CHO-M₂- und CHO-M₃-Zellen (diese Arbeit). **pK_B**: Apparente Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Hybrids; ermittelt nach der Methode von Furchgott, (1972). **i.a.**: Intrinsische Aktivität; Quotient aus dem Maximaleffekt der Testsubstanz und dem des Referenz-Agonisten in Prozent. **pEC₅₀**: Negativer dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration, die zu einem halbmaximalen Effekt führt. **E_{max}**: Maximale Hybrid-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung im Verhältnis zur Acetylcholin-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung in Prozent.

Bei Betrachtung der Daten für den M₂-Rezeptor ist festzustellen, dass die Iperoxo-abgeleiteten Hybride DDT5 und MMH5-6 sowohl in dieser Arbeit als auch in den Organbadexperimenten als Vollagonisten identifiziert werden konnten, wobei die in beiden Systemen gefundenen Wirksamkeiten (pEC₅₀) recht gut übereinstimmen. Im Fall der Hybride DDT1 und MMH1-6 bestehen jedoch Abweichungen zwischen den Befunden. Während sich die beiden Substanzen in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten als schwache Partialagonisten erwiesen, wurden diese im Organbad als Antagonisten identifiziert. Die isolierte Betrachtung der mit M₂-Rezeptoren erhaltenen Befunde führt zu der Annahme, dass [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente an M₂-Rezeptoren sensitiver sind als Organbadversuche am Meerschweinchen-Herzvorhof.

Am M₃-Rezeptor waren die Unterschiede zwischen den Ergebnissen aus beiden Testsystemen stärker ausgeprägt. Im Organbadexperiment verursachten alle Hybride einen Effekt. Dabei erwiesen sich auch hier die beiden Iperoxo-abgeleiteten Verbindungen DDT5 und MMH5-6 annähernd als Vollagonisten, wobei der pEC₅₀-Wert jeweils um mehr als eine Dekade kleiner war als der am M₂-Rezeptor beobachtete pEC₅₀-Wert. Somit

wiesen diese Hybride im Organbadversuch eine Selektivität hinsichtlich der Wirksamkeit auf. DDT1 und MMH1-6 zeigten hier einen schwach partialagonistischen Effekt. Wie zu Beginn des Abschnitts bereits dargestellt, besaß im [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment MMH5-6 als einzige Verbindung eine geringe Aktivität am M₃-Rezeptor, alle anderen getesteten Hybride zeigten hier keinen Effekt. Mit MMH5-6 handelte es sich um die Substanz, die bisher in allen Testsystemen die höchste Wirksamkeit aufwies. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die zu den Organbadversuchen abweichenden Befunde durch das Messsystem bedingt sind.

Im [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment kam es wie eingangs erläutert zu einer generellen Verschiebung der pEC₅₀-Werte zwischen M₂- und M₃-Rezeptor. Da am Meerschweinchen-Ileum für die Hybride niedrigere Affinitäten gefunden wurden als am Meerschweinchen-Herzvorhof, wäre es denkbar, dass die im [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperiment eingesetzten Konzentrationen nicht ausreichten, um einen Effekt festzustellen. Diese Überlegung erklärt jedoch nicht den niedrigen Maximaleffekt von MMH5-6 in Bezug auf den Standardagonisten Acetylcholin. Eine niedrigere intrinsische Aktivität könnte durch einen Partialagonismus des Hybrids, das heißt eine Stabilisierung aktiver und inaktiver Rezeptorkonformationen, am M₃-Rezeptor erklärt werden. Darüber hinaus sind aber auch methodische Ursachen in Erwägung zu ziehen. Aufgrund der Irreversibilität der [³⁵S]GTPγS-Bindung kommt es bei diesen Versuchen nicht zu einer Gleichgewichtseinstellung. Daher spielt der Inkubationszeitraum eine entscheidende Rolle. In der Literatur wird berichtet, dass basale und Agonist-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung unterschiedlichen Kinetiken folgen (Senogles et al., 1990; Munshi et al., 1991; Negishi et al., 1993). Falls unter dem Einfluss von MMH5-6 die [³⁵S]GTPγS-Bindung im Vergleich zur Acetylcholin-induzierten verlangsamt wäre, käme es zu dem hier beobachteten Phänomen. Darüber hinaus sind Hybride möglicherweise ihre eigenen Dissoziationsverzögerer. Um einen Effekt hervorzurufen, müssen Agonisten mit dem Rezeptor assoziieren, aber auch wieder schnell dissoziieren, damit der Aktivierungszyklus von neuem beginnen kann (Paton, 1961; Kenakin, 1997). Durch den allosterischen Anteil der Hybride könnte deren eigene Dissoziation vom M₃-Rezeptor verzögert sein. Wäre das der Fall, müsste es jedoch verwundern, dass ein solches Phänomen nicht am M₂-Rezeptor auftritt. Untersuchungen, in denen die Affinität der allosterischen Muttersubstanz Naphmethonium zum Iperoxobesetzten M₃-Rezeptor bestimmt wird, könnten hier zur weiteren Aufklärung beitragen.

In dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Barocelli konnte in Organbadexperimenten darüber hinaus mit Hilfe der von Furchgott (1992) beschriebenen Methode der Rezeptor-Alkylierung für jedes der hier betrachteten Hybride die Affinität (pK_D) zu M_2 - und M_3 -Rezeptoren bestimmt werden. Diese Untersuchungen ergaben, dass die Hybride eine höhere Affinität zu M_2 - als zu M_3 -Rezeptoren aufweisen. Dieser Befund ist jedoch nicht mit der in vorliegender Arbeit gefundenen Selektivität der Hybride bezüglich der intrinsischen Aktivität in Einklang zu bringen. Daher sind [35 S]GTP γ S-Bindungsexperimente an CHO-Zellen, die jeweils unterschiedliche Subtypen des muskarinischen Acetylcholinrezeptors exprimieren, offenbar kein geeignetes System, um Untersuchungen zur Selektivität von Testsubstanzen durchzuführen.

5 Zusammenfassung

In Bezug auf die allosterische Bindungsstelle G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sind muskarinische Acetylcholinrezeptoren die am besten untersuchte Rezeptor-Familie. Da die meisten allosterischen Modulatoren, zu denen auch die Alkan-Bisammonium-Verbindungen W84 und Naphmethonium gehören, die höchste Affinität zum M₂-Rezeptor aufweisen, stand dieser Subtyp im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Die räumliche Nähe der im Bereich der extrazellulären Schleifen angesiedelten, allosterischen Bindungsstelle zum orthosterischen Haftareal, das sich im oberen Drittel der transmembranären Domänen befindet, führte zur Entwicklung sogenannter Hybridliganden. Diese entstanden durch kovalente Verbindung eines orthosterischen, muskarinischen Antagonisten oder Agonisten mit einem wesentlichen Strukturelement der zu den Alkan-Bisammonium-Verbindungen gehörenden allosterischen Antagonisten W84 oder Naphmethonium. Durch die Hybridbildung sollte eine Überbrückung beider Bindungsstellen ermöglicht und so dem orthosterischen Liganden zu einer besseren Haftung am Rezeptor und einer höheren Subtypselektivität verholfen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst aufgeklärt werden, wie die Bindungseigenschaften eines orthosterischen Antagonisten durch die Hybridbildung verändert wurden. In einer vorangegangenen Arbeit hatte sich gezeigt, dass Hybride aus dem muskarinischen Antagonisten AF-DX 384 und unterschiedlich langen Strukturelementen von W84 nicht die Affinität der Muttersubstanz AF-DX 384 zum freien M₂-Rezeptor erreichten (M. Mohr, (2004) *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn). Daher wurde postuliert, dass diese Hybride in der allosterischen Bindungsstelle festgehalten werden. Im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg) wurde eines der Hybride durch eine Kettenverlängerung innerhalb der AF-DX 384-Struktur noch weiter modifiziert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Radioligandbindungsstudien an Herzventrikelgewebe des Hausschweins mit [³H]NMS als Sonde ergaben für dieses Hybrid eine um mehr als eine Dekade höhere Affinität zum M₂-Rezeptor als vorher für das analoge Hybrid gefunden wurde. Somit führte die

Kettenverlängerung zu einer besseren Überbrückung der allosterischen und orthosterischen Bindungsstelle.

Im Hauptteil dieser Arbeit wurden Hybride getestet, die in dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Marco De Amici synthetisiert worden waren. Diese bestanden aus unterschiedlichen Oxotremorin-M-artigen Agonisten, die jeweils kovalent mit einem konstanten Strukturanteil von W84 oder Naphmethonium verknüpft waren. Da die Hybride eine agonistische und eine antagonistische Strukturkomponente vereinigten, waren [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimente an Membransuspensionen aus stabil mit dem M₂-Rezeptor-Gen transfizierten CHO-Zellen ein geeignetes Versuchssystem, um die Fähigkeit dieser Verbindungen bezüglich der Rezeptoraktivierung zu untersuchen. Bei keinem der getesteten Hybride kam es durch die allosterische Komponente zu einer vollständigen Auslöschung der intrinsischen Aktivität. Es konnten zwei vollagonistische Hybride identifiziert werden, die sich von dem sehr aktiven Oxotremorin-M-Derivat Iperoxo ableiteten. Allerdings kam es durch die Hybridbildung zu einer signifikanten Verminderung der Wirksamkeit (pEC₅₀) im Vergleich zur Muttersubstanz Iperoxo. Hybride, die entweder die Oxotremorin-M-Struktur selbst oder weitere Derivate davon enthielten, wurden als Partialagonisten identifiziert. Die Verkürzung eines von Iperoxo abgeleiteten Hybrids um zwei Methylengruppen hatte keinen Einfluss auf die intrinsische Aktivität (E_{max}) und die Wirksamkeit. Hingegen führte eine umfassendere Verkürzung um sechs Methylengruppen und einen quartären Stickstoff zu einer drastischen Verminderung der intrinsischen Aktivität.

