

**Allosterische Modulation an muskarinischen
Acetylcholinrezeptoren des Subtyps M₂:
Identifizierung essentieller Strukturelemente für Förderer der
N-Methylscopolamin-Bindung vom Alkan-bisammonium-Typ**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Alexandra Raasch

aus

Bonn

Bonn 2003

Danksagung

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit sowie für seine Unterstützung, auf die ich mich während der Bearbeitung meines Projektes stets verlassen konnte. Für die Gelegenheit, in dem von ihm geleiteten pharmakologisch-toxikologischen Demonstrationskursus, in den Kursen der Physiologie sowie in der Vorlesung Pharmakologie & Toxikologie für Pharmazeuten mitwirken zu können, bin ich ausgesprochen dankbar. Die Erfahrungen, die ich im Rahmen dieser Lehrtätigkeit sammeln konnte, sind für mich sehr wertvoll. Das hierbei von Herrn Prof. Mohr in mich gesetzte Vertrauen weiß ich sehr zu schätzen.

Herrn Prof. Dr. med. Eberhard Schlicker danke ich herzlich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn PD Dr. Christian Tränkle danke ich für seine Bereitschaft zu Gespräch und wissenschaftlicher Diskussion sowie für seine Hilfestellung bezüglich organisatorischer und die Laborarbeit betreffender Fragen.

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe und Herrn Dr. Olaf Scharfenstein danke ich für die Synthese und Bereitstellung der meisten von mir untersuchten Verbindungen sowie die stets gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Seraina Duda, die mich in unserer gemeinsamen Doktorandenzeit nicht nur durch das Korrekturlesen des Manuskriptes dieser Arbeit, sondern auch durch ihre Gesprächs- und Hilfsbereitschaft sehr unterstützt hat.

Frau Uta Voigtländer danke ich für eine ausgesprochen gute Zusammenarbeit im Labor sowie für ihre über meine Laborzeit hinausgehenden Hilfestellungen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Stefan Buller danke ich für die Einarbeitung in die Methoden der Mutagenese-Untersuchungen sowie für seine Unterstützung in der Klärung aller diesbezüglicher Fragen.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Niels Eckstein und Frau Dr. Maren Großmüller, deren fachliche und freundschaftliche Unterstützung ich stets sehr zu schätzen wusste.

In guter Erinnerung an unser gemeinsames Projekt der Etablierung der Zweipunkt-Kinetik danke ich herzlich Frau Iris Jusen. Durch ihre Hilfsbereitschaft und ihre unvergleichliche Art hält sie diese Abteilung zusammen und ermöglicht ein Arbeiten in angenehmer Atmosphäre.

Ebenso gilt mein Dank Frau Irmgard Knöbel, die mir in ihrer erfrischenden und unkomplizierten Art oft zur Seite gestanden hat.

Ich danke Frau Jennifer Roche und Herrn Andreas Dittmann, die mir als Bürokollegen in der Endphase der Erstellung dieser Dissertationsschrift ein Arbeiten in freundlicher und angenehmer Umgebung ermöglicht haben.

Auch allen weiteren derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Pharmakologie & Toxikologie danke ich für das gute Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Herzlich danke ich auch Frau Dorthe Steinhoff, die mich durch ihre Freundschaft und ihre herzliche Art stets sehr unterstützt hat.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie und Valentin, die durch ihre unermüdliche Unterstützung und Geduld entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen Eltern
und Valentin

1	EINLEITUNG	1
1.1	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren.....	1
1.2	Allosterische Modulation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren.....	3
1.3	Perspektiven für den Einsatz allosterischer Modulatoren in der Therapie	5
1.4	Fragestellung.....	7
2	METHODEN UND MATERIAL	10
2.1	Herstellung von Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweines	10
2.2	Bestimmung des Proteingehaltes der Membransuspension	11
2.3	Gewinnung von Membransuspensionen aus transient transfizierten COS 7-Zellen.....	11
2.3.1	Kultivierung von COS 7-Zellen	12
2.3.2	Molekularbiologische Arbeiten	13
2.3.2.1	Zielgerichtete Mutagenese	13
2.3.2.2	Transformation	16
2.3.2.3	Plasmid-Amplifikation durch Bakterienkultur	18
2.3.2.4	Glycerolkulturen	18
2.3.2.5	Plasmidgewinnung	19
2.3.2.6	Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA	20
2.3.2.7	Sequenzierung	20
2.3.3	Zellbiologische Arbeiten.....	21
2.3.3.1	Transiente Transfektion	21
2.3.3.2	Herstellung von Membransuspensionen aus transient transfizierten COS 7-Zellen	22
2.4	Radioligandbindungsstudien.....	24
2.4.1	Allgemeine Theorie zu Radioligandbindungsstudien	24
2.4.2	Homologe Konkurrenzexperimente	25
2.4.2.1	Theoretische Grundlagen.....	25
2.4.2.2	Durchführung der Experimente	28
2.4.3	Heterologe Interaktionsexperimente	31
2.4.3.1	Theoretische Grundlagen.....	31
2.4.3.2	Durchführung der Experimente	34
2.4.4	Kinetische Experimente	37
2.4.4.1	Theoretische Grundlagen.....	37

2.4.4.2	Experimente zur Untersuchung eines kompletten Dissoziationsverlaufes.....	40
2.4.4.3	Zweipunkt-Dissoziationsexperimente	42
2.4.4.3.1	Theoretische Grundlagen kinetischer Zweipunkt-Experimente	42
2.4.4.3.2	Etablierung und Validierung	43
2.4.4.3.3	Durchführung von Experimenten mit manueller Einzelfiltration	45
2.4.4.3.4	„Screening-Untersuchungen“ mittels kinetischer Zweipunkt-Experimente	47
2.4.4.3.5	Durchführung von Experimenten am Brandel-Filtrationssystem.....	48
2.5	Materialien.....	52
2.5.1	Antagonisten am Muskarinrezeptor	52
2.5.2	Allosterische Modulatoren.....	53
2.5.3	Verwendete Reagenzien.....	56
2.5.4	„Kits“ für molekularbiologische Arbeiten.....	56
2.5.5	Herstellung von Zellkulturmedien und Nährböden	57
2.5.6	Herstellung von Lösungen und Puffern.....	59
2.6	Statistische Auswertungen	61
2.7	Computerprogramme.....	63
3	ERGEBNISSE.....	64
3.1	Homologe Kompetitionen zur Charakterisierung der verwendeten Membransuspensionen	64
3.2	Charakterisierung der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit W84-artiger allosterischer Modulatoren.....	68
3.2.1	Untersuchung der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit verschiedener strukturmodifizierter Derivate des Prototyp-Modulators W84	68
3.2.2	Dissoziationsexperimente mit den hydroxylierten Derivaten von W84 sowie dem tertiären W84-Analogen	71
3.3	„Screening-Untersuchungen“ zur heterologen Interaktion W84-artiger allosterischer Modulatoren mit [³H]N-Methylscopolamin	73
3.4	Charakterisierung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität anhand ausgewählter methylierter W84-Derivate	76
3.4.1	Heterologe Interaktionsexperimente mit dem Prototyp-Modulator W84 und dessen methylierten Derivaten.....	76
3.4.2	Gegenüberstellung der Kenndaten aus heterologen Interaktionsexperimenten sowie aus kinetischen Experimenten	78
3.4.3	Überprüfung des Kooperativitätsverhaltens des methylierten Modulators CH ₃ ,H,CH ₃ ,H in Na, K, P _i -Puffer	82

3.5	Charakterisierung der Epitop-Abhängigkeit der Kooperativität durch Untersuchungen an Rezeptormutanten	85
3.5.1	Charakterisierung der M ₂ /M ₅ -Selektivität ausgewählter allosterischer Modulatoren.....	86
3.5.2	Suche nach den für die M ₂ /M ₅ -Selektivität essentiellen Epitopen durch Experimente an den M ₂ /M ₅ -chimären Rezeptoren CR3, CR4 und CR6	89
3.5.3	Eingrenzung des für die M ₂ /M ₅ -Selektivität essentiellen Epitops in der zweiten extrazellulären Schleife	94
3.5.3.1	Untersuchungen an M ₂ -Rezeptoren mit chimärer Sequenzsubstitution in der zweiten extrazellulären Schleife	96
3.5.3.2	Untersuchungen an M ₅ -Rezeptoren mit chimärer Sequenzsubstitution in der zweiten extrazellulären Schleife	98
3.5.4	Identifizierung der für die M ₂ /M ₅ -Selektivität essentiellen Aminosäure in der zweiten extrazellulären Schleife.....	101
3.5.4.1	Untersuchungen an punktmutierten M ₂ -Rezeptoren	101
3.5.4.2	Untersuchungen am punktmutierten M ₅ -Rezeptor	103
3.5.5	Untersuchung der M ₂ -Doppelmutante M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His sowie der M ₅ -Doppelmutante M ₅ ¹⁸⁴ Gln→Tyr + ⁴⁷⁸ His→Thr	105
3.5.6	Heterologe Interaktion des methylierten Modulators CH ₃ ,H,CH ₃ ,H mit [³ H]N-Methylscopolamin an der M ₂ -Doppelmutante M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	111
3.5.7	Übersicht über die Halbwertszeiten der [³ H]NMS-Dissoziation an den untersuchten Wildtyp- und mutierten Muskarinrezeptoren.....	112
3.5.8	Kenndaten der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der untersuchten allosterischen Modulatoren an Wildtyp- und mutierten Rezeptoren.....	113
4	DISKUSSION	116
4.1	Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität methylierter W84-Derivate	116
4.2	Heterologe Interaktion des Modulators CH₃,H,CH₃,H mit [³H]NMS an muskarinischen M₂-Rezeptoren aus verschiedenen Expressionssystemen.....	120
4.3	Entwicklung eines dreidimensionalen Modells des [³H]NMS-besetzten muskarinischen M₂-Rezeptors und Erörterung der Epitop-Abhängigkeit allosterischer Modulatoren am besetzten M₂-Rezeptor ...	124
4.3.1	Das dreidimensionale Modell des NMS-besetzten M ₂ -Rezeptors.....	124
4.3.2	Prüfung des 3D-Modells des NMS-besetzten M ₂ -Rezeptors auf der Basis von Befunden aus Radioligandbindungsstudien an Rezeptormutanten	127

4.4	Überlegungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen allosterischer Modulatoren basierend auf Radioligandbindungsstudien zur Epitop-Abhängigkeit sowie auf dem 3D-Modell des M₂-Rezeptors	132
4.4.1	Erörterung der am [³ H]NMS-besetzten Rezeptor erhobenen Befunde	132
4.4.1.1	Erkenntnisse zur M ₂ /M ₅ -Selektivität.....	132
4.4.1.2	Erkenntnisse zur Basisaffinität	136
4.4.2	Erörterung der am Orthoster-freien Rezeptor erhobenen Befunde	141
5	ZUSAMMENFASSUNG	149
6	LITERATURVERZEICHNIS	152
7	VERÖFFENTLICHUNGEN	157
7.1	Wissenschaftliche Originalarbeiten.....	157
7.2	Abstrakta/ Kongressmitteilungen	157

1 Einleitung

1.1 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren gehören als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren zu der größten Superfamilie von Rezeptoren (Christopoulos und Kenakin, 2002). Gemeinsame Strukturmerkmale der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind sieben hydrophobe transmembranale Domänen, die durch extra- und intrazelluläre Schleifen des Peptidstranges miteinander verbunden sind, sowie der extrazellulär vorliegende Aminoterminus und der im Cytoplasma lokalisierte Carboxyterminus (Hulme et al., 1990).

Bis heute wurden fünf verschiedene Subtypen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren, M_1 bis M_5 , kloniert (Kubo et al., 1986; Bonner et al., 1987, 1988). Die fünf Muskarinrezeptor-Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich der Art der G-Protein-Kopplung, ihrer spezifischen zellulären Funktionen sowie ihres Expressionsmusters in verschiedenen Gewebetypen. Es ist bekannt, dass die Rezeptorsubtypen M_1 , M_3 und M_5 bevorzugt an $G_{q/11}$ -Proteine koppeln, worauf eine Aktivierung der Phospholipase C folgt. M_2 - und M_4 -Rezeptoren koppeln hingegen an $G_{i/o}$ -Proteine, was zu einer Hemmung der Adenylatcyclase führt (Hulme et al., 1990). Die über Muskarinrezeptoren der Peripherie bzw. des zentralen Nervensystems vermittelten Effekte des Neurotransmitters Acetylcholin wurden beispielsweise von Wess (1996) beschrieben. Die Bestimmung des Expressionsmusters der Rezeptorsubtypen M_1 bis M_5 in unterschiedlichen Geweben erweist sich als kompliziert, da die meisten Gewebearten mehrere Rezeptorsubtypen aufweisen. Eine Möglichkeit der Charakterisierung des Verteilungsmusters der Rezeptorsubtypen M_1 bis M_5 in verschiedenen Geweben beruht auf der quantitativen Bestimmung der in den entsprechenden Gewebearten enthaltenen mRNA der Rezeptorsubtypen und wurde von Krejčí und Tuček (2002) beschrieben. Das Expressionsmuster der muskarinischen Rezeptorsubtypen M_1 - M_5 kann ferner durch immunhistochemische Untersuchungen unter Verwendung Subtyp-spezifischer Antikörper bestimmt werden (Dörje et al., 1991; Levey et al., 1991). Mit Hilfe der beschriebenen Untersuchungsmethoden konnten folgende Erkenntnisse hinsichtlich der Gewebeverteilung der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren M_1 bis M_5 gesammelt werden: Muskarinische Acetylcholinrezeptoren vom Subtyp M_1 liegen im zentralen Nervensystem, vornehmlich in den Bereichen Cortex und Hippocampus, sowie in peripheren Ganglien vor. M_2 -Rezeptoren werden typischerweise in der Muskulatur des

Herzens exprimiert, darüber hinaus jedoch auch im zentralen Nervensystem sowie in der glatten Muskulatur. Muskarinrezeptoren vom Subtyp M_3 sind hauptsächlich in glatter Muskulatur sowie in exokrinem Drüsengewebe zu finden. M_4 -Rezeptoren werden im zentralen Nervensystem, vornehmlich in den Bereichen Vorderhirn und Striatum, sowie in der Lunge exprimiert. M_5 -Rezeptoren liegen ebenfalls im zentralen Nervensystem in der Substantia nigra sowie im Hippocampus vor (Mutschler et al., 1995; IUPHAR Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification, 1998).

Um die pharmakologischen Eigenschaften eines einzelnen Subtyps muskarinischer Acetylcholinrezeptoren innerhalb eines verschiedene Subtypen exprimierenden genuinen Gewebes charakterisieren zu können, wurden Subtyp-selektive Liganden muskarinischer Acetylcholinrezeptoren entwickelt (Dörje et al., 1990; Mutschler et al., 1995). Der Einsatz Subtyp-selektiver Antagonisten bzw. Agonisten in Radioligandbindungsstudien und funktionellen Experimenten ermöglicht es, einzelne in einem Gewebe vorkommende Rezeptorsubtypen getrennt voneinander zu erfassen und zu untersuchen.

Eine weitere Möglichkeit, die Eigenschaften eines einzelnen Rezeptorsubtypen zu bestimmen, besteht darin, Zelllinien einzusetzen, die mit dem Gen eines einzelnen Muskarinrezeptor-Subtyps transfiziert wurden und dementsprechend nur diesen Subtyp exprimieren.

Die orthosterische Bindungsstelle muskarinischer Acetylcholinrezeptoren scheint in der Tiefe einer von den sieben transmembranalen Domänen des Rezeptors gebildeten Bindungstasche zu liegen (Wess, 1993) und ist unter den Muskarinrezeptor-Subtypen M_1 - M_5 hochkonserviert (Hulme et al., 1990). Die ausgeprägte Sequenzhomologie der verschiedenen Muskarinrezeptor-Subtypen im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle ist vermutlich die Ursache dafür, dass bis heute keine absolut Subtyp-selektiven Muskarinrezeptor-Agonisten bzw. -Antagonisten für die Therapie gefunden werden konnten (Felder et al., 2000).

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren besitzen neben der orthosterischen Bindungsstelle für den physiologischen Liganden Acetylcholin eine zweite, allosterische Bindungsstelle (Lazareno und Birdsall, 1995; Holzgrabe und Mohr, 1998). Diese allosterische Bindungsstelle befindet sich in einem weiter extrazellulär gelegenen Bereich des Muskarinrezeptors am Eingang der zuvor beschriebenen Ligandbindungstasche (Ellis et al., 1993). Da die Homologie der Aminosäuresequenz

der Rezeptorsubtypen M_1 - M_5 in diesem extrazellulär gelegenen Bereich des Rezeptorproteins deutlich geringer ausgeprägt ist als im Bereich der transmembranalen Domänen, erscheint die Suche nach Subtyp-selektiven Liganden der allosterischen Bindungsstelle wesentlich erfolgversprechender als die Suche nach entsprechenden Liganden der orthosterischen Bindungsstelle (Tuček und Proška, 1995; Buller et al., 2002).

Seitdem die dreidimensionale Struktur des Photorezeptors Rhodopsin, der ebenfalls zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört, durch röntgenkristallographische Untersuchungen des bovinen Rhodopsins aufgeklärt werden konnte (Palczewski et al., 2000), besteht die Möglichkeit, Rückschlüsse auf die bisher noch nicht aufgeschlüsselte dreidimensionale Struktur muskarinischer Acetylcholinrezeptoren zu ziehen. Die Röntgenstruktur des bovinen Rhodopsinrezeptors dient seither als Grundlage für die Interpretation von Untersuchungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen bzw. von Bindungsexperimenten an Wildtyp-Rezeptoren und Rezeptormutanten aus dem Bereich der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Basierend auf den Daten der Röntgenstrukturanalyse des bovinen Rhodopsins kann die Struktur von Rezeptor-G-Protein-Komplexen bzw. von Rezeptor-Ligand-Komplexen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren mit einiger Wahrscheinlichkeit vorausgesagt werden (Lu et al., 2002).

In Kenntnis der röntgenkristallographischen Struktur des bovinen Rhodopsins gelang es Jöhren und Höltje (2002) ein dreidimensionales Modell des durch den muskarinischen Antagonisten *N*-Methylscopolamin (NMS) besetzten M_2 -Rezeptors zu erstellen. Simulationen der Bindung eines allosterischen Modulators an diesem dreidimensionalen Rezeptormodell ermöglichen die Modellierung des für allosterische Interaktionen charakteristischen ternären Komplexes. Ferner können mit Hilfe des 3D-Modells Moleküldynamiksimulationen für die Interaktion eines allosterischen Liganden mit einzelnen Rezeptorepitopen durchgeführt werden.

1.2 Allosterische Modulation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren

Alle Subtypen des muskarinischen Acetylcholinrezeptors, M_1 - M_5 , sind allosterisch modulierbar (Ellis et al., 1991). Die allosterische Modulation von Muskarinrezeptoren wird als Modell für die Interaktion allosterischer Modulatoren mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren betrachtet und ist deshalb in der Vergangenheit ausführlich untersucht

worden (Christopoulos und Kenakin, 2002). Zu den bisher in der Literatur beschriebenen allosterischen Modulatoren gehören strukturell und pharmakologisch stark unterschiedliche Verbindungen wie z.B. Alcuronium (Tuček et al., 1990), Gallamin (Ellis et al., 1991) und W84 (Lüllmann et al., 1969; Tränkle und Mohr, 1997). In der vorliegenden Arbeit sollte die allosterische Interaktion verschiedener Derivate der Alkan-bisammonium-Verbindung W84 mit muskarinischen Acetylcholinrezeptoren verschiedener Subtypen untersucht werden.

Da allosterische Modulatoren nicht mit dem orthosterischen Liganden um dessen Bindungsstelle konkurrieren, erfolgt die Interaktion zwischen allosterischem und orthosterischem Liganden nicht kompetitiv, sondern kooperativ (Christopoulos und Kenakin, 2002). Dies bedeutet, dass sich der allosterische Modulator und der orthosterische Ligand hinsichtlich ihrer Affinität zur jeweiligen Bindungsstelle wechselseitig beeinflussen. Da das Bindungsverhalten eines Liganden das Resultat zweier kinetischer Teilreaktionen, der Dissoziation sowie der Assoziation, darstellt, liegt der gegenseitigen Beeinflussung des Bindungsverhaltens zweier kooperativ interagierender Liganden eine gegenseitige Beeinflussung ihrer Bindungskinetiken zugrunde. Durch Besetzen der von der orthosterischen Bindungsstelle getrennten allosterischen Bindungsstelle beeinflusst ein allosterischer Modulator beide genannten Teilreaktionen der Bindung eines orthosterischen Liganden, in der Regel im Sinne einer Dissoziationsverzögerung sowie einer Assoziationshemmung. Das Phänomen der Assoziationshemmung charakterisiert die allosterische Modulation nicht eindeutig, da nicht nur Liganden der allosterischen Bindungsstelle, sondern auch kompetitive Antagonisten an der orthosterischen Bindungsstelle zu einer Hemmung der Assoziation des orthosterischen Liganden führen würden. Dahingegen kann eine Verzögerung der Dissoziation des orthosterischen Liganden nur dadurch erklärt werden, dass ein allosterischer Modulator durch Bindung an eine zusätzliche, allosterische Bindungsstelle eines bereits Orthoster-besetzten Rezeptors die Dissoziation des orthosterischen Liganden hemmt. Somit ist die Beobachtung einer Dissoziationsverzögerung ein eindeutiger Beweis für eine allosterische Interaktion (Kostenis und Mohr, 1996b; Christopoulos und Kenakin, 2002).

Der Einfluss eines allosterischen Modulators auf die Gleichgewichtsbindung eines orthosterischen Liganden hängt von dem Verhältnis der durch den entsprechenden Modulator hervorgerufenen Effekte auf die Assoziation bzw. die Dissoziation des orthosterischen Liganden ab. Im Falle der positiven Kooperativität überwiegt die

Dissoziationsverzögerung die Assoziationshemmung, so dass der muskarinische allosterische Modulator die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden fördert. Bei neutraler Kooperativität gleichen sich die Effekte des Modulators auf Dissoziation und Assoziation des orthosterischen Liganden aus, weshalb die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden trotz der Beeinflussung der kinetischen Teilreaktionen durch den Modulator unverändert bleibt. Negative Kooperativität bedingt eine Abnahme der Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden; in diesem Falle hemmt der muskarinische allosterische Modulator die Assoziation des orthosterischen Liganden stärker als die Dissoziation. Es sei angemerkt, dass bei anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren die kinetischen Teilreaktionen durch allosterische Modulatoren auch in anderer Weise beeinflusst werden können, d. h. auch im Sinne der Beschleunigung.

1.3 Perspektiven für den Einsatz allosterischer Modulatoren in der Therapie

Ein prominentes Beispiel für ein auf allosterischer Modulation beruhendes therapeutisches Prinzip stellen die hauptsächlich zur Anxiolyse und Sedation eingesetzten Benzodiazepine dar. Neben den Bindungsstellen im zentralen Nervensystem, über die Benzodiazepine ihre klassischen Effekte Anxiolyse, Sedation, Myotonolyse und Antikonvulsion vermitteln, wurden auch in peripheren Geweben Bindungsstellen für Benzodiazepine gefunden (Gavish et al., 1999).

Auf zentraler Ebene interagieren Benzodiazepine positiv kooperativ mit dem physiologischen Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) und fördern dessen Bindung an den GABA_A-Rezeptor, einem ligandgesteuerten Ionenkanal-Rezeptor. Indem Benzodiazepine die Wirkung des Neurotransmitters GABA verstärken, erhöhen sie den Einfluss inhibitorischer Neurone im zentralen Nervensystem. Da die allosterische Bindungsstelle der Benzodiazepine, die auch als Omega-Rezeptor bezeichnet wird, Teil des GABA_A-Rezeptorproteins ist, liegen die zentralen Bindungsstellen für Benzodiazepine ausschließlich in GABAerg innervierten Bereichen des zentralen Nervensystems. Infolgedessen werden unter Benzodiazepin-Gabe nur solche zentralnervösen Funktionen beeinflusst, die von GABAergen Neuronen abhängen. Darin zeigt sich, dass Benzodiazepine differenziert in das zentrale Geschehen eingreifen, weshalb diese Substanzgruppe einen deutlichen Vorteil

gegenüber den in früheren Zeiten als Sedativa und Hypnotika eingesetzten, unspezifischer wirkenden Barbituraten besitzt.

An dem beschriebenen Beispiel der Benzodiazepine lassen sich verschiedene Vorteile des therapeutischen Einsatzes allosterischer Modulatoren gegenüber der Verwendung direkt agonistisch oder antagonistisch wirkender Arzneistoffe verdeutlichen. Einerseits wirken allosterische Modulatoren nur in Gegenwart des physiologischen Neurotransmitters, dessen Bindungsverhalten sie modulieren. Wie das Beispiel der Benzodiazepine zeigt, nutzen allosterische Modulatoren zur Vermittlung ihrer Wirkungen einen physiologischen Signaltransduktionsweg, wobei das physiologische Muster der Signaltransduktion erhalten bleibt. Andererseits besitzen allosterische Modulatoren den in der Therapie bedeutsamen Vorteil eines in höheren Konzentrationsbereichen sättigbaren Effektes (Lüllmann et al., 1969). Daher ist die Gefahr einer Intoxikation nach Überdosierung eines Medikamentes im Falle eines allosterischen Wirkprinzips entscheidend verringert (Holzgrabe und Mohr, 1998).

Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt wurde, ist die Homologie der Aminosäuresequenz der Rezeptorsubtypen M_1 - M_5 im Bereich der weiter extrazellulär gelegenen allosterischen Bindungsstelle deutlich geringer als im Bereich der inmitten der transmembranalen Domänen lokalisierten orthosterischen Bindungsstelle. Daraus ergibt sich ein weiterer Vorteil der allosterischen Modulatoren gegenüber direkten Agonisten bzw. Antagonisten an der orthosterischen Bindungsstelle muskarinischer Acetylcholinrezeptoren. Aufgrund des geringeren Konservierungsgrades der allosterischen Bindungsstelle besitzen allosterische Modulatoren ein größeres Potential hinsichtlich der Entwicklung von Subtyp-selektiven Arzneistoffen (Felder et al., 2000). Durch allosterische Modulation ergeben sich zwei mögliche Formen der Subtyp-Selektivität. Typischerweise entsteht Subtyp-Selektivität dadurch, dass ein allosterischer Modulator zu der allosterischen Bindungsstelle eines einzelnen Rezeptorsubtyps ein Maß an Affinität besitzt, das deutlich über die Affinität der entsprechenden Verbindung zu den übrigen Rezeptorsubtypen hinausgeht. Diese Form der Subtyp-Selektivität wird als relativ bezeichnet. Die relative Subtyp-Selektivität verringert sich bei steigenden Konzentrationen des allosterischen Modulators, da der allosterische Modulator in ausreichend hohen Konzentrationen alle Rezeptorsubtypen besetzen wird (Holzgrabe und Mohr, 1998). Die Mehrzahl der bekannten allosterischen Modulatoren weist eine relative Subtyp-Selektivität auf, wobei die Modulatoren typischerweise die höchste Affinität zum M_2 -Subtyp bzw. die niedrigste Affinität zum M_5 -Subtyp zeigen (Ellis und

Seidenberg, 2000; Buller et al., 2002). Relative Subtyp-Selektivität wäre theoretisch auch durch einen direkten Agonisten bzw. Antagonisten mit variierenden Affinitäten zu der orthosterischen Bindungsstelle der Rezeptorsubtypen M₁-M₅ erreichbar.

Die allosterische Modulation ermöglicht allerdings noch eine weitere Form der Subtyp-Selektivität, die auf dem Phänomen der Kooperativität zwischen allosterischem Modulator und orthosterischem Liganden beruht und von Birdsall et al. (1997) als absolute Subtyp-Selektivität bezeichnet worden ist. In diesem Fall zeigt der allosterische Modulator an einem Rezeptorsubtyp positive bzw. negative Kooperativität mit einem orthosterischen Liganden, wohingegen an allen übrigen Rezeptorsubtypen neutrale Kooperativität zwischen allosterischem und orthosterischem Liganden zu beobachten ist. Folglich wird die Bindung eines orthosterischen Liganden, beispielsweise des physiologischen Agonisten Acetylcholin, durch den Modulator an einem Rezeptorsubtyp gefördert bzw. gehemmt, während an den anderen Rezeptorsubtypen keine Beeinflussung der Acetylcholinbindung stattfindet. Ein großer Vorteil der absoluten gegenüber der zuvor dargestellten relativen Subtyp-Selektivität besteht darin, dass die absolute Subtyp-Selektivität bei steigenden Konzentrationen des allosterischen Modulators bestehen bleibt (Holzgrabe und Mohr, 1998).

Die Aussicht darauf, muskarinische Acetylcholinrezeptoren mittels allosterischen Modulatoren Subtyp-selektiv beeinflussen zu können, besitzt große Bedeutung für die Entwicklung von Subtyp-spezifischen Arzneistoffen, die sich im Gegensatz zu unselektiven Arzneistoffen durch ein vermindertes Nebenwirkungsspektrum auszeichnen. Durch selektive Modulation einzelner Subtypen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren könnten nach dem heutigen Stand der Kenntnis Fortschritte in der Behandlung von Schmerzzuständen, in der Therapie der Alzheimer-Demenz, des Morbus Parkinson, der Schizophrenie, der Harnblaseninkontinenz sowie chronisch-obstruktiver Atemwegserkrankungen erzielt werden (Eglen et al., 2001; Birdsall et al., 2001).

1.4 Fragestellung

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war es, die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität allosterischer Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ mit dem muskarinischen Antagonisten [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS) zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurde eine Reihe allosterischer Modulatoren ausgewählt, die durch strukturelle Modifikation aus dem Prototyp-Modulator W84 hervorgegangen waren. Mit

Hilfe des [³H]NMS sollten die Testsubstanzen hinsichtlich ihrer dissoziationsverzögernden Wirksamkeit bzw. ihres Kooperativitätsverhaltens geprüft werden. In diesen Untersuchungen wurden Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein eingesetzt, da der Subtyp M₂ der muskarinischen Acetylcholinrezeptoren in diesem Gewebe dominiert. Kürzlich zeigten Krejčí und Tuček (2002) durch quantitative Untersuchung der im Herzventrikelgewebe von Säugetieren enthaltenen mRNA der muskarinischen Rezeptorsubtypen M₁-M₅, dass über 90% der in diesem Gewebe enthaltenen Muskarinrezeptoren zum Subtyp M₂ gehören. Dementsprechend ist der prozentuale Anteil der anderen Rezeptorsubtypen im Herzventrikelgewebe vernachlässigbar gering.

Erste orientierende Studien ergaben, dass die in dieser Arbeit untersuchten allosterischen Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS am muskarinischen M₂-Rezeptor in unterschiedlicher Weise beeinflussen. Deshalb sollte in einem weiteren Schritt anhand einiger systematisch strukturmodifizierter Testsubstanzen die Beziehung zwischen Struktur und Wirkung der betreffenden allosterischen Modulatoren im Hinblick auf ihr Kooperativitätsverhalten mit [³H]NMS beschrieben werden.

Weiterhin sollte die Rezeptorepitop-Abhängigkeit der Wirkung ausgewählter allosterischer Modulatoren mit unterschiedlichem Kooperativitätsverhalten gegenüber [³H]NMS an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren charakterisiert werden. Hierzu sollten Radioligandbindungsstudien an muskarinischen Wildtyp-Rezeptoren sowie diversen chimären und punktmutierten Rezeptoren durchgeführt werden. Da die zuvor untersuchten Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität die Bedeutung der Affinität der allosterischen Modulatoren zum Orthoster-besetzten Rezeptor für das Auftreten positiver Kooperativität deutlich hervorgehoben hatten, sollten die Untersuchungen zur Epitop-Abhängigkeit der Kooperativität zunächst in Form kinetischer Experimente am Orthoster-besetzten Muskarinrezeptor durchgeführt werden. Als allosterische Testsubstanzen wurden der Prototyp-Modulator W84 sowie zwei methylierte W84-Derivate ausgewählt, die sich strukturell zwar nur im Grad ihrer Methylierung unterschieden, in vorangegangenen Untersuchungen jedoch entgegengesetzte Kooperativität mit [³H]NMS gezeigt hatten. Im Folgenden sollte die Frage geklärt werden, ob die Strukturmodifikationen, die eine Änderung der

Kooperativität der allosterischen Modulatoren mit [³H]NMS bedingen, auch zur Nutzung unterschiedlicher Epitope am muskarinischen M₂-Rezeptor führen.

In den Untersuchungen zur Epitop-Abhängigkeit wurden Membransuspensionen aus COS 7-Zellen, die mit Genen von humanen Wildtyp- bzw. mutierten Muskarinrezeptoren transient transfiziert waren, eingesetzt. Wie bereits in Kapitel 1.3 erwähnt wurde, besitzen die meisten bekannten allosterischen Modulatoren deutlich verschiedene Affinitäten zu den fünf Subtypen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren, typischerweise mit der höchsten Affinität zu M₂ sowie mit der niedrigsten Affinität zu M₅ (Ellis und Seidenberg, 2000; Buller et al. 2002). In Untersuchungen an muskarinischen Wildtyp-Rezeptoren vom Subtyp M₂ und M₅ konnte auch für die in der vorliegenden Arbeit ausgewählten allosterischen Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ ein hohes Maß an M₂/M₅-Selektivität festgestellt werden. Infolgedessen sollte die Frage nach der Epitop-Abhängigkeit der Wirkung der entsprechenden Testsubstanzen mit Hilfe von M₂/M₅-chimären Rezeptormutanten untersucht werden.

Im ersten Schritt sollten die für die M₂/M₅-Selektivität der allosterischen Modulatoren essentiellen Epitope durch Experimente an chimären Rezeptoren mit breiter Sequenzsubstitution eingegrenzt werden. Die in diesen Untersuchungen als wichtig erkannten Rezeptorareale sollten in nachfolgenden Experimenten an Rezeptormutanten mit kurzer chimärer Sequenzsubstitution stärker eingengt werden. Schließlich sollten die für die Subtyp-Selektivität der verschiedenen allosterischen Modulatoren essentiellen Epitope durch Einsatz von zielgerichteten Punktmutanten identifiziert werden. Zur Überprüfung der erhobenen Befunde sollte untersucht werden, ob die betreffenden allosterischen Modulatoren an Rezeptoren mit reziproker chimärer Sequenzsubstitution bzw. mit reziproker Punktmutation inverse Effekte zeigen.

In einem weiteren Abschnitt dieser Arbeit sollten Erkenntnisse zur Epitop-Abhängigkeit der Wirkung allosterischer Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ an Orthoster-freien Muskarinrezeptoren gesammelt werden. Erste orientierende Experimente sollten zeigen, ob die Epitope, die sich in vorausgegangenen Untersuchungen als essentiell für die Affinität der allosterischen Modulatoren zum Orthoster-besetzten M₂-Rezeptor erwiesen hatten, ebenfalls einen Einfluss auf die Affinität dieser Modulatoren zum entsprechenden Orthoster-freien Muskarinrezeptor besitzen.

2 Methoden und Material

Die Methoden der Herstellung und Charakterisierung von Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweines sowie aus transient transfizierten COS 7-Zellen und die Durchführung der sich anschließenden Radioligandbindungsstudien werden im folgenden Teil dieser Arbeit beschrieben.

2.1 Herstellung von Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweines

Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikelgewebe wurden aus Schweineherzen gewonnen, die im Schlachthof Köln entnommen und direkt anschließend unter Eiskühlung in eine Präparationskammer überführt wurden. Detailliert ist die Herstellung einer Membransuspension aus Hausschweinherzventrikelgewebe bereits von Tränkle et al. (1996) beschrieben worden. In der auf 4°C temperierten Kammer wurde ein Ventrikelgewebestück von ca. 40g zerkleinert und mit 0,32M Saccharoselösung gewaschen. Nach Aufnahme in Saccharoselösung (ca. 10 ml/g Feuchtgewicht des Gewebes) wurde die Gewebesuspension mit Hilfe eines Waring Blendor-Homogenisators (New Hartford, USA) zerkleinert. Die Suspension wurde sodann mit Saccharoselösung auf das Zwanzigfache der Einwaage aufgefüllt und mit einem Potter Elvehjem Glashomogenisator (Janke und Kunkel, IKA® Labortechnik, Staufen) homogenisiert. Anschließend wurde die Suspension in einer Ultrazentrifuge (Beckman L7-35, Rotortyp 35, Palo Alto, USA) 11 min mit 2000 Umdrehungen pro Minute (Upm) bei 4°C zentrifugiert. Durch eine weitere Zentrifugation über 41 min mit 32000 Upm wurden schließlich die im Überstand verbliebenen Membranfragmente abgetrennt. Die erhaltenen Pellets wurden in 50 mM Tris,HCl-Puffer (ca. 4 ml/g Gewebeeinwaage) resuspendiert und mit Hilfe des Potter Elvehjem Glashomogenisators homogenisiert. Aliquota mit je 1 ml der Suspension wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung im Experiment gelagert.

2.2 Bestimmung des Proteingehaltes der Membransuspension

Der Proteingehalt der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt, wobei humanes anstelle von bovinem Serumalbumin als Standard eingesetzt wurde. Der Mittelwert des Proteingehaltes von fünf hergestellten und untersuchten Homogenaten betrug $4,18 \pm 0,86$ mg Protein/ ml Membransuspension (Mittelwert \pm Standardfehler).

Homogenat	Proteingehalt nach Lowry (mg/ml Membransuspension)
24.03.1999	1,56
25.05.1999	3,55
09.08.1999	4,33
03.02.2000	6,92
29.01.2001	4,52
Mittelwert \pm Standardfehler	$4,18 \pm 0,86$

Tab. 1: Übersicht über den Proteingehalt der in dieser Arbeit eingesetzten Homogenate aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein.

2.3 Gewinnung von Membransuspensionen aus transient transfizierten COS 7-Zellen

Die in dieser Arbeit untersuchten muskarinischen Wildtyp-Rezeptoren vom Subtyp M_2 und M_5 sowie die Rezeptormutanten wurden nach transienter Transfektion in COS 7-Zellen exprimiert. Ziel war es, Membransuspensionen zu gewinnen, die einen Wildtyp- oder mutierten Rezeptor enthielten, um diese im Bindungsexperiment (s. 2.4) einzusetzen. Im folgenden Kapitel werden die molekular- und zellbiologischen Methoden beschrieben, die zur Gewinnung von Membransuspensionen aus transient transfizierten COS 7-Zellen angewendet wurden.

2.3.1 Kultivierung von COS 7-Zellen

Für die unter 2.3.3 beschriebenen zellbiologischen Arbeiten wurden COS 7-Zellen, die freundlicherweise von Dr. J. Ellis, Penn State University, Hershey PA, USA, zur Verfügung gestellt wurden, in Kultur genommen. COS 7-Zellen (Gluzman, 1981) sind embryonale Nierenepithelzellen der afrikanischen grünen Meerkatze. Sie wachsen in Zellkultur einschichtig. Die Arbeit mit lebenden COS 7-Zellen wurde stets unter aseptischen Bedingungen an einer Werkbank mit laminarem Luftstrom (Bio-Flow Technik, Meckenheim) durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂-Begasung und 96% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank (Water Jacketed Incubator, Forma Scientific, Marjetta, USA) in 10 cm- oder 15 cm-Zellkulturschalen (Cellstar Gewebekulturschalen, steril, 100/20 mm, Art. Nr. 664160 bzw. 145/20 mm, Kat. Nr. 639160, Greiner Bio-One, Solingen) kultiviert. Als Nährmedium wurde Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) verwendet. Die Herstellung des Nährmediums ist unter 2.5.5 beschrieben. Nach 2-3 Tagen hatten die COS 7-Zellen ca. 70%ige Konfluenz erreicht und wurden im Verhältnis 1:2 bis 1:4 auf neue Kulturschalen verteilt. Nach Absaugen des Nährmediums wurde der Zellrasen einer 15 cm-Zellkulturschale mit 15 ml PBS-Puffer (siehe 2.5.6) gewaschen und mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung ungefähr 5 min im Brutschrank inkubiert. Die vom Boden der Kulturschale abgelösten Zellen wurden auf mehrere neue Kulturschalen mit jeweils 30 ml frischem Nährmedium verteilt. Bei der Passage aus einer 10 cm-Kulturschale wurden die Zellen mit 10 ml PBS-Puffer gespült, mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert und in 15 ml frischem Nährmedium aufgenommen.

Einfrieren und Reaktivieren von COS 7-Zellen

Nach Abschluss der Arbeiten mit lebenden COS 7-Zellen wurden diese zur Aufbewahrung eingefroren. Nach Absaugen des Nährmediums wurden die Zellen einer 15 cm-Zellkulturschale mit 15 ml PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline, s. Tab. 13, S. 60) gespült und mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung bis zur Ablösung vom Boden inkubiert. Die Trypsin-haltige Zellsuspension wurde mit frischem Nährmedium im Verhältnis 1:1 versetzt, um den Verdauungsprozess durch Trypsin zu beenden. Nach fünfminütiger Zentrifugation der Zellsuspension bei 1000 x g und Raumtemperatur (Zentrifuge Avanti™ J25, Rotortyp JS-7.5, Beckman, Palo Alto, USA) wurde das Zellpellet in frischem Nährmedium resuspendiert. Das Volumen des Nährmediums wurde so berechnet, dass aus jeder konfluenten Zellkulturschale drei 1 ml-Aliquota zur

Aufbewahrung entstehen konnten. Die Zellsuspension wurde schließlich unter 10% DMSO-Zugabe auf Kryoröhrchen (Nunc CryoFlexTM, Kat. Nr. 343958, Nunc, Wiesbaden) verteilt. Um ein schonendes Einfrieren der Zellen zu gewährleisten, wurden diese zunächst bei -80°C eingefroren und nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Wiederaufnahme der Zellkultur wurde ein Kryoröhrchen in einem auf 37°C temperierten Wasserbad kurz aufgetaut. Eine 10 cm-Zellkulturschale wurde mit 15 ml Nährmedium beschickt, um die aufgetaute Zellsuspension aufzunehmen. Nach 6-8 h im Brutschrank hafteten die Zellen am Kulturschalenboden an. Um Reste von DMSO zu entfernen, wurde der Zellrasen nach Absaugen des Nährmediums vorsichtig mit 10 ml PBS-Puffer gespült und mit 15 ml frischem Nährmedium beschickt.

2.3.2 Molekularbiologische Arbeiten

2.3.2.1 Zielgerichtete Mutagenese

In der vorliegenden Arbeit wurde durch zielgerichtete Mutagenese die Basensequenz des in einem Plasmid lokalisierten Rezeptor-Gens verändert, um auf diese Weise Rezeptormutanten zu gewinnen. Eingesetzt wurden Okayama/Berg pcD-Plasmide (Okayama and Berg, 1983). Diese tragen das Gen, das für den entsprechenden muskarinischen Wildtyp- oder mutierten Rezeptor codiert. Bei den mutierten Rezeptor-Genen handelte es sich entweder um punktmutierte oder M₂/M₅-chimäre Rezeptor-Gene. Die Gewinnung der pcD-Plasmide, die das Gen zur Expression des humanen M₂- und M₅-Wildtyp-Rezeptors (Hm2pCD bzw. Hm5pCDp1) tragen, wurde von Bonner et al. (1987, 1988) beschrieben.

Die in dieser Arbeit untersuchten M₂/M₅-chimären Rezeptoren (CR3, CR4 und CR6) wurden durch Expression der entsprechenden M₂/M₅-chimären Muskarinrezeptor-Gene erhalten. Diese wurden von Dr. J. Wess und Dr. D. Gdula im Labor von Dr. M. Brann (National Institutes of Health, Bethesda MD, USA) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der chimären Muskarinrezeptor-Gene wurde von Wess et al. (1992) beschrieben. Die chimären Rezeptoren CR3, CR4 und CR6 sind in Abb. 8 (s. S. 90) schematisch dargestellt. Ihre genaue Sequenz lautet: CR3: hM₅ 1-162, hM₂ 156-300, hM₅ 336-532; CR4: hM₅ 1-445, hM₂ 391-421, hM₅ 477-532; CR6: hM₂ 1-69, hM₅ 77-445, hM₂ 391-466.

Die im Laufe dieser Arbeit durchgeführte zielgerichtete Mutagenese in Wildtyp- und punktmutierten Rezeptor-Genen erfolgte mit Hilfe des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene, La Jolla CA, USA). Durch Substitution einzelner Basen wurde das als Matrize dienende Wildtyp- oder bereits punktmutierte Rezeptor-Gen bei gleichbleibender Länge gezielt verändert. Die Abwandlung der Basensequenz und die Amplifikation der mutierten DNA-Fragmente erfolgte im Zuge einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR beginnt mit der Anlagerung von komplementären Oligonukleotiden an den als Matrize dienenden Plasmid-DNA-Strang, wonach die DNA-Polymerase diese sogenannten Oligonukleotid-Primer durch Einbau von weiteren Nukleotiden komplementär zur Matrize verlängert. Durch Einsatz von Oligonukleotid-Primern mit gewünschter Sequenzabweichung in der PCR wird eine zielgerichtete Mutagenese erreicht. Die bei dieser PCR entstehenden DNA-Stränge zeichnen sich durch die von der Matrize abweichende Basensequenz aus und tragen somit die Mutation an der gewünschten Stelle.

Beim **Design der Oligonukleotid-Primer** mit der angestrebten Mutation sind folgende Punkte zu beachten:

Es müssen zwei Oligonukleotid-Primer synthetisiert werden. Diese sind jeweils komplementär zu dem Abschnitt auf den gegenüberliegenden Matrizensträngen, der später die Mutation tragen soll. Die Länge der Oligonukleotid-Primer sollte zwischen 25 und 45 Basen gewählt werden, der Schmelzpunkt (Ablösungstemperatur eines gebundenen Oligonukleotid-Primers von der DNA-Matrize) der Primer muss dabei mindestens 4°C über der Temperatur der Elongationsphase der PCR liegen. Der beabsichtigte Aminosäureaustausch sollte durch möglichst wenige Basensubstitutionen erreicht werden. Ein hoher Gehalt - mindestens 40% - an Guanin-Cytosin-Basenpaaren stabilisiert die Bindung an die Matrize, die Primer sollten deshalb auch mit mehreren Guanin- und Cytosin-Basen beginnen und enden. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Oligonukleotid-Primer wurden in aufgereinigter Form von der Sigma-ARK GmbH, Darmstadt, bezogen.

Die **Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion** erfolgt in mehreren Schritten: Die als Matrize dienende DNA wird durch Hitze denaturiert, wobei sich die komplementären Stränge trennen. Im nächsten Schritt wird die Temperatur vermindert, wodurch es zur Hybridisierung zwischen Oligonukleotid-Primer und dem komplementären Abschnitt der DNA-Matrize kommt. Danach wird die Temperatur so gesteigert, dass optimale

Bedingungen für die DNA-Polymerase entstehen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete *Pfu*-DNA-Polymerase ist thermostabil und elongiert den gebundenen Primer durch Anlagerung von Desoxynukleotidtriphosphaten komplementär zur Matrize. Spezielle 0,2 ml-Reaktionsgefäße (MicroAmp[®], Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA, Kat. Nr. N801-0540) wurden nach dem in Tab. 2 dargestellten Pipettierschema befüllt und in einen programmierbaren Heizblock (Thermocycler, Perkin Elmer, Norwalk CT, USA) überführt.

Der Arbeitsanweisung des verwendeten Kits folgend wurde eine Kontrollreaktion mit dem pWhitescript[™]-Kontrollplasmid der Firma Stratagene durchgeführt. Dieses Plasmid trägt eine Punktmutation im β -Galactosidase-Gen, wodurch das Enzym nicht funktionsfähig exprimiert werden kann. Bei erfolgreich verlaufender Mutagenese wird diese Punktmutation wieder rückgängig gemacht. Nach Transformation der Kontrollreaktion in kompetente *E.coli* XL1-Blue-Bakterien zeigen Kolonien der transformierten Bakterien anhand einer Farbreaktion, ob die Mutagenese nach Plan verlaufen ist (siehe 2.3.2.2).

Probenreaktion	Kontrollreaktion
5 μ l „10x Reaktionspuffer“	5 μ l „10x Reaktionspuffer“
2 μ l (10 ng) DNA-Matrize	2 μ l pWhitescript Kontrollplasmid
2 μ l (125 ng) Primer #1	1,25 μ l Kontrollprimer #1
2 μ l (125 ng) Primer #2	1,25 μ l Kontrollprimer #2
1 μ l 10 mM dNTP-Mischung	1 μ l 10 mM dNTP-Mischung
38 μ l ddH ₂ O (50 μ l Endvolumen)	39,5 μ l ddH ₂ O (50 μ l Endvolumen)
1 μ l <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l)	1 μ l <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/ μ l)

Tab. 2: Pipettierschema der Polymerase-Kettenreaktion. Die Zusammensetzung des „10x Reaktionspuffers“ kann dem Handbuch des QuikChange[™] Site-Directed Mutagenesis Kits (s. 2.5.4, S. 56) entnommen werden.

Die oben beschriebenen Schritte der PCR werden in aufeinanderfolgenden Zyklen wiederholt, wie Tab. 3 schematisch wiedergibt. Dabei hängt die Anzahl der Zyklen im Segment 2 von der Anzahl auszutauschender Basen ab; der Austausch von einer, zwei oder mehr als zwei Basen bedingt 12, 16 bzw. 18 Zyklen. Die Elongationszeit von 12 min ergibt sich aus der Synthesegeschwindigkeit der verwendeten *Pfu*-DNA-Polymerase von 2 min/kb Plasmidlänge und einer pcD-Plasmidgröße von etwa 6 kb.

Segment	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit	Stadium der Reaktion
1	1	95°C	30 s	initiale Denaturierung
2	12-18	95°C 55°C 68°C	30 s 1 min 12 min	Denaturierung Primerhybridisierung Elongation
3	1	4°C	1 h bis ∞	Konservierung

Tab. 3: Zyklisierungsschema der Polymerase-Kettenreaktion

Nach abgeschlossener Polymerase-Kettenreaktion muss die mutierte, neu synthetisierte DNA von der Matrizen-DNA, die den entsprechenden Genabschnitt in unveränderter Form enthält, befreit werden. Jeder Reaktionsansatz wurde deshalb mit 1 μ l **Dpn I-Endonuklease** versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Hierzu wurden die Ansätze wieder in den programmierbaren Heizblock überführt, der zuvor für die PCR genutzt worden war. Die *Dpn I*-Endonuklease ist ein Restriktionsenzym, das methylierte DNA erkennt und selektiv verdaut. Die als Matrize eingesetzten DNA-Stränge waren methyliert; sie wurden aus *E.coli* XL1-Blue-Bakterien isoliert, die diese speziesspezifische DNA-Methylierung durchführen. Da die in der PCR neu entstehende mutierte DNA jedoch nicht methyliert und somit unempfindlich gegenüber der Behandlung mit *Dpn I*-Endonuklease ist, wird der Reaktionsansatz ausschließlich von methylierter, nicht mutierter Matrizen-DNA befreit.

Bis zur Durchführung der sich anschließenden Transformationsreaktion in *E.coli* XL1-Blue-Bakterien wurden die Ansätze mit der mutierten DNA bei -20°C gelagert.

2.3.2.2 Transformation

Die in der PCR gewonnene, mutierte DNA wurde durch Transformation in kompetente *E.coli* XL1-Blue-Bakterien eingebracht. Die verwendeten Bakterien sind aufgrund einer entsprechenden Vorbehandlung in der Lage, DNA aufzunehmen, weshalb man sie als kompetent bezeichnet.

Nach Auftauen der Bakterien auf Eis wurden eisgekühlte Polypropylen-Rundbodenröhrchen (Falcon 2059, Fisher-Scientific, Kat. Nr. 9401352) mit jeweils 50 μ l der Bakterienzellsuspension beschickt. Zu der Suspension wurde 1 μ l des jeweiligen *Dpn I*-Endonuklease-behandelten Reaktionsansatzes gegeben, der die mutierte DNA enthielt. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Transformation durch

Hitzeschock: die vorbereiteten Ansätze wurden 45 s lang in ein auf 42°C temperiertes Wasserbad gehalten, danach wurden sie für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von jeweils 500 µl auf 42°C temperiertes NZY⁺-Nährmedium (siehe 2.5.5) wurde jeder Reaktionsansatz 1 h mit 225-250 Upm bei 37°C geschüttelt. Da das die Mutation tragende Plasmid ebenfalls ein Ampicillin-Resistenzgen trägt, produzieren die Bakterienzellen, die durch erfolgreiche Transformation das Plasmid aufgenommen haben, in dieser Stunde β-Lactamase. Dies ist von Bedeutung, da im Anschluss jeweils 150 µl eines Ansatzes mit einer ausgeglühten Impföse auf bereits vorbereiteten Ampicillin-haltigen Luria-Bertani (LB)-Agarnährböden (siehe 2.5.5) ausgestrichen wurden. Die Agarplatten wurden über Nacht (ca. 16-18 h) im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nur erfolgreich transfizierte Bakterienzellen konnten wachsen und Kolonien bilden.

Die Transformation wurde von zwei Kontrollen begleitet. Als erste Kontrolle wurde die Transformation des Kontrollansatzes aus der PCR (s. S.14) durchgeführt. Nach erfolgreich verlaufener Mutagenese sollte dieser Ansatz ein wieder intaktes β-Galactosidase-Gen enthalten. Der zweite Kontrollansatz entstand durch Zugabe von 1 µl pUC18-Kontrollplasmid (mit intaktem β-Galactosidase-Gen) anstelle von *Dpn* I-Endonuklease-behandeltem Reaktionsansatz zu einem Aliquot Bakterienzellsuspension. Die erste Kontrolle dient der Überprüfung von Mutagenese- und Transformationseffizienz, wobei die zweite Kontrolle nur Aussagekraft bezüglich des Transformationserfolges hat. Vor dem Ausplattieren der Kontrollreaktionen wurden zwei Agarplatten mit jeweils 100 µl einer 10 mM IPTG-Lösung und nach Antrocknen dieser Lösung mit 100 µl einer 2%igen X-gal-Lösung benetzt. X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) ist ein Lactoseanalogon, das unter Enzyminduktion durch IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid) von der β-Galactosidase zu dem tiefblauen Reaktionsprodukt 5-Brom-4-chlor-indigo abgebaut wird. Von der ersten Kontrolle wurden 250 µl des Ansatzes auf einer vorbehandelten Agarplatte ausgestrichen, wohingegen von der zweiten Kontrolle nur 5 µl des Ansatzes nach Auffüllen mit NZY⁺-Nährmedium ad 200 µl ausplattiert wurden. Auch die Kontroll-Agarplatten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Wachsen nach dem Ausstrich der ersten Kontrolle blaue Kolonien auf der Agarplatte, so waren Mutagenese und Transformation erfolgreich verlaufen. Zeigte der Ausstrich der zweiten Kontrolle blaue Kolonien, konnte daraus nur auf eine gelungene Transformation rückgeschlossen werden.

2.3.2.3 Plasmid-Amplifikation durch Bakterienkultur

Nach Inkubation über Nacht zeigten die Agarplatten mit Ausstrichen der einzelnen Probenansätze weiße Kolonien, auf den Kontroll-Agarplatten waren blaue Kolonien zu sehen. Um die erfolgreich mutierten und transformierten Plasmide zu amplifizieren, wurden von jeder Agarplatte mit Ausstrich eines Probenansatzes zwei einzelne Kolonien mit Hilfe einer sterilen 100 µl-Pipettenspitze entnommen und separat in 50 ml-Polypropylen-Röhrchen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Kat. Nr. 227261) verbracht. Diese waren zuvor mit je 12 ml Luria-Bertani (LB)-Nährmedium (siehe 2.5.5) sowie 12 µl Ampicillin-Lösung [50 mg Ampicillin/ml Lösung] beschickt worden. Die Röhrchen wurden durch lockeres Aufsetzen und Fixieren der Deckel nur lose verschlossen und für 3 bis 6 h bei 37°C und 200 Upm im Schüttelinkubator (Orbital Shaker, Forma Scientific, Marjetta OH, USA) geschüttelt. Wiesen die Startkulturen eine deutliche Trübung auf, wurde für jede Mutante eine von zwei angesetzten Startkulturen ausgewählt, um eine Übernachtskultur anzuzüchten. Diese Startkultur wurde zu diesem Zweck in einen 2 l-Erlenmeyerkolben mit 500 ml LB-Nährmedium sowie 500 µl Ampicillin-Lösung [50 mg/ml Lösung] überführt. Die Kulturen verblieben über Nacht (16 bis 18 h) bei 37°C und 200 Upm im Schüttelinkubator und dienten am nächsten Tag der Gewinnung von Plasmiden (siehe 2.3.2.5) und Glycerolkulturen.

2.3.2.4 Glycerolkulturen

Vor der Gewinnung der amplifizierten Plasmide aus der Übernachtskultur wurden Glycerolkulturen zur Konservierung der erfolgreich transfizierten Bakterien hergestellt. Hierzu wurden 900 µl der Übernachtskultur und 300 µl sterilfiltriertes 60%iges Glycerol kurz mit Hilfe eines Rotationsmischers (Vortex Genie2[®], Bender & Holbein AG, Zürich, Schweiz) vermischt und in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Bakterien einer Glycerolkultur wurden bei Bedarf wieder reaktiviert, indem mit der Spitze einer sterilen 10 ml-Glaspipette ungefähr 20 µl einer gefrorenen Glycerolkultur herausgeschabt und in 500 ml LB-Nährmedium mit 500 µl Ampicillin-Lösung [50 mg/ml Lösung] überführt wurden. Zur Amplifikation der Plasmide wurde dieser Ansatz über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 Upm geschüttelt und diente am nächsten Tag ebenfalls der Plasmidgewinnung.

2.3.2.5 Plasmidgewinnung

Die Plasmidgewinnung wurde mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) durchgeführt. In diesem Abschnitt soll der theoretische Hintergrund der Isolierung von Plasmid-DNA kurz dargestellt werden; das exakte Protokoll zur Durchführung der einzelnen Schritte ist jedoch dem Handbuch des Qiagen Plasmid Maxi Kits zu entnehmen, das mit jedem Kit geliefert wird.

Nach 16 bis 18 h Inkubationszeit wurden die Bakterienzellen der Übernachtskultur abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in Tris/EDTA-Puffer, dem kurz zuvor RNase A zugesetzt worden war, resuspendiert. Durch Zusatz von NaOH-Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Puffer wurde eine alkalische Lyse der Bakterienzellen eingeleitet, wobei die anwesende RNase A in diesem Prozess freierwerdende RNA verdaut. Phospholipide und Proteinbausteine der bakteriellen Zellmembran werden durch SDS solubilisiert, das Zellinnere wird folglich freigesetzt. Chromosomale und Plasmid-DNA sowie Proteine werden durch NaOH denaturiert. Um Plasmid-DNA möglichst ohne Verunreinigung durch zellwandgebundene chromosomale DNA zu gewinnen, wurde die im Protokoll vorgegebene Lysezeit streng eingehalten. Diese garantiert eine optimale Freisetzung von gewünschter Plasmid-DNA aus der Zelle. Sie endet aber, bevor zellwandgebundene chromosomale DNA freigesetzt werden kann und bevor die freigesetzte Plasmid-DNA durch zu lange Einwirkung von NaOH irreversibel denaturiert wird. Durch Zugabe von Kaliumacetat-Puffer wurde das Lysat neutralisiert. Die hohe Salzkonzentration lässt Kaliumdodecylsulfat (KDS) und in Salz-Detergens-Komplexen eingeschlossene denaturierte Proteine, chromosomale DNA und sonstige Zellbestandteile ausfallen. Da Plasmid-DNA jedoch kleiner und ringförmig geschlossen ist, bleibt sie in Lösung und renaturiert. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und der klare Überstand auf eine präequilibrierte Anionenaustauscherharz-Säule der Firma Qiagen gegeben. Das Anionenaustauscherharz ist als Träger positiver Ladung in der Lage, Nukleinsäuren, die bei den gegebenen pH-Bedingungen anionisch vorliegen, zu binden. Die Salzkonzentration und der pH-Wert des Lysates sind so eingestellt, dass ausschließlich die gelöste Plasmid-DNA durch das Harz zurückgehalten wird. Alle anderen im Lysat gelösten Bestandteile laufen durch die Säule hindurch. Die Säule wurde mit einem Puffer mittlerer Salzkonzentration gewaschen, um verbliebene Verunreinigungen zu entfernen. Anschließend wurde die durch das Harz gebundene Plasmid-DNA durch einen Puffer hoher Salzkonzentration eluiert und durch Zugabe von Isopropanol

ausgefällt. Das nach Zentrifugation entstandene DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol salzfrei gewaschen, an der Luft getrocknet und in 600 µl sterilfiltriertem TE-Puffer (siehe 2.5.6) aufgenommen. Die auf diese Weise gewonnene DNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.3.2.6 Konzentration und Reinheit der Plasmid-DNA

Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der gewonnenen Plasmid-DNA erfolgte photometrisch (UV-Spektralphotometer Beckman DU[®], Beckman Instruments GmbH, München). Die Absorptionsmessung wurde bei 260 nm durchgeführt, was dem für doppelsträngige Nukleinsäuren typischen Absorptionsmaximum entspricht. Die DNA wurde im Verhältnis 1:50 mit Aqua dest. verdünnt und in 100 µl-Quarzglasküvetten unter Verwendung von Aqua dest. als Referenz vermessen. Die Berechnung der Konzentration einer wässrigen DNA-Lösung nach Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}) erfolgte nach der unten angegebenen Gleichung 1. Dieser Berechnung liegt zugrunde, dass bei einer gemessenen Absorption A_{260} von 1 ungefähr 50 µg doppelsträngige DNA pro 1 ml Probe vorliegen. Der vor der Messung durchgeführten DNA-Verdünnung ist in der Gleichung durch den Faktor 50 Rechnung getragen.

$$\text{DNA-Konzentration } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260} \cdot 0,05 \cdot 50$$

Gleichung 1

Zur Bestimmung des Reinheitsgrades der DNA wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen, da in DNA-Proben vorkommende Verunreinigungen, wie beispielsweise Proteine, bei 280 nm eine starke Absorption zeigen. Das Verhältnis der Absorptionen A_{260}/A_{280} liegt bei reinen DNA-Proben zwischen 1,8 und 2,0 und fällt bei Verunreinigung der DNA deutlich ab.

2.3.2.7 Sequenzierung

Zur Überprüfung der Basensequenz einer durch zielgerichtete Mutagenese neu gewonnenen Rezeptormutante wurde eine Sequenzanalyse des mutierten Genabschnitts in Auftrag gegeben. Das Pharmazeutische Institut für Mikrobiologie der Universität Bonn führte die Sequenzierung unter Anwendung des Didesoxynukleotid-vermittelten Kettenabbruchverfahrens nach Sanger (Sanger et al., 1977) durch.

2.3.3 Zellbiologische Arbeiten

2.3.3.1 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion von COS 7-Zellen wurde nach einem festen Zeitplan, der sich über sieben Tage erstreckte, vorbereitet und durchgeführt.

An **Tag 1** wurden die angezüchteten Zellen geerntet, gezählt und ausgesät. Nach Absaugen des Nährmediums und Spülen mit PBS-Puffer wurden die Zellen durch Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst. Die Trypsin-haltige Zellsuspension aller Kulturschalen wurde vereinigt und im Verhältnis 1:1 mit frischem Nährmedium versetzt, um den Trypsin-bedingten Verdauungsprozess zu beenden. Es wurden 50 µl der durch Schwenken homogenisierten Zellsuspension entnommen, um eine Zellzählung mit Hilfe eines Standard-Hämocytometers, der sogenannten Neubauer-Zählkammer, durchzuführen. Nach Aufbringen von 20 µl Zellsuspension auf das Hämocytometer wurden die Zellen unter dem Mikroskop (Axiovert 25, Carl Zeiss, Jena) ausgezählt. Die Zellen wurden in vier Großquadraten, die jeweils in 16 kleinere Quadrate unterteilt waren, ausgezählt, um eine durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat berechnen zu können. Ein Großquadrat repräsentiert ein Volumen von 0,1 mm³, was 0,1 µl entspricht. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension wurde dann nach Gleichung 2 ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ ml} = \text{durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat} \times 10^4 \quad \text{Gleichung 2}$$

Aus der Zellzahl pro ml wurde die Gesamtzellzahl der geernteten Zellsuspension ermittelt. Nach vierminütiger Zentrifugation der Zellsuspension bei 1000 x g und Raumtemperatur (in 50 ml-Polypropylen-Röhrchen; Rotortyp JS-7.5) wurde der Überstand abgesaugt und die Zellpellets in frischem Nährmedium aufgenommen. Das Volumen des Nährmediums wurde so berechnet, dass die entstehende Zellsuspension 625.000 Zellen pro ml enthielt. Eine dem Volumen der vorliegenden Zellsuspension entsprechende Anzahl an 10 cm-Zellkulturschalen wurde mit jeweils 10 ml Nährmedium beschickt. Nach Zugabe von 1 ml Zellsuspension wurden die Kulturschalen in den Inkubator überführt.

An **Tag 4** wurde die transiente Transfektion nach der Methode der Calciumphosphat-Präzipitation durchgeführt (Chen und Okayama, 1988). Bei dieser Methode werden DNA, Calcium und Phosphatpuffer gemischt, wobei sich ein feinkörniger Niederschlag aus Calciumphosphat und DNA bildet. Dieses Präzipitat wird auf die Zellen pipettiert,

woraufhin diese die Kristalle durch Endocytose aufnehmen. Die DNA wird in der Zelle transkribiert und anschließend translatiert.

Für jede Kulturschale, die transfiziert werden sollte, wurde ein Transfektionsansatz hergestellt. In sterile 5 ml-Rundboden-Röhrchen aus Polystyrol (Falcon 352054, Becton Dickinson Labware, Le Pont de Claix, Frankreich) wurden nacheinander 500 µl 0,25 M CaCl₂-Lösung, 20 µg DNA sowie 500 µl BBS (2x)-Puffer (s. Tab. 13, S. 60) pipettiert. Das hinzuzugebende Volumen in µl, das einer DNA-Menge von 20 µg entspricht, konnte anhand der unter 2.3.2.6 beschriebenen Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA ausgerechnet werden. Durch vorsichtiges Schütteln wurden die Komponenten vermischt. In den folgenden 10 bis 15 min ließ man die Transfektionsansätze stehen, damit sich der feinkörnige Niederschlag aus Calciumphosphat und DNA bilden konnte. Die Transfektion erfolgte, indem der 1 ml-umfassende Ansatz mit Hilfe einer sterilen Pasteur-Pipette unter ständigem Schwenken der Zellkulturschale gleichmäßig auf den Zellen verteilt wurde. Bis zum folgenden Tag verblieben die Zellen in einem auf 3% CO₂-Begasung eingestellten Inkubator, wobei das Nährmedium einen für die Transfektion optimalen pH-Wert annimmt.

An **Tag 5** erfolgte ein Wechsel des Nährmediums. Nach Absaugen des Nährmediums und Spülen des Zellrasens mit PBS-Puffer wurde jede Zellkulturschale mit 10 ml frischem Medium beschickt. Die Inkubation der Zellen wurde bei 5% CO₂-Begasung im Brutschrank fortgeführt.

An **Tag 7** – ungefähr 72 h nach der Transfektion - wurden die transfizierten Zellen geerntet und zur Gewinnung von Membransuspensionen eingesetzt.

2.3.3.2 Herstellung von Membransuspensionen aus transient transfizierten COS 7-Zellen

Jede Kulturschale mit transfizierten Zellen wurde zunächst vom Nährmedium befreit. Der am Boden der Kulturschale anhaftende Zellrasen wurde vorsichtig mit ungefähr 2 ml auf 37°C temperiertem PBS-Puffer (nicht sterilfiltriert) gespült und anschließend mit 4 ml eisgekühltem 5 mM Na,K,P_i-Puffer versetzt. Ein Zellschaber (Cell Scraper 32 cm, Nunc GmbH, Wiesbaden) diente dazu, die Zellen vom Boden der Kulturschale abzulösen. Die in den einzelnen Kulturschalen vorliegende Zellsuspension wurde in eisgekühlten Zentrifugen-Röhrchen (50 ml Centrifuge Bottles Polycarbonate, Kat. Nr. 357002, Beckman, Palo Alto, USA) vereinigt. Jeweils 5 Zellkulturschalen wurden mit insgesamt 5 ml gekühltem 5 mM Na,K,P_i-Puffer gespült; die aus diesem Spülvorgang

resultierende Zellsuspension wurde ebenfalls in die Zentrifugen-Röhrchen überführt. Jedes Zentrifugen-Röhrchen enthielt schließlich die Zellsuspension aus 5 Kulturschalen sowie dem zugehörigen Spülvorgang (ungefähr 25 ml). Mit Hilfe eines Polytron-Homogenisators (PT 10-35, Kinematica AG, Littau, Schweiz) wurde die Zellsuspension in den Zentrifugen-Röhrchen unter Eiskühlung dreimal 10 s auf Stufe 6 des Drehzahlreglers bearbeitet. Hierbei wurden die Zellen aufgeschlossen und zu Fragmenten zerkleinert. Zur Abtrennung rezeptorhaltiger Membranfragmente wurde 30 min bei 18000 Upm und 4°C zentrifugiert (Rotortyp JA-25.50). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 2 ml gekühltem 5 mM Na,K,P_i-Puffer resuspendiert und unter Verwendung einer Pasteur-Pipette in ein Potter-Glasgefäß verbracht. Das zugehörige Zentrifugen-Röhrchen wurde zweimal mit jeweils 2 ml 5 mM Na,K,P_i-Puffer geschüttelt und gespült. Nach Überführung der aus dem Spülvorgang resultierenden Suspension in das Potter-Glasgefäß wurde das gesammelte Volumen mit 5 mM Na,K,P_i-Puffer auf insgesamt 18 ml aufgefüllt und mit dem Potter Elvehjem Glashomogenisator homogenisiert. Schließlich wurde die Suspension mit 5 mM Na,K,P_i-Puffer so aufgefüllt, dass pro eingesetzter Zellkulturschale mit transfizierten Zellen 3 ml Membransuspension erhalten wurden. Die Membransuspension wurde zu je 1 ml in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

2.4 Radioligandbindungsstudien

2.4.1 Allgemeine Theorie zu Radioligandbindungsstudien

Die reversible Interaktion eines Liganden mit einem Rezeptor wird durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben:



[R], [L] und [RL] stellen die Konzentration der Rezeptoren, des Liganden und der Rezeptor-Ligand-Komplexe dar. k_{+1} und k_{-1} sind die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- bzw. der Dissoziationsreaktion.

Die Geschwindigkeit der Assoziation des Liganden an den Rezeptor v_{hin} wird nach der folgenden Gleichung berechnet:

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

Dementsprechend ergibt sich die Geschwindigkeit der Dissoziation eines Rezeptor-Ligand-Komplexes $v_{\text{rück}}$ aus:

$$v_{\text{rück}} = k_{-1} [RL] \quad \text{Gleichung 5}$$

Nehmen die Geschwindigkeiten der Assoziations- und Dissoziationsreaktion den gleichen Wert an, so ändert sich die Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe [RL] nicht mehr. Die Reaktion befindet sich im dynamischen Gleichgewicht und es gilt:

$$k_{+1} [R] [L] = k_{-1} [RL] \quad \text{Gleichung 6}$$

Aus dem Quotienten der beschriebenen kinetischen Konstanten ergibt sich die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D :

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} = \frac{1}{K_A} \quad \text{Gleichung 7}$$

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D entspricht der Ligandkonzentration, bei der eine halbmaximale Besetzung der vorhandenen Rezeptoren durch den Liganden vorliegt. Ein niedriger K_D -Wert ist somit ein Maß für eine hohe Affinität des Liganden

zum Rezeptor. K_A ist die Gleichgewichtsassoziationskonstante und ergibt sich aus dem Kehrwert von K_D .

2.4.2 Homologe Konkurrenzexperimente

2.4.2.1 Theoretische Grundlagen

Mittels homologen Konkurrenzexperimenten werden die Bindungseigenschaften einer Membransuspension charakterisiert, bevor diese im Bindungsexperiment eingesetzt wird. Ziel der Charakterisierung ist es, die Affinität eines Liganden zu seinem Rezeptor (K_D) sowie die Konzentration der vorhandenen Bindungsstellen (B_{\max}) zu bestimmen. Homologe Konkurrenzexperimente zeichnen sich dadurch aus, dass ein Radioligand und ein strukturidentischer, aber nicht radioaktiv markierter Inhibitor um die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor konkurrieren. Der Radioligand wird in einer konstanten Konzentration eingesetzt, während die Konzentration des Inhibitors stufenweise erhöht wird. Die Gesamtbindung des Radioliganden wird in Abwesenheit eines Inhibitors ermittelt; seine unspezifische Bindung wird in Anwesenheit eines im Überschuss zugesetzten strukturverschiedenen Kompetitors gemessen, der den Radioliganden von seinen spezifischen Bindungsstellen verdrängt. Die gemessene Bindung des Radioliganden wird sodann gegen den Logarithmus der molaren Konzentration des Inhibitors aufgetragen. Die computergestützte Kurvenanpassung an die Datenpunkte erfolgt durch nichtlineare Regressionsanalyse gemäß der Hill-Gleichung (Hill, 1910):

$$B_{\text{ges}} = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + (\text{IC}_{50}/10^{[X]})^{n_H}} \quad \text{Gleichung 8}$$

- B_{ges} : Gesamtbindung des Radioliganden
- Max: Gesamtbindung gemessen in Abwesenheit des Inhibitors (oberes Plateau der Kurve)
- Min: Gesamtbindung gemessen in Anwesenheit hoher Konzentrationen des strukturverschiedenen Inhibitors, entspricht der unspezifischen Bindung des Radioliganden (unteres Plateau der Kurve)
- IC_{50} : Konzentration des Inhibitors, die die spezifische Bindung des Radioliganden um 50% reduziert
- [X]: Konzentration des Inhibitors
- n_H : Hill-Koeffizient als Maß für die Steilheit der Kurve

Aus der sigmoidal verlaufenden Inhibitionskurve ergeben sich der IC_{50} -Wert, die Konzentration des Inhibitors, die die spezifische Radioligandbindung halbmaximal reduziert, sowie der Hill-Koeffizient n_H , der ein Maß für die Steilheit der Kurve ist. Ein Hill-Koeffizient von $n_H = -1$, lässt auf eine Interaktion des Liganden mit einer einheitlichen Rezeptorpopulation schließen.

Nach Ermittlung des IC_{50} -Wertes aus der Inhibitionskurve kann mit Hilfe der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973) die Inhibitionskonstante K_i , die der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Inhibitors entspricht und die Affinität des Inhibitors zum Rezeptor beschreibt, berechnet werden. Dazu müssen die Radioligandkonzentration $[L]$ und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Radioliganden K_D bekannt sein; außerdem muss die Reaktion das Gleichgewicht erreicht haben. Die Gleichung lautet:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad \text{Gleichung 9}$$

Die Konzentration des Radioliganden $[L]$ ist eine bekannte Größe, die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D jedoch nicht. Da aber Radioligand und Inhibitor bei homologen Konkurrenzexperimenten strukturidentisch sind, weisen sie die gleiche Affinität zum Rezeptor auf. Es gilt $K_D = K_i$ und die Gleichung nach Cheng und Prusoff vereinfacht sich wie folgt:

$$K_D = K_i = IC_{50} - [L] \quad \text{Gleichung 10}$$

Durch Umwandlung der Gleichung des Massenwirkungsgesetzes nach Gleichung 9 entwickelten DeBlasi et al. (1989) eine Gleichung zur Ermittlung der Konzentration der vorhandenen Bindungsstellen B_{max} :

$$B_{max} = \frac{[RL]_0 IC_{50}}{[L]} \quad \text{Gleichung 11}$$

B_{max} : Konzentration der vorhandenen Bindungsstellen

$[RL]_0$: spezifische Radioligandbindung, d.h. Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe in Abwesenheit eines Inhibitors

Unter Anwendung der Gleichungen 10 und 11 auf die Daten von homologen Konkurrenzexperimenten können die zur Charakterisierung einer Membransuspension benötigten Parameter K_D und B_{\max} bestimmt werden.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der genannten Bindungsparameter einer Membransuspension geht von der Sättigungsisotherme nach Langmuir aus:

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

B: Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe, entspricht [RL]

Die Sättigungsisotherme stellt die Abhängigkeit der Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe B von der Ligandkonzentration [L] unter Gleichgewichtsbedingungen dar. Die fraktionelle Rezeptorbesetzung ergibt sich daraus wie folgt:

$$\frac{B}{B_{\max}} = \frac{[L]}{K_D + [L]} \quad \text{Gleichung 13}$$

Durch lineare Transformation dieser Sättigungsisotherme entsteht die Scatchard-Gleichung (1949):

$$\frac{B}{[L]} = \frac{B_{\max} - B}{K_D} = -\frac{1}{K_D} B + \frac{B_{\max}}{K_D} \quad \text{Gleichung 14}$$

Nach Scatchard lassen sich die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Radioliganden K_D sowie die Konzentration der vorhandenen Bindungsstellen B_{\max} ebenfalls ermitteln. Die Bindungsdaten eines homologen Konkurrenzexperimentes werden unter Anwendung der Gleichung linear transformiert und graphisch aufgetragen. Dabei müssen die Konzentrationen von freiem und gebundenem Liganden, [L] bzw. B, bekannt sein. Der Schnittpunkt der aus der linearen Regressionsanalyse resultierenden Geraden mit der Abszisse spiegelt die Konzentration der vorhandenen Bindungsstellen B_{\max} wider. K_D ergibt sich aus dem negativen Kehrwert der Steigung der Geraden.

Bennett und Yamamura (1985) berichteten über Voraussetzungen zur Anwendung der Scatchard-Analyse. Demzufolge muss die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor bei der Messung ein dynamisches Bindungsgleichgewicht erreicht haben und dem Massenwirkungsgesetz folgen. Der B_{\max} -Wert (fmol/mg Protein) darf 10% des K_D -

Wertes (nmol/l) nicht übersteigen. Weiterhin darf die Ligandbindung an den Rezeptor keinen Einfluss auf nachfolgende Interaktionen zwischen Rezeptor und Ligand haben. Ligand- und Rezeptorpopulation müssen homogen sein. Die unspezifische Bindung des Radioliganden muss exakt bestimmt werden. Die Autoren weisen darauf hin, dass maximal 10% der eingesetzten Ligandkonzentration gebunden werden dürfen, da die freie Ligandkonzentration über den Zeitraum des Versuches als konstant und unverändert betrachtet wird.

2.4.2.2 Durchführung der Experimente

Zur Bestimmung der Bindungseigenschaften der in dieser Arbeit eingesetzten Membransuspensionen wurden die Bindungsparameter K_D und B_{max} mit Hilfe des radioaktiv markierten, muskarinischen Antagonisten [3H]N-Methylscopolamin ([3H]NMS) bestimmt. Die Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikelgewebe sowie aus COS 7-Zellen erfolgte in homologen Konkurrenzexperimenten, die im Folgenden beschrieben werden sollen. Die Gefäße für die Reaktionsansätze wurden in Abhängigkeit von der angestrebten Filtrationsmethode ausgewählt. Bei manueller Einzelfiltration der Proben wurden Reaktanden und Inkubationspuffer in Reagenzgläser bzw. zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit in zuvor mit Sigmacote[®] silanierte Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Die Entscheidung, Zentrifugengläser gegen silanierte Reaktionsgefäße auszutauschen, wurde gefällt, da die Bindung allosterischer Testsubstanzen an Glasoberflächen nicht ausgeschlossen werden konnte. Die Versuche wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt. War eine Vakuumfiltration mit Hilfe des Brandel-Filtrationssystems beabsichtigt, wurden die Reaktionsansätze in Reagenzgläser (Boratglas-Kulturröhrchen, 16x100 mm, Kat. Nr FB51330, Fisher Scientific, Schwerte) pipettiert. Da diese Filtrationsmethode mit einer geringeren Streuung der Messdaten einhergeht, wurden diese Versuchsansätze doppelt bestimmt. Auf die verschiedenen Filtrationsmethoden soll im letzten Abschnitt dieses Kapitels ausführlich eingegangen werden. Die Ansatzkomponenten wurden gemäß folgendem Schema einpipettiert:

Volumen [μ l]	Einpipettierte Lösung
100	[3 H]NMS in Aqua dest.
50	Aqua dest. (Gesamtbindung), Atropin in Aqua dest. (unspezifische Bindung) oder NMS-Verdünnungsreihe in Aqua dest.
1100	Inkubationspuffer
250	Homogenat in Puffer verdünnt

Tab. 4: Pipettierschema zur Durchführung homologer Kompetitionsversuche mit Homogenaten aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein sowie aus COS 7-Zellen. Zur Pufferzusammensetzung siehe Text und Tab. 13.

Die Konzentration des Radioliganden [3 H]NMS im Reaktionsansatz betrug 0,2 nM. Der nicht radioaktiv markierte, strukturidentische Inhibitor NMS wurde in aufsteigenden Konzentrationen eingesetzt, die im Reaktionsansatz Endkonzentrationen von 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 100 und 1000 nM ergaben.

In den Protokollen zur Charakterisierung der oben genannten Homogenattypen wurden unterschiedliche Konzentrationen des Kompetitors zur Bestimmung der unspezifischen Bindung sowie verschiedene Pufferbedingungen, Inkubationstemperaturen und Filtrationsanlagen eingesetzt. Im folgenden Abschnitt sollen diese Variablen erläutert werden.

Die Bestimmung der unspezifischen Bindung des Radioliganden erfolgte, indem der orthosterische Antagonist Atropin als strukturverschiedener Inhibitor im Überschuss zugesetzt wurde. In homologen Wettbewerbsexperimenten zur Charakterisierung von Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikelgewebe wurde Atropin mit der Endkonzentration 1 μ M eingesetzt, wohingegen die Atropin-Endkonzentration in den entsprechenden Versuchen zur Charakterisierung von COS 7-Zellhomogenaten 3 μ M betrug. Die Atropin-Endkonzentration in letztgenannten Experimenten wurde in Anlehnung an die unter 2.4.4 beschriebenen kinetischen Experimente gewählt. Diese wurden ebenso wie die hier beschriebenen homologen Wettbewerbsexperimente bei Verwendung von COS 7-Zellhomogenaten mit Hilfe des Brandel-Filtrationssystems (s. 2.4.4.3.5) durchgeführt. Ziel war es, verschiedenen Experimenten mit gleichem Homogenattyp und gleicher Filtrationsmethode gleiche Versuchsbedingungen zugrunde zu legen.

Ein weiterer Unterschied in der Untersuchung der beiden Homogenattypen lag in den verschiedenen Pufferbedingungen. Bei der Charakterisierung von Membran-

suspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein wurde die frisch aufgetaute Membransuspension mit 50 mM Tris,Cl-Puffer (s. Tab. 13) verdünnt, als Inkubationspuffer wurde Mg,Tris,Cl,P_i-Puffer verwendet. Die Endkonzentrationen der Pufferkomponenten im Gesamtansatz betragen 2,6 mM MgHPO₄ und 45 mM Tris-HCl. In Untersuchungen der Bindungseigenschaften von COS 7-Zellhomogenaten wurden diese nach dem Auftauen mit 5 mM Na,K,P_i-Puffer (s. Tab. 13) verdünnt. Als Inkubationspuffer wurde ebenfalls Na,K,P_i-Puffer eingesetzt, wobei dessen Endkonzentration im Reaktionsansatz 5 mM betrug. Die Pufferkomponenten wiesen hierbei Endkonzentrationen von 4 mM Na₂HPO₄ und 1 mM KH₂PO₄ auf.

Die Reaktion wurde durch Zugabe der entsprechenden Membransuspension gestartet und die Ansätze direkt im Anschluss ungefähr 5 s lang geschüttelt (Vortex Genie2[®], Bender & Holbein AG, Zürich, Schweiz). Nach Abdichten der Zentrifugengläser mit Parafilm (American National Can[™], Chicago, USA) bzw. nach Verschließen der Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden die Reaktionsansätze in ein temperiertes Wasserbad (GFL[®] 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel) überführt und bis zur Einstellung des Reaktionsgleichgewichtes während 2 Stunden unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Temperatur des Wasserbades wurde zuvor in Abhängigkeit von den vorliegenden Pufferbedingungen eingestellt: Versuchsansätze in Mg,Tris,Cl,P_i-Puffer wurden bei 37°C inkubiert, Na,K,P_i-Puffer als Inkubationsmedium erforderte eine Temperatur von 23°C.

Die Reaktion wurde beendet, indem eine Vakuumfiltration zur Trennung des frei vorliegenden von membrangebundenem Radioliganden durchgeführt wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden in Abhängigkeit von dem untersuchten Homogenattyp zwei verschiedene Filtrationsmethoden angewendet, die im folgenden beschrieben werden. Homologe Kompletionsansätze zur Charakterisierung von Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikelgewebe wurden nach Erreichen des Reaktionsgleichgewichtes kurz geschüttelt. Den einzelnen Proben wurde ein Volumen von 1 ml entnommen und über einen Glasfaserrundfilter (GF6, Schleicher & Schüll, Dassel) vakuumfiltriert. Der Filter wurde zweimal mit je 5 ml eisgekühltem Aqua dest. gespült, in ein Szintillationsgefäß (21 ml-Polyethylengefäß, Labomedic, Bonn) verbracht und mit 5 ml Szintillationscocktail (Ready Protein[®], Beckman) versetzt. Während einer einstündigen Inkubationsphase bewirkt der Szintillationscocktail die Auflösung von Gewebekomponenten, so dass anschließend die in der Probe enthaltene Radioaktivität mit Hilfe eines Flüssigkeits-Szintillationsmessgerätes (Beckman LS 6000 SC) erfasst

werden kann. In homologen Konkurrenzexperimenten zur Charakterisierung von COS 7-Zellhomogenaten wurde hingegen die membrangebundene Radioaktivität mit Hilfe eines Brandel-Filtrationssystems (Brandel Harvester, M-48, Biomedical Research & Development Laboratories, Gaithersburg MD, USA) abgetrennt. Das Brandel-Filtrationssystem ermöglicht die gleichzeitige Vakuumfiltration von 48 Reaktionsansätzen über eine Glasfaserfiltermatte (Whatman GF/B, Brandel Part # FPB 148L). Um die unspezifische [³H]NMS-Bindung an den Filter zu vermindern, wurde die Filtermatte vor ihrer Verwendung mindestens 30 min lang in 0,1%ige (m/v) Polyethylenimin-Lösung eingelegt und unmittelbar vor der Filtration der Reaktionsansätze einmal mit eisgekühltem 40 mM Na,K,P_i-Puffer gespült. Dieser Puffer diente ebenfalls dazu, die Filtermatte nach Filtration der Proben zweimal zu spülen, wobei ungebundener Radioligand ausgewaschen werden soll. Nach Öffnen des Filtrationsblocks erschienen die zu den einzelnen Proben gehörenden Filtrationsareale auf der Filtermatte durch den Druck der Dichtungsringe gut erkennbar und konnten als einzelne Rundfilter mit Hilfe einer Pinzette entnommen werden. Die einzelnen Filter wurden in Szintillationsgefäße überführt und für 1 h mit 5 ml gewebe lösendem Szintillationscocktail inkubiert. Anschließend wurden die Proben der oben bereits beschriebenen Flüssigkeits-Szintillationsmessung unterworfen. Die Analyse der Daten erfolgte wie unter 2.4.2.1 beschrieben.

2.4.3 Heterologe Interaktionsexperimente

2.4.3.1 Theoretische Grundlagen

Ziel heterologer Interaktionsexperimente in der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss allosterischer Modulatoren auf die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden [³H]NMS zu untersuchen. Allosterische Modulatoren konkurrieren nicht mit dem Radioliganden um dessen orthosterische Bindungsstelle, sondern sie besetzen eine zweite, allosterische Bindungsstelle am Rezeptor. Orthosterischer Ligand und allosterischer Modulator können bei zeitgleicher Besetzung ihrer jeweiligen Bindungsstellen miteinander interagieren. Kooperativität bezeichnet die gegenseitige Beeinflussung der Affinität von Ligand und Modulator zur jeweiligen Bindungsstelle. Durch heterologe Interaktionsexperimente kann die Kooperativität zwischen allosterischem Modulator und orthosterischem Liganden sowie die Affinität des allosterischen Modulators zum nicht mit Ligand besetzten Rezeptor bestimmt werden.

Die Interaktionen zwischen einem orthosterischen Radioliganden L, einem allosterischen Modulator A und einem Rezeptor R wurde von Ehlert (1988) durch das ternäre Modell allosterischer Interaktion - auch als Kooperativitätsmodell bezeichnet - beschrieben:

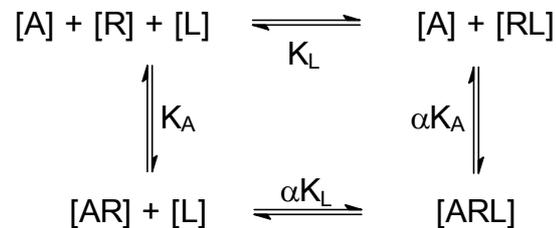


Abb. 1: Ternäres Modell allosterischer Interaktion (Kooperativitätsmodell) nach Ehlert (1988)

K_L : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Radioliganden L als Maß für dessen Affinität zur orthosterischen Bindungsstelle

K_A : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des allosterischen Modulators A als Maß für dessen Affinität zur allosterischen Bindungsstelle am nicht Orthoster-besetzten, freien Rezeptor (nicht identisch mit der Gleichgewichtsassoziationskonstanten K_A in Gleichung 7, s. 2.4.1, S. 24)

α : Kooperativitätsfaktor

Der Kooperativitätsfaktor α spiegelt das Ausmaß der wechselseitigen Beeinflussung der Bindungsaffinitäten von orthosterischem Liganden und allosterischem Modulator wider. Das Phänomen der gegenseitigen Beeinflussung der Bindungsaffinitäten ist in einer Beeinflussung der Bindungskinetiken von Radioligand und allosterischem Modulator begründet. Die Ligandbindung ist das Resultat zweier kinetischer Teilreaktionen, der Dissoziation und der Assoziation. Der allosterische Modulator beeinflusst beide Teilreaktionen der Ligandbindung, in der Regel im Sinne einer Dissoziationsverzögerung bzw. einer Assoziationshemmung. Dabei führt erstere zu einer Bindungsförderung, letztere zu einer Bindungsverminderung. Der Effekt des allosterischen Modulators auf die Gleichgewichtsbindung des Radioliganden ergibt sich letztlich aus der Bilanz beider kinetischen Ereignisse auf molekularer Ebene. Negative Kooperativität, bei der der Kooperativitätsfaktor α einen Wert größer 1 annimmt, kommt demzufolge dadurch zustande, dass der allosterische Modulator die Assoziation des Radioliganden stärker hemmt als die Dissoziation verzögert wird. Der Modulator hat in

diesem Fall eine höhere Affinität zum freien als zum Orthoster-besetzten Rezeptor und vermindert die Gleichgewichtsbindung des Orthosters. Werden Assoziation und Dissoziation des orthosterischen Liganden durch den allosterischen Modulator im gleichen Maße gehemmt, so heben sich die kinetischen Effekte gegenseitig auf und die Gleichgewichtsbindung des Orthosters bleibt unbeeinflusst; es liegt neutrale Kooperativität mit einem Kooperativitätsfaktor von $\alpha = 1$ vor. Besitzt der allosterische Modulator eine höhere Affinität zum Orthoster-besetzten als zum freien Rezeptor, so fällt die Dissoziationsverzögerung stärker aus als die Assoziationshemmung und der allosterische Modulator fördert die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden im Sinne der positiven Kooperativität. In diesem Fall nimmt der Kooperativitätsfaktor α Werte zwischen 0 und 1 an.