Für das Iperoxo-Hybrid aus der Naphmethonium-Reihe wurde exemplarisch in Radio-ligandbindungsstudien an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hauschweins die Affinität zum freien und zum [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptor bestimmt. Es zeigte sich, dass das Hybrid allosterische Wirksamkeit besaß.

In einem weiteren Schritt wurden Interaktionsexperimente zwischen den agonistischen Hybriden und allosterischen oder orthosterischen Antagonisten an M₂-Rezeptoren durchgeführt, um einen Einblick in die Topologie der Rezeptorbindung und -aktivierung zu erhalten. Interagierten die Hybride mit den Allosteren W84 oder Naphmethonium, resultierte eine stark negative Kooperativität oder sogar ein kompetitiver Antagonismus hinsichtlich der Rezeptorbindung. Dies kann als ein Hinweis darauf gewertet werden, dass die Hybride das allosterische Haftareals besetzen. Bei der Interaktion der vollagonistischen Hybride mit dem orthosterischen Antagonisten Atropin wurde eine negative Kooperativität

hinsichtlich der Rezeptorbindung und Rezeptoraktivierung festgestellt. Die beobachtete Senkung der Hybrid-vermittelten Rezeptoraktivierung stand in Verbindung mit der Bildung ternärer Komplexe aus Alloster-Anteil des Hybrids, Atropin und Rezeptor. Da Atropin dem Hybrid die Bindung an die orthosterische Bindungsstelle unmöglich machte, konnte mit diesen Befunden ein Hinweis erbracht werden, dass die Hybride den Rezeptor über das orthosterische Haftareal aktivieren.

6 Literaturverzeichnis

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.

Arunlakshana O and Schild HO (1959) Some quantitative uses of drug antagonists. *Brit 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-Bisammonium-Verbindungen. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Barlow R and Blake JF (1989) Hill coefficients and the logistic equation. *Trends Pharmacol Sci* **10**:440-441.

Barocelli E, Ballabeni V, Bertoni S, Dallanoce 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.

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.

Block GA, Martin KJ, de Francisco AL, Turner SA, Avram MM, Suranyi MG, Hercz G, Cunningham J, Abu-Alfa AK, Messa P, Coyne DW, Locatelli F, Cohen RM, Evenepoel P, Moe SM, Fournier A, Braun J, McCary LC, Zani VJ, Olson KA, Drueke TB, and Goodman WG (2004) Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* **350**:1516-1525.

Breivogel CS, Selley DE, and Childers SR (1998) Cannabinoid receptor agonist efficacy for stimulating [35 S]GTP γ S binding to rat cerebellar membranes correlates with agonist-induced decreases in GDP affinity. *J Biol Chem* **273**:16865-16873.

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.

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 (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**:3099-3108.

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.

Cussac D, Newman-Tancredi A, Duqueyroi D, Pasteau V, and Millan MJ (2002) Differential activation of Gq/11 and Gi₃ proteins at 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors revealed by antibody capture assays: influence of receptor reserve and relationship to agonist-directed trafficking. *Mol Pharmacol* **62**:578-589.

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.

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.

DeLapp NW, McKinzie JH, Sawyer BD, Vandergriff A, Falcone J, McClure D, and Felder CC (1999) Determination of [³⁵S]guanosine-5'-o-(3-thio)triphosphate binding mediated by cholinergic muscarinic receptors in membranes from chinese hamster ovary cells and rat striatum using an anti-G protein scintillation proximity assay. *J Pharmacol Exp Ther* **289**:946-955.

Disingrini T, Muth M, Dallanoce C, Barocelli E, Bertoni S, Kellershohn K, Mohr K, De Amici M, and Holzgrabe U (2006) Design, synthesis, and action of oxotremorine-related hybrid-type allosteric modulators of muscarinic acetylcholine receptors. *J Med Chem* **49**:366-372.

Dittmann, A. (2003) Untersuchungen zur Topologie der Interaktion atypischer allosterischer Modulatoren mit dem M₂-Acetylcholin-Rezeptor. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Eckstein, N. (2004) Pharmakologische und biochemische Untersuchungen zur allosterischen Modulation Agonist-induzierter Wirkungen an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Eglen RM (2005) Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog Med Chem* **43**:105-136.

Ehlert FJ (1988) Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol* **33**:187-194.

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.

Franken C, Tränkle C, and Mohr K (2000) Testing the specificity of allosteric modulators of muscarinic receptors in phylogenetically closely related histamine H₁-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **361**:107-112.

- Furchgott R.F. (1972) The classification of adrenoreceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory., in *Handbook of Experimental Pharmacology* (Blanschko H. and Muscholl E. eds) **33**:283-335, Springer, New York.
- Gaddum JH, Hameed KA, Hathway DE, and Stephens FF (1955) Quantitative studies of antagonists for 5-hydroxytryptamine. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* **40**:49-74.
- Gao ZG and Ijzerman AP (2000) Allosteric modulation of A_{2A} adenosine receptors by amiloride analogues and sodium ions. *Biochem Pharmacol* **60**:669-676.
- 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.
- Griffin MT, Figueroa KW, Liller S, and Ehlert FJ (2007) Estimation of agonist activity at G protein coupled receptors: analysis of M₂ muscarinic receptor signaling through G_{i/o}, G_s and G₁₅. *J Pharmacol Exp Ther*.
- Harrison C and Traynor JR (2003) The [³⁵S]GTPγS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci* **74**:489-508.
- 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.
- Holzgrabe U and Mohr K (1998) Allosteric modulators of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors. *Drug Discovery Today* **3**:214-222.
- Holzgrabe U, De Amici M, and Mohr K (2006) Allosteric modulators and selective agonists of muscarinic receptors. *J Mol Neurosci* **30**:165-168.
- 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.
- Hulme EC, Curtis CA, Wheatley M, Aitken A, and Harris AC (1989) localization and structure of the muscarinic receptor ligand binding site. *Trends Pharmacol Sci* **Suppl**:22-25.
- Jäger D, Schmalenbach C, Prilla S, Schrobang J, Kebig A, Sennwitz M, Heller E, Tränkle C, Holzgrabe U, Höltje HD, and Mohr K (2007) Allosteric small molecules unveil a role of an extracellular E2/TM7 junction for GCPR activation. *J Biol Chem*, in press.
- Jakubík J, Bačákováč 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, Haga T, and Tuček S (1998) Effects of an agonist, allosteric modulator, and antagonist on guanosine-γ-[³⁵S]thiotriphosphate binding to liposomes with varying muscarinic receptor/G_o protein stoichiometry. *Mol Pharmacol* **54**:899-906.
- Jöhren, K. (2004) Der muskarinerge M₂-Rezeptor - Theoretische Betrachtungen des Bindungsmodus orthosterischer und allosterischer Liganden. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Kenakin TP (1982) The Schild regression in the process of receptor classification. *Can J Physiol Pharmacol* **60**:249-265.

Kenakin TP (1992) Tissue response as a functional discriminator of receptor heterogeneity: effects of mixed receptor populations on Schild regressions. *Mol Pharmacol* **41**:699-707.

Kenakin TP (1997) *Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, New York.

Klemt, Dorothea (2005) Allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung an muskarinischen M₂- und M₄-Rezeptoren. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Kollias-Baker CA, Ruble J, Jacobson M, Harrison JK, Ozeck M, Shryock JC, and Belardinelli L (1997) Agonist-independent effect of an allosteric enhancer of the A₁ adenosine receptor in CHO cells stably expressing the recombinant human A₁ receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **281**:761-768.

Kords H, Lullmann H, Ohnesorge FK, and Wassermann O (1968) Action of atropine and some hexane-1.6-bis-ammonium derivatives upon the toxicity of DFP in mice. *Eur J Pharmacol* **3**:341-346.

Kostenis E and Mohr K (1996) Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation. *Trends Pharmacol Sci* **17**:280-283.

Kruh J (1982) Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem* **42**:65-82.

Langmead CJ, Fry VA, Forbes IT, Branch CL, Christopoulos A, Wood MD, and Herdon HJ (2006) Probing the molecular mechanism of interaction between 4-n-butyl-1-[4-(2-methylphenyl)-4-oxo-1-butyl]-piperidine (AC-42) and the muscarinic M₁ receptor: direct pharmacological evidence that AC-42 is an allosteric agonist. *Mol Pharmacol* **69**:236-246.

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 and Birdsall NJ (1993) Pharmacological characterization of acetylcholine-stimulated [³⁵S]-GTPγS binding mediated by human muscarinic m1-m4 receptors: antagonist studies. *Br J Pharmacol* **109**:1120-1127.

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, Gharagozloo P, Kuonen D, Popham A, and Birdsall NJ (1998) Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogues and acetylcholine at muscarinic receptors: radioligand binding studies. *Mol Pharmacol* **53**:573-589.

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.

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.

Leppik RA and Birdsall NJ (2000) Agonist binding and function at the human α_{2A} -adrenoceptor: allosteric modulation by amilorides. *Mol Pharmacol* **58**:1091-1099.

Leppik RA, Mynett A, Lazareno S, and Birdsall NJ (2000) Allosteric interactions between the antagonist prazosin and amiloride analogs at the human α_{1A} -adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* **57**:436-445.

Lew MJ and Angus JA (1995) Analysis of competitive agonist-antagonist interactions by nonlinear regression. *Trends Pharmacol Sci* **16**:328-337.

Litschig S, Gasparini F, Rueegg D, Stoehr N, Flor PJ, Vranesic I, Prezeau L, Pin JP, Thomsen C, and Kuhn R (1999) CPCCOEt, a noncompetitive metabotropic glutamate receptor 1 antagonist, inhibits receptor signaling without affecting glutamate binding. *Mol Pharmacol* **55**:453-461.

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, Saldanha JW, and Hulme EC (2002) Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. *Trends Pharmacol Sci* **23**:140-146.

Lüllmann 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.