Aus dem ternären Modell allosterischer Interaktion nach Ehlert wurde eine Gleichung abgeleitet, nach der eine computerunterstützte, nichtlineare Regressionsanalyse zur Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A eines allosterischen Modulators sowie des Kooperativitätsfaktors α der Interaktion zwischen Orthoster und Alloster durchgeführt werden kann:

$$B_A = \frac{B_0 \cdot (10^{\log L} + 10^{\log K_L})}{10^{\log L} + 10^{\log K_L} \left[\frac{10^{\log K_A} + 10^{\log X}}{10^{\log K_A} + 10^{\frac{\log X}{\alpha}}} \right]} \quad \text{Gleichung 15}$$

- B_A : Spezifische Bindung des Radioliganden in Anwesenheit des allosterischen Modulators
- B_0 : Spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des allosterischen Modulators
- K_L : K_D des Radioliganden [M]
- K_A : K_D des allosterischen Modulators am nicht Orthoster-besetzten Rezeptor [M]
- α : Kooperativitätsfaktor
- X : Konzentration des allosterischen Modulators [M]
- L : Konzentration des Radioliganden [M]

Die Größe K_L wird in homologen Konkurrenzexperimenten - wie unter 2.4.2.1 beschrieben - ermittelt und in der oben dargestellten Analyse nach Ehler (1988) ebenso wie die Größe L konstant gesetzt.

Die nicht lineare Regressionsanalyse nach Gleichung 15 versagt bei Vorliegen einer neutral kooperativen Interaktion. Um auch neutral kooperatives Verhalten analysieren zu können, wird K_A in Gleichung 15 durch den Quotienten $EC_{0,5,diss}/\alpha$ ersetzt (Daiss et al., 2002). $EC_{0,5,diss}$ ist die Konzentration des allosterischen Modulators, die die Dissoziation des Radioliganden halbmaximal reduziert.

Bei der Durchführung heterologer Interaktionsexperimente zur Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A eines allosterischen Modulators sowie des Kooperativitätsfaktors α wird sichergestellt, dass zum Zeitpunkt der Messung Gleichgewichtsbedingungen vorliegen. Lazareno und Birdsall (1995) entwickelten eine Gleichung, nach der die Halbwertszeit der Einstellung des Bindungsgleichgewichtes ermittelt werden kann:

$$t_{1/2obs} = t_{1/2off} \left(1 + X \cdot \frac{1}{EC_{0,5,diss}} \right) \quad \text{Gleichung 16}$$

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

$t_{1/2off}$: Halbwertszeit der Dissoziation des orthosterischen Liganden unter Kontrollbedingungen

X : Konzentration des allosterischen Modulators [M]

$EC_{0,5,diss}$: Konzentration des allosterischen Modulators bei halbmaximaler Reduktion der Radioligand-Dissoziation

Der sich anschließenden Berechnung der im Experiment einzuhaltenen Inkubationszeit liegt die Annahme zugrunde, dass das Bindungsgleichgewicht nach der fünffachen Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung $t_{1/2obs}$ erreicht ist.

2.4.3.2 Durchführung der Experimente

Heterologe Interaktionsexperimente wurden in Analogie zu den unter 2.4.2.2 beschriebenen homologen Konkurrenzversuchen durchgeführt. Details zur praktischen Durchführung der einzelnen Schritte beim Ansetzen der Proben, während der Inkubationsphase, beim Filtrationsprozess sowie zur Vorbereitung der Flüssigkeits-

Szintillationsmessung können daher dem Kapitel 2.4.2.2 entnommen werden. Im Folgenden sollen die experimentellen Besonderheiten heterologer Interaktionsexperimente aufgezeigt werden. Um den Effekt eines allosterischen Modulators auf die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung untersuchen zu können, wurde der Radioligand mit ansteigenden Konzentrationen dieses Modulators inkubiert. Die [³H]NMS-Konzentration in heterologen Interaktionsansätzen betrug 0,2 nM, 0,05 nM oder 0,02 nM. Heterologe Interaktionen von allosterischen Modulatoren mit [³H]NMS wurden sowohl an Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikelgewebe als auch an COS 7-Zellhomogenaten untersucht, wobei die Versuche unabhängig vom eingesetzten Homogenattyp nach folgendem Pipettierschema angesetzt wurden:

Volumen [µl]	Einpipettierte Lösung
100	[³ H]NMS in Aqua dest.
50	Aqua dest. (Gesamtbindung), Atropin in Aqua dest. (unspezifische Bindung) oder Alloster-Verdünnungsreihe in Aqua dest.
1100	Inkubationspuffer
250	Homogenat in Puffer verdünnt

Tab. 5: Pipettierschema zur Durchführung heterologer Interaktionsversuche. Die Verdünnung des Homogenates mit Puffer richtete sich nach den Ergebnissen der homologen Wettbewerbsversuche. Zu den Pufferbedingungen siehe Text und Tab. 13.

Die Wahl der Ansatzgefäße richtete sich wie unter 2.4.2.2 beschrieben nach der geplanten Filtrationsmethode. Experimente, bei denen manuelle Einzelfiltration der Proben vorgesehen war, wurden allerdings ausschließlich in zuvor mit Sigmacote[®] silanisierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Diese Experimente wurden als Dreifachbestimmungen durchgeführt. Bei Einsatz des Brandel-Filtrationssystems erfolgte eine Doppelbestimmung der Reaktionsansätze.

Unterschiede ergaben sich in den Protokollen von heterologen Interaktionsversuchen wiederum bezüglich der Konzentration des Kompetitors zur Bestimmung der unspezifischen Bindung, der Pufferbedingungen, der Inkubationstemperatur sowie der angewandten Filtrationsmethode. Die zur Bestimmung der unspezifischen [³H]NMS-Bindung in heterologen Interaktionsversuchen eingesetzte Atropinkonzentration richtete sich nach der im Versuchsprotokoll vorgesehenen Filtrationsmethode. War eine manuelle Einzelfiltration der Proben beabsichtigt, so wurde Atropin in einer

Endkonzentration von 1 μM eingesetzt. Die Endkonzentration des Kompetitors in Versuchen mit Vakuumfiltration am Brandel-Filtrationssystem betrug 3 μM . Die Pufferbedingungen in heterologen Interaktionsversuchen richteten sich zunächst danach, ob Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikelgewebe oder COS 7-Zellhomogenate eingesetzt wurden. In dieser Phase entsprachen die Pufferbedingungen somit ebenfalls den zur Durchführung homologer Konkurrenzexperimente (s. 2.4.2.2) gemachten Angaben. Zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit wurden allerdings auch heterologe Interaktionsexperimente mit Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein in 5 mM Na,K,P_i-Puffer angesetzt, bei 23°C inkubiert und mit Hilfe des Brandel-Filtrationssystems filtriert. Diesen Experimenten mit Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein wurden exakt die Versuchsbedingungen zugrunde gelegt, die zuvor für entsprechende Versuchsansätze mit COS 7-Zellhomogenaten beschrieben wurden. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, an verschiedenen Homogenattypen erhobene Bindungsdaten miteinander zu vergleichen. Die Inkubationstemperatur der heterologen Interaktionsversuche richtete sich ebenso wie bei den homologen Konkurrenzexperimenten nach den vorliegenden Pufferbedingungen (s. 2.4.2.2). Die benötigte Inkubationszeit wurde nach der unter 2.4.3.1 beschriebenen Methode unter Verwendung von Gleichung 16 abgeschätzt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zur Beendigung der Reaktion eine der beiden unter 2.4.2.2 beschriebenen Vakuumfiltrationsmethoden angewendet. Zunächst wurden heterologe Interaktionsansätze mit Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikelgewebe und Mg,Tris,Cl,P_i-Puffer als Inkubationsmedium der Einzelfiltration unterzogen. Die in einer späteren Phase der vorliegenden Arbeit aus Vergleichsgründen durchgeführten heterologen Interaktionsexperimente mit Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikelgewebe in 5 mM Na,K,P_i-Puffer wurden allerdings - wie zuvor erwähnt - mit dem Brandel-Filtrationssystem vakuumfiltriert. COS 7-Zellhomogenate wurden ausschließlich in Na,K,P_i-Puffer als Inkubationsmedium untersucht und mit Ausnahme eines einzigen Experimentes, welches zum Zwecke des Vergleiches einzelfiltriert wurde, der Vakuumfiltration durch das Brandel-Filtrationssystem unterzogen.

Die in den Proben enthaltene Radioaktivität wurde durch die unter 2.4.2.2 beschriebene Flüssigkeits-Szintillationsmessung bestimmt. Die Analyse der Messwerte erfolgte wie unter 2.4.3.1 beschrieben.

2.4.4 Kinetische Experimente

2.4.4.1 Theoretische Grundlagen

Kinetische Experimente stellen eine weitere Form von Radioligandbindungsstudien dar, die der Charakterisierung allosterischer Interaktionen an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren dient. Diese Experimente werden unter Ungleichgewichtsbedingungen durchgeführt und beschreiben die Radioligandbindung als Funktion der Zeit. In der vorliegenden Arbeit wurde der zeitliche Verlauf des Zerfalls von Rezeptor-Radioligand-Komplexen in An- und Abwesenheit allosterischer Modulatoren untersucht. Diese Dissoziationsexperimente erlauben die Bestimmung der Affinität eines allosterischen Modulators zu seiner Bindungsstelle am Rezeptor, während die orthosterische Bindungsstelle durch den Radioliganden [³H]NMS besetzt ist. Typische Effekte von allosterischen Modulatoren an Muskarinrezeptoren sind die Verzögerung der Dissoziation von Rezeptor-Radioligand-Komplexen sowie die Hemmung der Assoziation des Radioliganden an den Rezeptor. Einer Hemmung der Radioligand-Assoziation kann nicht nur eine allosterische Modulation, sondern auch ein kompetitiver Antagonismus an der orthosterischen Bindungsstelle zugrunde liegen. Die Hemmung der Dissoziation des Rezeptor-Radioligand-Komplexes kann jedoch nur auf einen Modulator zurückgeführt werden, der eine von der besetzten orthosterischen Bindungsstelle verschiedene, allosterische Bindungsstelle benutzt. Somit garantiert die Beobachtung des Phänomens der Dissoziationsverzögerung die Anwesenheit eines allosterisch interagierenden Modulators (Kostenis und Mohr, 1996b). Bei den zuvor beschriebenen heterologen Interaktionsexperimenten (siehe 2.4.3) unter Gleichgewichtsbedingungen kann bei Beobachtung einer starken Reduktion der Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden nicht mit Sicherheit zwischen einer allosterischen, stark negativ kooperativen Interaktion und einer Konkurrenz zwischen Testsubstanz und Radioligand an der unbesetzten orthosterischen Bindungsstelle unterschieden werden (Christopoulos und Kenakin, 2002). Zeigt eine Testsubstanz im heterologen Interaktionsversuch keinen Einfluss auf die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden, kann mit Hilfe von Dissoziationsexperimenten zwischen dem Vorliegen von neutraler Kooperativität und dem Fehlen jeglicher Interaktion von Testsubstanz und Rezeptor differenziert werden. Im Falle fehlender Interaktion von Testsubstanz und Rezeptor ist im kinetischen Experiment keine Dissoziationsverzögerung erkennbar (Kostenis und Mohr, 1996b; Duda-Johner, 2002).

Ziel der durchgeführten Dissoziationsexperimente war die Bestimmung der Potenz allosterischer Modulatoren, die Dissoziation von Rezeptor-Radioligand-Komplexen zu verzögern. Nach Tränkle et al. (1998) lässt die dissoziationsverzögernde Wirkung eines allosterischen Modulators Rückschlüsse auf die Besetzung der allosterischen Bindungsstelle durch den Modulator zu. Somit kann aus experimentellen Daten, die die Verzögerung der Radioligand-Dissoziation durch einen allosterischen Modulator widerspiegeln, die Affinität des Modulators zu seiner allosterischen Bindungsstelle abgeleitet werden. Der experimentell bestimmbare $EC_{0,5,diss}$ -Wert gilt als Maß für die dissoziationsverzögernde Wirkung eines allosterischen Modulators und somit auch für die Affinität des allosterischen Modulators zu seiner Bindungsstelle am Orthoster-besetzten Rezeptor. Der $EC_{0,5,diss}$ -Wert beschreibt die Konzentration des allosterischen Modulators, bei der die Dissoziationsgeschwindigkeit des Radioliganden halbmaximal reduziert ist; er stellt den Wendepunkt der gemäß Regressionsanalyse der Daten resultierenden, sigmoiden Konzentrations-Wirkungs-Kurve dar. Reduziert ein allosterischer Modulator in hohen Konzentrationen die Dissoziation des Radioliganden auf 0% des Kontrollwertes in Abwesenheit des Modulators, so liegt der Wendepunkt der Konzentrations-Wirkungs-Kurve exakt bei 50% des Ausgangswertes der Dissoziation und wird $EC_{50,diss}$ -Wert genannt. Den zuvor erwähnten Betrachtungen von Tränkle et al. entsprechend beschreibt der $EC_{0,5,diss}$ -Wert diejenige Konzentration des allosterischen Modulators, bei der 50% der Orthoster-besetzten Rezeptoren zusätzlich durch Alloster besetzt sind.

In kinetischen Experimenten verändert sich die Konzentration von Rezeptor-Radioligand-Komplexen [RL] in Abhängigkeit von parallel ablaufenden Dissoziations- und Assoziationsprozessen. Die folgende Differentialgleichung stellt diesen Zusammenhang dar:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{+1} [R] [L] - k_{-1} [RL] \quad \text{Gleichung 17}$$

Soll ausschließlich die Dissoziation der Rezeptor-Radioligand-Komplexe gemessen werden, muss die erneute Assoziation des Radioliganden an den Rezeptor unterdrückt werden. Die Reaktion wird nach einer Phase der Vorinkubation von Radioligand und Membransuspension gestartet, indem dem Versuchsansatz ein kompetitiver Antagonist des Radioliganden im Überschuss zugesetzt wird. Dieser unterbindet die Reassoziaton des bereits abdissoziierten Radioliganden, wodurch die Dissoziation der Messung

zugänglich wird. Die ablaufende Dissoziation der Rezeptor-Radioligand-Komplexe lässt sich durch folgende monoexponentielle Funktion beschreiben:

$$B_t = B_0 e^{-k_{-1}t} + u \quad \text{Gleichung 18}$$

B_t : Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t

B_0 : spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt $t = 0$ unmittelbar vor dem Start der Reaktion

u : unspezifische Bindung des Radioliganden

Auf der Basis von Gleichung 18 ergibt eine computerunterstützte, nichtlineare Regressionsanalyse die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} . Mit der Kenntnis von k_{-1} lässt sich die Dissoziationshalbwertszeit $t_{1/2}$ nach folgender Gleichung ermitteln:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{-1}} \quad \text{Gleichung 19}$$

Die Dissoziationshalbwertszeit $t_{1/2}$ gibt den Zeitraum an, in welchem die spezifische Radioligandbindung um die Hälfte des Ausgangswertes zum Zeitpunkt $t = 0$ unmittelbar vor Zugabe des kompetitiven Antagonisten reduziert wird. Ein allosterischer Modulator beeinflusst die Dissoziationshalbwertszeit $t_{1/2}$ und folglich auch die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} in Abhängigkeit von seiner Konzentration. Ist ein allosterischer Modulator zugegen, bezeichnet man k_{-1} als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante. Hiermit wird ausgedrückt, dass die dieser Geschwindigkeitskonstante zugrunde liegende Dissoziation in Anwesenheit eines allosterischen Modulators nicht mehr ausschließlich Gleichung 5 gehorcht.

Zur Darstellung der durch einen allosterischen Modulator verzögerten Dissoziation von Rezeptor-Radioligand-Komplexen wird eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve erstellt, indem die in Anwesenheit des allosterischen Modulators gemessene apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit des allosterischen Modulators gegen den Logarithmus der vorliegenden Modulatorkonzentration aufgetragen wird. Die Kurvenanpassung an die Datenpunkte beruht auf einer computergestützten nichtlinearen Regressionsanalyse gemäß Gleichung 8. Aus der resultierenden, sigmoidal verlaufenden Konzentrations-Wirkungs-Kurve wird der zuvor beschriebene $EC_{0,5,diss}$ -Wert abgeleitet. Eine Konzentrations-

Wirkungs-Kurve, deren unteres Plateau statistisch signifikant von 0% verschieden ist, zeigt, dass der allosterische Modulator selbst in hoher Konzentration die Dissoziation der Rezeptor-Ligand-Komplexe nicht vollständig zu verzögern vermag. Der Ligand dissoziiert trotz Bindung des allosterischen Modulators, was auf ein komplexeres Bindungsverhalten hinweisen könnte (Gnagey et al., 1999). Ein Hill-Koeffizient, der mit statistischer Signifikanz von $n_H = -1$ abweicht, deutet darauf hin, dass der allosterische Modulator mit dem Rezeptor nicht im stöchiometrischen Verhältnis 1 : 1 interagiert (Barlow und Blake, 1989).

2.4.4.2 Experimente zur Untersuchung eines kompletten Dissoziationsverlaufes

In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente zur Messung des kompletten Dissoziationsverlaufes des Radioliganden [^3H]NMS durchgeführt, um die im Laufe der Validierungsphase der im folgenden Abschnitt beschriebenen Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erhobenen Befunde zu überprüfen.

Die Kinetik der kompletten [^3H]NMS-Dissoziation wurde an Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikelgewebe in Mg,Tris,Cl, P_i -Puffer als Inkubationsmedium über 120 min verfolgt. Die [^3H]NMS-Konzentration im Reaktionsansatz betrug 0,2 nM. Als allosterischer Modulator wurde in diesen Versuchen Alcuronium eingesetzt, da diese Substanz neben anderen zur Validierung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente verwendet wurde. Es wurden fünf Reaktionsansätze in 50 ml-Erlenmeyer-Kolben nach folgendem Schema pipettiert:

Volumen [μl]	Einpipettierte Lösung
1600	[^3H]NMS in Aqua dest.
200	Aqua dest.
16800	Mg,Tris,Cl, P_i -Puffer (s. Tab. 13)
4000	Homogenat in Tris,Cl-Puffer verdünnt

Tab. 6: Pipettierschema für die Vorinkubations-Versuchsansätze zur Verfolgung kompletter Dissoziationsverläufe. Die Homogenatverdünnung wurde bis zu ihrer Verwendung eisgekühlt und mit Hilfe eines Magnetrührers in Suspension gehalten.

Die Reaktion wurde durch Zugabe der Membransuspension gestartet. Es folgte eine 30minütige Vorinkubationsphase, um die Gleichgewichtseinstellung zwischen Rezeptor,

Radioligand und Rezeptor-Radioligand-Komplexen zu ermöglichen. Während der Vorinkubation und der sich anschließenden Dissoziationsphase wurden die Ansätze mit Hilfe eines Magnetrührers (Janke & Kunkel ES5, Staufen) kontinuierlich gerührt, die Inkubationstemperatur betrug 37°C. Nach Ablauf der Vorinkubation wurde die [³H]NMS-Gesamtbindung zum Zeitpunkt t = 0 bestimmt, indem jedem Ansatz dreimal ein Volumen von 1 ml entnommen und filtriert wurde. Unmittelbar danach wurde die Messung des Dissoziationsverlaufes gestartet, indem zu jedem Reaktionsansatz 1,4 ml Startlösung pipettiert wurde. Diese enthielt 700 µl einer Alcuronium-Lösung bestimmter Konzentration bzw. Aqua dest. im Falle des Reaktionsansatzes zur Bestimmung der Kontrolldissoziation sowie 700 µl einer wässrigen 3·10⁻⁵ M Atropin-Lösung zur Unterbindung der Reassoziaton des Radioliganden. Zur Aufnahme des Dissoziationsverlaufes wurden zu festgelegten Zeitpunkten 1 ml-Proben gezogen und einzeln manuell filtriert. Der Zeitplan der Probenentnahme gewährleistete eine gute Beschreibung der Dissoziation von Rezeptor-Ligand-Komplexen gemessen an dem Verlauf der Dissoziation unter Kontrollbedingungen. Die durchgeführte Einzelfiltration der gezogenen Proben, die Aufbereitung nach der Filtration und die Messung der gebundenen Radioaktivität erfolgte wie unter 2.4.2.2 beschrieben.

Aus den resultierenden Bindungsdaten wurden gemäß der Darstellung unter 2.4.4.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt. Dabei musste beachtet werden, dass sich durch die Probenentnahme zur Bestimmung der Gesamtbindung vor dem Start der Dissoziation sowie durch die nachfolgende Zugabe der Startlösung Änderungen bezüglich Volumen und Konzentration einstellten. Um die darin begründeten Unterschiede zwischen den Proben zur Bestimmung der Gesamtbindung und den später gezogenen Proben zu korrigieren, wurden die Messwerte für die Gesamtbindung mit dem Faktor 0,94 multipliziert.

2.4.4.3 Zweipunkt-Dissoziationsexperimente

2.4.4.3.1 Theoretische Grundlagen kinetischer Zweipunkt-Experimente

Der experimentelle Ansatz von Zweipunkt-Dissoziationsversuchen beruht auf einer Messung der spezifischen Bindung des Radioliganden unmittelbar vor dem Start der zu messenden Dissoziation zum Zeitpunkt $t = 0$ sowie zu einem zuvor bestimmten Zeitpunkt t im Verlauf der Dissoziation. Die theoretischen Grundlagen der Methode wurden von Kostenis und Mohr (1996a) detailliert beschrieben. Der folgende Abschnitt fasst die zugrundeliegenden Gesetzmäßigkeiten in Kürze zusammen.

Um den Verlauf einer Dissoziation durch Messung der Radioligandbindung zu zwei Zeitpunkten erfassen zu können, muss die Abnahme der Radioligandbindung durch eine monoexponentielle Funktion beschrieben werden können. Die Voraussetzung der Monophasizität wurde in den unter 2.4.4.2 dargestellten Experimenten zur Untersuchung kompletter Dissoziationsverläufe als gegeben bestätigt. Demzufolge kann die spezifische Bindung des Radioliganden zu dem für die Messung gewählten Zeitpunkt t gemäß folgender Gleichung bestimmt werden:

$$B_{t,\text{spez}} = B_{0,\text{spez}} e^{-k_{-1}t} \quad \text{Gleichung 20}$$

$B_{t,\text{spez}}$: spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t

$B_{0,\text{spez}}$: spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt $t = 0$
unmittelbar vor dem Start der Reaktion

Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} lässt sich aus der spezifischen Radioligandbindung zum Zeitpunkt t , $B_{t,\text{spez}}$, der spezifischen Radioligandbindung vor dem Start der Reaktion, $B_{0,\text{spez}}$, sowie dem Messzeitpunkt t , an dem die Dissoziation durch Vakuumfiltration gestoppt wird, nach folgender Gleichung ermitteln:

$$k_{-1} = \frac{\ln\left(\frac{B_{t,\text{spez}}}{B_{0,\text{spez}}}\right)}{t} \quad \text{Gleichung 21}$$

Die Erstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die Verzögerung der Dissoziation von Rezeptor-Radioligand-Komplexen in Anwesenheit eines allosterischen Modulators erfolgt bei Kenntnis der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} wie bereits unter 2.4.4.1 beschrieben.

2.4.4.3.2 Etablierung und Validierung

Zweipunkt-Dissoziationsversuche stellen einen vereinfachten experimentellen Ansatz dar, mit Hilfe dessen die Verzögerung der Dissoziation eines Radioliganden durch einen allosterischen Modulator in Abhängigkeit von dessen Konzentration bestimmt werden kann. Die Quantifizierung der allosterischen Wirksamkeit mittels kinetischer Zweipunkt-Untersuchungen ist weniger zeit- und materialaufwendig als die Bestimmung kompletter Dissoziationsverläufe. Deshalb wurde die Messung vollständiger [³H]NMS-Dissoziationsverläufe zugunsten des effizienteren und zeitsparenden Zweipunkt-Messverfahrens eingestellt, nachdem die Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgreich etabliert und - wie im Folgenden beschrieben - validiert worden waren.

In der Phase der Validierung sollte zunächst gezeigt werden, dass die in Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten erhobenen Befunde nicht statistisch signifikant von Ergebnissen abweichen, die durch Untersuchung des kompletten Dissoziationsverlaufes erhalten wurden. Es sollte gezeigt werden, dass Zweipunkt-Dissoziationsexperimente Bestimmungen mit vergleichbarer Präzision erlauben. Mit diesem Ziel wurde die bereits aus kompletten Dissoziationsexperimenten bekannte dissoziationsverzögernde Wirkung des allosterischen Prototyp-Modulators W84 (s. 2.5.2) in kinetischen Zweipunkt-Experimenten erneut untersucht.

Ein Aspekt, der in der Phase der Etablierung und Validierung dieses experimentellen Ansatzes außerdem untersucht werden sollte, war der Einfluss des Materials der Ansatzgefäße auf die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit der im Experiment eingesetzten allosterischen Modulatoren. Dieser Einfluss wurde bereits von Burgmer (1997) ausführlich untersucht. Burgmer belegte experimentell, dass eine sättigbare Adsorption positiv geladener Testsubstanzen an das Glas der Reaktionsgefäße zu einem Substanzverlust im Reaktionsansatz führt, der sich verfälschend auf das Versuchsergebnis auswirkt. Um diesen Befunden Rechnung zu tragen, wurden die oben beschriebenen Zweipunkt-Dissoziationsexperimente parallel in Reagenzgläsern bzw. in zuvor mit Sigmacote[®] silanisierten Eppendorfreaktionsgefäßen durchgeführt. Durch letztere Versuchsansätze in silanisierten Reaktionsgefäßen konnte die Adsorption der in der vorliegenden Arbeit untersuchten, zweifach positiv geladenen allosterischen Modulatoren an die Oberfläche von Glas ausgeschlossen werden.

Dieses Validierungskonzept ermöglichte einerseits den Vergleich der in früheren Experimenten zur Untersuchung eines kompletten Dissoziationsverlaufes erhobenen Daten mit Ergebnissen aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten in Glasgefäßen;

dieser Vergleich sollte zeigen, ob die früher erhobenen Befunde mit Hilfe kinetischer Zweipunkt-Experimente bei gleichbleibenden Versuchsbedingungen reproduzierbar sind. Andererseits wurden die in kompletten Dissoziationsexperimenten ermittelten Daten mit den Ergebnissen aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten in silanisierten Reaktionsgefäßen verglichen. Hierbei sollte geprüft werden, ob die gemäß den Befunden von Burgmer modifizierte Methode der Durchführung von Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten in silanisierten Reaktionsgefäßen die Ergebnisse aus kompletten Dissoziationsversuchen wiedergibt. Obwohl die Befunde aus kompletten Dissoziationsexperimenten in Glasgefäßen erhoben wurden, gelten sie als verlässlich, da in diesem experimentellen Ansatz die Glasoberfläche im Verhältnis zum Volumen des Ansatzes deutlich geringer ist als im Reaktionsansatz der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente.

Verglichen mit den in kompletten Dissoziationsexperimenten erhobenen Daten zu W84, die der Literatur entnommen wurden (Tränkle et al., 1996), wurde die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit des allosterischen Modulators in Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten in Glasgefäßen um den Faktor drei unterschätzt (Daten nicht gezeigt). Das Phänomen der Adsorption des bisquartären allosterischen Modulators an die im Zweipunkt-Dissoziationsexperiment verhältnismäßig größere Glasoberfläche und der damit verbundene Substanzverlust werden durch dieses Ergebnis bestätigt. Zweipunkt-Dissoziationsexperimente in silanisierten Reaktionsgefäßen hingegen erlaubten die exakte Bestimmung der Wirksamkeit von W84 entsprechend den Ergebnissen von kompletten Dissoziationsexperimenten.

Die Experimente der Etablierungs- und Validierungsphase wurden in Anlehnung an die Versuche von Kostenis und Mohr (1996a) zunächst mit einem Dissoziationsintervall von $t = 4$ min zwischen Start der Dissoziation und ihrer Beendigung durch Filtration durchgeführt. Der Verlauf einer Dissoziation kann jedoch durch Zweipunkt-Messung nur dann korrekt beschrieben werden, wenn durch die Länge des Dissoziationsintervalls ein ausreichendes Messfenster gewährleistet wird. Der Zeitpunkt t der Messung sollte einerseits noch im steilen Teil der den Dissoziationsverlauf beschreibenden Kurve liegen, andererseits sollte er nicht zu schnell auf den Start der Dissoziation folgen. Da das letztere Kriterium bei einem Dissoziationsintervall von $t = 4$ min nicht ausreichend berücksichtigt zu sein schien, sollte auch die Länge des Dissoziationsintervalls optimiert werden. Zu diesem Zweck wurde die Verzögerung der Dissoziation von [^3H]NMS durch eine definierte Konzentration des allosterischen Modulators Alcuronium untersucht.

Dieser Versuch wurde parallel in verschiedenen silanisierten Eppendorfreaktionsgefäßen angesetzt und zu variierenden Zeitpunkten durch Filtration gestoppt. Aus Experimenten zur Untersuchung des kompletten Dissoziationsverlaufes von [³H]NMS (s. 2.4.4.2) war die in Gegenwart der eingesetzten Alcuroniumkonzentration gemessene apparente Dissoziations-geschwindigkeitskonstante k_{-1} von [³H]NMS in Prozent des k_{-1} -Wertes unter Kontrollbedingungen bekannt. Die aus den Experimenten zur Optimierung des Dissoziationsintervalls resultierenden Bindungsdaten wurden als separate Zweipunkt-Dissoziationsexperimente mit entsprechendem Dissoziationsintervall ausgewertet. Anhand der untersuchten Dissoziationszeiträume wurde der für das Zweipunkt-Messverfahren optimale Zeitpunkt t der Filtration nach folgendem Kriterium ausgewählt: Die bei Auswertung nach der Zweipunkt-Methode in Anwesenheit der eingesetzten Alcuroniumkonzentration ermittelte apparente Dissoziations-geschwindigkeitskonstante k_{-1} von [³H]NMS in Prozent der mit dem gleichen Dissoziationsintervall gemessenen Kontrolle sollte mit dem entsprechenden Wert aus den kompletten Dissoziationsversuchen übereinstimmen.

Nach den Erkenntnissen des gesamten Validierungsprozesses wurden Dissoziationsexperimente an Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikelgewebe im Folgenden als Zweipunkt-Experimente mit dem Filtrationszeitpunkt $t = 10$ min in silanisierten Eppendorfreaktionsgefäßen durchgeführt. Auf die Darstellung der aus dem Validierungsprozess resultierenden Daten wird in dieser Arbeit verzichtet.

Die Wahl des Filtrationszeitpunktes t in Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten an COS 7-Zellhomogenaten wird in dem Kapitel zur Durchführung von Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten am Brandel-Filtrationssystem (s. 2.4.4.3.5) separat beschrieben.

2.4.4.3.3 Durchführung von Experimenten mit manueller Einzelfiltration

Nach der im vorherigen Kapitel beschriebenen Etablierung und Validierung wurden Zweipunkt-Dissoziationsexperimente zur Bestimmung der dissoziationsverzögernden Wirkung allosterischer Modulatoren an Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikelgewebe durchgeführt. Die [³H]NMS-Konzentration im Reaktionsansatz betrug 0,2 nM. Die Experimente aus dieser frühen Phase der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich in Mg,Tris,Cl,P_i-Puffer als Inkubationsmedium bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden in zuvor mit

Sigmacote[®] silanisierte 1,7 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße (Kat. Nr. 7080.1, Roth, Karlsruhe) pipettiert. Die folgenden Tabellen 7 und 8 führen die Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze auf:

Volumen [µl]	Einpipettierte Lösung
100	[³ H]NMS in Aqua dest.
50	Aqua dest. (Gesamtbindung), Atropin in Aqua dest. (unspezifische Bindung)
1100	Mg, Tris, Cl, P _i -Puffer (s. Tab. 13)
250	Homogenat in Tris, Cl-Puffer verdünnt

Tab. 7: Pipettierschema für die Reaktionsansätze zur Bestimmung der Gesamt- und unspezifischen Bindung.

Volumen [µl]	Einpipettierte Lösung
100	[³ H]NMS in Aqua dest.
1150	Mg, Tris, Cl, P _i -Puffer (s. Tab. 13)
250	Homogenat in Tris, Cl-Puffer verdünnt

Tab. 8: Pipettierschema für die Vorinkubations-Reaktionsansätze zur Bestimmung der Dissoziationsreaktion in An- und Abwesenheit von allosterischem Modulator. Zur Zugabe des allosterischen Modulators siehe Text.

Die Reaktionsansätze wurden jeweils dreifach bestimmt. Die Homogenatverdünnung wurde mit Hilfe eines Magnetrührers in Suspension gehalten, bis sie den einzelnen Ansätzen nach einem festgelegten Zeitplan zum Starten der Reaktion zupipettiert wurde. Nach Zugabe der Membransuspension wurde jeder Reaktionsansatz kurz mit Hilfe eines Rotationsmischers geschüttelt und in ein auf 37°C vortemperiertes Schüttelwasserbad verbracht. Für jeden Ansatz wurde eine 30minütige Vorinkubationsphase zur Gleichgewichtseinstellung zwischen Rezeptor, Radioligand und Rezeptor-Radioligand-Komplexen eingehalten. Nach Ablauf der Vorinkubationszeit wurden den Ansätzen zur Bestimmung der Gesamtbindung zum Zeitpunkt $t = 0$ Proben zu jeweils 1 ml entnommen und einzeln vakuumfiltriert. Die in diesem Versuchsansatz vorgesehene Bestimmung der unspezifischen [³H]NMS-Bindung erfolgte im Anschluss nach demselben Verfahren. Die unspezifische Radioligandbindung wurde unter Verwendung einer wässrigen 1 µM Atropin-Lösung erfasst (Endkonzentration im

Versuchsansatz). In den übrigen Ansätzen wurde die Dissoziation durch Zugabe der Startlösung der Messung zugänglich gemacht. Die Startlösung eines Reaktionsansatzes bestand aus 50 µl einer wässrigen $3 \cdot 10^{-5}$ M Atropin-Lösung zur Unterbindung der Reassoziaton des Radioliganden nach dem Start der Dissoziation sowie 50 µl einer Lösung des zu untersuchenden allosterischen Modulators in bestimmter Konzentration. Die Ansätze der Kontrolldissoziation in Abwesenheit von allosterischem Modulator enthielten 50 µl Aqua dest. statt letzterer Komponente. Nach Zugabe der Startlösung sowie kurzem Schütteln wurden die Ansätze bis zum Filtrationszeitpunkt t im temperierten Wasserbad weiterhin inkubiert.

Zum Zeitpunkt t wurde die membrangebundene Radioaktivität der Reaktionsansätze abgetrennt, indem ein Volumen von 1 ml entnommen und einzeln filtriert wurde. Die Einzelfiltration der Proben, die sich anschließende Aufbereitung der Filter sowie die Messung der gebundenen Radioaktivität erfolgten wie in Kapitel 2.4.2.2 beschrieben.

Aus den resultierenden Bindungsdaten wurden gemäß Gleichung 21 k_{-1} -Werte abgeleitet, mittels derer - wie unter 2.4.4.1 erläutert - Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt werden konnten. Die Werte der unspezifischen Bindung wurden zuvor von allen Bindungsdaten subtrahiert. Durch Zugabe der Startlösung zu den Reaktionsansätzen zur Bestimmung der Dissoziationsreaktion in An- und Abwesenheit von allosterischem Modulator ergab sich verglichen mit den Ansätzen der Gesamtbindung ein Unterschied in Volumen und Konzentration, der durch Multiplikation der Gesamtbindungsdaten mit dem Faktor 0,94 korrigiert wurde.

2.4.4.3.4 „Screening-Untersuchungen“ mittels kinetischer Zweipunkt-Experimente

Kinetische Experimente in der in Kapitel 2.4.4.3.3 beschriebenen Form sollten zur Untersuchung ausgewählter allosterischer Modulatoren aus der Reihe der OS-Substanzen (s. 2.5.2) durchgeführt werden. Um einen Überblick über diese Substanzreihe zu gewinnen und die Wirkung aller verfügbaren Modulatoren dieser Reihe auf die [^3H]NMS-Dissoziation einschätzen zu können, wurden Zweipunkt-Experimente zu „Screening-Untersuchungen“ eingesetzt. Die Durchführung der Zweipunkt-Experimente erfolgte wie unter 2.4.4.3.3 beschrieben. Um den Versuchsansatz für die orientierende Untersuchung vieler Substanzen zu vereinfachen, wurde deren allosterische Wirkung in nur zwei ausgewählten Konzentrationen - nämlich 10^{-6} M und 10^{-5} M - untersucht. Diese Reduktion der eingesetzten Konzentrationen ermöglichte die parallele Untersuchung von drei Modulatoren in einem Zweipunkt-

Experiment. Die aus den erhaltenen Bindungsdaten abgeleiteten Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden von zwei Datenpunkten, dem auf 100 % festgelegten oberen Kurvenplateau sowie dem auf 0 % festgesetzten unteren Plateau der Kurve bestimmt. Der Festlegung des unteren Kurvenplateaus auf 0 % lag die Annahme zugrunde, dass der allosterische Modulator die [³H]NMS-Dissoziation vollständig aufzuheben vermag. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven dienten der Abschätzung des EC_{50,diss}-Wertes und der aus diesem Wert ableitbaren Wirksamkeit des untersuchten allosterischen Modulators. Anhand des EC_{50,diss}-Wertes sowie interessanter struktureller Eigenschaften wurden einige Testsubstanzen ausgewählt, die in weiteren Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten einer genaueren Untersuchung unterzogen wurden. Im Vergleich der EC_{50,diss}-Werte aus orientierenden „Screening-Untersuchungen“ sowie aus nachfolgenden genaueren Untersuchungen ausgewählter Substanzen erwiesen sich die in orientierenden Experimenten erhobenen Kenndaten als äußerst valide. Anhand der aus den „Screening-Untersuchungen“ resultierenden Bindungsdaten wurden außerdem Balkendiagramme erstellt, die den direkten Vergleich der spezifischen Gesamtbindung zum Zeitpunkt t = 0 min mit der in Gegenwart von allosterischem Modulator der Konzentration 10⁻⁶ M bzw. 10⁻⁵ M erfassten spezifischen Restbindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t = 10 min ermöglichten.

2.4.4.3.5 Durchführung von Experimenten am Brandel-Filtrationssystem

Kinetische Untersuchungen zum Einfluss allosterischer Modulatoren auf die Dissoziation des Radioliganden [³H]NMS an COS 7-Zellhomogenaten wurden ebenfalls als Zweipunkt-Dissoziationsexperimente durchgeführt. Durch diese Experimente sollten die von Buller et al. (2002) beschriebenen Untersuchungen an COS 7-Zellhomogenaten fortgeführt werden. Das Protokoll zur Durchführung von Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten an COS 7-Zellhomogenaten wurde von S. Buller unverändert übernommen. Das experimentelle Verfahren sollte zunächst in einer Phase der Reproduktion von publizierten Ergebnissen etabliert werden, um dann mit neuen Experimenten nach derselben Methode an die bereits bestehende Befundlage anknüpfen zu können.

Die Experimente wurden mit Hilfe des Brandel-Filtrationssystems filtriert. Da bei dieser Filtrationsmethode die Reaktionsansätze für Gesamt- und unspezifische Bindung sowie zur Bestimmung der Dissoziationsreaktion in An- und Abwesenheit von allosterischem Modulator gleichzeitig filtriert werden, müssen die Versuchsansätze nach einem dem

gemeinsamen Reaktionsendpunkt angepassten Zeitplan pipettiert werden. Um diesen Zeitplan aufstellen zu können, muss zunächst die Länge des Dissoziationszeitraumes von der Zugabe der Startlösung bis zum Filtrationszeitpunkt t in Abhängigkeit von den im jeweiligen Experiment untersuchten Wildtyp- bzw. mutierten Muskarinrezeptoren festgelegt werden. Hierbei ist zu beachten, dass allosterische Modulatoren typischerweise die Dissoziation des Radioliganden verzögern, wodurch bei Einsatz steigender Konzentrationen des Modulators die Halbwertszeit der Radioligand-Dissoziation größer wird. Da der Verlauf der Dissoziation - wie unter 2.4.4.3.2 dargestellt - gut beschrieben werden kann, wenn der Zeitpunkt t der Messung zeitlich nicht zu nah am Start der Dissoziationsreaktion, aber dennoch im steilen Teil der Dissoziationsverlaufskurve liegt, wurde der Zeitpunkt t nach der 1,5- bis 2-fachen Dissoziationshalbwertszeit des Radioliganden unter Kontrollbedingungen gewählt. Liegt die Restbindung des Radioliganden unter Kontrollbedingungen zum Filtrationszeitpunkt t im Bereich von 25 bis 40% der Gesamtbindung, weist das Experiment ein angemessenes Messfenster auf. Da sich die an den untersuchten Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gemessenen Halbwertszeiten der [^3H]NMS-Dissoziation unter Kontrollbedingungen stark unterschieden (s. 3.5.7, Tab. 21, S. 113), variierte die Länge des Dissoziationsintervalls bis zum Filtrationszeitpunkt t in den durchgeführten Experimenten in Abhängigkeit vom Rezeptortyp erheblich.

Da das Brandel-Filtrationssystem die Filtration aus Reagenzgläsern vorsieht, wurden die Reaktionsansätze in diesen Versuchen im Gegensatz zu den Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit manueller Einzelfiltration (s. 2.4.4.3.3) in Reagenzgläser pipettiert. Der Einsatz von Glas widersprach den in Kapitel 2.4.4.3.2 aufgeführten Betrachtungen zum Einfluss des Materials der Ansatzgefäße auf die Radioligandbindung. Dennoch erschien es in diesem Teil der vorliegenden Arbeit unerlässlich, die experimentellen Bedingungen der Versuche von Buller et al. (2002) zu übernehmen, auf deren Ergebnisse Bezug genommen werden sollte.

Die verschiedenen Reaktionsansätze wurden gemäß folgendem Schema in Reagenzgläser pipettiert:

Volumen [μ l]	Einpipettierte Lösung
10	[3 H]NMS in Aqua dest.
10	Aqua dest. (Gesamtbindung), Atropin in Aqua dest. (unspezifische Bindung)
480	5,21 mM Na,K,P _i -Puffer
500	Homogenat in 5 mM Na,K,P _i -Puffer (s. Tab. 13) verdünnt

Tab. 9: Pipettierschema für die Reaktionsansätze zur Bestimmung der Gesamt- und unspezifischen Bindung.

Volumen [μ l]	Einpipettierte Lösung
10	[3 H]NMS in Aqua dest.
10	Aqua dest.
480	5,21 mM Na,K,P _i -Puffer
500	Homogenat in 5 mM Na,K,P _i -Puffer (s. Tab. 13) verdünnt

Tab. 10: Pipettierschema für die Vorinkubations-Reaktionsansätze zur Bestimmung der Dissoziationsreaktion in An- und Abwesenheit von allosterischem Modulator.

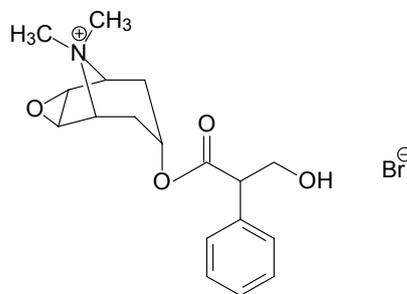
Die Bestimmung der Gesamt- und unspezifischen Bindung sowie der Kontrolldissoziation erfolgte vierfach, die Dissoziationsreaktion in Anwesenheit einer bestimmten Konzentration des allosterischen Modulators wurde hingegen zweifach bestimmt. Die [3 H]NMS-Endkonzentration betrug 1 nM. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde eine wässrige Atropin-Lösung von 3 μ M eingesetzt (Endkonzentration). Als Inkubationsmedium wurde in Dissoziationsexperimenten an COS 7-Zellhomogenaten ausschließlich Na,K,P_i-Puffer eingesetzt. Dabei wurde die eingesetzte Pufferkonzentration so gewählt, dass die Endkonzentration des Puffers im Reaktionsansatz 5 mM betrug. Die COS 7-Zellhomogenate wurden basierend auf den zuvor durchgeführten homologen Konkurrenzexperimenten mit 5 mM Na,K,P_i-Puffer verdünnt und anschließend in einem Pottergefäß manuell homogenisiert. Nach dem zu Beginn des Kapitels erwähnten Zeitplan wurde zunächst die Vorinkubationsphase der Ansätze zur Bestimmung der Dissoziationsreaktion in An- und Abwesenheit von allosterischem Modulator durch Zugabe der Membransuspension gestartet. Die Membransuspension wurde anschließend auf Eis gelagert. Die Reaktionsansätze wurden kurz mit Hilfe eines Rotationsmischers geschüttelt und 30 min bei 23°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Vorinkubation wurde die Dissoziationsmessung in den

Ansätzen zur Bestimmung der Dissoziationsreaktion in Anwesenheit von allosterischem Modulator sowie der Kontrolldissoziation durch Zugabe von je 1 ml Startlösung ermöglicht. Die Startlösung setzte sich aus 0,5 ml einer $1,2 \cdot 10^{-5}$ M Atropin-Lösung in 10 mM Na,K,P_i-Puffer sowie aus 0,5 ml einer Lösung des allosterischen Modulators bzw. Aqua dest. im Falle der Kontrolldissoziation zusammen. Da die Startlösung eine Endkonzentration von 6 µM Atropin aufwies, ergab sich nach Zugabe von 1 ml Startlösung zu den Ansätzen zur Bestimmung der Dissoziationsreaktionen à 1 ml (s. Tab. 10) eine Atropin-Endkonzentration von 3 µM. Die Reaktionsansätze wurden kurz geschüttelt und bis zum Filtrationszeitpunkt t im temperierten Wasserbad inkubiert. Da am Ende des Dissoziationsintervalls alle Reaktionsansätze gleichzeitig filtriert werden sollten, wurde die Inkubationsphase der Ansätze zur Bestimmung der Gesamt- und unspezifischen Bindung 30 min vor der Filtration gestartet. Hierzu wurden jeweils 500 µl der - einige Minuten zuvor vom Eis genommenen - Membransuspension zu diesen Ansätzen pipettiert. Nach kurzem Schütteln folgte auch hier die 30minütige Inkubationsphase zur Gleichgewichtseinstellung zwischen Rezeptor, Radioligand und Rezeptor-Radioligand-Komplexen. Zum Zeitpunkt t wurde die membrangebundene Radioaktivität aller Reaktionsansätze durch gleichzeitige Filtration abgetrennt. Angaben zur Durchführung der Filtration mit Hilfe des Brandel-Filtrationssystems, zur weiteren Bearbeitung der Filter sowie zur Messung der gebundenen Radioaktivität können dem Kapitel 2.4.2.2 entnommen werden. Bei der Auswertung dieser Experimente wurde zunächst der Wert der unspezifischen Bindung von den gemessenen Daten subtrahiert. Aus den resultierenden Daten der spezifischen Bindung wurden gemäß Gleichung 21 k_{-1} -Werte errechnet, die der Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven - wie unter 2.4.4.1 beschrieben - dienen.