May LT, Leach K, Sexton PM, and Christopoulos A (2007) Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**:1-51.

Messer WS, Jr. (2004) Bivalent ligands for G protein-coupled receptors. *Curr Pharm Des* **10**:2015-2020.

Michal P, El Fakahany EE, and Dolezal V (2007) Muscarinic M₂ receptors directly activate G_{q/11} and G_s G-proteins. *J Pharmacol Exp Ther* **320**:607-614.

Miller JH, Gibson VA, and McKinney M (1991) Binding of [³H]AF-DX 384 to cloned and native muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **259**:601-607.

Milligan G (2003) Principles: Extending the utility of [³⁵S]GTP γ S binding assays. *Trends Pharmacol Sci* **24**:87-90.

Milligan G and Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**:S46-S55.

Mitchelson F (1975) Antimuscarinic action of an alkane-bis-ammonium compound alone and in combination with (+)-benzetimide. *Eur J Pharmacol* **33**:237-246.

Mohr K, Tränkle C, and Holzgrabe U (2003) Structure/activity relationships of M₂ muscarinic allosteric modulators. *Receptors Channels* **9**:229-240.

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.

Mohr, M. (2004) Interaktion eines M₂-selektiven Antagonisten und strukturverwandter orthosterisch/allosterischer Hybridsubstanzen mit dem muskarinischen M₂-Acetylcholinrezeptor. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Monod J (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J Mol Biol* **12**:88-118.

Monod J, Changeux J-P, and Jacob F (1963) Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol* **6**:306-329.

Motulsky HJ (1995) *Intuitive biostatistics*. Oxford University Press.

Motulsky HJ (2003) *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting*. GraphPad Software Inc..

Munshi R, Pang IH, Sternweis PC, and Linden J (1991) A₁ adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins G₁₁, G₁₂, 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.

Nagano N and Nemeth EF (2005) Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca²⁺ for drug development: the extracellular calcium receptor and an innovative medical approach to control secondary hyperparathyroidism by calcimimetics. *J Pharmacol Sci* **97**:355-360.

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.

Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, and Christopoulos A (2003) International union of pharmacology committee on receptor nomenclature and drug classification. XXXVIII. update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* **55**:597-606.

Paton WDM (1961) A theory of drug action based on the rate of drug-receptor combination. *Proc R Soc Lond [Biol.]* **154**:21-69.

Petrel C, Kessler A, Dauban P, Dodd RH, Rognan D, and Ruat M (2004) Positive and negative allosteric modulators of the Ca²⁺-sensing receptor interact within overlapping but not identical binding sites in the transmembrane domain. *J Biol Chem* **279**:18990-18997.

Pfaffendorf M, Batink HD, Tränkle C, Mohr K, and van Zwieten PA (2000) Probing the selectivity of allosteric modulators of muscarinic receptors at other G-protein-coupled receptors. *J Auton Pharmacol* **20**:55-62.

Portoghese PS (1989) Bivalent ligands and the message-address concept in the design of selective opioid receptor antagonists. *Trends Pharmacol Sci* **10**:230-235.

Prilla S, Schrobang J, Ellis J, Höltje HD, and Mohr K (2006) Allosteric interactions with muscarinic acetylcholine receptors: complex role of the conserved tryptophan M₂⁴²²Trp in a critical cluster of amino acids for baseline affinity, subtype selectivity, and cooperativity. *Mol Pharmacol* **70**:181-193.

Raasch, Alexandra (2003) Allosterische Modulation an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren des Subtyps M₂. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Sabroe I, Peck MJ, Van Keulen BJ, Jorritsma A, Simmons G, Clapham PR, Williams TJ, and Pease JE (2000) A small molecule antagonist of chemokine receptors CCR1 and CCR3. Potent inhibition of eosinophil function and CCR3-mediated HIV-1 entry. *J Biol Chem* **275**:25985-25992.

Schmalenbach, Caroline (2005) Allosterische Modulation der durch Acetylcholin und weitere Agonisten ausgelösten Aktivierung von muskarinischen M₂-Rezeptoren. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Schwartz TW, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, and Elling CE (2006) Molecular mechanism of 7TM receptor activation - a global toggle switch model. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**:481-519.

Schwyzler R (1977) ACTH: a short introductory review. *Ann N Y Acad Sci* **297**:3-26.

Sennwitz, Matthias (2006) Subtypeselektivität allosterischer Liganden an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren - Untersuchungen mit strukturmodifizierten Alkan-Bisammonium-Verbindungen. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

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.

Smrcka AV, Hepler JR, Brown KO, and Sternweis PC (1991) Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase c activity by purified G_q. *Science* **251**:804-807.

Spalding TA, Ma JN, Ott TR, Friberg M, Bajpai A, Bradley SR, Davis RE, Brann MR, and Burstein ES (2006) Structural requirements of transmembrane domain 3 for activation by the M₁ muscarinic receptor agonists AC-42, AC-260584, clozapine, and n-desmethyleclozapine: evidence for three distinct modes of receptor activation. *Mol Pharmacol* **70**:1974-1983.

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 (1998) M₂ receptor binding of the selective antagonist AF-DX 384: possible involvement of the common allosteric site. *Mol Pharmacol* **53**:304-312.

Tränkle C, Dittmann A, Schulz U, Weyand O, Buller S, Jöhren K, Heller E, Birdsall NJ, Holzgrabe U, Ellis J, Holtje 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.

Urwyler S, Mosbacher J, Lingenhoehl K, Heid J, Hofstetter K, Froestl W, Bettler B, and Kaupmann K (2001) Positive allosteric modulation of native and recombinant γ -aminobutyric acid_B receptors by 2,6-di-*tert*-butyl-4-(3-hydroxy-2,2-dimethyl-propyl)-phenol (CGP7930) and its aldehyde analog CGP13501. *Mol Pharmacol* **60**:963-971.

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.

Wassermann O (1972) Studies on the pharmacokinetics of bisquaternary ammonium compounds. I. synthesis, physico-chemical properties and protein-binding of ³H-labelled hexamethonium and of some of its derivatives. *Arzneimittelforschung* **22**:1993-1995.

Wei JW and Sulakhe PV (1978) Regional and subcellular distribution of myocardial muscarinic cholinergic receptors. *Eur J Pharmacol* **52**:235-238.

Wess J (1993) Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci* **14**:308-313.

7 Anhang

7.1 K_D - und B_{\max} -Werte des Radioliganden [^3H]NMS

In Folgendem sollen die an CHO-M₂- und CHO-M₃-Membransuspensionen in homologen Konkurrenzexperimenten ermittelten, individuellen K_D - und B_{\max} -Werte des Radioliganden [^3H]NMS gezeigt werden.

CHO-M ₂			CHO-M ₃		
Datum der Membranpräparation	pK_D	B_{\max} (fmol/mg Protein)	Datum der Membranpräparation	pK_D	B_{\max} (fmol/mg Protein)
12.04.05	9,36	3709	16.05.06	8,96	17508,9
29.04.05	8,92	8835	23.05.06	8,94	17810,1
13.05.05	8,92	8246	01.08.06	9,03	10891,5
20.05.05	8,74	13082	08.08.06	8,90	16424,1
14.06.05	9,10	4958	08.12.06	8,93	19932,1
22.06.05	9,00	5482	16.05.06	8,96	17508,9
08.07.05	8,99	7140			
08.09.05	9,16	3804			
13.09.05	9,21	3167			
20.09.05	9,02	5972			
20.10.05	9,10	5463			
25.10.05	8,81	13508			
31.10.05	9,12	8465			
17.01.06	9,19	3350			
24.01.06	9,08	5218			
31.01.06	9,09	6315			
07.02.06	9,14	4780			
14.02.06	9,15	4913			
21.02.06	9,24	4202			
21.03.06	9,02	5915			
28.03.06	9,08	5648			
04.04.06	9,01	5912			
22.09.06	9,13	3659			
15.12.06	9,15	4333			
19.12.06	9,02	5653			

Tabelle 46: An Membransuspensionen aus CHO-M₂- und CHO-M₃-Zellen mit dem Radioliganden [^3H]NMS resultierende K_D - und B_{\max} -Werte.

7.2 Beeinflussung der [³⁵S]GTP_γS-Bindung durch rezeptorsättigende Konzentrationen muskarinischer Liganden

In Vorversuchen wurde für jede CHO-M₂- und CHO-M₃-Membransuspensionen der Einfluss rezeptorsättigender Konzentrationen der folgenden muskarinischen Liganden bestimmt: Oxotremorin-M (0,1 mM), Pilocarpin (1 mM), Alcuronium (0,1 mM) und Atropin (0,001 mM). Die basale [³⁵S]GTP_γS-Bindung wurde bei diesen Experimenten auf 100 % festgesetzt und die anderen Werte entsprechend normalisiert. Die tabellierten Werte zeigen jeweils den Mittelwert mit Standardfehler eines einzelnen Experiments, das als Achtfachbestimmung durchgeführt wurde.