2.5 Materialien

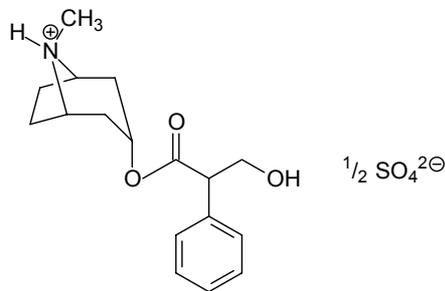
2.5.1 Antagonisten am Muskarinrezeptor

In der vorliegenden Arbeit wurde der Radioligand [^3H]N-Methylscopolamin ([^3H]NMS) in Form seines Bromidsalzes als Antagonist an der orthosterischen Bindungsstelle von Muskarin-Rezeptoren eingesetzt. Bezogen wurde der Radioligand von der Firma NEN-Dupont, Homburg. Die spezifische Aktivität betrug in Abhängigkeit von der jeweiligen Charge 82, 70 bzw. 83,5 Ci/mmol. Als strukturidentischer, kompetitiver Antagonist dieses Radioliganden wurde N-Methylscopolamin (NMS) von der Firma Sigma, Deisenhofen verwendet.



N-Methylscopolamin (NMS)

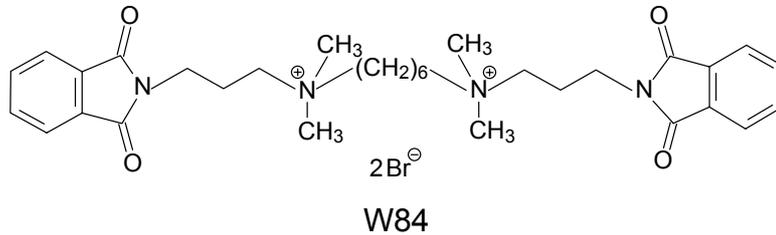
Als strukturverschiedener Kompetitor von [^3H]N-Methylscopolamin wurde Atropin zur Bestimmung der unspezifischen [^3H]NMS-Bindung sowie in kinetischen Experimenten zur Unterdrückung der Reassoziaton des Radioliganden eingesetzt. Atropin wurde in Form seines Sulfates ebenfalls von der Firma Sigma, Deisenhofen bezogen.



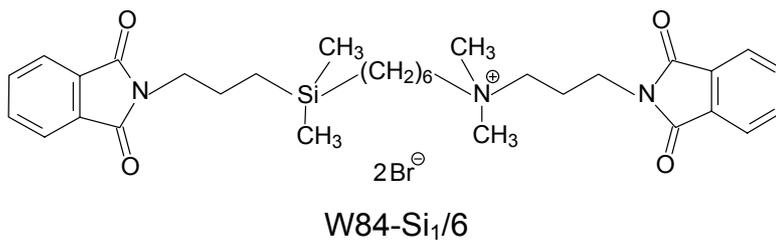
Atropin

2.5.2 Allosterische Modulatoren

Der Prototyp-Modulator W84 wurde von Herrn Dr. Pfeffer, Pharmakologisches Institut der Universität Kiel, synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

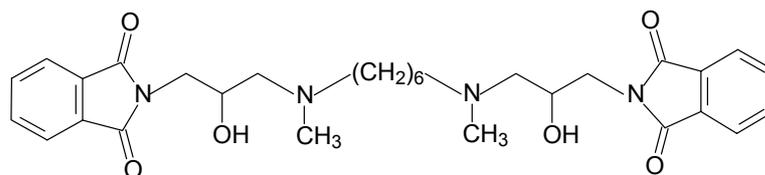


Das Silicium-substituierte W84-Derivat W84-Si₁/6 wurde von Herrn J. O. Daiss aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. Tacke, Institut für Anorganische Chemie, Universität Würzburg, synthetisiert und dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

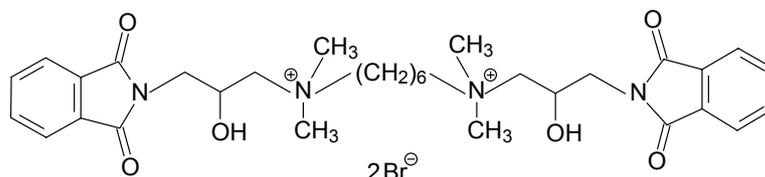


Die von W84 abgeleiteten allosterischen Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ wurden von Herrn Dr. O. Scharfenstein aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe, Pharmazeutisches Institut, Universität Würzburg, synthetisiert und dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

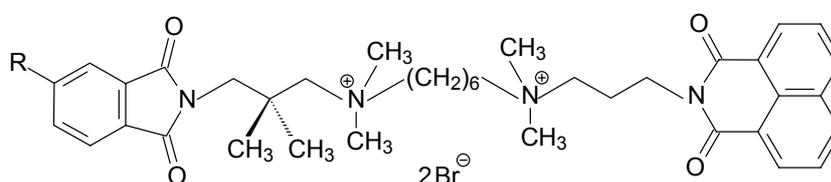
Da die numerische Bezeichnung dieser Substanzen im Verlauf der vorliegenden Arbeit geändert wurde, wird der Substanzbezeichnung in der folgenden Darstellung die neue Nummerierung in Klammern nachgestellt.



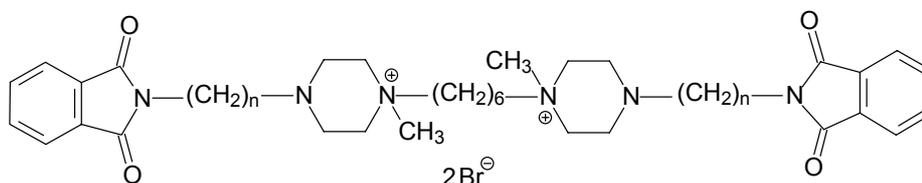
OS-06(16)



OS-08(17)

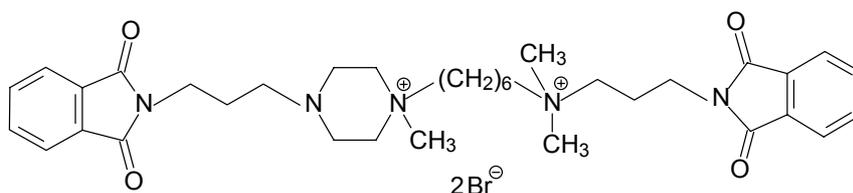


OS-69(33): R = H

OS-78(35): R = CH₃

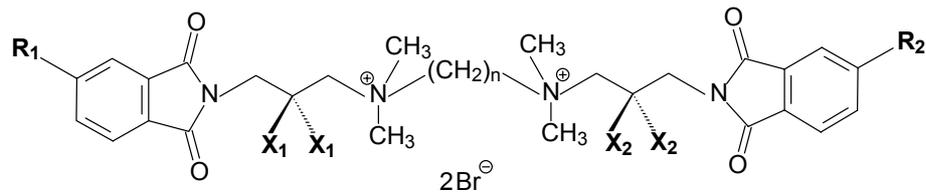
OS-23(20): n = 3

OS-27(23): n = 2



OS-24(21)

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten methylierten W84-Derivate, die sich in Anzahl und Position der Methylgruppen sowie in der Länge der Zwischenkette unterscheiden. Die folgende Strukturformel veranschaulicht die Positionen der Methylierungen, die in Tabelle 11 für die entsprechenden Verbindungen aufgeführt sind.



Nummerische Substanz- bezeichnung	Nomenklatur nach Substitutionsmuster R_1, R_2, X_1, X_2	R_1	R_2	X_1	X_2	n
WB-41	CH ₃ , H, H, H	CH ₃	H	H	H	6
OS-68(30)	H, H, CH ₃ , H	H	H	CH ₃	H	6
OS-66(28)	H, H, CH ₃ , CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃	6
OS-72(32)	CH ₃ , H, CH ₃ , H	CH ₃	H	CH ₃	H	6
OS-65(27)	CH ₃ , H, H, CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃	6
DMW	CH ₃ , CH ₃ , H, H	CH ₃	CH ₃	H	H	6
OS-74(34)	CH ₃ , CH ₃ , CH ₃ , H	CH ₃	CH ₃	CH ₃	H	6
OS-71(31)	CH ₃ , CH ₃ , CH ₃ , CH ₃	6				
OS-67(29)	-	H	H	CH ₃	CH ₃	7
OS-76(26)	-	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₃	7

Tab. 11: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten methylierten W84-Derivate, die sich in Anzahl und Position der Methylierungen sowie in der Länge der Zwischenkette unterscheiden; n beschreibt die Anzahl der Methylengruppen in der Zwischenkette der Verbindung. Da die Nummerierung der OS-Substanzen im Verlauf der vorliegenden Arbeit geändert wurde, wurde der Substanzbezeichnung in dieser Tabelle die neue Nummerierung in Klammern nachgestellt. Für die methylierten W84-Derivate mit n = 6 Methylengruppen in der Zwischenkette wurde zusätzlich eine Nomenklatur eingeführt, die in Zusammenhang mit der oberhalb der Tabelle dargestellten allgemeinen Strukturformel Anzahl und Position der Methylsubstituenten einer Verbindung wiedergibt. Diese Nomenklatur wird im Folgenden zur Bezeichnung der entsprechenden methylierten W84-Derivate benutzt.

Die Synthese und Bereitstellung von Monomethyl-W84 (WB-41) ist Frau Dr. W. Bender aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe zu verdanken; Dimethyl-W84 (DMW) wurde von Herrn Dr. Botero Cid aus selbigem Arbeitskreis synthetisiert und freundlicherweise bereitgestellt.

Alcuronium wurde als Dichlorid-Salz von der Firma Hoffmann-LaRoche AG (Grenzach-Wyhlen) bezogen.

2.5.3 Verwendete Reagenzien

Von der Firma **Sigma-Aldrich Chemie GmbH** (Taufkirchen) wurden die im folgenden aufgeführten Reagenzien bezogen, die Angabe der Katalog-Nummer ist in Klammern nachgestellt:

Albumin Human, Fraction V, 96-99% Albumin (A-1653); Ampicillin-Natriumsalz (A-9518); Atropinsulfat (A-0257); *N,N*-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure (BES; B-6266); 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-gal; B-4252); Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$; C-7902); Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA; E-9884); Glycerol (G-5516); Hefeextrakt (Y-0500); Isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosid (IPTG; I-6758); Isopropanol, 99,5%ig (27049-0); fetales Kälberserum (FKS; F-7524); Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 ; P-5379); Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3 ; S-5761); Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4 ; S-0876); *N*-Methylscopolaminbromid (S-8502); Penicillin G/ Streptomycin-Lösung (P-0781); Polyethylenimin, 50%ig (m/v) (PEI; P-3143); Sigmacote[®] (SL-2); Trypsin/EDTA-Lösung, 0,05/ 0,02%ig (m/v) (T-3924); Trypton (T-7293).

Die Firma **Fluka Chemie AG** (Buchs, Schweiz) lieferte:

Dimethylformamid (DMF; 40248); Dimethylsulfoxid (DMSO; 41640); Magnesiumhydrogenphosphat-Trihydrat ($\text{MgHPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$; 63080).

Bei der Firma **Merck KG** (Darmstadt) wurden weitere Reagenzien gekauft:

Aqua pro analysi (1.16754.5000); Glucose (8346); Kaliumchlorid (KCl; 1.04936); Natriumchlorid (NaCl ; 1.06404); Saccharose (1.07687); Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris; 1.08382); Folin Ciocalteus Phenolreagens; Kupfersulfat-Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$); Natriumcarbonat (Na_2CO_3); Natrium-Kalium-Tartrat.

Natriumchlorid (NaCl pro analysi; 207790010) wurde von der Firma **Acros Organics** bezogen.

2.5.4 „Kits“ für molekularbiologische Arbeiten

- a) QuikChange[™] Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla CA, USA; Kat. Nr. 200519)
- b) Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland; Kat. Nr. 12162)

2.5.5 Herstellung von Zellkulturmedien und Nährböden

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)

Verwendung: Zellkulturmedium für COS 7-Zellen

Herstellung: Eine DMEM-Pulvereinheit (L-Glutamin und 4,5 g/l Glucose enthaltend; Einheiten zu 13,4 g von Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen, Kat. Nr. D-5648) wurde in 900 ml Aqua dest. gelöst. Es wurden 10 ml eines zuvor aliquotierten Gemisches aus Penicillin G (10000 U/ml) und Streptomycin (10 mg/ml) sowie 3,7 g NaHCO₃ zugegeben. Anschließend wurde der pH-Wert unter Verwendung von HCl auf 7,2 eingestellt. Nachdem das Volumen der Lösung mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt worden war, wurden 100 ml fetales Kälberserum (FKS) zugesetzt. Das Medium wurde mit Hilfe von Sterilfiltrationseinheiten (SFCA Bottle Top Filters, 0,2 µm, Nalgene, Kat. Nr. 290-4520) in autoklavierte 500 ml-Glasflaschen sterilfiltriert.

Luria-Bertani (LB)-Nährmedium

Verwendung: Kulturmedium für *E.coli* XL1-Blue-Bakterien

Herstellung: Zur Herstellung von Luria-Bertani-Nährmedium wurden zunächst 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g Natriumchlorid, zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit 25 g des als Pulver bezogenen LB-Mediums gleicher Zusammensetzung (Sigma, Kat. Nr. L-3522) eingewogen und in 800 ml Aqua dest. gelöst. Nach Einstellung des pH-Wertes mit 1 N NaOH auf 7,0 wurde das Volumen der Lösung mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt. Jeweils 500 ml des Nährmediums wurden sterilisiert, indem die Lösung in 2 l-Erlenmeyerkolben für die Bakterienkultur autoklaviert wurde. Unmittelbar vor dem Start der Bakterienkultur wurden 500 ml autoklaviertes LB-Medium mit 500 µl Ampicillin-Lösung [50 mg Ampicillin/ml Lösung] zur Selektion der Bakterien versetzt (s. 2.3.2.3).

Luria-Bertani (LB)-Agarnährböden

Verwendung: Selektion erfolgreich transformierter *E.coli* XL1-Blue-Bakterien

Herstellung: Luria-Bertani (LB)-Agar mit der Zusammensetzung 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid und 20 g/l Agar wurde als fertige Pulvermischung bezogen (Sigma, L-3027). Um 1 l LB-Agar herzustellen, wurden 37 g des Pulvers in 1 l Aqua dest. eingerührt und in der Mikrowelle bis zur klaren Lösung erhitzt. Nach Autoklavieren der Lösung und Abkühlen auf ungefähr 55°C wurden dem LB-Agar 400 µl Ampicillin-Lösung [50 mg/ml Lösung] zugesetzt. Sterile 10 cm-Petrischalen wurden mit

jeweils 25 ml LB-Agar beschickt, der sich in den Schalen verfestigte. Die gewonnenen LB-Agarplatten (jeweils 10 µl Ampicillin-Lösung [50 mg/ml Lösung] enthaltend) wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

NZY⁺-Nährmedium

Verwendung: Nährmedium für transformierte *E.coli* XL1-Blue-Bakterien

Herstellung: Zunächst wurde NZY-Medium hergestellt, indem 21 g eines vorgemischten Pulvers zur Herstellung von NZY-Medium (GIBCO Life Technologies, Invitrogen, Kat. Nr. 13635-024) in 1 l Aqua dest. gelöst wurden. NZY-Medium besteht aus 10 g/l Caseinhydrolysat, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl und 0,94 g/l MgCl₂ (Anhydrat). Nach Einstellung des pH-Wertes mit NaOH auf 7,5 wurde die Lösung durch Autoklavieren sterilisiert. Kurz vor der Verwendung wurde NZY⁺-Medium erhalten, indem das benötigte Volumen NZY-Medium mit sterilfiltrierter 20%iger (m/v) Glucose-Lösung versetzt wurde. Dabei wurde das hinzuzugebende Volumen an Glucose-Lösung so berechnet, dass NZY⁺-Medium mit 0,4% (m/v) Glucose-Endkonzentration entstand.

2.5.6 Herstellung von Lösungen und Puffern

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer sind in den folgenden Tabellen (Tab. 12 bzw. Tab. 13) aufgeführt.

Lösung	Herstellung	Weitere Behandlung
Ampicillin-Stammlösung	[50 mg/ml] in Aqua dest. lösen	Sterilfiltration in 50 ml-Polypropylen-Röhrchen, zu 550 µl in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotieren, bei -20°C einfrieren
CaCl ₂ -Lösung	0,25 M in Aqua dest. lösen	Sterilfiltration in autoklavierte 500 ml-Glasflasche, in sterile 50 ml-Polypropylen-Röhrchen aliquotieren, bei -20°C einfrieren
Glucose-Lösung	20% (m/v) in Aqua dest. lösen	Sterilfiltration in 50 ml-Polypropylen-Röhrchen, Lagerung bei 4-8°C
Glycerol-Lösung	60% (v/v) in Aqua dest. lösen	Sterilfiltration in 50 ml-Polypropylen-Röhrchen, Lagerung bei 4-8°C
IPTG-Lösung	10 mM IPTG in Aqua dest. lösen	Sterilfiltration in 15 ml-Polypropylen-Röhrchen, Lagerung bei 4-8°C
Polyethylenimin-Lösung	1% (m/v) in Aqua dest, Herstellung aus 50%iger (m/v) wässriger Polyethylenimin-Lösung	Lagerung bei 4-8°C
X-Gal-Lösung	2% (m/v) in Dimethylformamid lösen	Lagerung in 15 ml-Polypropylen-Röhrchen bei 4-8°C

Tab. 12: Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten Lösungen.

Puffer	Herstellung	Weitere Behandlung
BBS (2x)-Puffer	50 mM BES, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ in Aqua dest. lösen, pH 6,95 (!) einstellen, mit Aqua dest. auf 500 ml Endvolumen auffüllen	Sterilfiltration in autoklavierte 500 ml-Glasflasche, in sterile 50 ml-Polypropylen-Röhrchen aliquotieren, bei -20°C einfrieren
5 mM Na,K,P _i -Puffer	4 mM Na ₂ HPO ₄ , 1 mM KH ₂ PO ₄ ; Herstellung aus 40 mM Na,K,P _i -Puffer, pH 7,4 überprüfen und ggf. mit 1 N H ₃ PO ₄ einstellen	Lagerung bei 4-8°C
40 mM Na,K,P _i -Puffer	32 mM Na ₂ HPO ₄ , 8 mM KH ₂ PO ₄ ; Herstellung aus 0,5 M Na ₂ HPO ₄ - und 0,5 M KH ₂ PO ₄ -Stammlösung, pH 7,4 überprüfen	Lagerung bei 4-8°C
PBS-Puffer	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Sigma, D-5652); Zusammensetzung: 0,2 g/l KH ₂ PO ₄ , 0,2 g/l KCl, 8,0 g/l NaCl, 1,15 g/l Na ₂ HPO ₄ ; 1 Pulvereinheit (9,6 g) in 1 l Aqua dest. lösen, pH 7,5 überprüfen	Sterilfiltration in autoklavierte 500 ml-Glasflaschen, Lagerung bei 4-8°C
TE-Puffer	1 mM EDTA unter NaOH-Zugabe in Aqua dest. lösen, 10 mM Tris hinzugeben, mit 1 N HCl auf pH 8,0 einstellen	Sterilfiltration in 50 ml-Polypropylen-Röhrchen, Lagerung bei 4-8°C
Mg,Tris,Cl,P _i -Puffer	3,6 mM MgHPO ₄ x 3 H ₂ O unter HCl-Zugabe in Aqua dest. lösen, 50 mM Tris hinzugeben, mit 1 N HCl auf pH 7,3 einstellen	Lagerung bei 4-8°C
Tris,Cl-Puffer	50 mM Tris in Aqua dest. lösen, mit 1 N HCl auf pH 7,4 einstellen	Lagerung bei 4-8°C

Tab. 13: Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten Puffer. Die Bezeichnung BBS (2x)-Puffer deutet auf die zweifache Konzentration der Pufferkomponenten des in dieser Arbeit verwendeten BBS-Puffers hin.

Zur Sterilfiltration in autoklavierte 500 ml-Glasflaschen wurden die Sterilfiltrationseinheiten SFCA Bottle Top Filters (0,2 µm, Nalgene, Kat. Nr. 290-4520) benutzt.

Die Sterilfiltration in sterile 50 ml-Polypropylen-Röhrchen erfolgte über Sterilfiltrationseinheiten, die aus einer 10 ml- bzw. 20 ml-Einmal-Injektionsspritze

(B. Braun Melsungen AG), einem sterilen QUALILAB® Spritzenvorsatzfilter (0,22 µm CM Membran, Merck Labor und Chemie Vertrieb GmbH, Bruchsal, Kat. Nr. 5122110) und einer Sterican® Einmal-Injektionskanüle Gr.1 (B. Braun Melsungen AG) zusammengesetzt waren.

2.6 Statistische Auswertungen

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur statistischen Auswertung herangezogenen Analysemethoden sollen in diesem Abschnitt kurz erläutert werden.

Die Gleichung zur Berechnung des arithmetischen Mittels \bar{x} aus Einzelmesswerten x_i bei einer Anzahl von n gemessenen Werten lautet:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Gleichung 22}$$

Die Standardabweichung SD dient als Maß für die Streuung von Messwerten. Sie entspricht der Quadratwurzel aus der Varianz s^2 und lässt sich folgendermaßen berechnen:

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

Der Standardfehler des Mittelwertes SEM wird aus der Standardabweichung gemäß folgender Beziehung abgeleitet:

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad \text{Gleichung 24}$$

Bei der Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven (Gleichung 8) mittels computergestützter nichtlinearer Regressionsanalyse gemäß der Hill-Gleichung wurden verschiedene Kurvenanpassungen an einen Datensatz mit unterschiedlicher Anzahl an Variablen vorgenommen und mit Hilfe eines F-Testes verglichen. Der F-Test prüft, ob

die aus zwei verschiedenen Analysen resultierenden Varianzen signifikant verschieden sind (Motulsky, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde beispielsweise getestet, ob eine Analyse mit variablem Hill-Koeffizienten n_H eine statistisch signifikant bessere Kurvenanpassung ergab als die entsprechende Analyse mit konstantgesetztem Hill-Koeffizienten $n_H = -1$. Um den Vergleich durchzuführen, wurde der F-Wert nach folgender Gleichung ermittelt:

$$F = \frac{\frac{SS_a - SS_b}{df_a - df_b}}{\frac{SS_b}{df_b}} \quad \text{Gleichung 25}$$

ss_a : Summe der Fehlerquadrate unter Anwendung der einfacheren Gleichung a

ss_b : Summe der Fehlerquadrate unter Anwendung der komplexeren Gleichung b mit einer zusätzlichen Variablen

df_a : Anzahl der Freiheitsgrade der einfacheren Gleichung a

df_b : Anzahl der Freiheitsgrade der komplexeren Gleichung b

Der resultierende F-Wert wird mit einem tabellierten F-Wert für die entsprechende Irrtumswahrscheinlichkeit - in der vorliegenden Arbeit $p < 0,05$ - verglichen. Übersteigt der errechnete F-Wert den tabellierten F-Wert, so ergibt sich aus der komplexeren Gleichung mit einer zusätzlichen Variablen die statistisch signifikant bessere Kurvenanpassung an die Datenpunkte.

Der t-Test dient dem Vergleich von Mittelwerten und wurde in dieser Arbeit als zweiseitiger, ungepaarter t-Test durchgeführt. Als Voraussetzung für den t-Test müssen die Daten einer Normalverteilung nach Gauss unterliegen. Fernerhin ist bei diesem Test zu beachten, dass sich die Standardabweichungen der zu vergleichenden Mittelwerte nicht signifikant voneinander unterscheiden dürfen. Diese Bedingung wurde vor der Durchführung des t-Testes mittels F-Test überprüft. Lag ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Standardabweichungen der Mittelwerte vor, wurde ein ungepaarter t-Test mit Korrektur nach Welch durchgeführt.

Den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten statistischen Analysen wurde ein Signifikanzniveau von $p = 0,05$ zugrunde gelegt.

2.7 Computerprogramme

Die computergestützte Analyse und graphische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Bindungsdaten wurden mit Hilfe des Programms GraphPad Prism[®], Version 2.0, 3.0 bzw. 3.02 (GraphPad[®] Software, San Diego, USA) durchgeführt. Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte anhand des Programms GraphPad InStat[®], Version 3.0 (GraphPad[®] Software, San Diego, USA). Zur Darstellung chemischer Strukturformeln diente die Software von ChemWindow[®], Version 6.0 (Bio-Rad Laboratories, Sadtler Division, Philadelphia, USA). Die Auswertung der Proteinbestimmung erfolgte unter Verwendung von Microsoft[®] Excel 2000 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Außerdem wurde der ExPaSy-Server des Schweizer Instituts für Bioinformatik mit der Internetadresse <http://www.expasy.ch> genutzt, um eine Sequenzüberprüfung neu hergestellter punktmutierter Muskarinrezeptoren mit Hilfe eines „Alignments“ durchzuführen.

3 Ergebnisse

3.1 Homologe Kompetitionen zur Charakterisierung der verwendeten Membransuspensionen

Die Bindungseigenschaften der in den Radioligandbindungsstudien dieser Arbeit eingesetzten Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe des Hausschweines sowie aus COS 7-Zellen wurden mit Hilfe von homologen Konkurrenzexperimenten charakterisiert. Ermittelt wurden die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D als Maß für die Affinität des Radioliganden [^3H]NMS zu den muskarinischen Rezeptoren sowie B_{max} , die Gesamtzahl der vorhandenen Bindungsstellen für [^3H]NMS. Die Durchführung der homologen Konkurrenzversuche erfolgte wie unter 2.4.2.2 beschrieben, Angaben zur Analyse der resultierenden Bindungsdaten sind dem Kapitel 2.4.2.1 zu entnehmen. Die folgende Abbildung (Abb. 2) zeigt exemplarisch das Ergebnis eines homologen Konkurrenzexperimentes zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften einer Membransuspension aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein.

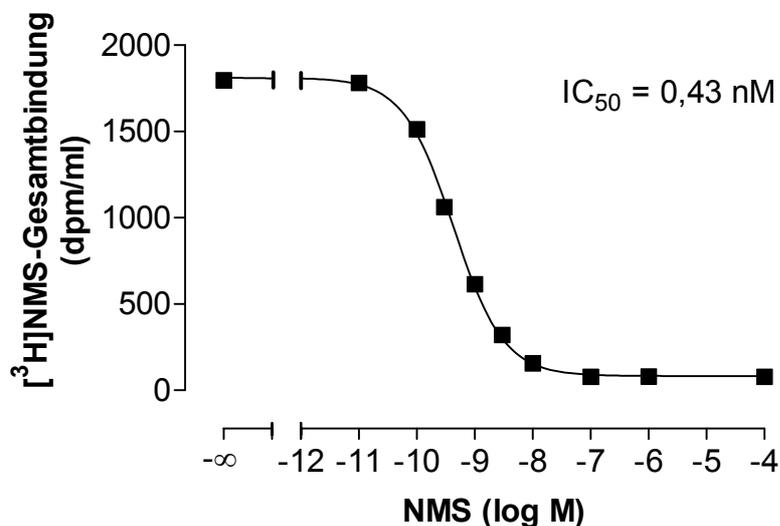


Abb. 2: Homologe Konkurrenz zwischen [^3H]NMS (0,2 nM) und nicht markiertem NMS in steigenden Konzentrationen zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften einer Membransuspension aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein. Ordinate: [^3H]NMS-Gesamtbindung in dpm/ml; Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration von NMS. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, durchgeführt als Dreifachbestimmung. Streuungsbalken sind nicht erkennbar, da sie nicht über die Symbolgröße hinausgehen.

Die Kurvenanpassung an die Datenpunkte sowie die Ermittlung des IC_{50} -Wertes erfolgte durch nichtlineare Regressionsanalyse gemäß der unter 2.4.2.1 dargestellten Hill-Gleichung (Gleichung 8). Das obere Plateau der Kurve stellt die Gesamtbindung des Radioliganden [3H]NMS in Abwesenheit des nicht markierten Kompetitors NMS dar. Das untere Kurvenplateau spiegelt die in Gegenwart von $1 \mu M$ Atropin ermittelte unspezifische Bindung wider. Der Hill-Koeffizient unterschied sich nicht statistisch signifikant von $n_H = -1$ und wurde deshalb auf diesen Wert festgelegt. Der durch den Wendepunkt des sigmoiden Kurvenverlaufes beschriebene IC_{50} -Wert beträgt in diesem Versuch $0,43 \text{ nM}$. Wie in Kapitel 2.4.2.1 beschrieben, dient der IC_{50} -Wert zur Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D gemäß Gleichung 10 nach Cheng und Prusoff (1973) sowie zur Ermittlung der Gesamtzahl vorhandener Bindungsstellen B_{max} gemäß Gleichung 11 nach DeBlasi et al. (1989). Aus dem exemplarisch dargestellten homologen Konkurrenzexperiment resultiert für das untersuchte Homogenat ein pK_D -Wert von $9,64$. Der B_{max} -Wert beträgt $63 \text{ fmol/mg Protein}$, wobei die Verdünnung des Homogenates im Experiment bei der Berechnung zu berücksichtigen ist.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Bindungsparameter K_D und B_{max} stellt die lineare Transformation nach Scatchard (1949) dar. Die Bindungsparameter K_D und B_{max} der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Homogenate aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein wurden sowohl nach Cheng und Prusoff bzw. DeBlasi berechnet als auch nach linearisierter Auftragung der Messwerte gemäß Scatchard graphisch ermittelt.

Die folgende Tabelle (Tab. 14) fasst die pK_D - und B_{max} -Werte aller im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Homogenate aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein zusammen. Die Ergebnisse der Berechnung dieser Parameter nach Cheng und Prusoff bzw. DeBlasi sind den Ergebnissen der Datenanalyse nach Scatchard zum Zwecke des Vergleiches gegenübergestellt.

Homogenat	pK _D		B _{max} (fmol/mg Protein)		Anzahl der Versuche
	Cheng & Prusoff	Scatchard	DeBlasi	Scatchard	
24.03.1999	9,39 (9,41; 9,37)	9,36 (9,44; 9,28)	117 (114; 120)	113 (97; 128)	2
25.05.1999	9,40 (9,41; 9,39)	9,33 (9,22; 9,43)	48 (50; 46)	53 (62; 44)	2
09.08.1999	9,39 ± 0,04	9,42 ± 0,02	43 ± 6	40 ± 2	3
03.02.2000	9,38 (9,48; 9,28)	9,32 (9,37; 9,26)	97 (88; 105)	104 (101; 107)	2
29.01.2001	9,63 (9,62; 9,64)	9,65 (9,74; 9,55)	63 (62; 63)	63 (55; 70)	2
Mittelwert ± S.E.M.	9,44 ± 0,05	9,42 ± 0,06	74 ± 14	75 ± 14	-

Tab. 14: Zusammenfassung der Ergebnisse der homologen Konkurrenzexperimente, die zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der in dieser Arbeit eingesetzten Homogenate aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein durchgeführt wurden. In den Experimenten wurde Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer als Inkubationsmedium eingesetzt; die Inkubationstemperatur betrug 37°C. Die Ergebnisse der Datenanalysen nach Cheng und Prusoff (1973) bzw. DeBlasi et al. (1989) sowie nach Scatchard (1949) sind jeweils einander gegenübergestellt. Bei der Auswertung weiterer Experimente wurden die gemäß den Gleichungen nach Cheng und Prusoff bzw. DeBlasi berechneten pK_D- und B_{max}-Werte berücksichtigt. Aufgeführt sind die Mittelwerte der pK_D- und B_{max}-Werte der einzelnen Homogenate aus jeweils 2-3 unabhängigen Experimenten. Wurden zwei Experimente durchgeführt, sind die dem Mittelwert zugrunde liegenden Einzelwerte in Klammern nachgestellt, da die Berechnung eines Standardfehlers bei der Mittelung zweier Werte statistisch nicht sinnvoll erscheint. Im Falle eines Homogenates wurden drei Experimente durchgeführt, weshalb Mittelwerte ± Standardfehler angegeben sind. Weiterhin sind Mittelwerte ± Standardfehler (S.E.M.) der gemittelten pK_D- bzw. B_{max}-Werte der einzelnen Homogenate errechnet und am Schluß der Tabelle aufgeführt.

In der folgenden Tabelle (Tab. 15) werden die Ergebnisse der homologen Konkurrenzexperimente zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der in dieser Arbeit eingesetzten COS 7-Zellhomogenate gezeigt. Die pK_D- und B_{max}-Werte der untersuchten COS 7-Zellhomogenate wurden nach Cheng und Prusoff (1973) bzw. DeBlasi et al. (1989) berechnet. Auf eine zusätzliche Bestimmung der Bindungsparameter durch eine Analyse der experimentellen Daten nach Scatchard (1949) wurde im Falle der COS 7-Zellhomogenate verzichtet.

Homogenat	pK _D Cheng & Prusoff	B _{max} (fmol/ml) DeBlasi
M₂ wt (06.09.01)	10,36 (10,41; 10,32)	157 (141; 173)
M₂ wt (20.04.00)	10,75 (10,16; 11,35)	290 (349; 231)
M₅ wt	9,89 (9,89; 9,88)	153 (153; 153)
M₂("A" M₅)	10,30 (10,15; 10,45)	108 (115; 100)
M₂("B" M₅)	10,92 (10,48; 11,36)	68 (91; 44)
M₂("C" M₅)	10,20 (10,31; 10,10)	389 (367; 411)
M₅("A" M₂)	10,03 (10,11; 9,95)	124 (119; 129)
M₅("B" M₂)	10,12 (9,87; 10,37)	119 (134; 103)
M₅("C" M₂)	10,08 (10,12; 10,04)	179 (175; 183)
M₂¹⁷²Glu→Ala	10,82 (10,77; 10,87)	151 (160; 141)
M₂¹⁷³Asp→Leu	11,80 (13,00; 10,60)	88 (89; 86)
M₂¹⁷⁵Glu→Ala	10,75 (11,24; 10,26)	172 (165; 178)
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	11,09 (10,96; 11,22)	402 (416; 388)
M₂⁴²³Thr→His (07.06.00)	11,07 (11,17; 10,97)	293 (249; 336)
M₂⁴²³Thr→His (07.02.02)	10,28 (10,10; 10,46)	132 (140; 123)
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His	10,47 (10,80; 10,14)	409 (366; 452)
M₅¹⁸⁴Gln→Tyr	11,37 (12,62; 10,12)	130 (109; 150)
M₅⁴⁷⁸His→Thr	10,42 (10,13; 10,70)	317 (313; 321)
M₅¹⁸⁴Gln→Tyr + ⁴⁷⁸His→Thr	11,74 (12,52; 10,95)	230 (210; 249)

Tab. 15: Legende siehe nächste Seite

Legende zu Tab. 15: Zusammenfassung der Ergebnisse der homologen Konkurrenzexperimente, die zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der in dieser Arbeit eingesetzten COS 7-Zellhomogenate durchgeführt wurden. In den Experimenten wurde Na,K,P_i-Puffer als Inkubationsmedium eingesetzt; die Inkubationstemperatur betrug 23°C. Die Berechnung der pK_D- und B_{max}-Werte erfolgte nach Cheng und Prusoff (1973) bzw. nach DeBlasi et al. (1989). Für jeden in der Tabelle aufgeführten Wildtyp (wt)- bzw. mutierten Rezeptor wurden ein repräsentatives Homogenat bzw. maximal zwei Homogenate untersucht. Im Falle der Untersuchung zweier Homogenate sind zur Unterscheidung die Herstellungsdaten der betreffenden Homogenate in Klammern aufgeführt. Die Erläuterung der Nomenklatur der untersuchten Rezeptormutanten erfolgt im Zusammenhang mit der Darstellung der an den Rezeptormutanten erhobenen Befunde in den entsprechenden Abschnitten des Kapitels 3.5 (s. S. 85 ff.). Dargestellt sind die Mittelwerte der pK_D- und B_{max}-Werte eines Homogenates aus jeweils zwei unabhängigen Experimenten. Da die Berechnung eines Standardfehlers bei der Mittelung zweier Werte statistisch nicht sinnvoll erscheint, sind die dem Mittelwert zugrunde liegenden Einzelwerte in Klammern nachgestellt. Die in unabhängigen Einzelexperimenten ermittelten B_{max}-Werte einiger COS 7-Zellhomogenate zeigen deutliche Abweichungen voneinander. Auf eine Bestimmung des Proteingehaltes der Membransuspensionen aus COS 7-Zellen wurde verzichtet, weshalb die Angabe der B_{max}-Werte in fmol/ml Membransuspension erfolgen muss.

3.2 Charakterisierung der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit W84-artiger allosterischer Modulatoren

3.2.1 Untersuchung der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit verschiedener strukturmodifizierter Derivate des Prototyp-Modulators W84

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe allosterischer Modulatoren vom Alkanbisammonium-Typ untersucht, die durch strukturelle Modifikationen aus dem Prototyp-Modulator W84 hervorgegangen waren. In Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten (s. 2.4.4.3) sollten die Testsubstanzen zunächst hinsichtlich ihrer Potenz, die Dissoziation des Antagonisten [³H]NMS vom Muskarinrezeptor zu verzögern, geprüft werden. Diese Experimente wurden mit Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein durchgeführt, die überwiegend Muskarinrezeptoren vom Subtyp M₂ enthalten. Die in Dissoziationsexperimenten mit Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein in Mg,Tris,Cl,P_i-Puffer bei 37°C gemessene mittlere Halbwertszeit der [³H]NMS-Dissoziation in Abwesenheit von allosterischem Modulator betrug $t_{1/2, \text{Kontrolle}} = 2,64 \pm 0,05$ min (Mittelwert \pm Standardfehler, n = 122). Die Untersuchung der allosterischen Wirksamkeit in Dissoziationsexperimenten am Orthoster-besetzten muskarinischen Rezeptor

gewährleistet, dass ausschließlich über die allosterische Bindungsstelle vermittelte Effekte der Testsubstanz erfasst werden (Kostenis und Mohr, 1996b). Um einen Überblick über die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit der allosterischen Modulatoren aus der Reihe der sogenannten OS-Substanzen (s. 2.5.2) zu gewinnen, wurden zuerst „Screening-Untersuchungen“ mittels kinetischer Zweipunkt-Dissoziationsexperimente, wie in Kapitel 2.4.4.3.4 beschrieben, durchgeführt. Anhand der Ergebnisse dieser orientierenden Untersuchungen wurden einige Modulatoren ausgewählt, die aufgrund einer hohen dissoziationsverzögernden allosterischen Wirksamkeit bzw. durch strukturelle Merkmale besonders interessant erschienen. Diese Substanzen wurden in Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten gemäß 2.4.4.3.3 ausführlich untersucht. In Tab. 16 sind die Ergebnisse dieser ausgewählten allosterischen Modulatoren aus den orientierenden „Screening-Untersuchungen“ sowie den nachfolgenden Experimenten zur genaueren Beschreibung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve einander gegenübergestellt. Im Vergleich der als Maß für die allosterische Wirksamkeit dienenden $pEC_{50,diss}$ -Werte eines Modulators aus orientierenden „Screening-Untersuchungen“ sowie aus nachfolgenden genaueren Untersuchungen erweisen sich die in orientierenden Experimenten erhobenen Kenndaten als äußerst zuverlässig. Außerdem sind die orientierenden Ergebnisse der allosterischen Modulatoren, deren Untersuchung nicht weiterverfolgt wurde, aufgeführt.

Allosterischer Modulator	„Screening-Untersuchung“			„Ausführliche Untersuchung“		
	pEC _{50,diss}	n _H	n	pEC _{50,diss}	n _H	n
W84/ H,H,H,H	-	-	-	6,00 ± 0,07	-0,86 ± 0,12 ^{n.s.}	3
OS-68(30)/ H,H,CH ₃ ,H	6,87 ± 0,03	-0,91 ± 0,20 ^{n.s.}	3	6,87 ± 0,04	-0,95 ± 0,08 ^{n.s.}	3
OS-66(28)/ H,H,CH ₃ ,CH ₃	6,75 ± 0,04	-1,20 ± 0,92 ^{n.s.}	3	-	-	-
OS-72(32)/ CH ₃ ,H,CH ₃ ,H	7,12 ± 0,06	-1,10 ± 0,17 ^{n.s.}	3	7,26 ± 0,02	-1,08 ± 0,05 ^{n.s.}	3
OS-65(27)/ CH ₃ ,H,H,CH ₃	7,15 ± 0,11	-0,59 ± 0,24 ^{n.s.}	3	-	-	-
OS-74(34)/ CH ₃ ,CH ₃ ,CH ₃ ,H	7,25 ± 0,05	-1,06 ± 0,18 ^{n.s.}	3	7,44 ± 0,06	-1,04 ± 0,14 ^{n.s.}	4
OS-71(31)/ CH ₃ ,CH ₃ ,CH ₃ ,CH ₃	7,33 ± 0,10	-1,24 ± 0,25 ^{n.s.}	3	-	-	-
OS-67(29)	6,72 ± 0,04	-0,72 ± 0,17 ^{n.s.}	3	-	-	-
OS-76(26)	7,32 ± 0,03	-1,01 ± 0,10 ^{n.s.}	3	-	-	-
OS-69(33)	7,22 ± 0,02	-1,22 ± 0,06*	3	-	-	-
OS-78(35)	7,53 ± 0,02	-0,96 ± 0,04 ^{n.s.}	3	7,59 ± 0,04	-1,14 ± 0,10 ^{n.s.}	3
OS-23(20)	6,47 ± 0,05	-0,91 ± 0,25 ^{n.s.}	3	-	-	-
OS-24(21)	6,23 ± 0,04	-0,86 ± 0,16 ^{n.s.}	3	-	-	-
OS-27(23)	6,45 ± 0,06	-0,84 ± 0,28 ^{n.s.}	3	-	-	-

Tab. 16: Ergebnisse der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente mit dem Radioliganden [³H]NMS unter Einwirkung des Prototyp-Modulators W84 sowie der allosterischen Modulatoren der OS-Reihe. Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der allosterischen Modulatoren aus den zur Orientierung durchgeführten „Screening-Untersuchungen“; bei einigen ausgewählten Testsubstanzen sind diesen Befunden die Ergebnisse aus nachfolgenden detaillierteren Untersuchungen gegenübergestellt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler, basierend auf 3-4 unabhängigen Experimenten. Die Anzahl der mit einer Testsubstanz durchgeführten Experimente n ist separat aufgeführt. Die oberen und unteren Plateau-Werte der Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden bei der Durchführung der nichtlinearen

Regressionsanalyse auf 100 % bzw. 0 % festgesetzt. Der Festlegung des unteren Kurvenplateaus auf 0 % lag die Annahme zugrunde, dass die OS-Substanzen in Analogie zum strukturverwandten Prototyp-Modulator W84 in hohen Konzentrationen in der Lage sind, die [³H]NMS-Dissoziation vollständig zu verzögern. In diesem Fall können, wie unter 2.4.4.1 beschrieben, EC_{50,diss}-Werte angegeben werden. Die OS-Substanzen sind numerisch bezeichnet; bei den ersten sechs Verbindungen handelt es sich um methylierte W84-Derivate mit 6 Methylengruppen in der Zwischenkette, für die eine zusätzliche Nomenklatur nach Substitutionsmuster eingeführt wurde und hier angegeben ist. Nähere Erläuterungen zur Nomenklatur der OS-Substanzen sowie Strukturformeln sind dem Kapitel 2.5.2 zu entnehmen.

^{n.s.} Kurvensteilheit nicht signifikant verschieden von $n_H = -1$ (F-Test, $p \geq 0,05$)

* Kurvensteilheit signifikant verschieden von $n_H = -1$ (F-Test, $p < 0,05$)

3.2.2 Dissoziationsexperimente mit den hydroxylierten Derivaten von W84 sowie dem tertiären W84-Analogon

Zu den in dieser Arbeit untersuchten strukturmodifizierten W84-Derivaten zählen ferner die hydroxylierten Testsubstanzen OS-06(16) und OS-08(17). OS-08(17) stellt in Analogie zu den übrigen OS-Substanzen eine Alkan-bisammonium-Verbindung dar, wohingegen OS-06(16) von dem tertiären Analogon des Prototyp-Modulators W84 abgeleitet ist. Die Strukturformeln sind dem Kapitel 2.5.2 zu entnehmen. Durch die Hydroxylierung entstehen in beiden Verbindungen asymmetrische Kohlenstoff-Atome, so dass OS-06(16) und OS-08(17) als (-)- oder (+)-Enantiomer vorliegen können. Das Razemat enthält beide Enantiomere zu gleichen Teilen. Um die chiralen Testsubstanzen im Hinblick auf eine Enantioselektivität ihrer Wirksamkeit untersuchen zu können, wurden neben dem Razemat die (-)- und (+)-Enantiomere, ausgehend von den entsprechenden enantiomerenreinen Edukten, synthetisiert (Scharfenstein, 2000). Die hydroxylierten Substanzen OS-06(16) und OS-08(17) wurden sowohl als Razemat als auch in Form ihrer (-)- bzw. (+)-Enantiomere in Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten gemäß der Darstellung unter 2.4.4.3.3 hinsichtlich ihres dissoziationsverzögernden Einflusses auf den Antagonisten [³H]NMS untersucht. In diesen Experimenten sollte neben der Frage nach einer bestehenden Enantioselektivität der Wirksamkeit ebenfalls geklärt werden, ob die Pfeiffer'sche Regel (Pfeiffer, 1956) auf die hydroxylierten OS-Substanzen übertragbar ist. Gemäß Pfeiffer besteht folgender Zusammenhang: Je stärker die Wirksamkeit einer chiralen Substanz ist, desto größer fällt der Unterschied zwischen den Wirkstärken der beiden Enantiomere aus. Die folgende Tabelle (Tab. 17) fasst die Ergebnisse der

Dissoziationsexperimente mit dem Radioliganden [^3H]NMS in Gegenwart der allosterischen Modulatoren OS-06(16) bzw. OS-08(17), jeweils in Form ihrer Razemate, (-)- sowie (+)-Enantiomere, zusammen.