Datum der Membranpräparation	Oxotremorin-M (0,1 mM)	Pilocarpin (1 mM)	Alcuronium 0,1 mM)	Atropin (0,001 mM)
12.04.05	223 ± 5	199 ± 6	100 ± 3	87 ± 3
29.04.05	212 ± 6	210 ± 7	96 ± 4	88 ± 1
13.05.05	234 ± 3	228 ± 11	99 ± 5	75 ± 9
20.05.05	224 ± 10	195 ± 5	93 ± 3	78 ± 3
14.06.05	221 ± 3	207 ± 6	84 ± 10	76 ± 4
22.06.05	240 ± 7	202 ± 11	90 ± 6	80 ± 7
08.07.05	180 ± 6	158 ± 8	92 ± 17	64 ± 1
08.09.05	343 ± 28	333 ± 20	86 ± 4	85 ± 3
13.09.05	344 ± 12	288 ± 9	88 ± 10	80 ± 4
20.09.05	406 ± 6	336 ± 18	92 ± 2	93 ± 6
20.10.05	435 ± 14	351 ± 12	96 ± 3	93 ± 3
25.10.05	438 ± 10	341 ± 16	94 ± 1	92 ± 3
31.10.05	360 ± 13	312 ± 3	88 ± 2	82 ± 2
07.02.06	388 ± 8	293 ± 9	87 ± 4	80 ± 4
14.02.06	414 ± 13	320 ± 11	89 ± 3	87 ± 3
21.02.06	423 ± 16	316 ± 11	94 ± 3	89 ± 3
21.03.06	322 ± 12	232 ± 12	73 ± 3	67 ± 2
28.03.06	320 ± 16	224 ± 5	67 ± 3	67 ± 3
04.04.06	235 ± 7	185 ± 6	56 ± 2	54 ± 2
22.09.06	256 ± 7	193 ± 10	64 ± 1	62 ± 2
15.12.06	385 ± 13	317 ± 10	82 ± 3	81 ± 2
19.12.06	402 ± 14	321 ± 12	79 ± 1	79 ± 3

Tabelle 47: Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden auf die [³⁵S]GTP_γS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. Angegeben sind jeweils Mittelwerte ± Standardfehler von Einzelexperimenten, die als Achtfachbestimmungen durchgeführt wurden.

Datum der Membranpräparation	Oxotremorin-M (0,1 mM)	Pilocarpin (1 mM)	Alcuronium 0,1 mM)	Atropin (0,001 mM)
09.05.06	236 ± 6	121 ± 3	91 ± 1	92 ± 3
16.05.06	252 ± 3	140 ± 9	107 ± 6	98 ± 2
23.05.06	268 ± 21	124 ± 2	96 ± 2	100 ± 3
01.08.06	205 ± 16	132 ± 9	95 ± 2	94 ± 5
08.08.06	235 ± 5	129 ± 4	92 ± 2	100 ± 6
08.12.06	269 ± 4	130 ± 3	110 ± 8	96 ± 2

Tabelle 48: Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen muskarinischer Liganden auf die [³⁵S]GTP_γS-Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₃-Zellen. Angegeben sind jeweils Mittelwerte ± Standardfehler von Einzelexperimenten, die als Achtfachbestimmungen durchgeführt wurden.

7.3 CZA-1-induzierte [³⁵S]GTP_γS-Bindung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit CZA-1 exemplarisch eine dimere Verbindung untersucht. Diese besteht aus zwei miteinander kovalent verknüpften Molekülen Iperoxo.

Abbildung 67: Strukturformel von CZA-1 (M = 608,4 g/mol). Diese Verbindung wurde im Arbeitskreis von Professor Dr. M. De Amici (Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi di Milano, Italien) synthetisiert.

In Bindungsexperimenten zeigte diese Substanz eine dissoziationsverzögernde Wirksamkeit (Kepe, mündliche Mitteilung), was ein Hinweis auf einen allosterischen Wirkmechanismus ist. In dieser Arbeit wurde CZA-1 in [³⁵S]GTP_γS-Bindungsexperimenten an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen getestet. In Abbildung 68 ist die gemittelte CZA-1-Konzentrations-Effekt-Kurve im Vergleich zur Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve dargestellt.

Die Maximaleffekte der CZA-1- und der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven unterschieden sich nicht signifikant voneinander (t-Test, $p < 0,05$). Somit handelte es sich bei der Testsubstanz um einen Vollagonisten. CZA-1 wies einen um etwa eine halbe Dekade signifikant größeren pEC₅₀-Wert auf als Acetylcholin (t-Test, $p < 0,05$). Wie schon für das Monomer Iperoxo gefunden wurde, ergab sich auch für CZA-1 im F-Test ein von eins abweichender Hill-Koeffizient, der in vorliegendem Fall jedoch größer als eins war.