Allosterischer Modulator	$\text{pEC}_{50,\text{diss}}$	n_{H}
OS-06(16) Razemat	$4,38 \pm 0,07$	$-0,96 \pm 0,15^{\text{n.s.}}$
(-)OS-06(16)	$4,29 \pm 0,08$	$-0,95 \pm 0,18^{\text{n.s.}}$
(+)OS-06(16)	$4,42 \pm 0,08$	$-0,99 \pm 0,20^{\text{n.s.}}$
OS-08(17) Razemat	$5,32 \pm 0,05$	$-1,09 \pm 0,12^{\text{n.s.}}$
(-)OS-08(17)	$5,57 \pm 0,07$	$-0,88 \pm 0,13^{\text{n.s.}}$
(+)OS-08(17)	$6,11 \pm 0,03$	$-0,82 \pm 0,05^*$

Tab. 17: Zusammenfassung der Ergebnisse der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente mit dem Radioliganden [^3H]NMS unter Einwirkung der allosterischen Modulatoren OS-06(16) und OS-08(17), jeweils als Razemat, (-)- bzw. (+)-Enantiomer. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler, basierend auf jeweils 3 unabhängigen Experimenten. Die oberen Plateau-Werte der Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden bei der Durchführung der nichtlinearen Regressionsanalyse auf 100 % festgesetzt. Die unteren Kurvenplateau-Werte wurden auf 0 % festgesetzt unter der Annahme, dass die hydroxylierten OS-Substanzen dem strukturverwandten Prototyp-Modulator W84 entsprechend in hohen Konzentrationen die [^3H]NMS-Dissoziation vollständig verzögern. In diesem Fall können, wie unter 2.4.4.1 beschrieben, $\text{EC}_{50,\text{diss}}$ -Werte angegeben werden.

^{n.s.} Kurvensteilheit nicht signifikant verschieden von $n_{\text{H}} = -1$ (F-Test, $p \geq 0,05$)

* Kurvensteilheit signifikant verschieden von $n_{\text{H}} = -1$ (F-Test, $p < 0,05$)

Die oben dargestellten Befunde zeigen für das Razemat der vom tertiären W84-Analogen abgeleiteten Base OS-06(16) eine um den Faktor 10 geringere dissoziationsverzögernde Wirksamkeit verglichen mit dem Razemat des quartären Alkan-bisammonium-Salzes OS-08(17). Die OS-08(17)-Enantiomere zeigen eine deutliche Enantioselektivität der Wirksamkeit, wobei (+)OS-08(17) das stärker wirksame Enantiomer darstellt. Dahingegen weisen die schwächer wirksamen Enantiomere von OS-06(16) nur einen geringen Unterschied in ihrer Wirksamkeit auf, was anhand der

von Pfeiffer aufgezeigten Proportionalität von Wirksamkeit und Enantioselektivität zu erklären ist. Die Ergebnisse der Untersuchung der Razemate und Enantiomere von OS-06(16) und OS-08(17) stimmen demzufolge mit der Pfeiffer'schen Regel überein.

3.3 „Screening-Untersuchungen“ zur heterologen Interaktion W84-artiger allosterischer Modulatoren mit [³H]N-Methylscopolamin

Nachdem der Einfluss der allosterischen Modulatoren aus der Reihe der OS-Substanzen auf die [³H]NMS-Dissoziation untersucht worden war, sollte im Folgenden ein Überblick über das Kooperativitätsverhalten der OS-Verbindungen (s. 2.5.2) mit [³H]NMS am Muskarinrezeptor gewonnen werden. Zur orientierenden Einschätzung der Wirkung der OS-Substanzen auf die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung wurden heterologe Interaktionsexperimente, wie unter 2.4.3.2 beschrieben, durchgeführt. Der Versuchsansatz wurde allerdings dahingehend vereinfacht, dass die untersuchten allosterischen Modulatoren jeweils nur in einer Konzentration eingesetzt wurden. Indem für jede Substanz basierend auf den Befunden aus Dissoziationsexperimenten die entsprechende EC_{25,diss}-Konzentration ausgewählt wurde, wurde gewährleistet, dass die unterschiedlichen Modulatoren in äquieffektiven Konzentrationen untersucht wurden. In der EC_{25,diss}-Konzentration reduziert der allosterische Modulator die [³H]NMS-Dissoziation auf 25% des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz, so dass die allosterische Wirkung sichergestellt ist. Die folgende Abbildung (Abb. 3) stellt die Ergebnisse der orientierenden Untersuchung des Kooperativitätsverhaltens des Radioliganden [³H]NMS mit dem Prototyp-Modulator W84 sowie den verschiedenen allosterischen Modulatoren der OS-Reihe in Form eines Balkendiagramms dar.

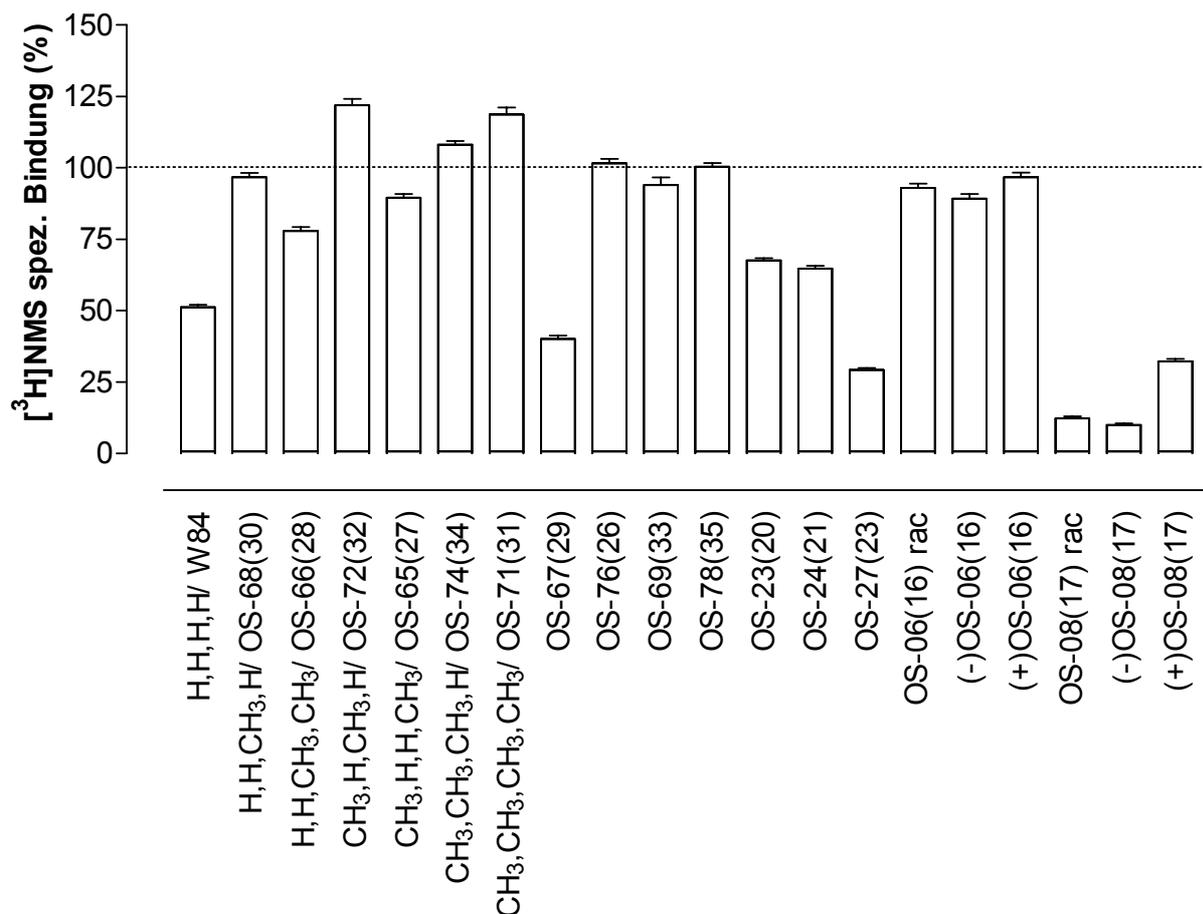


Abb. 3: Einfluss des Prototyp-Modulators W84 sowie der allosterischen Modulatoren der OS-Reihe auf die Gleichgewichtsbindung des Radioliganden [³H]NMS (0,2 nM). Ordinate: Spezifische [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung in Gegenwart eines allosterischen Modulators in seiner EC_{25,diss}-Konzentration in Prozent des Wertes in Abwesenheit des Modulators; Abszisse: Allosterischer Modulator in der EC_{25,diss}-Konzentration. Der Prototyp-Modulator W84 wurde zum Zwecke des Vergleiches in die Untersuchungen miteinbezogen. Die Benennung der OS-Substanzen erfolgte in Analogie zu Tab. 16 und Tab. 17: Die Substanzen sind numerisch bezeichnet, wobei für die methylierten W84-Derivate mit einer Zwischenkette aus 6 Methylengruppen zusätzlich die Nomenklatur nach Substitutionsmuster angegeben ist. Nähere Erläuterungen zur Nomenklatur der OS-Substanzen sowie Strukturformeln sind dem Kapitel 2.5.2 zu entnehmen. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler, basierend auf 4 unabhängigen Experimenten, durchgeführt als Dreifachbestimmung. Die Experimente wurden unter Verwendung von Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein durchgeführt; Mg,Tris,Cl,P_i-Puffer diente als Inkubationsmedium; die Inkubationstemperatur betrug 37°C. Die zur Einstellung des Bindungsgleichgewichtes benötigte Inkubationszeit wurde nach der in Kapitel 2.4.3.1 beschriebenen Methode unter Verwendung von Gleichung 16 abgeschätzt und betrug 1 h. Die Bestimmung der unspezifischen [³H]NMS-Bindung erfolgte in Gegenwart von 1 µM Atropin.

Die in der obigen Abbildung (Abb. 3) dargestellten Befunde zeigten erstmalig, dass allosterische Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ in der Lage sind, die Gleichgewichtsbindung des Radioliganden [^3H]NMS am muskarinischen Rezeptor zu fördern. In der Reihe der OS-Substanzen wurden somit die ersten positiv kooperativen W84-Derivate gefunden. Das Balkendiagramm (Abb. 3) verdeutlicht, dass die Verbindungen, die sich positiv kooperativ mit [^3H]NMS verhalten, aus der Reihe der methylierten W84-Derivate stammen. Interessanterweise zeigen die OS-Substanzen, die bei unveränderter Zwischenkettenlänge von 6 Methylengruppen durch Methylierung von W84 abgeleitet wurden, kein einheitliches Kooperativitätsverhalten. Unter diesen OS-Verbindungen befinden sich gemäß der in Abb. 3 dargestellten orientierenden Einschätzung negativ, annähernd neutral sowie positiv kooperative allosterische Modulatoren, wodurch die Möglichkeit aufgezeigt wurde, anhand methylierter W84-Derivate die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität zu beschreiben. Die durch Methylierung von W84 abgeleiteten allosterischen Modulatoren sollen im Folgenden ausschließlich durch die in Kapitel 2.5.2 eingeführte Nomenklatur nach Substitutionsmuster bezeichnet werden.

Die Halbwertszeit der Zersetzung der bereits unter 3.2.2 beschriebenen hydroxylierten Modulatoren OS-06(16) und OS-08(17) beträgt gemäß Scharfenstein (2000) unter den gewählten Versuchsbedingungen 1,5 h bzw. 2,8 h. Nach Ablauf der einstündigen Inkubationszeit, die für die im vorliegenden Kapitel dargestellten Gleichgewichtsbindungsexperimente gemäß der unter 2.4.3.1 beschriebenen Methode nach Gleichung 16 abgeschätzt wurde, ist die Konzentration von OS-06(16) auf 63% der Ausgangskonzentration abgesunken, im Falle von OS-08(17) beträgt die nach einstündiger Inkubation verbleibende Konzentration 78% der ursprünglich vorhandenen Konzentration. Da die Geschwindigkeit der Zersetzung der genannten Modulatoren eine exakte Bestimmung ihrer Bindungsparameter unmöglich macht, wurde die Untersuchung der hydroxylierten Derivate von W84 und seinem tertiären Analogon nicht weiter verfolgt.

3.4 Charakterisierung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität anhand ausgewählter methylierter W84-Derivate

Im Folgenden wurden der Prototyp-Modulator W84 sowie die Verbindungen H,H,CH₃,H, H,H,CH₃,CH₃, CH₃,H,CH₃,H, CH₃,H,H,CH₃, CH₃,CH₃,CH₃,H und CH₃,CH₃,CH₃,CH₃ aus der Reihe der methylierten OS-Modulatoren ausgewählt, anhand derer eine genaue Untersuchung der Beziehung zwischen Struktur und Wirkung der allosterischen Modulatoren im Hinblick auf deren Kooperativitätsverhalten mit [³H]NMS durchgeführt werden sollte. Um die Reihe der sukzessiv in den Seitenketten und/ oder an den Phthalimidringen methylierten Verbindungen zu ergänzen und auf diese Weise die Erfassung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen zu vervollständigen, wurden die allosterischen Modulatoren Monomethyl-W84 (CH₃,H,H,H) und Dimethyl-W84 (CH₃,CH₃,H,H) in die weiteren Untersuchungen miteinbezogen. Die Strukturformeln der aufgeführten Verbindungen sowie Erläuterungen zur Nomenklatur sind dem Kapitel 2.5.2 zu entnehmen.

3.4.1 Heterologe Interaktionsexperimente mit dem Prototyp-Modulator W84 und dessen methylierten Derivaten

Der Einfluss des Prototyp-Modulators W84 sowie seiner methylierten Derivate auf die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung wurde in ausführlichen heterologen Interaktionsexperimenten untersucht. Die Versuche wurden unter Verwendung von Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein in Mg,Tris,Cl,Pi-Puffer als Inkubationsmedium bei 37°C durchgeführt. Nähere Angaben zum experimentellen Ablauf können dem Kapitel 2.4.3.2 entnommen werden. In der folgenden Abbildung (Abb. 4) werden die Ergebnisse dieser Untersuchungen in Form von Konzentrations-Wirkungs-Kurven gemäß dem ternären Modell allosterischer Interaktion (Ehlert, 1988) gezeigt.

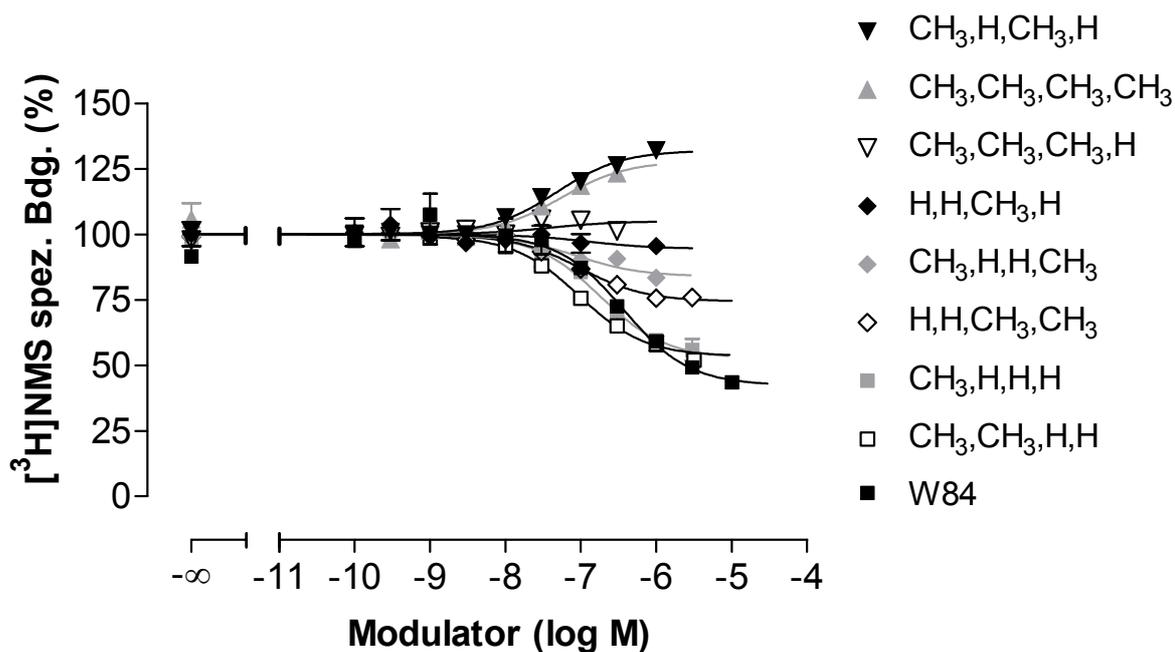


Abb. 4: Ergebnisse der Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen mit dem Prototyp-Modulator W84 und dessen methylierten Derivaten. Ordinate: Spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf B₀; Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration der untersuchten Modulatoren. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus jeweils 3 unabhängigen Experimenten, die als Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. Streuungsbalken sind meist nicht erkennbar, da sie nicht über die Symbolgröße hinausgehen. Die Kurvenanpassung erfolgte gemäß dem ternären Modell allosterischer Interaktion.

Die in Abb. 4 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven verdeutlichen, dass weder die einseitig noch die beidseitig am Phthalimidring methylierte Verbindung CH₃,H,H,H bzw. CH₃,CH₃,H,H ein von W84 abweichendes Kooperativitätsverhalten gegenüber dem Radioliganden [³H]NMS zeigt; CH₃,H,H,H und CH₃,CH₃,H,H verhalten sich negativ kooperativ und vermindern eindeutig die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS. Dahingegen entsteht durch einseitige Methylierung von W84 in der Propylseitenkette der allosterische Modulator H,H,CH₃,H, der beinahe keinen Effekt auf die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung zu haben scheint. Die Befunde aus Dissoziationsexperimenten (s. 3.2.1, Tab. 16) belegen allerdings eindeutig, dass eine Interaktion der Substanz mit dem Rezeptor stattfindet. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Besetzung des Rezeptors durch H,H,CH₃,H die Gleichgewichtsbindung des Radioliganden unbeeinflusst lässt. Die Verbindung H,H,CH₃,H verhält sich neutral kooperativ mit [³H]NMS. Die symmetrische Methylierung beider Propylseitenketten bringt jedoch keinen Vorteil hinsichtlich der Kooperativität, was die wiederum negativ kooperative Verbindung H,H,CH₃,CH₃ zeigt. Auch der allosterische Modulator

$\text{CH}_3, \text{H}, \text{H}, \text{CH}_3$, der in einer Molekülhälfte an der Propylseitenkette und in der anderen Hälfte des Moleküls am Phthalimidring methyliert ist, vermindert im Gegensatz zu der einseitig Seitenketten-methylierten Verbindung $\text{H}, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$. Eine deutliche Förderung der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung wird in Gegenwart des allosterischen Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ beobachtet, der einseitig an der Propylseitenkette sowie am Phthalimidring methyliert ist. Das positiv kooperative Verhalten von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ verdeutlicht im Vergleich mit der negativen Kooperativität der Verbindung $\text{CH}_3, \text{H}, \text{H}, \text{CH}_3$, dass eine Förderung der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung durch einseitige Methylierung der Propylseitenkette sowie des Phthalimidringes nur zu erreichen ist, sofern die Methylierungen in derselben Molekülhälfte vorliegen. Die von der positiv kooperativen Verbindung $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ ausgehende weitere Methylierung der Propylseitenkette der zweiten Molekülhälfte zu $\text{CH}_3, \text{CH}_3, \text{CH}_3, \text{H}$ ist von Nachteil, da das positiv kooperative Verhalten von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ durch die zusätzliche Methylierung auf eine annähernd neutrale Kooperativität von $\text{CH}_3, \text{CH}_3, \text{CH}_3, \text{H}$ mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ zurückfällt. Die weitere Methylierung des Phthalimidringes der zweiten Molekülhälfte ergibt die symmetrisch Seitenketten- und Phthalimidring-methylierte Verbindung $\text{CH}_3, \text{CH}_3, \text{CH}_3, \text{CH}_3$, die die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung wiederum zu fördern vermag. Allerdings resultiert aus der beidseitigen Seitenketten- und Phthalimidring-Methylierung im Hinblick auf das Kooperativitätsverhalten kein Vorteil gegenüber der gleichen Methylierung auf nur einer Molekülseite. Die in Gegenwart der einseitig an der Propylseitenkette und am Phthalimidring methylierten Verbindung $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ beobachtete Förderung der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung wird durch die positive Kooperativität der symmetrisch methylierten Verbindung $\text{CH}_3, \text{CH}_3, \text{CH}_3, \text{CH}_3$ mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ nicht übertroffen.

3.4.2 Gegenüberstellung der Kenndaten aus heterologen Interaktionsexperimenten sowie aus kinetischen Experimenten

In der folgenden Tabelle (Tab. 18) sollen die in Gleichgewichtsbindungs- und Dissoziationsexperimenten erhobenen Kenndaten für die Wirkungen des Prototyp-Modulators W84 sowie seiner methylierten Derivate zusammengefasst werden.

Allosterischer Modulator	pK _A	pα	α	p(α·K _A)	pEC _{50,diss}	p(α·K _A) - pEC _{50,diss}
W84 H,H,H,H	6,53 ± 0,02	-0,48 ± 0,02	3,02	6,05	6,00 ± 0,07	0,05
H,H,CH ₃ ,H	6,90 ± 0,03 ^{a,b}	-0,04 ± 0,03 ^a	1,10	6,86	6,87 ± 0,04 ^a	-0,01 ^b
H,H,CH ₃ ,CH ₃	7,08 ± 0,09 ^a	-0,21 ± 0,02 ^a	1,62	6,87	6,75 ± 0,04 ^a	0,12
CH ₃ ,H,H,H	6,89 ± 0,18	-0,43 ± 0,01	2,69	6,46	6,49 ± 0,04 ^a	-0,03
CH ₃ ,H,CH ₃ ,H	7,26 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,02 ^{a,c}	0,65	7,45	7,26 ± 0,02 ^a	0,19
CH ₃ ,H,H,CH ₃	7,20 ± 0,22	-0,13 ± 0,02 ^a	1,35	7,07	7,15 ± 0,11 ^a	-0,08
CH ₃ ,CH ₃ ,H,H	7,08 ± 0,10 ^{a,d}	-0,33 ^{a,d}	2,14	6,75	6,77 ± 0,03 ^{a,d}	-0,02
CH ₃ ,CH ₃ ,CH ₃ ,H	7,41 ± 0,02 ^{a,b}	0,03 ± 0,02 ^a	0,93	7,44	7,44 ± 0,06 ^a	0,00 ^b
CH ₃ ,CH ₃ ,CH ₃ ,CH ₃	7,21 ± 0,11 ^a	0,17 ± 0,02 ^{a,c}	0,68	7,38	7,33 ± 0,10 ^a	0,05

Tab. 18: Zusammenfassung der Kenndaten des Prototyp-Modulators W84 sowie seiner methylierten Derivate aus Gleichgewichtsbindungs- und Dissoziationsexperimenten. Zusätzlich werden die Werte für p(α·K_A) sowie für die Differenz aus p(α·K_A) und pEC_{50,diss} aufgeführt. Anhand der Differenz aus p(α·K_A) und pEC_{50,diss} wird geprüft, ob die den Daten zugrundeliegenden unterschiedlichen experimentellen Ansätze übereinstimmende Ergebnisse liefern. In diesem Fall sollte die Differenz aus p(α·K_A) und pEC_{50,diss} den Wert Null annehmen. Aufgeführt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Da die α-Werte durch Entlogarithmieren der pα-Werte ermittelt wurden, erfolgt ihre Angabe ohne Standardfehler.

^a Diese Parameter unterscheiden sich statistisch signifikant von den entsprechenden mit dem Prototyp-Modulator W84 erhobenen Werten (p < 0,05).

^b Die Analyse der heterologen Interaktionsexperimente in Gegenwart von annähernd neutral kooperativen Testsubstanzen erfolgte gemäß der modifizierten Gleichung 15, in der, entsprechend der Darstellung in Kapitel 2.4.3.1 (s. S. 31 ff.) K_A durch den Quotienten EC_{50,diss}/α ersetzt wird.

^c Die pα-Werte der positiv kooperativen Verbindungen CH₃,H,CH₃,H und CH₃,CH₃,CH₃,CH₃ unterscheiden sich statistisch signifikant von dem pα-Wert der annähernd neutral kooperativen Verbindung CH₃,CH₃,CH₃,H (p < 0,05).

^d Die Kenndaten der Verbindung CH₃,CH₃,H,H wurden der Dissertationsschrift von Mies-Klomfaß (1997) entnommen. Die Angabe eines Standardfehlers von pα ist auf der Basis der vorliegenden Daten nicht möglich.

In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 5) sind die Affinitäten von W84 und dessen methylierten Derivaten zum freien Rezeptor, dargestellt als pK_A -Werte, und zum Orthoster-besetzten Rezeptor, dargestellt als $p(\alpha \cdot K_A)$ -Werte, in Form eines Säulendiagramms einander gegenübergestellt.

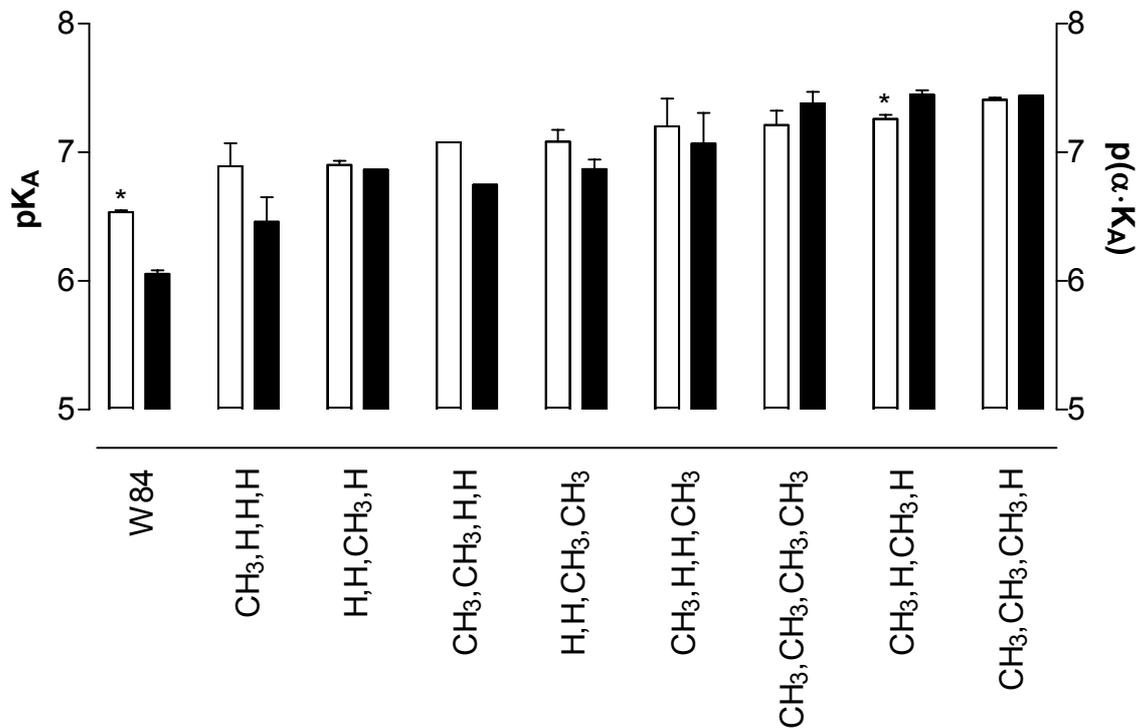


Abb. 5: Gegenüberstellung der Affinitäten des Prototyp-Modulators W84 sowie der methylierten W84-Derivate zum freien Rezeptor, dargestellt als pK_A -Werte in Form offener Säulen, sowie der Affinitäten der entsprechenden Modulatoren zum Orthoster-besetzten Rezeptor, dargestellt als $p(\alpha \cdot K_A)$ -Werte in Form ausgefüllter Säulen. Linke Ordinate: pK_A -Werte der allosterischen Modulatoren (offene Säulen); rechte Ordinate: $p(\alpha \cdot K_A)$ -Werte der allosterischen Modulatoren (ausgefüllte Säulen); Abszisse: Untersuchte allosterische Modulatoren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler, basierend auf jeweils drei unabhängigen heterologen Interaktionsexperimenten. Die Reihenfolge, in der die allosterischen Modulatoren aufgeführt sind, wurde nach dem Kriterium der ansteigenden Affinität zum freien Rezeptor, d.h. nach steigenden pK_A -Werten, festgelegt.

* Die Affinität des entsprechenden allosterischen Modulators zum freien Rezeptor (pK_A) unterscheidet sich statistisch signifikant ($p < 0,05$) von dessen Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor ($p(\alpha \cdot K_A)$).

Das obige Säulendiagramm veranschaulicht, dass die Affinität des Prototyp-Modulators W84 zum freien Rezeptor durch Einführung verschiedener Methylierungsmuster gesteigert werden konnte. Die strukturelle Modifikation der allosterischen Modulatoren geht ferner einher mit einer Steigerung der Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor,

wie die geschlossenen Säulen in Abb. 5 zeigen. Aus der Gegenüberstellung der Affinitäten der unterschiedlich methylierten allosterischen Modulatoren zum freien und zum Orthoster-besetzten Rezeptor resultiert, dass die im Zuge der Methylierung von W84 erreichbare Steigerung der Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor die Steigerung der Affinität zum freien Rezeptor übertrifft.

Wie aus Abb. 4 und Tab. 18 hervorgeht, wirkt die Ausgangsverbindung W84 hemmend auf die Gleichgewichtsbindung des Radioliganden [³H]NMS. Dem negativ kooperativen Verhalten liegt zugrunde, dass die betreffende Verbindung, wie in Kapitel 2.4.3.1 beschrieben, größere Affinität zum Orthoster-freien als zum -besetzten Rezeptor besitzt. Dies wird für W84 durch die in Abb. 5 dargestellten Befunde belegt. Im Zuge der Strukturvariation von W84 sind die methylierten Verbindungen CH₃,CH₃,CH₃,CH₃ und CH₃,H,CH₃,H entstanden, deren Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor ausgeprägter ist als die Affinität zum freien Rezeptor (s. Abb. 5). Diese Verbindungen zeigen positive Kooperativität mit [³H]NMS, was durch Abb. 4 und Tab. 18 gezeigt wird. Durch die Strukturmodifikation wurde demnach eine Umkehrung des Verhältnisses der Affinitäten der allosterischen Modulatoren zum Orthoster-besetzten und freien Rezeptor erreicht, so dass ein Wechsel von negativ zu positiv kooperativem Verhalten beobachtet werden kann. Charakteristisch für die allosterischen Modulatoren vom Alkanbisammonium-Typ verglichen mit allosterisch wirksamen Verbindungen anderer Struktur ist der Befund, dass die Optimierung des Verhältnisses der Affinitäten auf einer bevorzugten Steigerung der Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor gegenüber einer schwächer ausgeprägten Steigerung der Affinität zum freien Rezeptor beruht.

Um den molekularen Hintergrund des unterschiedlichen Kooperativitätsverhaltens von W84 und seinen methylierten Derivaten gegenüber [³H]NMS zu erforschen, wurden für den weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Epitop-Abhängigkeit unterschiedlicher Kooperativität angestrebt. Dies beruhte auf der Annahme, dass die positiv kooperativen, methylierten W84-Derivate in der Lage sind, die für die Affinität der allosterischen Modulatoren entscheidenden Epitope am Orthoster-besetzten Rezeptor besser auszunutzen als die negativ kooperative Ausgangsverbindung W84. Aus dieser Annahme resultierte die weiterführende Frage, ob die Verbindung CH₃,H,CH₃,H, die positive Kooperativität mit [³H]NMS zeigt, die gleichen Epitope am Orthoster-besetzten Rezeptor benutzt wie die nicht methylierte, negativ kooperative Ausgangsverbindung W84. Die Untersuchung dieser Fragestellung soll in den folgenden Kapiteln dieser Arbeit beschrieben werden.

3.4.3 Überprüfung des Kooperativitätsverhaltens des methylierten Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ in Na, K, P_i -Puffer

Bevor untersucht wurde, ob die Methylierung der Verbindung $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ eine Veränderung der Epitop-Abhängigkeit am Orthoster-besetzten Rezeptor im Vergleich zur Ausgangsverbindung W84 bedingt, sollte geprüft werden, inwiefern die bei dem methylierten Modulator beobachtete positive Kooperativität mit dem Radioliganden [^3H]NMS von den vorliegenden experimentellen Bedingungen abhängig ist. Die in den vorangegangenen Abschnitten dargestellten Befunde der Förderung der Gleichgewichtsbindung von [^3H]NMS durch $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ wurden an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein in Mg, Tris, Cl, P_i -Puffer als Inkubationsmedium bei 37°C erhoben. Die für den weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit vorgesehenen Untersuchungen zur Epitop-Abhängigkeit der Kooperativität sollten allerdings gemäß der von Buller et al. (2002) dargestellten Methode durchgeführt werden. Da die in der genannten Arbeit beschriebene Bestimmung der Epitop-Abhängigkeit durch Mutagenese-Untersuchungen an COS 7-Zellhomogenaten in Na, K, P_i -Puffer erfolgte, sollte im Folgenden geklärt werden, ob sich der methylierte Modulator $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ auch unter diesen experimentellen Bedingungen positiv kooperativ gegenüber [^3H]NMS verhält. Mit diesem Ziel wurden heterologe Interaktionsexperimente mit $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ an Membransuspensionen aus Hausschweinherzventrikelgewebe sowie an COS 7-Zellhomogenaten unter Verwendung von Na, K, P_i -Puffer als Inkubationsmedium bei 23°C durchgeführt. Genaue Angaben zur Durchführung dieser Experimente sind dem Kapitel 2.4.3.2 zu entnehmen. Die folgende Tabelle (Tab. 19) fasst alle in Gleichgewichtsbindungsstudien erhobenen Kenndaten des allosterischen Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ zusammen.

Homogenat	Puffer (°C)	[³ H]NMS [nM]	n	R _f (%)	IZ (h)	pK _A	pα	α	p(α·K _A)
HSV	Mg,Tris,Cl,P _i (37)	0,2	3	32	3,3	7,26 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,65	7,45
HSV	Na,K,P _i (23)	0,02	3	17	26	7,70 ± 0,26	0,48 ± 0,05	0,33	8,18
M ₂ -COS 7	Na,K,P _i (23)	0,2	1	74	4	8,65	0,69	0,20	9,34
M ₂ -COS 7	Na,K,P _i (23)	0,02	2	32	4	8,75 ± 0,05	-0,02 ± 0,05	1,04	8,74
M ₂ -COS 7	Na,K,P _i (23)	0,02	3	32	26	8,07 ± 0,15	0,11 ± 0,01	0,77	8,18
M ₂ -COS 7	Na,K,P _i (23)	0,05	1	54	26	8,22	0,07	0,85	8,29

Tab. 19: Zusammenfassung der Kenndaten der Interaktion des methylierten W84-Derivates CH₃,H,CH₃,H mit [³H]NMS in heterologen Interaktionsexperimenten mit Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein (HSV) sowie mit Homogenaten aus COS 7-Zellen, die transient mit dem Gen des humanen Muskarinrezeptors vom Subtyp M₂ transfiziert wurden (M₂-COS 7). Die Experimente mit Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein wurden entweder in Mg,Tris,Cl,P_i-Puffer bei 37°C oder in Na,K,P_i-Puffer bei 23°C durchgeführt. Die Versuche an M₂-COS 7-Zellhomogenaten wurden ausschließlich in Na,K,P_i-Puffer bei 23°C inkubiert. Die Konzentration des Radioliganden [³H]NMS wurde in Abhängigkeit von der für den jeweiligen Versuchsansatz angestrebten fraktionellen Rezeptorbesetzung (R_f) variiert. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler der pK_A- und pα-Werte aus n = 2-3 unabhängigen Experimenten. Die pK_A- und pα-Werte von nur einfach durchgeführten Experimenten sind ohne Fehlerangabe aufgeführt. Zusätzlich werden die Werte für α und p(α·K_A) angegeben. Da die maximale Konzentration des allosterischen Modulators CH₃,H,CH₃,H in den verschiedenen Versuchsansätzen variierte, ergaben sich gemäß Lazareno und Birdsall (1995; s. 2.4.3.1) unterschiedliche Inkubationszeiten (IZ), die einer separaten Spalte zu entnehmen sind.

Der methylierte allosterische Modulator CH₃,H,CH₃,H zeigt in Untersuchungen an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein in Mg,Tris,Cl,P_i- sowie in Na,K,P_i-Puffer positive Kooperativität mit dem Radioliganden [³H]NMS. In den Experimenten, die im Hinblick auf die weiterführenden Mutagenese-Untersuchungen an M₂-COS 7-Zellhomogenaten in Na,K,P_i-Puffer durchgeführt wurden, erwies sich die Verbindung jedoch als annähernd neutral kooperativ. Es sei angemerkt, dass ein Einzelversuch an einem M₂-COS 7-Zellhomogenat in Na,K,P_i-Puffer einen Hinweis auf positive Kooperativität zwischen CH₃,H,CH₃,H und [³H]NMS ergab. Wie Tab. 19 jedoch

verdeutlicht, war die eingesetzte [^3H]NMS-Konzentration recht hoch und führte zu einer fraktionellen Rezeptorbesetzung von 74%. Somit blieb kaum noch Raum für eine Steigerung. Deshalb wurde in weiteren Versuchen die [^3H]NMS-Konzentration gesenkt. In diesen Experimenten zeigte sich durchgängig eine annähernd neutrale Kooperativität zwischen dem methylierten Modulator und dem Radioliganden [^3H]NMS.

Da allerdings auch das neutral kooperative Verhalten von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ deutlich von dem bei der Ausgangsverbindung W84 in Unabhängigkeit vom Puffersystem beobachteten negativ kooperativen Verhalten abzugrenzen ist, wurden diese Verbindungen für die Untersuchung der Epitop-Abhängigkeit der Kooperativität ausgewählt.

3.5 Charakterisierung der Epitop-Abhängigkeit der Kooperativität durch Untersuchungen an Rezeptormutanten

Ziel der im Folgenden beschriebenen Untersuchungen war es, die Epitop-Abhängigkeit der Wirkung unterschiedlicher allosterischer Modulatoren mit Hilfe von Wildtyp- und mutierten Muskarinrezeptoren zu charakterisieren. Die in Kapitel 3.4 der vorliegenden Arbeit aufgezeigten Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität heben die Bedeutung der Affinität der allosterischen Modulatoren zum Orthoster-besetzten Rezeptor für das Auftreten positiver Kooperativität deutlich hervor. Infolgedessen wurden die Untersuchungen zur Epitop-Abhängigkeit der Kooperativität in Form kinetischer Experimente an Orthoster-besetzten humanen Wildtyp- sowie mutierten Muskarinrezeptoren durchgeführt. Um die Epitop-Abhängigkeit von allosterischen Modulatoren mit unterschiedlichem Kooperativitätsverhalten gegenüber [³H]NMS möglichst genau charakterisieren zu können, wurden die bereits für die Durchführung der Mutagenese-Untersuchungen vorgesehenen allosterischen Modulatoren W84 und CH₃,H,CH₃,H um die Verbindung H,H,CH₃,H erweitert. Wie Abb. 4 (s. S. 77) und Tab. 18 (s. S. 79) zu entnehmen ist, zeigt die Verbindung H,H,CH₃,H neutrale Kooperativität mit [³H]NMS. Die Modulatoren W84 und CH₃,H,CH₃,H verhalten sich unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen negativ bzw. positiv kooperativ. Somit werden verschiedene Ausrichtungen des Kooperativitätsverhaltens von allosterischen Modulatoren durch drei Verbindungen, die sich strukturell nur im Grad ihrer Methylierung unterscheiden, vertreten.

Im Rahmen eines Parallelprojektes wurde der positiv kooperative allosterische Modulator W84-Si₁/6 (s. 2.5.2, S. 53 f.) punktuell in die Untersuchungen miteinbezogen. Diese Verbindung gehört zu einer Reihe von Silicium-haltigen W84-Derivaten, die von Duda-Johner (2002) als hochpotente, atypische Förderer der Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS beschrieben wurden.

Der methodische Verlauf von Mutagenese-Untersuchungen zur Epitop-Abhängigkeit allosterischer Modulatoren wurde von Buller et al. (2002) beschrieben und in dieser Form für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen übernommen. In der Initialphase diente W84 als interner Standard. Durch die in den folgenden Abschnitten dargestellten Befunde, die mit diesem allosterischen Modulator erhoben wurden, konnten die von Buller et al. (2002) beschriebenen Kenndaten zu W84 reproduziert und somit die Methode etabliert werden.

Eine tabellarische Zusammenstellung der Halbwertszeiten der [^3H]NMS-Dissoziation von den untersuchten Wildtyp- und mutierten Muskarinrezeptoren unter Kontrollbedingungen (s. 3.5.7, Tab. 21, S. 113) sowie eine Übersicht über die Kenndaten der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der an den entsprechenden Rezeptoren untersuchten allosterischen Modulatoren (s. 3.5.8, Tab. 22 u. Tab. 23, S. 114 f.) befinden sich am Ende dieses Kapitels.

3.5.1 Charakterisierung der M_2/M_5 -Selektivität ausgewählter allosterischer Modulatoren

Die M_2/M_5 -Selektivität der ausgewählten allosterischen Modulatoren wurde geprüft, indem die Verzögerung der Dissoziation des Radioliganden [^3H]NMS vom humanen M_2 - bzw. M_5 -Wildtyp-Rezeptor in Gegenwart dieser Verbindungen untersucht wurde. Die folgende Abbildung (Abb. 6) zeigt beispielhaft die resultierenden Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Verzögerung der [^3H]NMS-Dissoziation von M_2 - bzw. M_5 -Rezeptoren in Gegenwart des allosterischen Modulators W84.

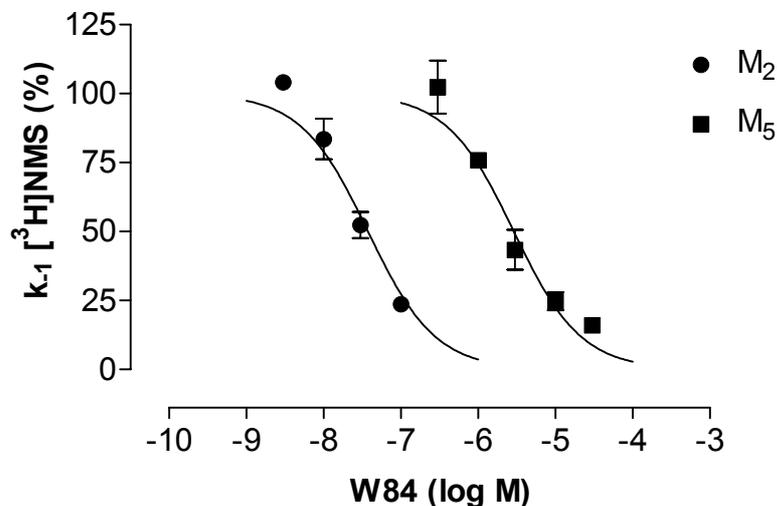


Abb. 6: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Verzögerung der [^3H]NMS-Dissoziation von M_2 - bzw. M_5 -Rezeptoren durch den Prototyp-Modulator W84. Ordinate: Geschwindigkeit der [^3H]NMS-Dissoziation dargestellt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} in Prozent des Kontrollwertes; Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten, wobei die Datenpunkte in den einzelnen Experimenten zweifach bestimmt wurden. Die oberen Kurvenplateau-Werte wurden auf 100% festgesetzt. Die unteren Plateau-Werte wurden auf 0% konstant gesetzt, da sie sich statistisch nicht signifikant von 0% unterscheiden. Die Kurvensteilheit zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied von $n_H = -1$ und wurde für die Kurvenanpassung auf diesen Wert festgesetzt (F-Test, $p \geq 0,05$).

Die Befunde der Untersuchungen zur M₂/M₅-Selektivität der allosterischen Modulatoren W84; CH₃,H,CH₃,H; H,H,CH₃,H und W84-Si₁/6 sind in der folgenden Tabelle (Tab. 20) zusammengefasst.

Modulator	M₂ pEC_{0,5,diss}	M₅ pEC_{0,5,diss}
W84	7,42 ± 0,07	5,54 ± 0,06
CH₃,H,CH₃,H	8,74 ± 0,08	6,03 ± 0,04 ^{a,*}
H,H,CH₃,H	8,16 ± 0,05*	5,46 ± 0,06 ^b
W84-Si₁/6	7,45 ± 0,09	5,78 ± 0,06 ^b

Tab. 20: Gegenüberstellung des verzögernden Einflusses der untersuchten allosterischen Modulatoren auf die [³H]NMS-Dissoziation an M₂- bzw. M₅-Rezeptoren, dargestellt in Form der pEC_{0,5,diss}-Werte. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler, basierend auf n = 3-4 unabhängigen Experimenten.

* Kurvensteilheit signifikant verschieden von n_H = -1 (F-Test, p < 0,05). Die ermittelten n_H-Werte sind in Kapitel 3.5.8 (Tab. 22 u. Tab. 23) aufgeführt.

^a Der Wert des unteren Kurvenplateaus unterscheidet sich statistisch signifikant von 0% (F-Test, p < 0,05), der untere Plateau-Wert beträgt 23,5 ± 2,5%.

^b Diese Daten wurden an M₅-Rezeptoren erhoben, die in stabil transfizierten CHO-Zellen exprimiert wurden. Nähere Informationen sind dem nachfolgenden Text zu entnehmen.

Die ersten Versuche im Rahmen der Mutagenese-Untersuchungen zur Epitop-Abhängigkeit der Kooperativität wurden mit Membransuspensionen aus CHO-Zellen (Chinese Hamster Ovary cells), die mit dem Gen des humanen Muskarinrezeptors vom Subtyp M₅ stabil transfiziert waren, durchgeführt. In nachfolgenden Untersuchungen an humanen M₂-Rezeptoren konnte belegt werden, dass die untersuchten allosterischen Modulatoren eine hohe Affinität zum M₂-Subtyp gegenüber einer deutlich niedrigeren Affinität zum M₅-Subtyp aufweisen. Diese Subtypselektivität der Verbindungen muss als Voraussetzung für die im Anschluss vorgesehene Untersuchung der Epitop-Abhängigkeit an M₂/M₅-chimären Rezeptoren gewährleistet sein. Mutagenese-Untersuchungen an chimären Rezeptoren stellen eine sinnvolle Methode dar, mit Hilfe derer die für die Subtypselektivität der untersuchten Modulatoren verantwortlichen subtyp-spezifischen Epitope identifiziert werden können. In den Experimenten an humanen M₂-Rezeptoren wurden Membransuspensionen aus transient mit dem

humanen M_2 -Rezeptor-Gen transfizierten COS 7-Zellen verwendet. Nach den ersten der Orientierung dienenden Untersuchungen an M_2 - und M_5 -Rezeptoren zur Überprüfung der Subtypselektivität wurde beschlossen, alle weiteren Versuche an transient in COS 7-Zellen exprimierten Wildtyp- oder mutierten Rezeptoren durchzuführen und somit die Methode von Buller et al. (2002) zu übernehmen. Humane Muskarinrezeptoren können zwar sowohl in transient transfizierten COS 7-Zellen als auch in stabil transfizierten CHO-Zellen exprimiert werden, jedoch können unterschiedliche Expressionssysteme verschiedene Glycosylierungsmuster der Rezeptoren bedingen. Da die Ergebnisse der im Folgenden beschriebenen Untersuchungen an Rezeptormutanten mit den an M_2 - und M_5 -Wildtyp-Rezeptoren erhobenen Befunden in Bezug gesetzt werden sollen, wurden die allosterischen Modulatoren W84 und CH_3, H, CH_3, H erneut an Membransuspensionen aus transient mit dem humanen M_5 -Rezeptor-Gen transfizierten COS 7-Zellen untersucht. Die folgende Abbildung (Abb. 7) zeigt beispielhaft die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Verzögerung der $[^3H]$ NMS-Dissoziation durch den Prototyp-Modulator W84 am humanen M_5 -Rezeptor, exprimiert in transient transfizierten COS 7-Zellen bzw. in stabil transfizierten CHO-Zellen.

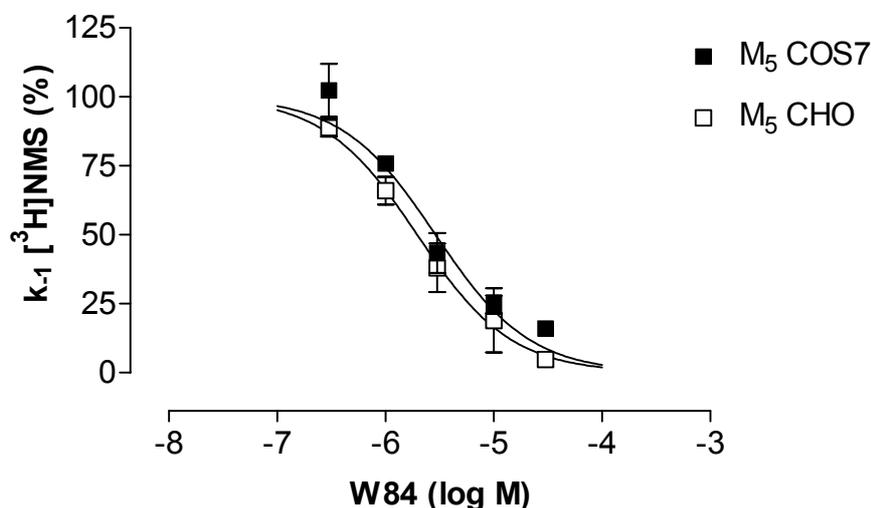


Abb. 7: Gegenüberstellung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den verzögernden Einfluss des allosterischen Modulators W84 auf die $[^3H]$ NMS-Dissoziation vom M_5 -Rezeptor, exprimiert in transient transfizierten COS 7-Zellen bzw. in stabil transfizierten CHO-Zellen. Ordinate: Geschwindigkeit der $[^3H]$ NMS-Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} in Prozent des Kontrollwertes; Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3–4 unabhängigen Experimenten, wobei die Datenpunkte in den einzelnen Experimenten doppelt bestimmt wurden. Die oberen Kurvenplateau-Werte

wurden auf 100% festgesetzt. Die unteren Plateau-Werte wurden auf 0% konstant gesetzt, da sie sich statistisch nicht signifikant von diesem Wert unterschieden. Die Kurvensteilheit zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied von $n_H = -1$ und wurde auf diesen Wert festgesetzt (F-Test, $p \geq 0,05$).

Der $pEC_{0,5,diss}$ -Wert der Konzentrations-Wirkungs-Kurve für die Verzögerung der [3H]NMS-Dissoziation durch W84 an M_5 -Rezeptoren, die in transient transfizierten COS 7-Zellen exprimiert wurden, liegt bei $5,54 \pm 0,06$ (Mittelwert \pm Standardfehler). Der entsprechende $pEC_{0,5,diss}$ -Wert, der an M_5 -Rezeptoren aus stabil transfizierten CHO-Zellen erhoben wurde, liegt bei $5,71 \pm 0,06$ (Mittelwert \pm Standardfehler). Der statistische Vergleich beider $pEC_{0,5,diss}$ -Werte ergibt keinen signifikanten Unterschied (t-Test, $p \geq 0,05$). Da der Vergleich der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die [3H]NMS-Dissoziationsverzögerung durch den allosterischen Modulator CH_3,H,CH_3,H an M_5 -Rezeptoren aus COS 7- bzw. aus CHO-Zellen ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied ergab (Daten nicht gezeigt), wurde auf die nachträgliche Untersuchung der Modulatoren H,H,CH_3,H und W84-Si_{1/6} an M_5 -Rezeptoren, die in transient transfizierten COS 7-Zellen exprimiert wurden, verzichtet. Infolgedessen sind in Tab. 20 für die Modulatoren H,H,CH_3,H und W84-Si_{1/6} die $pEC_{0,5,diss}$ -Werte aufgeführt, die in Experimenten an M_5 -Rezeptoren aus CHO-Zellen erhoben wurden, wohingegen alle übrigen aufgeführten $pEC_{0,5,diss}$ -Werte aus Untersuchungen an M_2 - bzw. M_5 -Rezeptoren aus transient transfizierten COS 7-Zellen resultieren.

3.5.2 Suche nach den für die M_2/M_5 -Selektivität essentiellen Epitopen durch Experimente an den M_2/M_5 -chimären Rezeptoren CR3, CR4 und CR6

Die allosterischen Modulatoren W84; CH_3,H,CH_3,H ; H,H,CH_3,H und W84-Si_{1/6} wurden an M_2/M_5 -chimären Rezeptoren mit breiter Sequenzsubstitution untersucht, um die für die M_2/M_5 -Selektivität des jeweiligen Modulators essentiellen Epitope zunächst grob einzugrenzen. In den untersuchten chimären Rezeptoren CR3, CR4 und CR6 wurden Teilsequenzen des M_5 -Wildtyp-Rezeptors durch die entsprechende Sequenz des M_2 -Wildtyp-Rezeptors ersetzt. In CR3 beginnt die in den M_5 -Rezeptor integrierte M_2 -Sequenz mit der zweiten extrazellulären Schleife und endet ungefähr in der Mitte der dritten intrazellulären Schleife. CR4 enthält in dem Bereich vom Anfang der transmembranalen Domäne 6 (TM6) bis zum Ende der dritten extrazellulären Schleife M_2 -Sequenz. Der Rezeptor CR6 besitzt ein Segment des M_2 -Wildtyp-Rezeptors vom Aminoterminus bis zur Mitte der zweiten transmembranalen Domäne (TM2) sowie ein

zweites M_2 -Segment, das am Anfang von TM6 beginnt und mit dem Carboxyterminus endet. Das M_2 -Segment in CR4 entspricht demzufolge dem carboxyterminalen M_2 -Segment in CR6 bis zum Ende der dritten extrazellulären Schleife. Die genannten chimären Rezeptoren sind in Abb. 8 stark vereinfacht schematisch dargestellt. Die den Piktogrammen folgende Abbildung (Abb. 9) zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Verzögerung der [3 H]NMS-Dissoziation von den Wildtyp-Rezeptoren M_2 und M_5 sowie den chimären Rezeptoren CR3, CR4 und CR6 in Anwesenheit der allosterischen Modulatoren W84; CH₃,H,CH₃,H; H,H,CH₃,H und W84-Si_{1/6}. Die Kenndaten der dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind in Tab. 22 und Tab. 23 in Kapitel 3.5.8 (s. S. 114 f.) zusammengefasst.

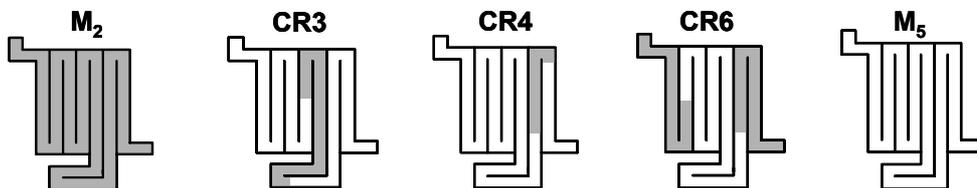


Abb. 8: Schematische Darstellung der Wildtyp-Rezeptoren M_2 und M_5 sowie der chimären Rezeptoren CR3, CR4 und CR6.

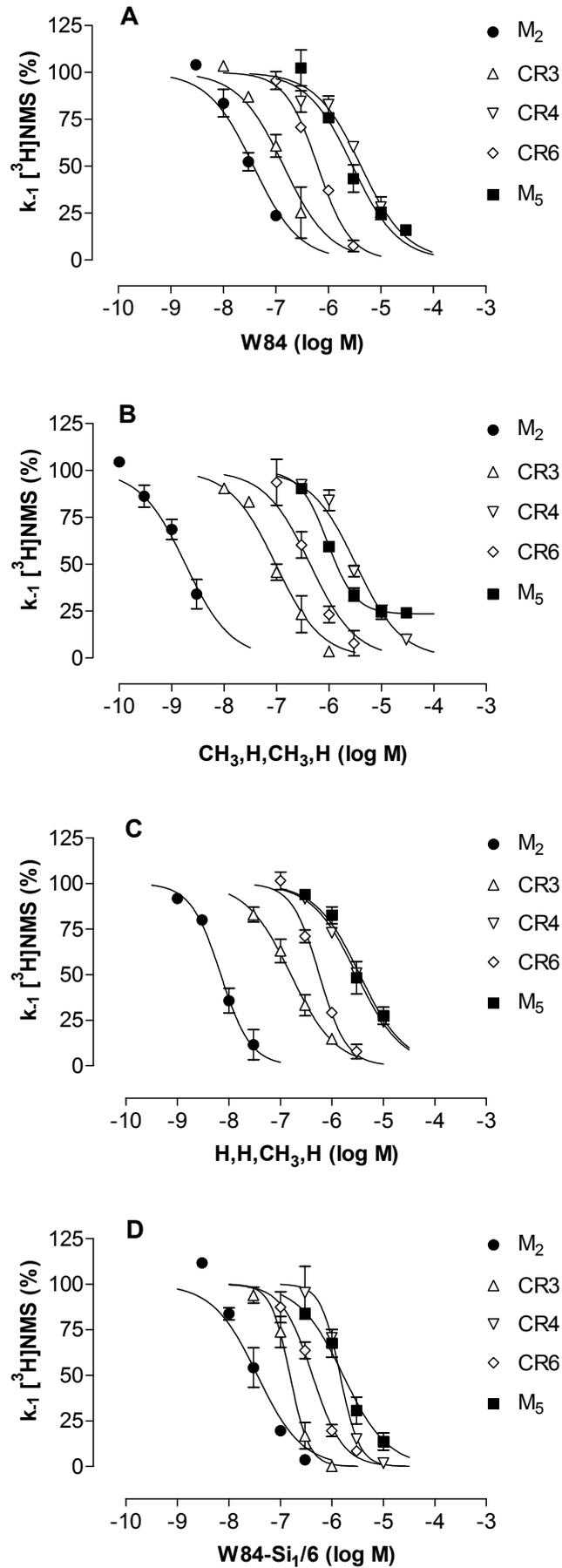


Abb. 9: Legende siehe nächste Seite

Legende zu Abb. 9: Effekt der allosterischen Modulatoren W84 (A), CH₃,H,CH₃,H (B), H,H,CH₃,H (C) und W84-Si_{1/6} (D) auf die Dissoziationskinetik von [³H]NMS gemessen an M₂- und M₅-Wildtyp-Rezeptoren sowie den chimären Rezeptoren CR3, CR4 und CR6. Die Wildtyp- und chimären Rezeptoren sind in der vorhergehenden Abbildung (Abb. 8) in Form von Piktogrammen schematisch dargestellt. Ordinate: Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} in Prozent des Kontrollwertes. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2–4 unabhängigen Experimenten, wobei die Datenpunkte in den einzelnen Experimenten zweifach bestimmt wurden. Die oberen Kurvenplateau-Werte wurden auf 100% festgesetzt. Die unteren Plateau-Werte wurden auf 0% konstant gesetzt, wenn sie sich im F-Test nicht statistisch signifikant von diesem Wert unterscheiden ($p \geq 0,05$). Außerdem wurde die Kurvensteilheit auf $n_H = -1$ festgesetzt, wenn sie keinen signifikanten Unterschied von diesem Wert zeigte (F-Test, $p \geq 0,05$). Kenndaten der Konzentrations-Wirkungs-Kurven, deren unterer Plateau-Wert von 0% abweicht bzw. deren Kurvensteilheit sich signifikant von $n_H = -1$ unterscheidet, können Tab. 22 und Tab. 23 sowie den zugehörigen Legenden in Kapitel 3.5.8 entnommen werden.

Die in Abb. 9 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven zeigen, dass die untersuchten allosterischen Modulatoren W84, CH₃,H,CH₃,H, H,H,CH₃,H und W84-Si_{1/6} jeweils eine gegenüber dem M₅-Rezeptor deutlich gesteigerte Affinität zum chimären Rezeptor CR3 aufweisen. Die Affinität der genannten Modulatoren zum chimären Rezeptor CR6 ist gegenüber der Affinität zu M₅ ebenfalls erhöht, jedoch ist die bei CR6 zu beobachtende Affinitätssteigerung wesentlich geringer als bei CR3. Interessanterweise zeigt keiner der Modulatoren eine im Vergleich zu M₅ gesteigerte Affinität zu dem chimären Rezeptor CR4. Demzufolge führt das in CR4 eingebrachte M₂-Segment vom Beginn von TM6 bis zum Ende der dritten extrazellulären Schleife nicht zu einem Affinitätsgewinn im Vergleich zu M₅.

Da das M₂-Segment in CR4 dem carboxyterminalen M₂-Segment in CR6 bis zum Ende der dritten extrazellulären Schleife entspricht, konnte ausgeschlossen werden, dass dieses M₂-Segment an der bei CR6 beobachteten Affinitätssteigerung gegenüber M₅ beteiligt ist. Daher musste das für die gesteigerte Affinität der allosterischen Modulatoren zum chimären Rezeptor CR6 verantwortliche Epitop entweder in dessen M₂-Sequenz vom Aminoterminal bis zur Mitte der zweiten transmembranalen Domäne (TM2) oder in dem Abschnitt des carboxyterminalen M₂-Segmentes, der die transmembranale Domäne 7 (TM7) und den Carboxyterminus enthält, liegen. Das für die Affinitätssteigerung des Prototyp-Modulators W84 zu CR6 gegenüber M₅ verantwortliche Epitop in dem chimären Rezeptor wurde bereits von Buller et al. (2002)

identifiziert. Es handelt sich um die Aminosäure M₂⁴²³Threonin, die am Beginn von TM7 liegt und für den mit CR6 beobachteten Affinitätsgewinn gegenüber M₅ ausschlaggebend ist. Diesen Befund erhob Buller für allosterische Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ sowie aus der Reihe der Caracurin V-Derivate.

In den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten mit dem Prototyp-Modulator W84 konnten die von Buller et al. (2002) für diese Verbindung erhobenen Befunde reproduziert werden. Die in Abb. 9 dargestellten Befunde deuteten daraufhin, dass in dem chimären Rezeptor CR3, bei dem für die untersuchten allosterischen Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ verglichen mit CR6 eine deutlich ausgeprägtere Affinitätszunahme gegenüber M₅ beobachtet wurde, ein zweites für die M₂/M₅-Selektivität der Modulatoren essentielles Epitop zu finden sein sollte. In Anbetracht des in den chimären Rezeptor CR3 integrierten M₂-Segmentes, das die zweite extrazelluläre Schleife bis zur Mitte der dritten intrazellulären Schleife umfasst, wurde die Vermutung aufgestellt, dass das für die Subtyp-Selektivität verantwortliche Epitop im Bereich der zweiten extrazellulären Schleife zu finden ist. Aufbauend auf diesen Ergebnissen sollte in den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit das zweite für die M₂/M₅-Selektivität essentielle Epitop in CR3 identifiziert werden.

Wie aus Abb. 9 hervorgeht, zeigen die in Hinsicht auf ihr unterschiedliches Kooperativitätsverhalten ausgewählten allosterischen Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ ein einheitliches Muster der an CR3 und CR6 zu beobachtenden Affinitätszunahme gegenüber dem Wildtyp-Rezeptor M₅. Da die beiden methylierten W84-Derivate CH₃,H,CH₃,H und H,H,CH₃,H in den Untersuchungen an den chimären Rezeptoren ein vergleichbares, W84-artiges Bindungsverhalten zeigten, sollten die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen mit dem Prototyp-Modulator W84 und der Verbindung CH₃,H,CH₃,H als Vertreter der Methyl-substituierten Modulatoren durchgeführt werden. Die Untersuchung des Modulators H,H,CH₃,H wurde nicht fortgeführt.

Das Silicium-haltige W84-Derivat W84-Si₁/6 weist verglichen mit den Alkan-bisammonium-Verbindungen ein ähnliches Affinitätsmuster bezüglich der untersuchten Wildtyp- und chimären Rezeptoren auf. Allerdings zeigen die Konzentrations-Wirkungskurven dieser Verbindung an den chimären Rezeptoren CR3, CR4 und CR6 Steigungsmaße, die sich signifikant von n_H = -1 unterscheiden (F-Test, p < 0,05). Das ebenfalls von Duda-Johner (2002) sowie Tabeteh Frunjang (2002) beobachtete

atypische Verhalten von W84-Si₁/6 deutet auf ein komplexeres Bindungsverhalten hin, dessen nähere Untersuchung den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde. Deshalb wurde die Untersuchung dieser Substanz ebenfalls nicht weiterverfolgt.

3.5.3 Eingrenzung des für die M₂/M₅-Selektivität essentiellen Epitops in der zweiten extrazellulären Schleife

Das in der zweiten extrazellulären Schleife des M₂-Rezeptors vermutete Epitop, welches neben der Aminosäure M₂⁴²³Threonin für die M₂/M₅-Selektivität der allosterischen Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ verantwortlich zu sein schien, sollte im Folgenden näher eingegrenzt werden.

Buller (2002) führte erste Untersuchungen zur Identifizierung des für die Subtyp-Selektivität essentiellen Epitops in dem chimären Rezeptor CR3 durch. Hierzu wurde der Bereich der zweiten extrazellulären Schleife, in dem das entsprechende Epitop vermutet wurde, in die drei Sequenzabschnitte A, B und C unterteilt. Die Einteilung der zweiten extrazellulären Schleife des M₂-Rezeptors in die genannten Abschnitte ist in der folgenden Abbildung (s. Abb. 10) nach Buller (2002) schematisch wiedergegeben.

durch die korrespondierenden M_5 -Sequenzen ersetzt wurden, tragen die Bezeichnungen $M_2(„A“M_5)$, $M_2(„B“M_5)$ bzw. $M_2(„C“M_5)$. Die Benennung der chimären Rezeptoren, bei denen im M_5 -Wildtyp-Rezeptor die Sequenzabschnitte A,B bzw. C durch die korrespondierenden M_2 -Sequenzen substituiert wurden, lautet dementsprechend $M_5(„A“M_2)$, $M_5(„B“M_2)$ bzw. $M_5(„C“M_2)$. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Substanzen W84 und CH_3,H,CH_3,H an den beschriebenen Rezeptormutanten mit chimärer Sequenzsubstitution in der zweiten extrazellulären Schleife untersucht. Die Befunde dieser Untersuchungen werden in den folgenden Abschnitten 3.5.3.1 und 3.5.3.2 beschrieben.

3.5.3.1 Untersuchungen an M_2 -Rezeptoren mit chimärer Sequenzsubstitution in der zweiten extrazellulären Schleife

Zunächst wurde der Einfluss der chimären Substitution der Abschnitte A, B und C des M_2 -Wildtyp-Rezeptors durch die jeweils korrespondierende M_5 -Sequenz auf die Affinität der allosterischen Modulatoren W84 und CH_3,H,CH_3,H zu [3H]NMS-besetzten Rezeptoren untersucht. Die folgende Abbildung (Abb. 11) gibt die chimären Rezeptoren $M_2(„A“M_5)$, $M_2(„B“M_5)$ und $M_2(„C“M_5)$ in Form von Piktogrammen schematisch wieder und zeigt die an den Rezeptormutanten ermittelten Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die untersuchten Modulatoren.

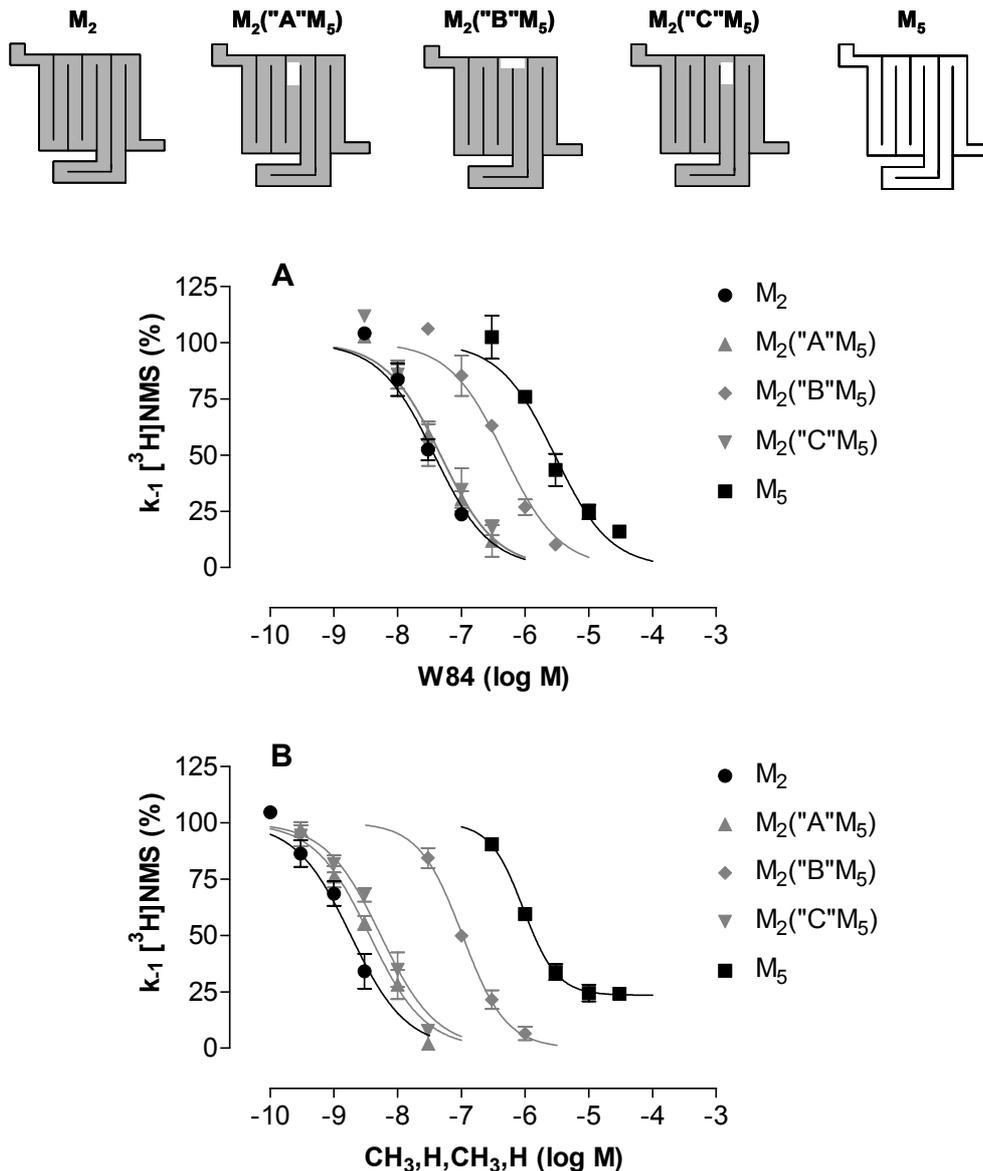


Abb. 11: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den verzögernden Einfluss der allosterischen Modulatoren W84 (A) bzw. $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ (B) auf die $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation von den Wildtyp-Rezeptoren M_2 und M_5 sowie von den chimären Rezeptoren mit Sequenzsubstitution in der zweiten extrazellulären Schleife des M_2 -Rezeptors. Die chimären Rezeptoren sind im oberen Teil der Abbildung stark vereinfacht schematisch dargestellt. Die genauen Aminosäuresequenzen der Abschnitte A, B und C der zweiten extrazellulären Schleife des M_2 -Rezeptor sind Abb. 10 und der zugehörigen Legende zu entnehmen. Ordinate: Geschwindigkeit der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} in Prozent des Kontrollwertes. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten, wobei die Datenpunkte in den einzelnen Experimenten zweifach bestimmt wurden. Die oberen Kurvenplateau-Werte wurden auf 100% festgesetzt. Die unteren Plateau-Werte wurden auf 0% konstant gesetzt, wenn sie sich im F-Test nicht statistisch signifikant von diesem Wert unterschieden ($p \geq 0,05$). Außerdem wurde die Kurvensteilheit auf $n_H = -1$ festgesetzt, wenn sie keinen signifikanten Unterschied von diesem Wert zeigte (F-Test, $p \geq 0,05$). Die Kenndaten der dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind in Tab. 22 (s. 3.5.8) zusammengefasst.

Die chimären Sequenzsubstitutionen der Abschnitte A bzw. C des M_2 -Rezeptors durch die jeweils korrespondierende Sequenz des M_5 -Rezeptors zeigen keinen deutlichen Einfluss auf die Affinität der untersuchten Modulatoren W84 und CH_3,H,CH_3,H zum [3H]NMS-besetzten Rezeptor. Daraus wurde geschlossen, dass die Abschnitte A und C der zweiten extrazellulären Schleife keine Bedeutung in Hinsicht auf die beobachtete M_2/M_5 -Selektivität der Modulatoren haben. Aus der chimären Substitution des Abschnittes B im M_2 -Rezeptor durch die korrespondierende M_5 -Sequenz resultiert hingegen eine starke Abnahme der Affinität von W84 sowie CH_3,H,CH_3,H zu dem chimären Rezeptor $M_2(„B“M_5)$ verglichen mit dem M_2 -Rezeptor. Da neben dem in der zweiten extrazellulären Schleife vermuteten Epitop auch die bereits von Buller et al. (2002) identifizierte Aminosäure M_2^{423} Threonin für die M_2/M_5 -Selektivität der untersuchten Modulatoren verantwortlich ist, fällt die Affinität der Modulatoren bei Verlust des erstgenannten Epitopes nicht auf das M_5 -Niveau zurück. Die Aminosäure M_2^{423} Threonin am Anfang von TM7 ist in dem chimären Rezeptor $M_2(„B“M_5)$ enthalten, so dass in diesem Rezeptor nur eines der beiden für die M_2/M_5 -Selektivität essentiellen Epitope fehlt.

Aufgrund dieser Befunde wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Abschnitt B in der zweiten extrazellulären Schleife des M_2 -Rezeptors den Bereich darstellt, der für die an dem chimären Rezeptor CR3 beobachtete Affinitätszunahme der Modulatoren gegenüber M_5 verantwortlich ist. Die Annahme sollte mit Hilfe der im Folgenden beschriebenen Untersuchungen an den chimären Rezeptoren mit inverser Mutation im M_5 -Rezeptor geprüft werden.

3.5.3.2 Untersuchungen an M_5 -Rezeptoren mit chimärer Sequenzsubstitution in der zweiten extrazellulären Schleife

Die allosterischen Modulatoren W84 und CH_3,H,CH_3,H wurden in Dissoziationsexperimenten an den chimären Rezeptoren $M_5(„A“M_2)$, $M_5(„B“M_2)$ sowie $M_5(„C“M_2)$ untersucht. Diese Rezeptormutanten zeichnen sich durch die reziproke chimäre Substitution der Abschnitte A, B bzw. C in der zweiten extrazellulären Schleife des M_5 -Rezeptors durch die korrespondierenden M_2 -Sequenzen aus. In Abb. 12 sind die Piktogramme der chimären Rezeptoren sowie die Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den allosterischen Effekt der untersuchten Modulatoren auf die Dissoziation von [3H]NMS von den Rezeptormutanten $M_5(„A“M_2)$, $M_5(„B“M_2)$ und $M_5(„C“M_2)$ dargestellt.

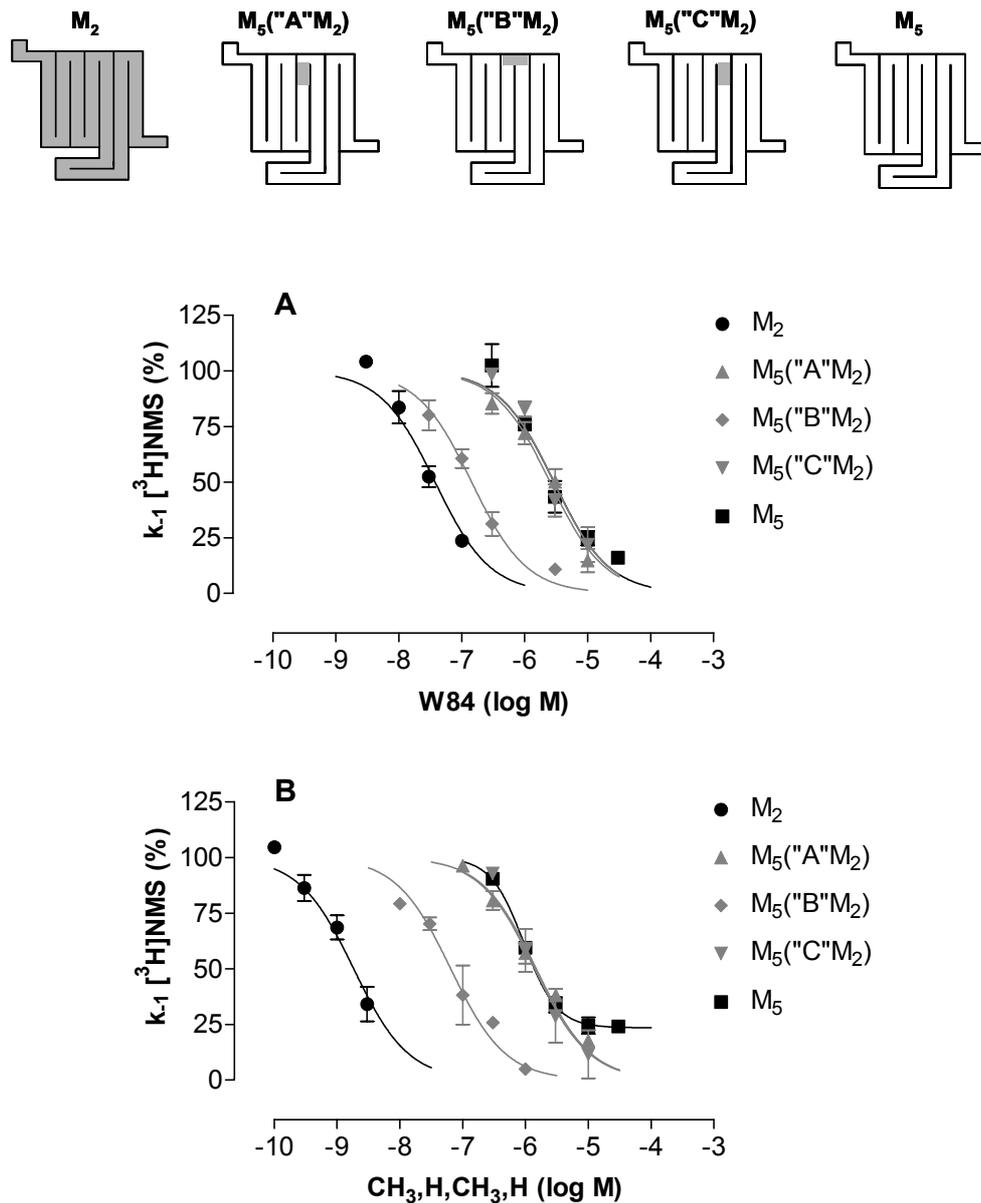


Abb. 12: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den allosterischen Effekt der Modulatoren W84 (A) bzw. CH_3,H,CH_3,H (B) auf die $[^3H]NMS$ -Dissoziation von den Wildtyp-Rezeptoren M_2 und M_5 sowie von den chimären Rezeptoren mit Sequenzsubstitution in der zweiten extrazellulären Schleife des M_5 -Rezeptors. Die chimären Rezeptoren sind im oberen Teil der Abbildung stark vereinfacht schematisch dargestellt. Die durch korrespondierende M_2 -Sequenzen chimär substituierten Abschnitte A, B und C der zweiten extrazellulären Schleife des M_5 -Rezeptors umfassen folgende Aminosäuresequenzen: Abschnitt A: $M_5^{168-175}$, Abschnitt B: $M_5^{179-184}$ und Abschnitt C: $M_5^{188-193}$. Ordinate: Geschwindigkeit der $[^3H]NMS$ -Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} in Prozent des Kontrollwertes. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten, wobei die Datenpunkte in den einzelnen Experimenten doppelt bestimmt wurden. Die oberen Kurvenplateau-Werte wurden auf 100% festgesetzt. Die unteren Plateau-Werte wurden auf 0% konstant gesetzt, wenn sie sich im F-Test nicht statistisch signifikant von diesem Wert unterschieden ($p \geq 0,05$). Ferner wurde die Kurvensteilheit auf $n_H = -1$ festgesetzt, wenn sie keinen signifikanten Unterschied von diesem Wert zeigte

(F-Test, $p \geq 0,05$). Die Kenndaten der dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind in Tab. 22 (s. 3.5.8) zusammengefasst.

Die Modulatoren W84 und CH₃,H,CH₃,H zeigen verglichen mit dem M₅-Wildtyp-Rezeptor keine Affinitätszunahme gegenüber den Rezeptormutanten M₅(„A“M₂) und M₅(„C“M₂). Ausschließlich aus der chimären Substitution des Abschnittes B im M₅-Rezeptor durch die korrespondierende M₂-Sequenz resultiert ein deutlicher Effekt: Zu dem chimären Rezeptor M₅(„B“M₂) zeigen die untersuchten Modulatoren eine erhebliche Zunahme der Affinität verglichen mit dem M₅-Rezeptor. Die Untersuchung der allosterischen Modulatoren an den chimären Rezeptoren mit Sequenzsubstitution im M₅-Rezeptor ergeben somit verglichen mit den Experimenten an den entsprechenden Rezeptormutanten mit Sequenzsubstitution im M₂-Rezeptor (s. 3.5.3.1) reziproke Befunde.

Basierend auf den beschriebenen Befunden wurde die im vorangegangenen Abschnitt aufgestellte Hypothese bestätigt: Der Abschnitt B in der zweiten extrazellulären Schleife des M₂-Rezeptors stellt den Bereich dar, der für die an dem chimären Rezeptor CR3 beobachtete Affinitätszunahme der Modulatoren W84 und CH₃,H,CH₃,H gegenüber M₅ verantwortlich ist. Der Vergleich der für die genannten Modulatoren in Tab. 22 aufgeführten EC_{0,5,diss}-Werte aus Untersuchungen an dem chimären Rezeptor CR3 mit den entsprechenden an dem chimären Rezeptor M₅(„B“M₂) erhobenen EC_{0,5,diss}-Werten belegt diesen Zusammenhang eindeutig.

Das zweite, neben der Aminosäure M₂⁴²³Threonin für die M₂/M₅-Selektivität essentielle Epitop konnte auf den aus sechs Aminosäuren bestehenden Sequenzabschnitt B (Glu-Asp-Gly-Glu-Cys-Tyr) in der zweiten extrazellulären Schleife des M₂-Rezeptors eingegrenzt werden.

3.5.4 Identifizierung der für die M₂/M₅-Selektivität essentiellen Aminosäure in der zweiten extrazellulären Schleife

3.5.4.1 Untersuchungen an punktmutierten M₂-Rezeptoren

Nachdem die Bedeutung des Sequenzabschnittes B in der zweiten extrazellulären Schleife des M₂-Rezeptors für die M₂/M₅-Selektivität der untersuchten Modulatoren erkannt worden war, galt es nun, innerhalb dieses Abschnittes eine oder mehrere Aminosäuren zu identifizieren, denen der Affinitätsgewinn der allosterischen Modulatoren an dem chimären Rezeptor M₅(„B“M₂) gegenüber M₅ zuzuschreiben ist. Zur Untersuchung des Einflusses einzelner Aminosäuren wurden punktmutierte Muskarinrezeptoren entwickelt, in denen jeweils eine Aminosäure des Sequenzabschnittes B des M₂-Rezeptors substituiert wurde. Folgende M₂-Punktmutanten wurden hergestellt: M₂¹⁷²Glu→Ala, M₂¹⁷³Asp→Leu, M₂¹⁷⁵Glu→Ala sowie M₂¹⁷⁷Tyr→Gln. Die Aminosäuren M₂¹⁷³Aspartat und M₂¹⁷⁷Tyrosin wurden durch die korrespondierende M₅-Aminosäure Leucin bzw. Glutamin ersetzt. Zu M₂¹⁷²Glutamat korrespondiert im M₅-Rezeptor die Aminosäure Prolin. Da bekannt ist, dass Prolin als sogenannter „Strukturbrecher“ die Konformation eines Peptidstranges deutlich verändert (MacArthur and Thornton, 1991), wurde M₂¹⁷²Glutamat durch die Aminosäure Alanin ersetzt. Von einer Substitution der Aminosäure M₂¹⁷⁴Glycin wurde abgesehen, da von einer neutralen Aminosäure kein Beitrag zur Affinität der allosterischen Modulatoren erwartet wurde. Obwohl M₂¹⁷⁵Glutamat eine zwischen M₂ und M₅ konservierte Aminosäure darstellt, wurde sie gegen Alanin ausgetauscht. Mit dieser Punktmutante sollte geprüft werden, ob M₂¹⁷⁵Glutamat als eine der drei negativ geladenen Aminosäuren der von Leppik et al. (1994) beschriebenen EDGE-Region zu der Affinität allosterischer Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ beiträgt. Die ebenfalls zwischen M₂ und M₅ konservierte Aminosäure M₂¹⁷⁶Cystein wurde hingegen nicht substituiert. Die folgende Abbildung (Abb. 13) zeigt die Befunde der Untersuchungen der Modulatoren W84 und CH₃,H,CH₃,H an den beschriebenen punktmutierten Rezeptoren.

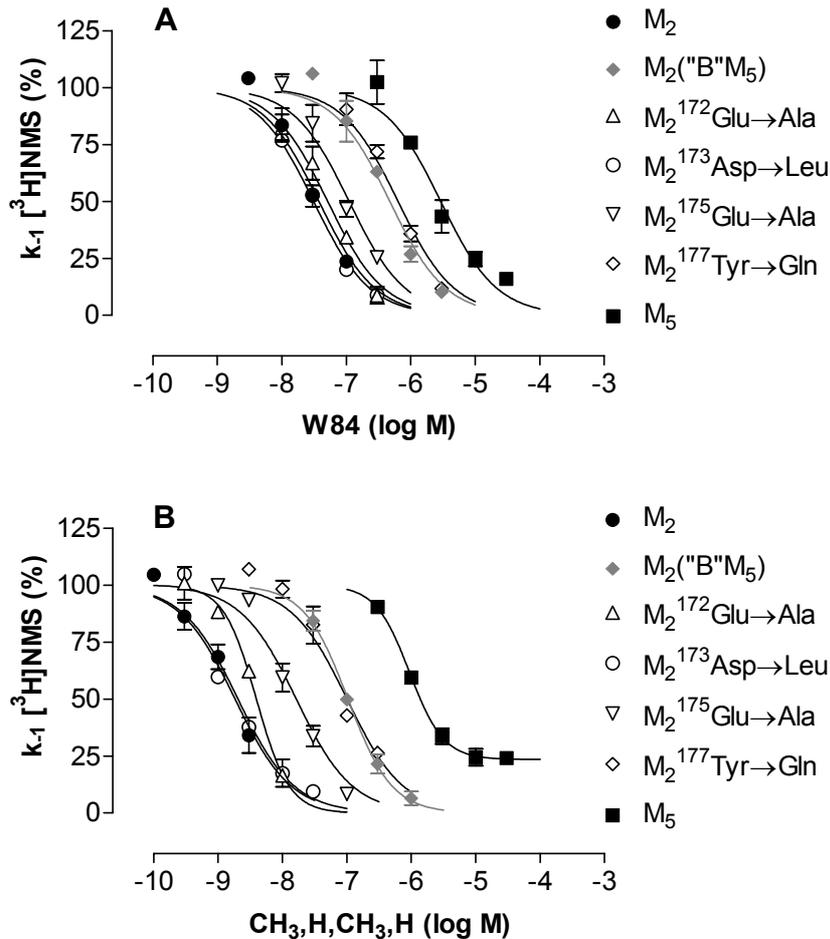


Abb. 13: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den allosterischen Effekt der Modulatoren W84 (A) bzw. $\text{CH}_3,\text{H},\text{CH}_3,\text{H}$ (B) auf die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation von den Wildtyp-Rezeptoren M_2 und M_5 , von dem chimären Rezeptor $M_2("B"M_5)$ sowie den punktmutierten Rezeptoren $M_2^{172}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$, $M_2^{173}\text{Asp} \rightarrow \text{Leu}$, $M_2^{175}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$ und $M_2^{177}\text{Tyr} \rightarrow \text{Gln}$. Ordinate: Geschwindigkeit der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} in Prozent des Kontrollwertes. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten; die Datenpunkte wurden in den Einzelexperimenten doppelt bestimmt. Die oberen Kurvenplateau-Werte wurden auf 100% festgesetzt. Die unteren Plateau-Werte wurden auf 0% konstant gesetzt, wenn sie sich im F-Test nicht statistisch signifikant von diesem Wert unterschieden ($p \geq 0,05$). Die Kurvensteilheit wurde auf $n_H = -1$ festgesetzt, wenn sie keinen signifikanten Unterschied von diesem Wert zeigte (F-Test, $p \geq 0,05$). Die Kenndaten der gezeigten Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind in Tab. 22 (s. 3.5.8) zusammengefasst.

Weder die Substitution von M_2^{172} Glutamat durch Alanin noch der Austausch von M_2^{173} Aspartat gegen Leucin führte zu einem signifikanten Affinitätsverlust der Modulatoren W84 bzw. $\text{CH}_3,\text{H},\text{CH}_3,\text{H}$ verglichen mit ihrer jeweiligen Affinität zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor. W84 zeigte eine geringfügig verminderte Affinität zu der

Punktmutante $M_2^{175}\text{Glu}\rightarrow\text{Ala}$, woraus auf einen Beitrag der Aminosäure $M_2^{175}\text{Glutamat}$ zur Affinität von W84 zum M_2 -Rezeptor geschlossen wurde. Experimente mit dem Modulator $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ bestätigten diesen Befund, wobei der Affinitätsverlust von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ an der Rezeptormutante $M_2^{175}\text{Glu}\rightarrow\text{Ala}$ verglichen mit der entsprechenden Affinitätsabnahme von W84 an dieser Punktmutante stärker ausfiel. Da $M_2^{175}\text{Glutamat}$ allerdings wie bereits erwähnt zwischen M_2 und M_5 konserviert ist, stellt diese Aminosäure kein für die M_2/M_5 -Selektivität der Modulatoren essentielles Epitop dar. Der bei Austausch dieser Aminosäure beobachtete Affinitätsverlust der allosterischen Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ deutet jedoch daraufhin, dass es sich um ein für deren Basisaffinität zu Muskarinrezeptoren essentielles Epitop handeln könnte. Tatsächlich ist die Affinität von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ am M_5 -Wildtyp-Rezeptor auch höher als die Affinität von W84 an dem entsprechenden Rezeptor.

Die Substitution der Aminosäure $M_2^{177}\text{Tyrosin}$ durch Glutamin resultierte in einer starken Verminderung der Affinität der Modulatoren W84 und $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ zu dem punktmultierten Rezeptor $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ gegenüber M_2 . Wie Abb. 13 veranschaulicht, ist der Affinitätsverlust beider Modulatoren an der Rezeptormutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ identisch mit der in Untersuchungen der entsprechenden Modulatoren an dem chimären Rezeptor $M_2(„B“M_5)$ beobachteten Abnahme der Affinität. Die Aminosäure $M_2^{177}\text{Tyrosin}$ konnte als das zweite, neben der Aminosäure $M_2^{423}\text{Threonin}$ für die M_2/M_5 -Selektivität essentielle Epitop in der zweiten extrazellulären Schleife des M_2 -Rezeptors identifiziert werden.