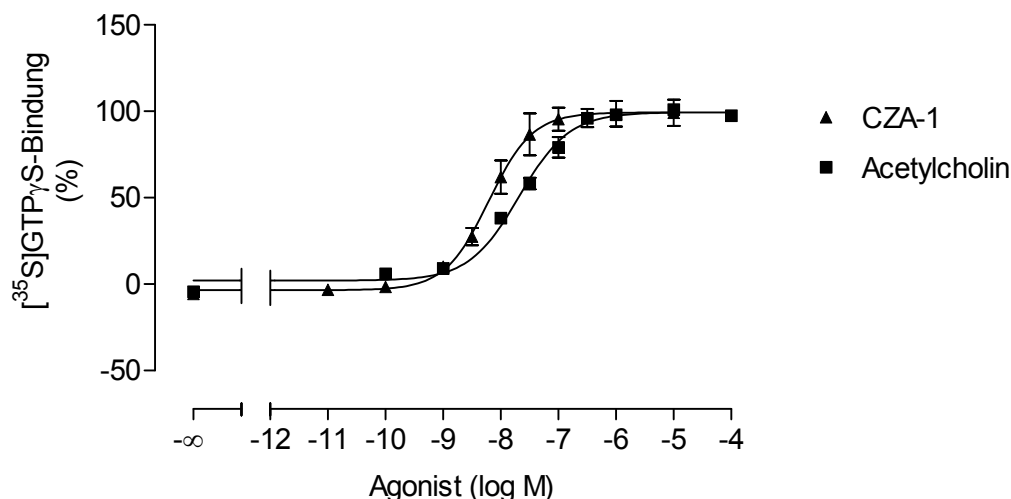


Abbildung 68: Vergleich von CZA-1- und Acetylcholin-induzierter $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an Membransuspensionen aus CHO-M₂-Zellen. **Ordinate:** Prozentuale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung. Dabei entspricht 0 % dem unteren Plateau und 100 % dem oberen Plateau der Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurve. **Abszisse:** Dekadischer Logarithmus der Agonist-Konzentration. **Kurvenanpassung:** „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gl. 6), CZA-1: Hill-Koeffizient signifikant verschieden von eins (F-Test, $p < 0,05$): $n_H = 1,14 \pm 0,06$, Acetylcholin: konstanter Hill-Koeffizient von $n_H = 1$. **Datenpunkte:** Mittelwerte \pm Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

	pEC₅₀	E_{min} (%)	E_{max} (%)	n_H (frei)	n
CZA-1	8,21 \pm 0,03*	-5 \pm 1	101 \pm 1	1,14 \pm 0,06 [#]	4
Acetylcholin	7,68 \pm 0,06	2 \pm 2	99 \pm 2	0,83 \pm 0,11	4

Tabelle 49: Kenngrößen \pm Standardfehler der gemittelten CZA-1- und Acetylcholin-Konzentrations-Effekt-Kurven aus Abbildung 68. Die Kenngrößen beruhen auf einer Kurvenanpassung mit einem Hill-Koeffizienten von $n_H = 1$. **pEC₅₀:** Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die eine halbmaximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung hervorruft. **E_{min}:** Minimale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (unteres Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **E_{max}:** Maximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve). **n_H (frei):** Freier Hill-Koeffizient. **n:** Anzahl unabhängiger Experimente.

* signifikanter Unterschied zu der entsprechenden Acetylcholin-Kenngröße (t-Test, $p < 0,05$)

[#] signifikant bessere Anpassung mit freiem Hill-Koeffizienten (F-Test, $p < 0,05$)

8 Veröffentlichungen

Wissenschaftliche Originalarbeiten

Disingrini T, Muth M, Dallanoce C, Barocelli E, Bertoni S, Kellershohn K, Mohr K, De Amici M, and Holzgrabe U (2006) Design, synthesis, and action of oxotremorine-related hybrid-type allosteric modulators of muscarinic acetylcholine receptors. *J Med Chem* **49**:366-372.

Abstrakta und Kongressbeiträge

Kellershohn K, Heller E, Holzgrabe U, and Mohr K (2005) Muscarinic allosteric/orthosteric hybrid compound derived from AF-DX 384: towards a higher affinity for free M₂ receptors. *Berichtskolloquium des Graduiertenkollegs 677 2005*, Bonn

Kellershohn K, Schmalenbach C, Muth M, De Amici M, Holzgrabe U and Mohr K (2005) Allosteric/orthosteric hybrid compounds with agonistic activity at muscarinic M₂ receptors. *DPhG-Jahrestagung 2005*, Mainz

Kellershohn K, Muth M, De Amici M, Holzgrabe U and Mohr K (2006) Interaction of a partial agonistic allosteric/orthosteric hybrid compound with an allosteric antagonist on muscarinic M₂ receptors. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **372** (Suppl 1): 87

Kellershohn K, Muth M, De Amici M, Holzgrabe U and Mohr K (2006) Influence of agonist-derived allosteric/orthosteric hybrid compounds on muscarinic M₂ receptors. *Internationales Symposium des Graduiertenkollegs 677 2006*, Bonn

Kellershohn K, Muth M, Holzgrabe U, De Amici M and Mohr K (2007) Cooperative interaction between atropine and a muscarinic M₂ receptor selective allosteric/orthosteric hybrid agonist. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **375** (Suppl 1): 50

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr für die Möglichkeit, eine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen. Seine ausgezeichnete Betreuung sowie seine ständige Gesprächsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Heinz Bönisch danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Prof. Dr. Michael Gütschow und Herrn Prof. Dr. Hanns Häberlein möchte ich für ihre Mitwirkung in der Prüfungskommission herzlich danken.

Mein Dank gilt außerdem Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe und Herrn Prof. Dr. Marco De Amici sowie deren Mitarbeitern für die Synthese und freundliche Bereitstellung der meisten von mir untersuchten Verbindungen.

Außerdem danke ich Herrn Stephan Jepards, den ich im Rahmen des Graduiertenkollegs als Forschungsstudent betreut habe, für die erfolgreiche Erhebung der Befunde zur Interaktion von MMH5-6 mit Atropin.

Allen Kollegen der Abteilung möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre herzlich danken.