3.5.4.2 Untersuchungen am punktmultierten M_5 -Rezeptor

Durch Austausch der Aminosäure $M_5^{184}\text{Glutamin}$ im M_5 -Wildtyp-Rezeptor gegen die korrespondierende M_2 -Aminosäure Tyrosin wurde die inverse Rezeptormutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}$ hergestellt. Anhand der inversen Mutation sollte geprüft werden, ob die allosterischen Modulatoren W84 und $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ an dem punktmultierten Rezeptor $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}$ eine reziproke Affinitätsverschiebung im Sinne einer deutlichen Steigerung ihrer Affinität zu diesem Rezeptor verglichen mit M_5 zeigen würden. Die folgende Abbildung (Abb. 14) gibt die Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus den Untersuchungen der Modulatoren W84 und $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ an dem beschriebenen punktmultierten Rezeptor wieder.

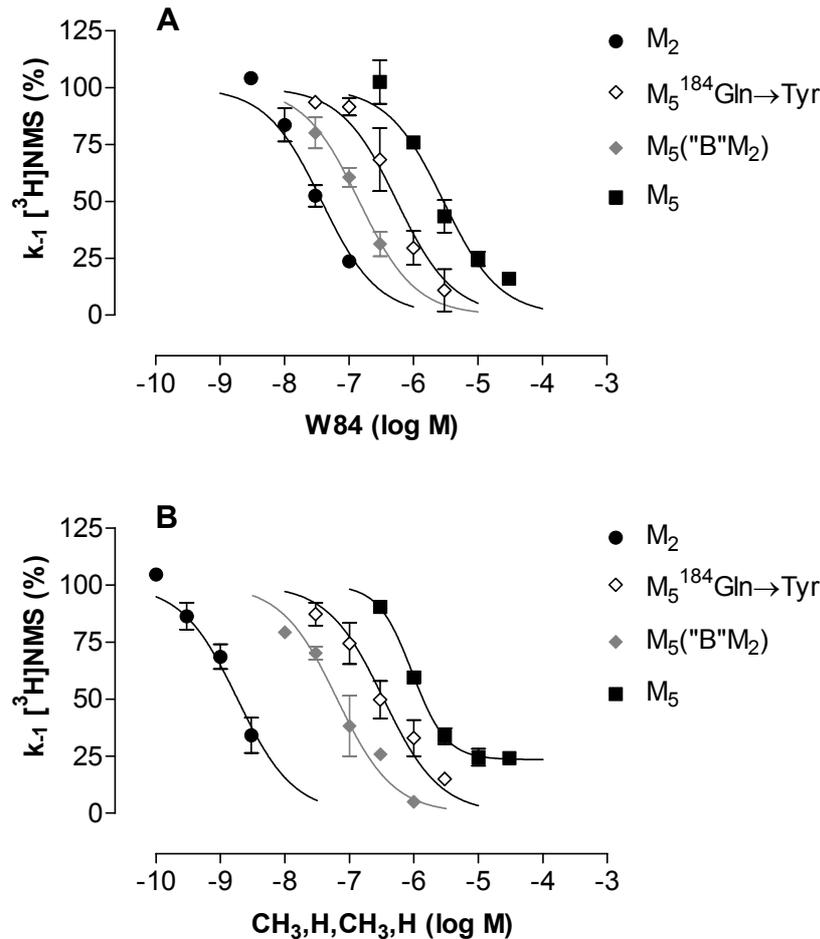


Abb. 14: Effekt der allosterischen Modulatoren W84 (A) und CH₃,H,CH₃,H (B) auf die Dissoziationskinetik von [³H]NMS an den Wildtyp-Rezeptoren M₂ und M₅, an dem chimären Rezeptor M₅(„B“M₂) sowie dem punktmutierten Rezeptor M₅¹⁸⁴Gln→Tyr. Ordinate: Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k₋₁ in Prozent des Kontrollwertes. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten; die Datenpunkte wurden in den Einzelexperimenten doppelt bestimmt. Die oberen Kurvenplateau-Werte wurden auf 100% festgesetzt. Die unteren Plateau-Werte wurden auf 0% konstant gesetzt, wenn sie sich im F-Test nicht statistisch signifikant von diesem Wert unterschieden (p ≥ 0,05). Die Kurvensteilheit wurde auf n_H = -1 festgesetzt, wenn sie keinen signifikanten Unterschied von diesem Wert zeigte (F-Test, p ≥ 0,05). Die Kenndaten der gezeigten Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind in Tab. 22 (s. 3.5.8) zusammengefasst.

Die Affinität der allosterischen Modulatoren W84 und CH₃,H,CH₃,H wurde durch den reziproken Austausch der Aminosäure M₅¹⁸⁴Glutamin gegen die korrespondierende M₂-Aminosäure Tyrosin im Vergleich zum M₅-Wildtyp-Rezeptor eindeutig gesteigert. Die in Abb. 14 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven demonstrieren allerdings, dass die genannten Verbindungen in Untersuchungen an dem punktmutierten Rezeptor

$M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}$ nicht das Affinitätsniveau des chimären Rezeptors $M_5(„B“M_2)$ erreichen. Durch die in Kapitel 3.5.4.1 beschriebenen Befunde konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass die Aminosäure $M_2^{177}\text{Tyrosin}$ das für die M_2/M_5 -Selektivität essentielle Epitop im Sequenzabschnitt B der zweiten extrazellulären Schleife des M_2 -Rezeptors darstellt. Dementsprechend wurde die Affinität der Modulatoren in Untersuchungen an dem punktmutierten Rezeptor $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ bis auf das für den chimären Rezeptor $M_2(„B“M_5)$ gefundene Affinitätsniveau abgesenkt. Obwohl an der inversen Punktmutation $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}$ nicht die reziproke Affinitätszunahme bis auf das Niveau der chimären Rezeptormutante $M_5(„B“M_2)$ beobachtet werden konnte, wurde die beschriebene Bedeutung der Aminosäure $M_2^{177}\text{Tyrosin}$ nicht angezweifelt. Auf diesen Aspekt soll in der Diskussion dieser Arbeit näher eingegangen werden (s. 4.3.2, S. 127 f).

3.5.5 Untersuchung der M_2 -Doppelmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ sowie der M_5 -Doppelmutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr} + ^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$

Die Fragestellung, ob die beiden Epitope, die bereits von Buller et al. (2002) identifizierte Aminosäure $M_2^{423}\text{Threonin}$ am Anfang von TM7 sowie die im Rahmen dieser Arbeit gefundene Aminosäure $M_2^{177}\text{Tyrosin}$ in der zweiten extrazellulären Schleife des M_2 -Rezeptors, die M_2/M_5 -Selektivität der untersuchten allosterischen Modulatoren vollständig erklären, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden. Hierzu wurden Rezeptoren mit zweifacher Punktmutation entwickelt. Die M_2 -Doppelmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ ermöglicht Experimente an einem M_2 -Rezeptor, in dem beide für die M_2/M_5 -Selektivität essentiellen Epitope des M_2 -Rezeptors, $M_2^{177}\text{Tyrosin}$ und $M_2^{423}\text{Threonin}$, durch die korrespondierenden M_5 -Aminosäuren, Glutamin bzw. Histidin, ersetzt wurden. Die M_5 -Doppelmutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr} + ^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$ stellt die inverse Mutation dar, in der die entsprechenden Aminosäuren des M_5 -Rezeptors, $M_5^{184}\text{Glutamin}$ und $M_5^{478}\text{Histidin}$, gegen die korrespondierenden Aminosäuren des M_2 -Rezeptors, Tyrosin bzw. Threonin, ausgetauscht wurden. Durch Untersuchungen an der inversen Doppelmutante soll gezeigt werden, ob durch Einbringen der essentiellen Epitope des M_2 -Rezeptors in den M_5 -Rezeptor reziproke Effekte bezüglich der an der M_2 -Doppelmutante erhobenen Befunde beobachtet werden können.

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 15) zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurven, die aus Untersuchungen der Modulatoren W84 und CH₃,H,CH₃,H an der M₂-Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His sowie an den einfach punktmultierten Rezeptoren M₂¹⁷⁷Tyr→Gln bzw. M₂⁴²³Thr→His resultieren.

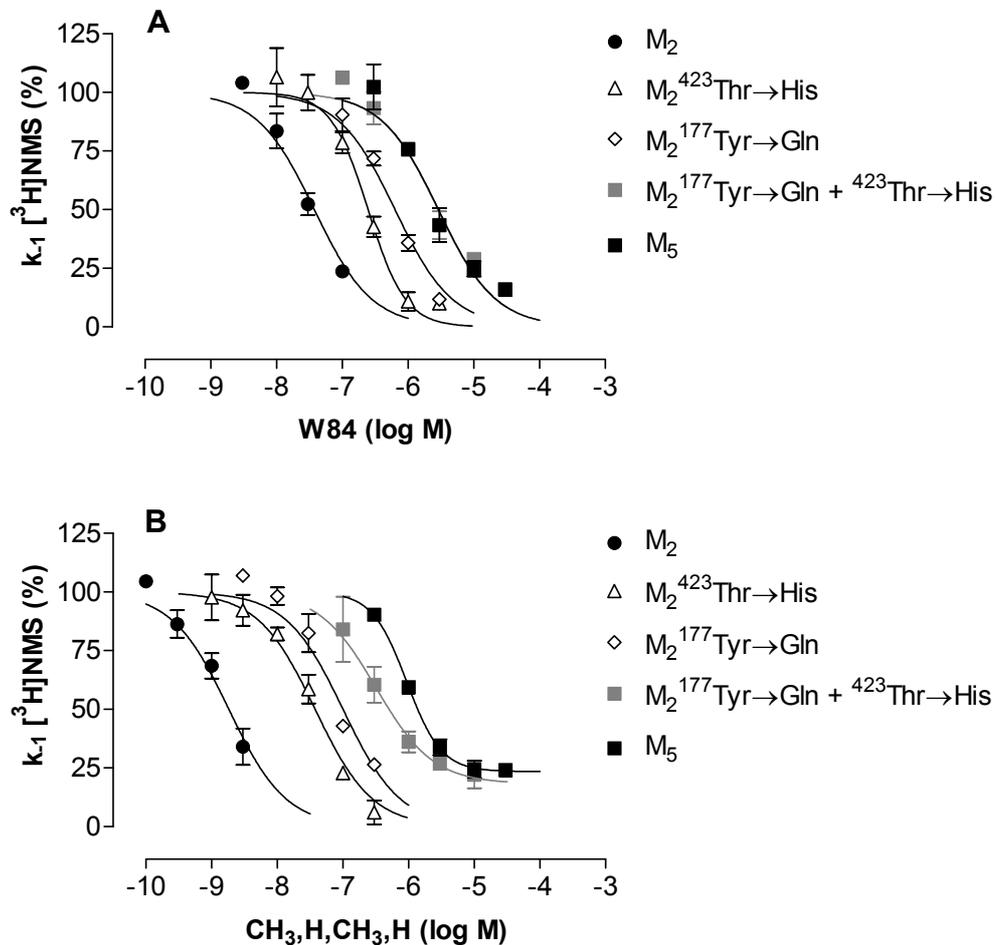


Abb. 15: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den verzögernden Einfluss der allosterischen Modulatoren W84 (A) bzw. CH₃,H,CH₃,H (B) auf die [³H]NMS-Dissoziation von den Wildtyp-Rezeptoren M₂ und M₅, von den einfach punktmultierten Rezeptoren M₂¹⁷⁷Tyr→Gln und M₂⁴²³Thr→His sowie der M₂-Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His. Ordinate: Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k₁ in Prozent des Kontrollwertes. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten bei zweifacher Bestimmung der einzelnen Datenpunkte. Die oberen Kurvenplateau-Werte wurden auf 100% festgesetzt. Die unteren Plateau-Werte wurden auf 0% konstant gesetzt, wenn sie sich im F-Test nicht statistisch signifikant von diesem Wert unterschieden ($p \geq 0,05$). Die Kurvensteilheit wurde auf $n_H = -1$ festgesetzt, wenn sie keinen signifikanten Unterschied von diesem Wert zeigte (F-Test, $p \geq 0,05$). Die Kenndaten der gezeigten Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind in Tab. 22 (s. 3.5.8) zusammengefasst.

Die in Abb. 15 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus den Untersuchungen der Modulatoren W84 und CH₃,H,CH₃,H an der M₂-Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His in Kombination mit den Konzentrations-Wirkungs-Kurven, die an den einfach punktmultierten Rezeptoren M₂¹⁷⁷Tyr→Gln und M₂⁴²³Thr→His aufgenommen wurden, veranschaulichen, dass sich die Effekte der genannten Einzelpunktmutanten zum Effekt der Doppelmutante addieren. Für den Prototyp-Modulator W84 (Abb. 15, Teil A) konnte eindeutig gezeigt werden, dass sich der schwächere affinitätsvermindernde Einfluss des Austausches von M₂⁴²³Threonin zu der deutlicher ausgeprägten Affinitätsabnahme durch den Verlust der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin hinzuaddiert. Die Summierung der auf dem Austausch der beiden Epitope basierenden Effekte spiegelt sich in der an der M₂-Doppelmutante aufgenommenen Konzentrations-Wirkungs-Kurve wider: Fallen beide Epitope weg, sinkt das Affinitätsniveau des Modulators W84 an der resultierenden M₂-Doppelmutante auf das an dem Wildtyp-Rezeptor M₅ gemessene Niveau ab.

Der Modulator CH₃,H,CH₃,H (Abb. 15, Teil B) verhielt sich in den Untersuchungen an den beschriebenen einfach punktmultierten Rezeptoren analog zu W84. Auch im Falle dieser Verbindung spiegelt sich eine Summierung der affinitätsvermindernden Effekte durch die Substitutionen der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin in der Konzentrations-Wirkungs-Kurve der M₂-Doppelmutante wider. Die in Gegenwart von CH₃,H,CH₃,H an der M₂-Doppelmutante sowie am M₅-Wildtyp-Rezeptor gemessenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven unterscheiden sich allerdings in der Lage ihrer EC_{0,5,diss}-Werte (s. 3.5.8, Tab. 22) statistisch signifikant voneinander (p < 0,05). Generell könnte von einer Abweichung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve des Modulators an der M₂-Doppelmutante von derjenigen am M₅-Wildtyp-Rezeptor auf die Existenz eines dritten für die M₂/M₅-Selektivität von CH₃,H,CH₃,H verantwortlichen Epitopes geschlossen werden. Da der hier beobachtete Unterschied im Affinitätsniveau zwischen den genannten Konzentrations-Wirkungs-Kurven des Modulators CH₃,H,CH₃,H jedoch gering ist, wird angenommen, dass er pharmakologisch nicht relevant ist. Unter Berücksichtigung dieses Aspektes zeigt CH₃,H,CH₃,H an den beschriebenen Rezeptormutanten ein dem W84 analoges Verhalten.

Die in Abb. 15 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven führen zu dem Schluß, dass zwei einzelne Aminosäuren, M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin, vollständig für die M₂/M₅-Selektivität der untersuchten allosterischen Modulatoren vom Alkan-

bisammonium-Typ verantwortlich sind. Durch die folgende schematische Darstellung (Abb. 16) wird die Lage dieser Aminosäuren veranschaulicht.

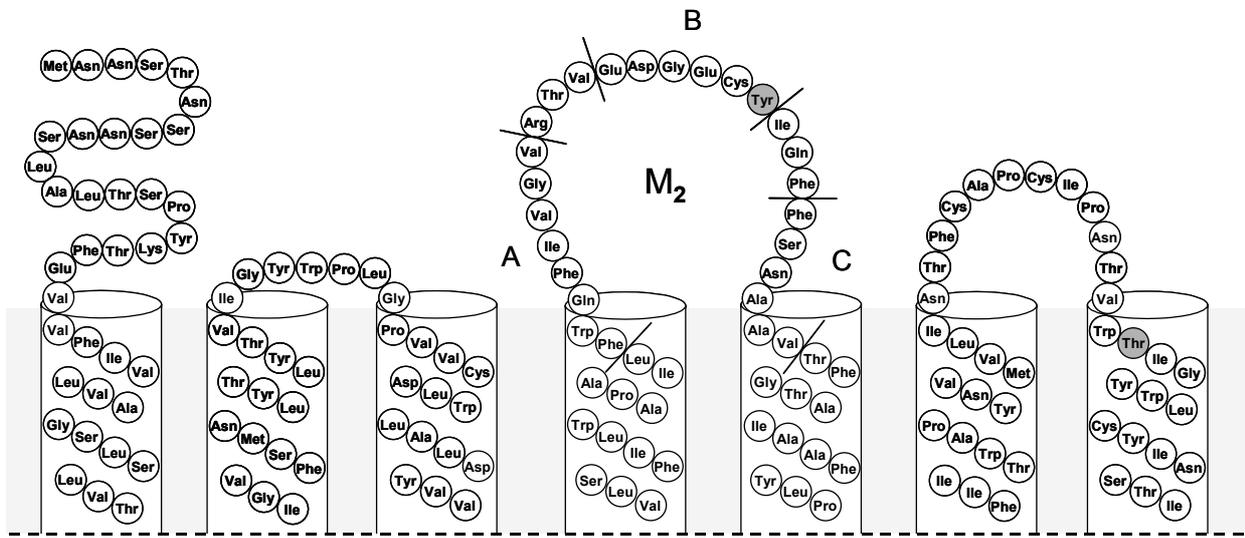


Abbildung modifiziert nach Buller (2002) sowie nach Bonner et al. (1988)

Abb. 16: Schematische Darstellung des extrazellulären sowie des transmembranalen Teils des M_2 -Rezeptorproteins modifiziert nach Buller (2002) sowie nach Bonner et al. (1988). Die grau unterlegten Kreise stellen die Epitope dar, die für die M_2/M_5 -Selektivität der in dieser Arbeit untersuchten allosterischen Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ verantwortlich sind: M_2^{177} Tyrosin in der zweiten extrazellulären Schleife sowie M_2^{423} Threonin am Beginn der siebten transmembranalen Domäne des M_2 -Rezeptors (Buller et al., 2002). Die in Kapitel 3.5.3 beschriebene Einteilung der zweiten extrazellulären Schleife des M_2 -Rezeptors in die Sequenzabschnitte A, B und C wurde in Analogie zu Abb. 10 in die obige Abbildung eingetragen.

Weiterführende Untersuchungen wurden an der inversen M_5 -Doppelmutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr} + ^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$ durchgeführt. Hier sollte geprüft werden, ob die zuvor durch Substitution der essentiellen Epitope im M_2 -Rezeptor hervorgerufenen Effekte in reziproker Form beobachtet werden können, wenn die entsprechenden M_2 -Epitope in den M_5 -Rezeptor eingebracht werden. In Abb. 17 werden die Konzentrations-Wirkungskurven, die für die Modulatoren W84 und $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ an der M_5 -Doppelmutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr} + ^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$ sowie an den einfach punktmultierten Rezeptoren $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}$ und $M_5^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$ aufgenommen wurden, gezeigt.

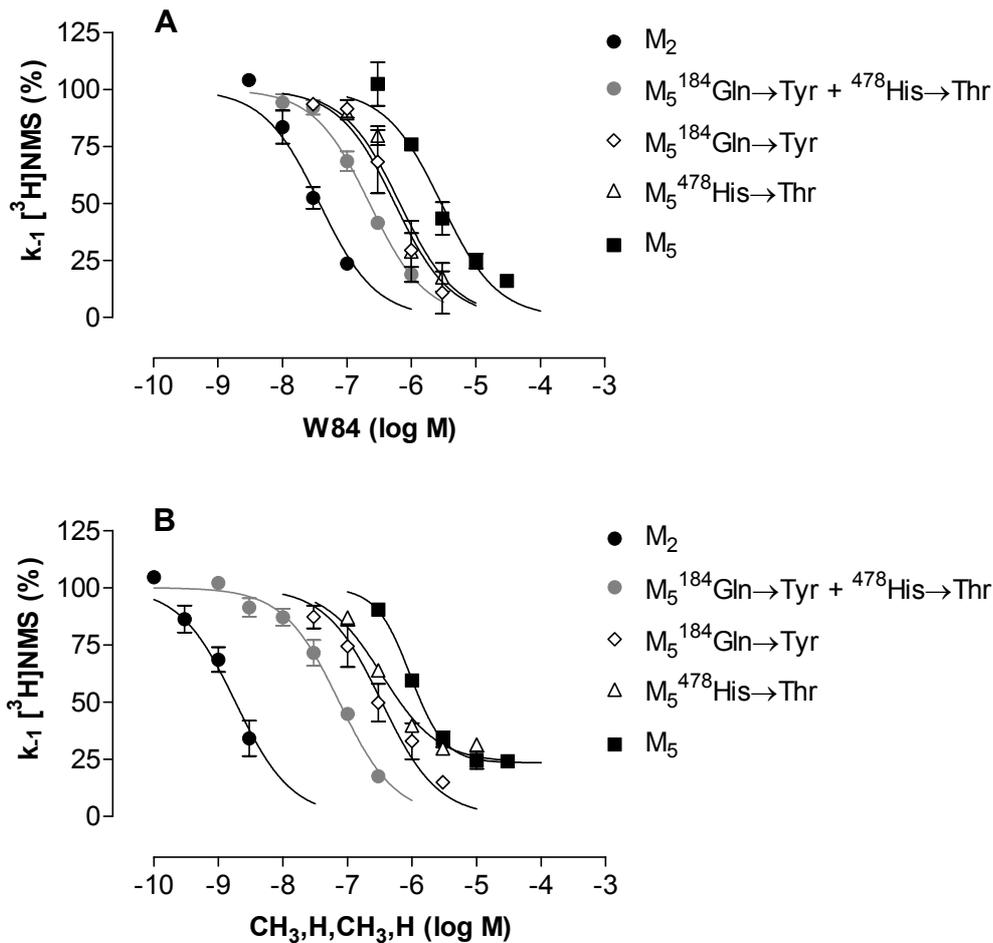


Abb. 17: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den allosterischen Effekt der Modulatoren W84 (A) bzw. CH₃,H,CH₃,H (B) auf die [³H]NMS-Dissoziation von den Wildtyp-Rezeptoren M₂ und M₅, von den einfach punktmutierten Rezeptoren M₅¹⁸⁴Gln→Tyr und M₅⁴⁷⁸His→Thr sowie der M₅-Doppelmutante M₅¹⁸⁴Gln→Tyr + ⁴⁷⁸His→Thr. Ordinate: Geschwindigkeit der [³H]NMS-Dissoziation ausgedrückt als apparente Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} in Prozent des Kontrollwertes. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-4 unabhängigen Experimenten bei zweifacher Bestimmung der einzelnen Datenpunkte. Die oberen Kurvenplateau-Werte wurden auf 100% festgesetzt. Die unteren Plateau-Werte wurden auf 0% konstant gesetzt, wenn sie sich im F-Test nicht statistisch signifikant von diesem Wert unterschieden ($p \geq 0,05$). Die Kurvensteilheit wurde auf $n_H = -1$ festgesetzt, wenn sie keinen signifikanten Unterschied von diesem Wert zeigte (F-Test, $p \geq 0,05$). Die Kenndaten der gezeigten Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind in Tab. 22 (s. 3.5.8) zusammengefasst.

Die in Abb. 17 gezeigten Konzentrations-Wirkungs-Kurven aus Untersuchungen der allosterischen Modulatoren W84 und CH₃,H,CH₃,H an den einfach punktmutierten Rezeptoren M₅¹⁸⁴Gln→Tyr und M₅⁴⁷⁸His→Thr veranschaulichen, dass der Affinitätsgewinn der Modulatoren durch Einbringen der einzelnen im M₂-Rezeptor

essentiellen Aminosäuren Tyrosin und Threonin in den M₅-Rezeptor relativ gering ist. Da sich auch bei der inversen Rezeptormutante offenbar die Effekte der Einzelmutanten zum Effekt der Doppelmutante addieren, fällt die sich in der Konzentrations-Wirkungs-Kurve der M₅-Doppelmutante widerspiegelnde Affinitätszunahme durch Einführung der Aminosäuren Tyrosin und Threonin in den M₅-Wildtyp-Rezeptor ebenfalls gering aus. Obwohl die M₅-Doppelmutante beide am M₂-Rezeptor für die M₂/M₅-Selektivität essentiellen Epitope besitzt, erreichen die Modulatoren W84 und CH₃,H,CH₃,H an dieser Rezeptormutante nicht annähernd das Affinitätsniveau des Wildtyp-Rezeptors M₂. Die am M₅-Rezeptor nach Einbringen der M₂-Aminosäuren Tyrosin und Threonin beobachteten Effekte verhalten sich folglich nicht reziprok zu denjenigen, die am M₂-Rezeptor nach Substitution der entsprechenden Aminosäuren durch die korrespondierenden M₅-Aminosäuren erhoben wurden. Dieser Sachverhalt geht aus der gemeinsamen Betrachtung der in Abb. 15 dargestellten Befunde aus Untersuchungen an der M₂-Doppelmutante sowie der in Abb. 17 gezeigten Ergebnisse aus Experimenten an der M₅-Doppelmutante hervor.

Eine Erklärung dafür, dass an der M₂-Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His die Affinität der untersuchten Modulatoren bis auf das Niveau des M₅-Wildtyp-Rezeptors abgesenkt wird, wohingegen der an der M₅-Doppelmutante M₅¹⁸⁴Gln→Tyr + ⁴⁷⁸His→Thr verzeichnete Affinitätsgewinn nicht das Niveau des M₂-Rezeptors erreicht, soll in der Diskussion gegeben werden (s. 4.3.2, S. 127 f).

Das analoge Verhalten der allosterischen Modulatoren W84 und CH₃,H,CH₃,H in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an diversen Rezeptormutanten lässt den Schluss zu, dass die genannten Verbindungen am Orthoster-besetzten Rezeptor die gleichen Epitope benutzen. Der methylierte Modulator CH₃,H,CH₃,H, der in Gleichgewichtsbindungsexperimenten positive bzw. neutrale Kooperativität mit [³H]NMS zeigte, besitzt die gleichen Interaktionspunkte am besetzten Rezeptor wie die nicht methylierte, negativ kooperative Ausgangsverbindung W84.

3.5.6 Heterologe Interaktion des methylierten Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ mit $[^3\text{H}]\text{N}$ -Methylscopolamin an der M_2 -Doppelmutante $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$

Nach den in den vorangegangenen Kapiteln beschriebenen Untersuchungen zur Epitop-Abhängigkeit unterschiedlich kooperativer allosterischer Modulatoren am Orthoster-besetzten Wildtyp- und mutierten Muskarinrezeptor wurden im Rahmen dieser Arbeit erste orientierende Bindungsexperimente am Orthoster-freien mutierten Rezeptor durchgeführt. In heterologen Interaktionsexperimenten sollte das Kooperativitätsverhalten des allosterischen Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an der M_2 -Doppelmutante $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ untersucht werden. Anhand dieser Versuche sollte herausgefunden werden, ob die unter den gegebenen experimentellen Bedingungen am freien M_2 -Wildtyp-Rezeptor beobachtete neutrale bis schwach positive Kooperativität des Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ (s. Tab. 19) durch die Substitution der für seine Affinität zum Orthoster-besetzten M_2 -Rezeptor essentiellen Epitope, M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin, beeinflusst wird. Die folgende Abbildung (Abb. 18) zeigt die Befunde der heterologen Interaktion von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an der M_2 -Doppelmutante $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ sowie dem M_2 -Wildtyp-Rezeptor.

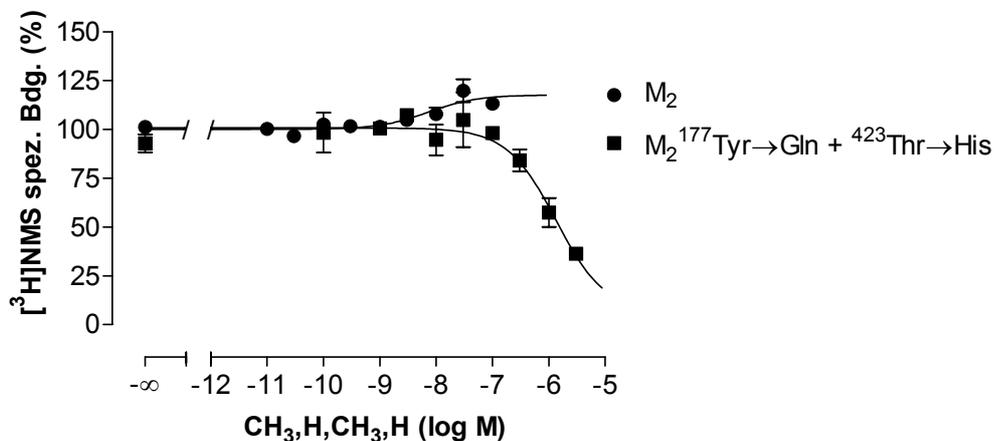


Abb. 18: Ergebnisse der heterologen Interaktionsexperimente mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (0,02 nM) in Gegenwart steigender Konzentrationen des allosterischen Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ am Wildtyp-Rezeptor M_2 sowie der M_2 -Doppelmutante $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$. Ordinate: Spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf B_0 ; Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des untersuchten Modulators. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten, die als Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Die Inkubationszeit, die gemäß Lazareno und Birdsall (1995; s. 2.4.3.1, Gleichung 16) unter Berücksichtigung der höchsten im Versuch eingesetzten Konzentration des Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ berechnet wurde, betrug in Experimenten am M_2 -Wildtyp-Rezeptor 26 h bzw. an der M_2 -Doppelmutante 25 h. Da die Inkubationszeit in den Experimenten mit Rücksicht auf die

Stabilität der Verbindung nicht erhöht werden konnte, musste die in den Experimenten am M₂-Wildtyp-Rezeptor eingesetzte maximale Konzentration des Modulators geringer gehalten werden als in den entsprechenden Experimenten an der M₂-Doppelmutante. Der Grund hierfür liegt im EC_{0,5,diss}-Wert für den allosterischen Effekt von CH₃,H,CH₃,H auf die [³H]NMS-Dissoziation vom M₂-Wildtyp-Rezeptor, der verglichen mit dem an der M₂-Doppelmutante erhobenen EC_{0,5,diss}-Wert geringer ist. Dies erhöht gemäß der Berechnung der Inkubationszeit nach Lazareno und Birdsall die bei Einsatz einer bestimmten Konzentration benötigte Inkubationszeit. Die Kurvenanpassung erfolgte gemäß dem ternären Modell allosterischer Interaktion nach Ehlert (1988).

Die in Abb. 18 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven zeigen, dass die annähernd neutrale Kooperativität des Modulators CH₃,H,CH₃,H mit [³H]NMS am M₂-Wildtyp-Rezeptor durch Austausch der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin gegen die korrespondierenden M₅-Aminosäuren in negative Kooperativität an der M₂-Doppelmutante umgewandelt wurde. In den heterologen Interaktionsexperimenten mit [³H]NMS in Gegenwart des allosterischen Modulators CH₃,H,CH₃,H an der M₂-Doppelmutante wurde ein p α -Wert von $-2,42 \pm 1,40$ sowie ein pK_A-Wert von $6,09 \pm 0,16$ ermittelt (Mittelwerte \pm Standardfehler). Die Kenndaten von CH₃,H,CH₃,H aus Gleichgewichtsbindungsexperimenten am M₂-Wildtyp-Rezeptor können Tab. 19 in Kapitel 3.4.3 (s. S. 83) entnommen werden.

Die sich ergebende Fragestellung, welche Kooperativität der allosterische Modulator am M₅-Wildtyp-Rezeptor zeigt und ob am freien Rezeptor ebenso wie am besetzten Rezeptor eine M₂/M₅-Selektivität zu beobachten ist, soll in nachfolgenden Arbeiten geklärt werden.

Die in diesem Kapitel präsentierten Befunde sollen in der Diskussion dieser Arbeit näher erläutert werden (s. 4.4.2, S. 141 f.).

3.5.7 Übersicht über die Halbwertszeiten der [³H]NMS-Dissoziation an den untersuchten Wildtyp- und mutierten Muskarinrezeptoren

In diesem Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Halbwertszeiten der [³H]NMS-Dissoziation von den untersuchten humanen Wildtyp- und mutierten Rezeptoren in Abwesenheit eines allosterischen Modulators tabellarisch zusammengestellt.

Rezeptor	Halbwertszeit der [³ H]NMS-Dissoziation (min)
M₂ wt	5,1 ± 0,2
M₅ wt	93 ± 1
CR3	125 ± 3
CR4	57 ± 2
CR6	3,8 ± 0,1
M₂("A" M₅)	6,3 ± 0,2
M₂("B" M₅)	4,6 ± 0,2
M₂("C" M₅)	4,5 ± 0,3
M₅("A" M₂)	115 ± 4
M₅("B" M₂)	239 ± 48
M₅("C" M₂)	276 ± 69
M₂¹⁷²Glu→Ala	4,5 ± 0,2
M₂¹⁷³Asp→Leu	3,7 ± 0,2
M₂¹⁷⁵Glu→Ala	5,3 ± 0,1
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln	5,9 ± 0,2
M₂⁴²³Thr→His	15 ± 1
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His	28 ± 1
M₅¹⁸⁴Gln→Tyr	151 ± 19
M₅⁴⁷⁸His→Thr	45 ± 2
M₅¹⁸⁴Gln→Tyr + ⁴⁷⁸His→Thr	58 ± 3

Tab. 21: Halbwertszeiten der [³H]NMS-Dissoziation von den in dieser Arbeit untersuchten Wildtyp (wt)- und mutierten Rezeptoren unter Kontrollbedingungen. Die Tabelle zeigt Mittelwerte ± Standardfehler der Dissoziationshalbwertszeiten von [³H]NMS, jeweils basierend auf mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.5.8 Kenndaten der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der untersuchten allosterischen Modulatoren an Wildtyp- und mutierten Rezeptoren

In den Tabellen dieses Kapitels werden die Kenndaten der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation von den untersuchten Wildtyp- und mutierten Rezeptoren durch die allosterischen Modulatoren W84 und CH₃,H,CH₃,H (s. Tab. 22) bzw. H,H,CH₃,H und W84-Si₁/6 (s. Tab. 23) aufgeführt.

Rezeptor	W84			CH ₃ ,H,CH ₃ ,H		
	pEC _{0,5,diss}	n _H	n	pEC _{0,5,diss}	n _H	n
M ₂ wt	7,42 ± 0,07	-1,31 ± 0,19 ^{n.s.}	3	8,74 ± 0,08	-1,26 ± 0,26 ^{n.s.}	3
M ₅ wt	5,54 ± 0,06	-1,03 ± 0,15 ^{n.s.}	4	6,03 ± 0,04 ^a	-1,65 ± 0,26*	4
CR3	6,85 ± 0,09	-1,36 ± 0,30 ^{n.s.}	2	7,02 ± 0,06	-1,20 ± 0,17 ^{n.s.}	2
CR4	5,38 ± 0,06	-0,94 ± 0,15 ^{n.s.}	2	5,49 ± 0,05	-1,17 ± 0,15 ^{n.s.}	2
CR6	6,20 ± 0,03	-1,40 ± 0,13*	3	6,36 ± 0,10	-1,47 ± 0,31 ^{n.s.}	3
M ₂ ("A"M ₅)	7,33 ± 0,05	-1,14 ± 0,14 ^{n.s.}	4	8,44 ± 0,05	-1,01 ± 0,13 ^{n.s.}	4
M ₂ ("B"M ₅)	6,33 ± 0,07	-1,28 ± 0,19 ^{n.s.}	3	6,98 ± 0,03	-1,27 ± 0,12*	3
M ₂ ("C"M ₅)	7,32 ± 0,09	-0,98 ± 0,21 ^{n.s.}	4	8,27 ± 0,05	-1,09 ± 0,15 ^{n.s.}	6
M ₅ ("A"M ₂)	5,60 ± 0,06	-1,02 ± 0,15 ^{n.s.}	3	5,83 ± 0,05	-0,85 ± 0,10 ^{n.s.}	3
M ₅ ("B"M ₂)	6,84 ± 0,05	-0,94 ± 0,16 ^{n.s.}	4	7,19 ± 0,09	-0,87 ± 0,21 ^{n.s.}	4
M ₅ ("C"M ₂)	5,54 ± 0,08	-1,29 ± 0,26 ^{n.s.}	2	5,85 ± 0,10	-1,20 ± 0,33 ^{n.s.}	2
M ₂ ¹⁷² Glu→Ala	7,29 ± 0,05	-1,11 ± 0,14 ^{n.s.}	2	8,40 ± 0,03	-1,71 ± 0,22*	2
M ₂ ¹⁷³ Asp→Leu	7,51 ± 0,03	-1,10 ± 0,07 ^{n.s.}	2	8,69 ± 0,10	-1,10 ± 0,26 ^{n.s.}	2
M ₂ ¹⁷⁵ Glu→Ala	6,96 ± 0,07	-1,28 ± 0,21 ^{n.s.}	2	7,79 ± 0,06	-1,26 ± 0,17 ^{n.s.}	2
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	6,20 ± 0,05	-1,26 ± 0,15 ^{n.s.}	4	7,00 ± 0,07	-1,25 ± 0,19 ^{n.s.}	4
M ₂ ⁴²³ Thr→His	6,61 ± 0,05	-1,53 ± 0,24*	4	7,42 ± 0,05	-1,18 ± 0,14 ^{n.s.}	4
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	5,54 ± 0,05	-0,99 ± 0,14 ^{n.s.}	4	6,49 ± 0,12 ^b	-1,23 ± 0,41 ^{n.s.}	4
M ₅ ¹⁸⁴ Gln→Tyr	6,26 ± 0,10	-1,35 ± 0,32 ^{n.s.}	4	6,47 ± 0,09	-0,77 ± 0,17 ^{n.s.}	4
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Thr	6,18 ± 0,10	-1,39 ± 0,30 ^{n.s.}	2	6,47 ± 0,08 ^c	-1,42 ± 0,22 ^{n.s.}	2
M ₅ ¹⁸⁴ Gln→Tyr + ⁴⁷⁸ His→Thr	6,65 ± 0,03	-1,07 ± 0,09 ^{n.s.}	4	7,13 ± 0,05	-0,96 ± 0,11 ^{n.s.}	4

Tab. 22: Legende siehe nächste Seite

Legende zu Tab. 22: Aufstellung der $pEC_{0,5,diss}$ -Werte sowie der Steigungsfaktoren n_H der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Verzögerung der [3H]NMS-Dissoziation von den untersuchten Wildtyp (wt)- und mutierten Rezeptoren durch die allosterischen Modulatoren W84 und CH₃,H,CH₃,H. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler, basierend auf $n = 2-6$ unabhängigen Experimenten. Die unteren Plateau-Werte dieser Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind in der Regel nicht signifikant verschieden von 0% (F-Test, $p \geq 0,05$). Hiervon ausgenommen sind die durch die Indices ^{a,b,c} gekennzeichneten Konzentrations-Wirkungs-Kurven, deren untere Plateau-Werte sich laut F-Test statistisch signifikant von 0% unterscheiden ($p < 0,05$). Die unteren Plateau-Werte lauten im einzelnen: ^a $23,5 \pm 2,5\%$; ^b $18,3 \pm 5,8\%$; ^c $23,6 \pm 4,2\%$.

^{n.s.} Kurvensteilheit nicht signifikant verschieden von $n_H = -1$ (F-Test, $p \geq 0,05$)

* Kurvensteilheit signifikant verschieden von $n_H = -1$ (F-Test, $p < 0,05$)

Rezeptor	H,H,CH ₃ ,H			W84-Si ₁ /6		
	$pEC_{0,5,diss}$	n_H	n	$pEC_{0,5,diss}$	n_H	n
M ₂ wt	8,16 $\pm 0,05$	-1,49 $\pm 0,24^*$	3	7,45 $\pm 0,09$	-1,47 $\pm 0,32^{n.s.}$	3
M ₅ wt	5,46 $\pm 0,06$	-1,08 $\pm 0,17^{n.s.}$	3	5,78 $\pm 0,06$	-1,11 $\pm 0,17^{n.s.}$	3
CR3	6,80 $\pm 0,04$	-0,99 $\pm 0,11^{n.s.}$	2	6,82 $\pm 0,04$	-2,33 $\pm 0,39^*$	2
CR4	5,52 $\pm 0,02$	-0,96 $\pm 0,03^{n.s.}$	2	5,84 $\pm 0,05$	-2,31 $\pm 0,49^*$	2
CR6	6,25 $\pm 0,04$	-1,64 $\pm 0,20^*$	3	6,38 $\pm 0,05$	-1,47 $\pm 0,22^*$	3
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Thr	6,17 $\pm 0,05$	-0,81 $\pm 0,09^{n.s.}$	2	6,18 $\pm 0,06$	-1,10 $\pm 0,15^{n.s.}$	2

Tab. 23: Aufstellung der $pEC_{0,5,diss}$ -Werte sowie der Steigungsfaktoren n_H der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Verzögerung der [3H]NMS-Dissoziation von den aufgeführten Wildtyp (wt)- und mutierten Rezeptoren durch die allosterischen Modulatoren H,H,CH₃,H und W84-Si₁/6. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler, basierend auf $n = 2-3$ unabhängigen Experimenten. Die unteren Plateau-Werte dieser Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind statistisch nicht signifikant verschieden von 0% (F-Test, $p \geq 0,05$). Die Kenndaten zur allosterischen Wirkung von H,H,CH₃,H und W84-Si₁/6 am M₅-Wildtyp-Rezeptor wurden in Experimenten erhoben, die mit Membransuspensionen aus stabil mit dem Gen des humanen M₅-Rezeptors transfizierten CHO-Zellen durchgeführt wurden. Nähere Erläuterungen sind dem Kapitel 3.5.1 zu entnehmen.

^{n.s.} Kurvensteilheit nicht signifikant verschieden von $n_H = -1$ (F-Test, $p \geq 0,05$)

* Kurvensteilheit signifikant verschieden von $n_H = -1$ (F-Test, $p < 0,05$)

4 Diskussion

4.1 Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität methylierter W84-Derivate

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität allosterischer Modulatoren vom Alkanbisammonium-Typ mit dem orthosterischen Liganden [^3H]NMS. Hierzu wurden der Prototyp-Modulator W84 sowie ausgewählte methylierte W84-Derivate in heterologen Interaktionsexperimenten untersucht. Die Kenndaten zu den untersuchten Modulatoren können Tab. 18 (s. 3.4.2, S. 79) entnommen werden. Anhand der in heterologen Interaktionsexperimenten erhobenen Befunde konnte erstmalig gezeigt werden, dass allosterische Förderer der Bindung eines orthosterischen Liganden an Muskarinrezeptoren durch geringfügige strukturelle Modifikationen von W84 abgeleitet werden können (Raasch et al., 2002). Auf diese Befunde soll im Folgenden näher eingegangen werden.

Die Ausgangsverbindung W84 hemmt die Bindung des muskarinischen Antagonisten [^3H]NMS und verhält sich somit negativ kooperativ mit diesem Liganden. Eine geringfügige Strukturmodifikation von W84 durch Einführung von Methylgruppen ergab die Verbindung $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ und reichte aus, um einen allosterischen Modulator mit positiv kooperativem Verhalten gegenüber [^3H]NMS zu erhalten.

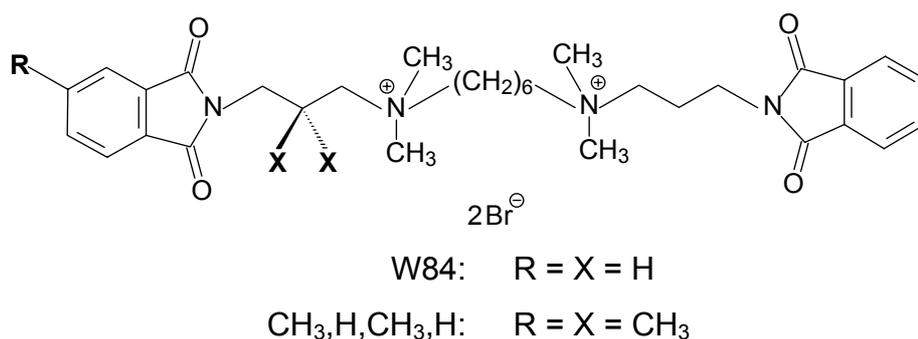


Abb. 19: Darstellung des Prototyp-Modulators W84 sowie des von W84 abgeleiteten methylierten Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$.

Wie aus Abb. 5 (s. S. 80) der vorliegenden Arbeit hervorgeht, erhöhte die Methylierung der Ausgangsverbindung W84 sowohl die Affinität des resultierenden Modulators zum Orthoster-freien Rezeptor, in der genannten Abbildung dargestellt als pK_A -Wert, als

auch die Affinität zum besetzten Rezeptor, dargestellt als $p(\alpha \cdot K_A)$ -Wert. Als Voraussetzung für das Auftreten positiver Kooperativität muss jedoch der allosterische Modulator eine höhere Affinität zum Orthoster-besetzten als zum freien Rezeptor haben (s. 2.4.3.1). Die resultierende Dissoziationsverzögerung ist in diesem Fall stärker als die Assoziationshemmung, so dass der entsprechende Modulator die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden im Sinne der positiven Kooperativität fördert. Verglichen mit dem negativ kooperativen Verhalten von W84 kam der im Rahmen dieser Arbeit beobachtete Wechsel zur positiven Kooperativität von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ dadurch zustande, dass die durch die Methylierung bedingte Affinitätszunahme des allosterischen Modulators zum Orthoster-besetzten Rezeptor größer ausfiel als die entsprechende Affinitätssteigerung zum freien Rezeptor.

Interessanterweise ergaben die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, dass die Beeinflussung der Affinität eines allosterischen Modulators zum Orthoster-besetzten Rezeptor und folglich die Beeinflussung des Kooperativitätsverhaltens dieses Modulators streng von der Position der Methylierung abhängen. Weder die einseitige Methylierung des Phthalimidringes zu der Verbindung $\text{CH}_3, \text{H}, \text{H}, \text{H}$ noch die entsprechende beidseitige Methylierung zu $\text{CH}_3, \text{CH}_3, \text{H}, \text{H}$ führte zu einer Abschwächung der bei der Ausgangsverbindung W84 beobachteten negativen Kooperativität. Dahingegen entstanden durch Methylierung der Propylseitenketten allosterische Modulatoren, die verglichen mit W84 eine deutlich weniger ausgeprägte negative Kooperativität mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ zeigten. Hierbei fiel auf, dass durch einseitige Propylseitenketten-Methylierung neutrale Kooperativität der Verbindung $\text{H}, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ erreicht werden konnte, wohingegen die symmetrische Propylseitenketten-Methylierung bei dem Modulator $\text{H}, \text{H}, \text{CH}_3, \text{CH}_3$ mit negativer Kooperativität einherging. Wurden Phthalimidring- und Propylseitenketten-Methylierung miteinander kombiniert, konnte im Falle der Verbindungen $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ sowie $\text{CH}_3, \text{CH}_3, \text{CH}_3, \text{CH}_3$ positive Kooperativität mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$ beobachtet werden. Allerdings belegten die an den allosterischen Modulatoren $\text{CH}_3, \text{H}, \text{H}, \text{CH}_3$ und $\text{CH}_3, \text{CH}_3, \text{CH}_3, \text{H}$ erhobenen Befunde, dass die Kombination von Phthalimidring- und Seitenketten-Methylierung nicht in allen Fällen zu positiv kooperativem Verhalten der methylierten Modulatoren führte. Der Vergleich der Kooperativität der Modulatoren $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ und $\text{CH}_3, \text{H}, \text{H}, \text{CH}_3$ ergab, dass positive Kooperativität durch einseitige Phthalimidring- und Seitenketten-Methylierung in der gleichen Molekülhälfte zu erreichen ist, wohingegen die

entsprechende unsymmetrische Methylierung in verschiedenen Molekülhälften zu negativer Kooperativität führt. Die in Gegenwart der in der gleichen Molekülhälfte Phthalimidring- und Seitenketten-methylierten Verbindung $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ beobachtete Förderung der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung konnte in Experimenten mit dem zusätzlich in der anderen Molekülhälfte methylierten Modulator $\text{CH}_3, \text{CH}_3, \text{CH}_3, \text{CH}_3$ nicht übertroffen werden.

Mit dem Ziel, einen genaueren Einblick in die Topographie der Bindungstasche sowie die molekularen Mechanismen der Interaktion von allosterischem Modulator und orthosterischem Liganden an M_2 -Rezeptoren zu erlangen, wurde von Jöhren und Höltje (2002) ein dreidimensionales Modell des NMS-besetzten M_2 -Rezeptors vorgestellt. Durch Moleküldynamiksimulationen an diesem dreidimensionalen Modell untersuchten Jöhren und Höltje die Bindung des Prototyp-Modulators W84 am NMS-besetzten M_2 -Rezeptor. Voigtländer et al. (2003) berichteten kürzlich über die anhand dieses Modells erhobenen Befunde, durch welche die zuvor beschriebenen Erkenntnisse über die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität methylierter W84-Derivate wie im Folgenden beschrieben untermauert werden konnten.

Die Simulation der molekularen Dynamik am Rezeptor ergab eine Hypothese zur Interaktion von W84 mit den für die M_2/M_5 -Selektivität am besetzten Muskarinrezeptor essentiellen Epitopen M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin. W84 füllt die Bindungstasche des allosterischen Modulators am NMS-besetzten M_2 -Rezeptor aus, nähert sich jedoch nur mit der Phthalimidgruppe *einer* Molekülhälfte den genannten Epitopen M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin. Unter der Annahme, dass der methylierte Modulator $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ in einer mit W84 vergleichbaren Orientierung am Orthoster-besetzten M_2 -Rezeptor bindet, wird nachvollziehbar, weshalb die symmetrische Methylierung der untersuchten Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ hinsichtlich der angestrebten Förderung der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung keinen Vorteil gegenüber der einseitigen Methylierung von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ aufweist.

Die beschriebenen Befunde verdeutlichen, dass die in dieser Arbeit untersuchten allosterischen Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ eine dominante Molekülhälfte besitzen, deren Methylierung am Phthalimidring sowie in der Propylseitenkette einen die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung fördernden Modulator ergibt. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die untersuchten Alkan-bisammonium-Verbindungen das Phänomen der dominanten Molekülhälfte nur in Bezug auf ihre Kooperativität mit dem orthosterischen Liganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ zeigen. Die Untersuchungen des allosterischen

Effektes des Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{H}, \text{CH}_3$ in Gleichgewichtsbindungs- sowie in Dissoziationsexperimenten belegen eindeutig, dass die Methylierung der anderen Molekülhälfte einen Einfluss auf die Affinität des Modulators zum M_2 -Rezeptor besitzt. Wie ein Vergleich der in Tab. 18 (s. 3.4.2, S. 79) aufgeführten Kenndaten des Prototyp-Modulators W84 sowie der methylierten Verbindung $\text{CH}_3, \text{H}, \text{H}, \text{CH}_3$ veranschaulicht, führt die unsymmetrische Phthalimidring- und Seitenketten-Methylierung in verschiedenen Molekülhälften zu einer Steigerung der Affinität der Verbindung $\text{CH}_3, \text{H}, \text{H}, \text{CH}_3$ zum Orthoster-freien und -besetzten M_2 -Rezeptor. Sowohl die Ausgangsverbindung W84 als auch der methylierte Modulator $\text{CH}_3, \text{H}, \text{H}, \text{CH}_3$ zeigen jedoch negative Kooperativität mit $[^3\text{H}]\text{NMS}$. Die durch Methylierung von Alkan-bisammonium-Verbindungen erreichte Steigerung der Affinität zum Orthoster-freien und -besetzten M_2 -Rezeptor ist unabhängig von der Position der eingeführten Methylgruppen zu beobachten. Die angestrebte Förderung der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung durch Alkan-bisammonium-Verbindungen, die mit einer überproportionalen Zunahme der Affinität der allosterischen Modulatoren zum Orthoster-besetzten M_2 -Rezeptor einhergeht, ist jedoch nur durch Methylierung der dominanten Molekülhälfte dieser Verbindungen zu erreichen.

Der Affinitätssteigerung des in verschiedenen Molekülhälften methylierten Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{H}, \text{CH}_3$ gegenüber der nicht-methylierten Ausgangsverbindung W84 liegt vermutlich eine Steigerung der Basisaffinität der Verbindung zu muskarinischen Acetylcholinrezeptoren zugrunde. Wie zuvor erwähnt, konnte auf der Grundlage des von Jöhren und Höltje (2002) beschriebenen 3D-Modells des NMS-besetzten M_2 -Rezeptors am Beispiel des Prototyp-Modulators W84 gezeigt werden, dass die Interaktion der in dieser Arbeit untersuchten Alkan-bisammonium-Modulatoren mit den für die M_2/M_5 -Selektivität dieser Verbindungen verantwortlichen Epitopen, M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin, über die dominante Molekülhälfte erfolgt. Einer durch Methylierung der entgegengesetzten Molekülhälfte hervorgerufenen Steigerung der Affinität des entsprechenden methylierten Modulators kann aufgrund der Entfernung der diese Methylierung tragenden Molekülhälfte von den für die Subtyp-Selektivität essentiellen Rezeptorepitopen M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin keine Zunahme der M_2/M_5 -Selektivität zugrunde liegen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Methylierung der nicht-dominanten Seite allosterischer Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ eine Steigerung der Basisaffinität bewirkt. Auf diesen Aspekt soll in Kapitel 4.4.1.2 dieser Diskussion nochmals eingegangen werden.

Durch Methylierung der untersuchten Phthalimidopropyl-substituierten Verbindungen vom Alkan-bisammonium-Typ in den hier beschriebenen, ausgewählten Positionen wurden Modulatoren erhalten, die die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Antagonisten [^3H]NMS an muskarinischen Rezeptoren allosterisch zu fördern vermögen. Da die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität allosterischer Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ allerdings von dem eingesetzten orthosterischen Liganden *N*-Methylscopolamin abhängen, können von den beschriebenen Befunden keine Rückschlüsse auf die Beziehung zwischen der Struktur der entsprechenden allosterischen Modulatoren und deren Wirkung auf die Gleichgewichtsbindung anderer orthosterischer Liganden - wie beispielsweise Acetylcholin - gezogen werden.

4.2 Heterologe Interaktion des Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ mit [^3H]NMS an muskarinischen M_2 -Rezeptoren aus verschiedenen Expressionssystemen

Der methylierte allosterische Modulator $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ zeigte in heterologen Interaktionsexperimenten unter Verwendung von $\text{Na}, \text{K}, \text{P}_i$ -Puffer als Inkubationsmedium bei 23°C ein in Abhängigkeit von der Art der eingesetzten Membransuspension variierendes Kooperativitätsverhalten mit dem orthosterischen Liganden [^3H]NMS. In Untersuchungen an Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein verhielt sich $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ positiv kooperativ mit [^3H]NMS, wohingegen sich die Verbindung in analogen Experimenten an M_2 -COS 7-Zellhomogenaten als neutral kooperativ erwies. Eine Zusammenfassung der in heterologen Interaktionsexperimenten erhobenen Kenndaten des allosterischen Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ zeigt Tab. 19 (s. 3.4.3, S. 83) der vorliegenden Arbeit.

Die bei Verwendung verschiedener Membransuspensionen beobachtete, statistisch signifikant unterschiedliche Kooperativität von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ mit dem Radioliganden [^3H]NMS könnte darauf zurückzuführen sein, dass die in den eingesetzten Membransuspensionen enthaltenen Muskarinrezeptoren vom Subtyp M_2 aus verschiedenen Expressionssystemen stammten und hinsichtlich ihrer Sequenz nicht vollkommen identisch waren. Bekannt ist, dass sich muskarinische M_2 -Rezeptoren vom Mensch (humane M_2 -Rezeptoren, hM_2) und vom Schwein (suine M_2 -Rezeptoren, sM_2) in 97,4% ihrer aus jeweils 466 Aminosäuren bestehenden Sequenz entsprechen. Die in

der Nähe des N-Terminus sowie im Bereich der dritten intrazellulären Schleife liegenden Sequenzunterschiede zwischen dem humanen und dem suinen M_2 -Rezeptor sind in der folgenden Tabelle (Tab. 24) zusammengefasst (Bonner et al., 1987).

Rezeptorbereich	Position der Aminosäure	M_2 -Rezeptor	
		Mensch	Schwein
N-Terminus	10	Asn	Ser
	11	Ser	Gly
dritte intrazelluläre Schleife	229	Asp	Glu
	250	Ser	Gly
	253	Asp	Glu
	254	Gly	Ala
	269	Pro	Ala
	326	Arg	Lys
	328	Gly	Val
	332	Pro	Gln
	340	Thr	Ala
	346	Val	Leu

Tab. 24: Zusammenfassung der Sequenzunterschiede zwischen den muskarinischen M_2 -Rezeptoren von Mensch und Schwein im Bereich des N-terminalen Endes sowie der dritten intrazellulären Schleife (Bonner et al., 1987).

Es wäre denkbar, dass das an M_2 -Rezeptoren humanen bzw. suinen Ursprungs beobachtete unterschiedliche Kooperativitätsverhalten des allosterischen Modulators CH_3, H, CH_3, H mit dem orthosterischen Liganden $[^3H]NMS$ auf den in Tab. 24 aufgeführten Abweichungen der Aminosäuresequenzen der genannten Rezeptoren beruht. Die Auswirkungen der Sequenzabweichung humaner bzw. suiner M_2 -Rezeptoren in den N-terminalen Positionen 10 und 11 wurden bereits von Dittmann (2003) anhand einer in COS 7-Zellen exprimierten Rezeptormutante untersucht, in der die Aminosäuren $M_2^{10-11}Asn-Ser$ des humanen M_2 -Rezeptors durch die entsprechenden Aminosäuren Serin und Glycin des suinen M_2 -Rezeptors ausgetauscht worden waren. In kinetischen Experimenten untersuchte Dittmann den Einfluss unterschiedlicher allosterischer Modulatoren auf die $[^3H]NMS$ -Dissoziation von der Rezeptormutante

M₂¹⁰⁻¹¹Asn-Ser→Ser-Gly im Vergleich zum humanen M₂-Wildtyp-Rezeptor. Zu den untersuchten allosterischen Modulatoren gehörten die Verbindungen Tacrin, das Tacrin-Dimer EHW 21 sowie die Bispyridinium-Verbindungen Duo3 und WDuo3. Dittmann konnte zeigen, dass der Austausch der Aminosäuren M₂¹⁰⁻¹¹Asn-Ser gegen die Aminosäuren Ser-Gly im humanen M₂-Rezeptor keinen Einfluss auf die Affinität der untersuchten allosterischen Modulatoren zum Orthoster-besetzten M₂-Wildtyp-Rezeptor besitzt. Die von Dittmann eingesetzten Verbindungen unterscheiden sich strukturell deutlich von den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Alkanbisammonium-Verbindungen. Dennoch könnten die beschriebenen Befunde als Hinweis darauf gedeutet werden, dass unterschiedliche Aminosäuresequenzen im humanen bzw. suinen M₂-Rezeptor zumindest im Bereich des N-Terminus keinen Einfluss auf die Interaktion eines allosterischen Modulators mit dem orthosterischen Liganden [³H]NMS am muskarinischen M₂-Rezeptor zu haben scheinen. Alle weiteren in Tab. 24 aufgeführten Sequenzunterschiede zwischen humanen und suinen M₂-Rezeptoren liegen im intrazellulären Bereich des Rezeptorproteins, weshalb auch sie vermutlich keine Bedeutung für die Interaktion des extrazellulär bindenden allosterischen Modulators mit [³H]NMS am M₂-Rezeptor besitzen.

Ein weiterer Erklärungsansatz für den unterschiedlichen Einfluss des Modulators CH₃,H,CH₃,H auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS an humanen bzw. suinen M₂-Rezeptoren basiert darauf, dass die Aminosäuresequenz eines Rezeptors das spezifische Glycosylierungsmuster des entsprechenden Rezeptorproteins bedingt. Hierbei ist einerseits zu berücksichtigen, dass unterschiedliche Aminosäuresequenzen von Rezeptorproteinen gleichen Typs verschiedene Glycosylierungen tragen können. Andererseits können unterschiedliche Aminosäuresequenzen jedoch auch dazu führen, dass angrenzende Aminosäuren, die in den entsprechenden Proteinen aus verschiedenen Expressionssystemen homolog vorliegen, unterschiedlich glycosyliert sind (van Koppen und Nathanson, 1990). Die Spezies-spezifisch erfolgende Glycosylierung eines Proteins ist von großer Bedeutung, da sie die biologischen Funktionen des Proteins in der Zelle beeinflusst (Kukuruzinska und Lennon, 1998; Raju et al., 2000).

Bei Vergleich der Glycosylierungsmuster der in dieser Arbeit untersuchten, aus verschiedenen Expressionssystemen stammenden M₂-Rezeptoren ist ein Unterschied in der Glycosylierung der Rezeptorproteine in Position 9 festzustellen. Während der humane M₂-Rezeptor jeweils an der Aminosäure Asparagin in den Positionen 2, 3, 6

und 9 eine N-Glycosylierung aufweist, zeigt der suine M_2 -Rezeptor nur in den Positionen 2, 3 und 6 N-glycosylierte Asparaginreste. In Position 9 des suinen M_2 -Rezeptors liegt in Homologie zum humanen M_2 -Rezeptor die Aminosäure Asparagin vor. sM_2^9 Asn ist allerdings im Gegensatz zu hM_2^9 Asn nicht N-glycosyliert. Die Ursache dafür, dass der humane und der suine M_2 -Rezeptor in Position 9 voneinander abweichende Glycosylierungsmuster zeigen, obwohl beide Rezeptoren in dieser Position die gleiche Aminosäure aufweisen, liegt in den Sequenzunterschieden der entsprechenden Rezeptoren in den angrenzenden Aminosäurepositionen 10 und 11. Die N-Glycosylierung eines Asparaginrestes ist nur möglich, wenn dieser Asparaginrest Teil der Aminosäuresequenz Asn-X-Ser bzw. Asn-X-Thr ist. Dabei kann die Position X von jeder beliebigen Aminosäure mit Ausnahme von Prolin bzw. Aspartat eingenommen werden (van Koppen und Nathanson, 1990). Dementsprechend weist der N-Terminus des humanen muskarinischen M_2 -Rezeptors in Position 9 eine potentielle Glycosylierungsstelle auf, wohingegen die Glycosylierung des suinen M_2 -Rezeptors in der entsprechenden Position aufgrund der angrenzenden Aminosäuresequenz sM_2^{10-11} Ser-Gly nicht möglich ist. Die unterschiedlichen Glycosylierungsmuster von Muskarinrezeptoren aus verschiedenen Expressionssystemen könnten die Ursache dafür sein, dass der Modulator CH_3, H, CH_3, H die Gleichgewichtsbindung von $[^3H]NMS$ in Untersuchungen an suinen bzw. humanen M_2 -Rezeptoren fördert bzw. unverändert lässt.

Christopoulos und Kenakin (2002) beschrieben kürzlich, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren nicht nur mit dem entsprechenden G-Protein, sondern darüber hinaus mit weiteren sogenannten „assozierten Proteinen“ interagieren. Dementsprechend könnte eine weitere Ursache für das unterschiedliche Kooperativitätsverhalten von CH_3, H, CH_3, H gegenüber dem Radioliganden $[^3H]NMS$ in Untersuchungen an M_2 -Rezeptoren verschiedener Herkunft in Unterschieden im Bereich dieser Proteine liegen. Wenn auch die mit den muskarinischen Rezeptoren „assozierten Proteine“ Spezies-spezifische Unterschiede hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz und gegebenenfalls ihrer Glycosylierung aufweisen, könnte die Variation dieser Proteine zu dem unterschiedlichen allosterischen Einfluss des untersuchten Modulators auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3H]NMS$ an suinen bzw. humanen M_2 -Rezeptoren beitragen. Fraglich ist in diesem Zusammenhang allerdings, inwieweit transient mit humanen Muskarinrezeptor-Genen transfizierte COS 7-Zellen „assozierte Proteine“ exprimieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob allosterische Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ, die aufgrund struktureller Unterschiede ein qualitativ und quantitativ verschiedenes Kooperativitätsverhalten gegenüber [³H]NMS zeigen, mit verschiedenen oder gleichen Epitopen des muskarinischen Rezeptors interagieren. Hierzu wurden der methylierte allosterische Modulator CH₃,H,CH₃,H sowie der nicht methylierte Prototyp-Modulator W84 ausgewählt. Die Ausgangssubstanz W84 verhält sich unabhängig von den zugrundeliegenden experimentellen Bedingungen negativ kooperativ gegenüber dem orthosterischen Liganden [³H]NMS. Die Verbindung CH₃,H,CH₃,H, die aufgrund ihrer Methylierung im Vergleich zu W84 eine deutliche Steigerung der Affinität zum Orthoster-freien sowie zum -besetzten M₂-Rezeptor zeigt, erwies sich in Experimenten an seinen M₂-Rezeptoren unabhängig von den zugrundeliegenden Pufferbedingungen sowie der Inkubationstemperatur als positiv kooperativ gegenüber [³H]NMS (s. Tab. 19, 3.4.3, S. 83). In Untersuchungen an M₂-Rezeptoren aus transient mit dem Gen des humanen M₂-Rezeptors transfizierten COS 7-Zellen, die in Na,K,P_i-Puffer bei 23°C durchgeführt wurden, verhielt sich CH₃,H,CH₃,H annähernd neutral kooperativ mit [³H]NMS. Folglich konnte das aufgrund der Methylierung veränderte Kooperativitätsverhalten von CH₃,H,CH₃,H - trotz der in diesem Kapitel diskutierten Unterschiede in der Kooperativität der Verbindung mit [³H]NMS an seinen bzw. humanen M₂-Rezeptoren - eindeutig von dem negativ kooperativen Verhalten der Ausgangssubstanz W84 abgegrenzt werden. Damit erfüllten die Verbindungen CH₃,H,CH₃,H und W84 die Voraussetzung zur Untersuchung der Epitopabhängigkeit allosterischer Modulatoren, die infolge struktureller Unterschiede ein qualitativ verschiedenes Kooperativitätsverhalten gegenüber [³H]NMS zeigen.

4.3 Entwicklung eines dreidimensionalen Modells des [³H]NMS-besetzten muskarinischen M₂-Rezeptors und Erörterung der Epitop-Abhängigkeit allosterischer Modulatoren am besetzten M₂-Rezeptor

4.3.1 Das dreidimensionale Modell des NMS-besetzten M₂-Rezeptors

Wie bereits in Kapitel 4.1 (s. S. 116 f.) erwähnt wurde, stellten Jöhren und Höltje (2002) ein dreidimensionales Modell des NMS-besetzten M₂-Rezeptors vor. Die Modellierung des Orthoster-besetzten M₂-Rezeptors erfolgte auf der Grundlage der röntgenkristallographischen Struktur des bovinen Photorezeptors Rhodopsin (Palczewski et al., 2000). Das dreidimensionale Modell des M₂-Rezeptors ermöglichte

erstmals einen Einblick in die Topographie der Bindungstaschen des orthosterischen Liganden [^3H]NMS sowie der in dieser Arbeit untersuchten allosterischen Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ an dem entsprechenden Muskarinrezeptor. Die folgende Abbildung (Abb. 20) zeigt die Simulation der Bindung des allosterischen Prototyp-Modulators W84 am [^3H]NMS-besetzten M_2 -Rezeptor auf der Basis des von Jöhren und Höltje beschriebenen dreidimensionalen Modells dieses Rezeptors.

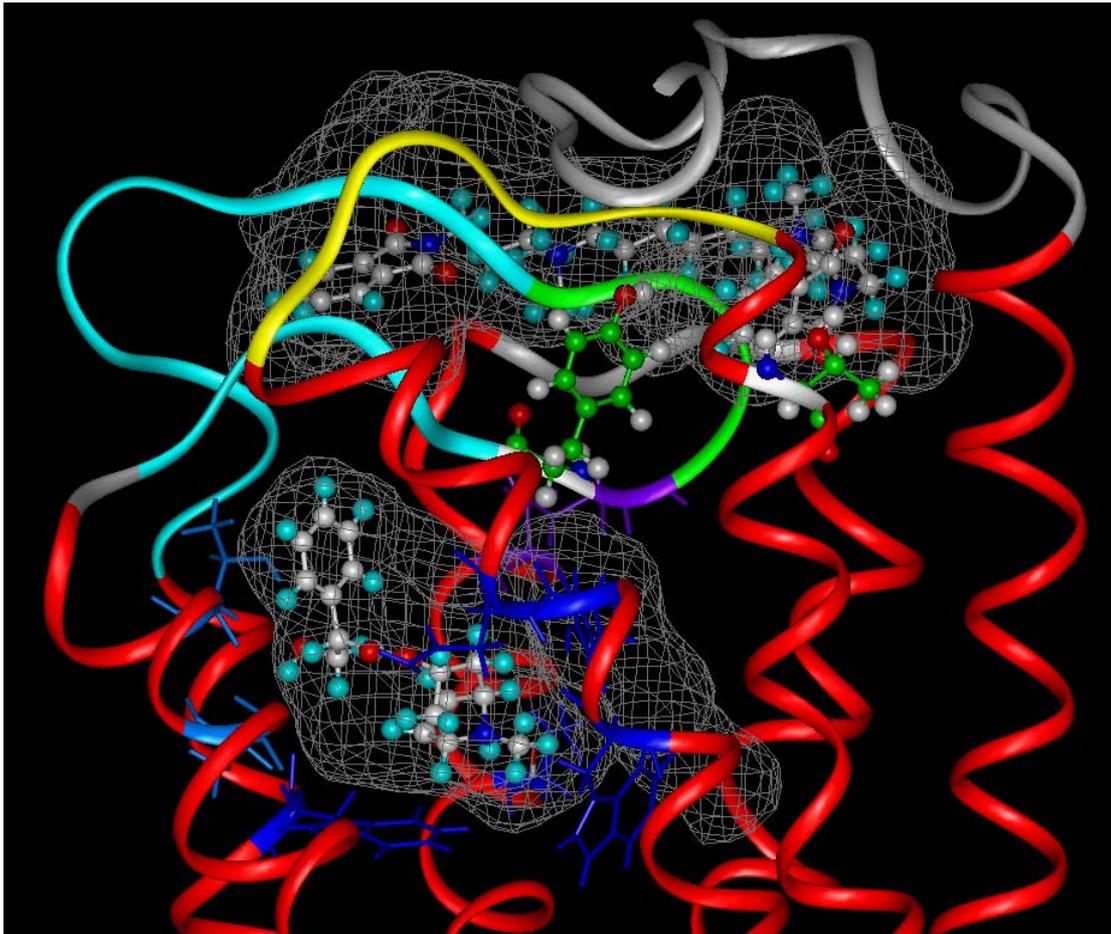


Abb. 20: Position des orthosterischen Antagonisten *N*-Methylscopolamin (NMS) sowie des allosterischen Prototyp-Modulators W84 am M_2 -Wildtyp-Rezeptor (nach Voigtländer et al., 2003). Verschiedene Bereiche des Rezeptorproteins sind in unterschiedlichen Farben wiedergegeben: transmembranale Helices (rot), N-Terminus und erste extrazelluläre Schleife (grau), zweite extrazelluläre Schleife (hellblau), EDGE-Region innerhalb der zweiten extrazellulären Schleife (grün), dritte extrazelluläre Schleife (gelb), Disulfid-Brücke (violett). Die orthosterische Bindungsstelle ist dunkelblau dargestellt. Freie Volumina innerhalb des Rezeptorproteins sind durch graue Gitterstrukturen gekennzeichnet. Die Aminosäuren $\text{M}_2^{177}\text{Tyrosin}$ und $\text{M}_2^{423}\text{Threonin}$ erscheinen in folgenden Farben: Kohlenstoff-Atome (grün), Stickstoff-Atome (dunkelblau), Sauerstoff-Atome (rot) und Wasserstoff-Atome (weiß). Die Liganden NMS und W84 sind wie folgt dargestellt: Kohlenstoff-Atome (weiß), Stickstoff-Atome (dunkelblau), Sauerstoff-Atome (rot), Wasserstoff-Atome (hellblau).

Mit Hilfe des 3D-Modells konnten grundlegende Hypothesen über die molekularen Mechanismen der Interaktion der untersuchten allosterischen Modulatoren mit den für die M_2/M_5 -Selektivität dieser Verbindungen essentiellen Epitopen des NMS-besetzten M_2 -Rezeptors, M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin, gewonnen werden.

Moleküldynamiksimulationen anhand des Modells des ternären Komplexes aus dem allosterischen Modulator W84, dem orthosterischen Liganden NMS und dem M_2 -Rezeptor ergaben, dass die Interaktion der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin mit dem Prototyp-Modulator auf π - π -Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Ring des Tyrosinrestes und dem aromatischen Ring der diesem Epitop zugewandten Molekülhälfte des allosterischen Modulators beruht. Dagegen erbrachte die Untersuchung der Interaktion zwischen der Aminosäure M_2^{423} Threonin und W84 keinen Hinweis auf direkte Wechselwirkungen zwischen dem Epitop des M_2 -Rezeptors und dem Modulator. Eine Simulation der Moleküldynamik des ternären Komplexes von W84, NMS sowie dem punktmultierten Rezeptor $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ verdeutlichte, dass die Substitution der M_2 -Aminosäure M_2^{423} Threonin durch die korrespondierende M_5 -Aminosäure Histidin keinen nennenswerten Einfluss auf die Interaktionsenergie zwischen W84 und der mutierten Position besitzt. Stattdessen bedingt der Austausch der Aminosäure M_2^{423} Threonin eine deutliche Abnahme der Interaktionsenergien zwischen W84 sowie den in der nahen Umgebung von M_2^{423} Threonin liegenden konservierten Tryptophanresten $M_2^{422}\text{Trp}$ und $M_2^{427}\text{Trp}$. Diesem Befund zufolge scheint den genannten Tryptophanresten eine bedeutende Rolle hinsichtlich der molekularen Interaktion zwischen dem allosterischen Modulator sowie dem M_2 -Rezeptor zuzukommen. Die Bedeutung der unter den Rezeptorsubtypen M_1 - M_5 konservierten Aminosäure M_2^{422} Tryptophan wurde bereits von Matsui et al. (1995) beschrieben. Anhand der Befunde aus Mutagenese-Untersuchungen konnten Matsui et al. (1995) zeigen, dass der Austausch dieses Tryptophanrestes gegen Alanin zu einer deutlichen Abnahme der Affinität einer Reihe von untersuchten allosterischen Modulatoren, wie beispielsweise Gallamin, führt. In Bezug auf die für die M_2/M_5 -Selektivität von W84 und seinen Derivaten essentielle Aminosäure M_2^{423} Threonin (Buller et al., 2002) lassen die dargestellten Befunde folgende Schlussfolgerung zu: Die Aminosäure M_2^{423} Threonin scheint die Orientierung der genannten Tryptophanreste sterisch zu beeinflussen. Die Interaktion des allosterischen Modulators W84 erfolgt mit den unter dem Einfluss von M_2^{423} Threonin ausgerichteten Epitopen M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan.

Anhand der von Jöhren und Höltje (2002) durchgeführten Untersuchungen zur Moleküldynamik von W84 an dem beschriebenen Modell des [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptors erkannten Voigtländer et al. (2003), dass die quartären Stickstoff-Atome der Verbindung in zwei von konservierten Aminosäuren gebildeten, lipophilen Bindungstaschen liegen, die auch polare Aminosäuren enthalten. In diesen Bindungstaschen interagieren die quartären Stickstoff-Atome über ihre positive Ladung bevorzugt mit der negativen Ladung der Aminosäure M₂²²Glutamat bzw. mit der polaren Aminosäure M₂⁶Asparagin. Für die in diesem Zusammenhang beschriebenen lipophilen Bindungstaschen erwägen Voigtländer et al. (2003) eine Beteiligung an der vom Rezeptorsubtyp unabhängigen Basisaffinität allosterischer Modulatoren zu muskarinischen Acetylcholinrezeptoren. Auf diesen Aspekt soll in Kapitel 4.4.1.2 (s. S. 136 f.) dieser Diskussion näher eingegangen werden.

4.3.2 Prüfung des 3D-Modells des NMS-besetzten M₂-Rezeptors auf der Basis von Befunden aus Radioligandbindungsstudien an Rezeptormutanten

Das von Jöhren und Höltje (2002) erstellte dreidimensionale Modell des NMS-besetzten M₂-Rezeptors sowie die anhand dieses Modells durchgeführten Simulationen der molekularen Dynamik von Komplexen aus allosterischem Modulator und Orthoster-besetztem Rezeptor basieren auf sogenannten „loss of function“-Mutationen, die von Voigtländer et al. (2003) sowie im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Radioligandbindungsstudien untersucht wurden. Eine „loss of function“-Mutation bewirkt eine Abnahme der Affinität eines Liganden zu seinem Rezeptor aufgrund des Verlustes eines für die Affinität des Liganden zu diesem Rezeptor essentiellen Epitopes. So führen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten „loss of function“-Mutationen M₂¹⁷⁷Tyr→Gln, M₂⁴²³Thr→His sowie M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His zu einer Abnahme der Affinität der untersuchten allosterischen Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ gegenüber dem M₂-Wildtyp-Rezeptor, da ein bzw. im Falle der M₂-Doppelmutante beide für die hohe M₂/M₅-Selektivität der entsprechenden Modulatoren verantwortlichen Epitope durch Punktmutation entfernt wurden. Die genannten „loss of function“-Mutationen führten Jöhren und Höltje (2002) an dem von ihnen erstellten dreidimensionalen Modell des NMS-besetzten M₂-Rezeptors durch (Voigtländer et al., 2003). Durch die Simulation ternärer Komplexe aus den allosterischen Modulatoren Diallylcaracurin V bzw. W84 sowie den NMS-besetzten punktmutierten M₂-Rezeptoren konnte gezeigt werden, dass die von Jöhren und Höltje (2002) erhobenen Befunde aus

Bindungs- und Moleküldynamiksimulationen auf der Basis des 3D-Modells mit den von Voigtländer et al. (2003) sowie in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunden aus entsprechenden Radioligandbindungsstudien übereinstimmen.

Auf der Basis des in Experimenten an den beschriebenen M₂-Punktmutanten beobachteten „loss of function“-Phänomens entstand die Erwartung, in entsprechenden Untersuchungen der inversen M₅-Punktmutationen reziproke „gain of function“-Effekte feststellen zu können. Radioligandbindungsexperimente an der M₅-Punktmutante M₅¹⁸⁴Gln→Tyr sowie an der M₅-Doppelmutante M₅¹⁸⁴Gln→Tyr + ⁴⁷⁸His→Thr bestätigten dies jedoch nicht. Dieser Aspekt soll im folgenden Abschnitt erläutert werden.

Die Untersuchungen der „gain of function“-Mutationen im M₅-Rezeptor basierten auf folgender Befundlage: Die Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin konnte im Rahmen dieser Arbeit als das zweite, neben der Aminosäure M₂⁴²³Threonin (Buller et al., 2002) für die M₂/M₅-Selektivität allosterischer Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ essentielle Epitop des M₂-Rezeptors identifiziert werden (s. 3.5.4.1, S. 101 f.). In Experimenten an der Rezeptormutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln zeigten die allosterischen Modulatoren W84 und CH₃,H,CH₃,H einen Affinitätsverlust gegenüber dem M₂-Rezeptor, der sich mit der Abnahme der Affinität des jeweiligen Modulators an dem chimären Rezeptor M₂(„B“M₅) deckte. Da der Sequenzabschnitt B der zweiten extrazellulären Schleife des M₂-Rezeptors, der in dem genannten chimären Rezeptor gegen die korrespondierende M₅-Sequenz ausgetauscht worden war, in vorausgegangenen Untersuchungen bereits als entscheidende Region für die M₂/M₅-Selektivität erkannt wurde (s. 3.5.3), bestätigte dieser Befund M₂¹⁷⁷Tyrosin als das für die Subtyp-Selektivität der untersuchten allosterischen Modulatoren verantwortliche Epitop in dieser Region des M₂-Rezeptors.

Untersuchungen an der inversen Punktmutante M₅¹⁸⁴Gln→Tyr sollten zeigen, ob der Austausch der korrespondierenden Aminosäure M₅¹⁸⁴Glutamin durch Tyrosin zu einer reziproken Affinitätssteigerung der allosterischen Modulatoren gegenüber dem M₅-Rezeptor führt. Die in Kapitel 3.5.4.2 (s. S. 103 f.) der vorliegenden Arbeit beschriebenen Befunde veranschaulichen, dass die Affinität der untersuchten Modulatoren W84 bzw. CH₃,H,CH₃,H zu dem punktmultierten Rezeptor M₅¹⁸⁴Gln→Tyr im Vergleich zum M₅-Rezeptor deutlich gesteigert wurde. Allerdings erreichten die Modulatoren an dem punktmultierten Rezeptor M₅¹⁸⁴Gln→Tyr nicht das in Untersuchungen an dem chimären Rezeptor M₅(„B“M₂) beobachtete Affinitätsniveau. Folglich konnte durch die an den inversen Rezeptormutanten erhobenen Befunde nicht

eindeutig bestätigt werden, dass ausschließlich die Aminosäure Tyrosin das für die M_2/M_5 -Selektivität der untersuchten allosterischen Modulatoren entscheidende Epitop im Sequenzabschnitt B der zweiten extrazellulären Schleife des M_2 -Rezeptors darstellt.

Der im Vergleich zu der chimären Rezeptormutante $M_5(„B“M_2)$ beobachtete relativ geringe Affinitätsgewinn der untersuchten Modulatoren zu der inversen Punktmutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}$ ist vermutlich darin begründet, dass das für die M_2/M_5 -Selektivität essentielle Epitop Tyrosin in der genannten Punktmutante in dem vom M_2 -Wildtyp-Rezeptor abweichenden Hintergrund des M_5 -Wildtyp-Rezeptors präsentiert wird. Der in Untersuchungen an dem chimären Rezeptor $M_5(„B“M_2)$ beobachtete vergleichsweise größere Affinitätsgewinn der Modulatoren gegenüber dem M_5 -Rezeptor erscheint plausibel, da Tyrosin in der chimären Rezeptormutante im Verbund mit dem Sequenzabschnitt B der zweiten extrazellulären Schleife des M_2 -Rezeptors im Hintergrund des M_5 -Rezeptors präsentiert wird. Wie bereits unter 3.5.4.1 erwähnt, korrespondiert zu der Aminosäure M_2^{172} Glutamat, der ersten Aminosäure des Sequenzabschnittes B, im M_5 -Rezeptor die Aminosäure M_5^{179} Prolin. Da Prolin in seiner Eigenschaft als „Strukturbrecher“ bekannt ist (MacArthur and Thornton, 1991), könnte diese Aminosäure die Konformation des Peptidstranges im entscheidenden Sequenzabschnitt B der zweiten extrazellulären Schleife des M_5 -Rezeptors verglichen mit dem entsprechenden Abschnitt des M_2 -Rezeptors verändern. In diesem Fall nimmt auch die in Position 184 des M_5 -Rezeptors eingebrachte Aminosäure Tyrosin eine gegenüber dem M_2 -Rezeptor veränderte Orientierung an. Infolgedessen könnte die Beeinflussung der Affinität der untersuchten Modulatoren durch das im M_2 -Rezeptor essentielle Epitop M_2^{177} Tyrosin bei dessen alleiniger Präsentation in der Umgebung des konformell abweichenden M_5 -Rezeptors deutlich schwächer ausfallen als bei dessen Präsentation in Form des gesamten Sequenzabschnittes B des M_2 -Rezeptors im Hintergrund des M_5 -Rezeptors.

Ein vergleichbares Phänomen zeigte sich in Experimenten an der M_5 -Doppelmutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr} + ^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$, die in Kapitel 3.5.5 der vorliegenden Arbeit (s. S. 105 f.) beschrieben wurden. In vorausgegangenen Untersuchungen des verzögernden Einflusses der Modulatoren W84 und $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ auf die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation an der M_2 -Doppelmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ war beobachtet worden, dass das Affinitätsniveau der genannten Modulatoren bei Austausch beider für die M_2/M_5 -

Selektivität essentiellen Epitope, M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin, auf das an dem Wildtyp-Rezeptor M_5 beobachtete Niveau abfällt (s. Abb. 15, S. 106). In den entsprechenden Experimenten an der M_5 -Doppelmutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr} + ^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$, in der die für die Subtyp-Selektivität essentiellen Aminosäuren des M_2 -Rezeptors in den M_5 -Rezeptor eingebracht wurden, zeigten die untersuchten Modulatoren jedoch nicht die entsprechende reziproke Steigerung ihrer Affinität bis auf das am M_2 -Rezeptor beobachtete Niveau (s. Abb. 17, S. 109). In Analogie zu den Untersuchungen an der M_2 -Doppelmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ sowie an den entsprechenden einfach punktmutierten Rezeptoren $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ bzw. $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ (s. 3.5.5, Abb. 15), addierten sich allerdings auch im Falle der inversen M_5 -Doppelmutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr} + ^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$ die an den einfach punktmutierten M_5 -Rezeptoren beobachteten Effekte zum Effekt der Doppelmutante (s. 3.5.5, Abb. 17). Es fiel jedoch auf, dass die allosterischen Modulatoren W84 und $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ einen relativ geringen Affinitätsgewinn an den einfachen Punktmutanten $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}$ bzw. $M_5^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$ gegenüber dem M_5 -Wildtyp-Rezeptor zeigten. Die an der Punktmutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}$ erhobenen Befunde wurden in Kapitel 3.5.4.2 dieser Arbeit dargestellt und im vorangegangenen Abschnitt dieser Diskussion erörtert; die Kenndaten der genannten Modulatoren aus Untersuchungen an dem punktmutierten Rezeptor $M_5^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$ können Tab. 22 (s. S. 114) der vorliegenden Arbeit entnommen werden. Die im Vergleich zu dem am M_2 -Wildtyp-Rezeptor beobachteten Affinitätsniveau relativ geringe Affinität der untersuchten Modulatoren W84 bzw. $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ zu der M_5 -Doppelmutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr} + ^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$ beruht folglich auf der Summierung der schwach ausgeprägten Effekte der einzelnen Punktmutationen, $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}$ sowie $M_5^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$, auf die Affinität der genannten Modulatoren.

Das hier beschriebene Phänomen, dass an der M_2 -Doppelmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ die Affinität der untersuchten Modulatoren bis auf das Niveau des M_5 -Wildtyp-Rezeptors abgesenkt wurde, wohingegen der an der M_5 -Doppelmutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr} + ^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$ verzeichnete Affinitätsgewinn nicht das Niveau des M_2 -Wildtyp-Rezeptors erreichte, kann in Anlehnung an die zuvor bezüglich der Punktmutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}$ diskutierten Aspekte betrachtet werden. Auch im vorliegenden Fall scheint der Einfluss der für die M_2/M_5 -Selektivität essentiellen Epitope des M_2 -Rezeptors, M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin, bei deren alleiniger Präsentation in der Umgebung des konformell abweichenden M_5 -Rezeptors deutlich schwächer

auszufallen, als wenn diese Epitope in ihrer natürlichen Umgebung der zweiten extrazellulären Schleife des M₂-Rezeptors präsentiert werden. Dieser Aspekt wurde in allgemeinerer Form von Voigtländer et al. (2003) beschrieben und lässt sich auf die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse übertragen: Wird ein essentielles Epitop in einem Rezeptor ausgetauscht, zeigt die resultierende Rezeptormutante im Experiment den vollständigen Verlust des Einflusses dieses Epitopes, sofern das im Austausch eingebrachte Epitop nicht in der Lage ist, diesen Verlust auszugleichen. Dahingegen hängt der Effekt einer Mutation, bei der ein essentielles Epitop eines Rezeptors in einen anderen Rezeptor eingebracht wird, entscheidend von der Struktur des Rezeptors ab, in den das betreffende Epitop integriert wird. Gemäß Voigtländer et al. (2003) erklärt die Präsentation eines in seinem natürlichen Rezeptor essentiellen Epitopes in der strukturell und konformell abweichenden Umgebung eines anderen Rezeptors die Abnahme der ursprünglichen Bedeutung dieses Epitopes hinreichend.

Unter Berücksichtigung der in diesem Kapitel diskutierten Bedeutung der Präsentation eines für die Affinität allosterischer Modulatoren essentiellen Epitopes in der natürlichen Umgebung seines Rezeptors scheint die Untersuchung eines Affinitätsverlustes durch „loss of function“-Mutationen wesentlich aussagekräftiger zu sein als die Untersuchung eines Affinitätsgewinnes mittels „gain of function“-Mutationen.

Wie zu Beginn des Kapitels erwähnt, untersuchten Jöhren und Höltje (2002) an dem von ihnen vorgestellten dreidimensionalen Modell des NMS-besetzten M₂-Rezeptors „loss of function“-Mutationen dieses Rezeptors und erhielten Befunde, die mit den Ergebnissen aus entsprechenden Radioligandbindungsstudien übereinstimmten (Voigtländer et al., 2003). Demzufolge wurde dieses 3D-Modell der im folgenden Kapitel geschilderten Interpretation der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Befunde zur Epitop-Abhängigkeit allosterischer Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ zugrunde gelegt.

4.4 Überlegungen zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen allosterischer Modulatoren basierend auf Radioligandbindungsstudien zur Epitop-Abhängigkeit sowie auf dem 3D-Modell des M₂-Rezeptors

4.4.1 Erörterung der am [³H]NMS-besetzten Rezeptor erhobenen Befunde

4.4.1.1 Erkenntnisse zur M₂/M₅-Selektivität

Die in Kapitel 4.1 bereits angesprochenen Moleküldynamiksimulationen an dem dreidimensionalen Modell des NMS-besetzten M₂-Rezeptors (Jöhren und Höltje, 2002) zeigten für den Prototyp-Modulator W84, dass seine Interaktion mit den Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin über die Phthalimidgruppe einer Molekülhälfte erfolgt (Voigtländer et al., 2003). Dabei beruht die Interaktion der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin mit dem Prototyp-Modulator auf π - π -Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Ring des Tyrosinrestes und dem aromatischen Ring der Phthalimidgruppe der dem Tyrosin zugewandten Molekülhälfte des allosterischen Modulators. Die Aminosäure M₂⁴²³Threonin interagiert hingegen auf indirekte Weise mit dem Prototyp-Modulator. M₂⁴²³Threonin richtet die benachbarten, konservierten Epitope M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan so aus, dass eine Interaktion zwischen diesen Aminosäuren und W84 ermöglicht wird. Dieser Aspekt wurde bereits in Kapitel 4.3.1 eingehend erläutert.

Eine Simulation der Bindung des methylierten Modulators CH₃,H,CH₃,H an dem 3D-Modell des NMS-besetzten M₂-Rezeptors wurde nicht durchgeführt. Da die allosterischen Modulatoren W84 und CH₃,H,CH₃,H in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten am Orthoster-besetzten muskarinischen M₂- bzw. M₅-Wildtyp-Rezeptor sowie an den untersuchten Rezeptormutanten jedoch die gleiche Abhängigkeit von den Epitopen M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin zeigten, wurde davon ausgegangen, dass auch die methylierte Verbindung über eine Molekülhälfte mit den genannten Epitopen interagiert. Die in den Kapiteln 3.4.1 und 3.4.2 dieser Arbeit dargestellten Befunde bestätigen diese Annahme wie folgt: Symmetrisch methylierte W84-Derivate - wie beispielsweise CH₃,CH₃,CH₃,CH₃ - besitzen weder in Hinblick auf die angestrebte Förderung der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung am M₂-Rezeptor noch in Bezug auf die Affinität zum Orthoster-besetzten M₂-Rezeptor einen Vorteil gegenüber dem einseitig methylierten Modulator CH₃,H,CH₃,H. Dies belegt der Vergleich der in Tab. 18 (s. 3.4.2, S. 79) aufgeführten pK_A-Werte der Modulatoren CH₃,CH₃,CH₃,CH₃ bzw. CH₃,H,CH₃,H (7,21 ± 0,11 versus 7,26 ± 0,03) sowie die Betrachtung der entsprechenden p(α-K_A)-Werte der genannten Verbindungen (7,38 versus 7,45).

Aus der mit der Methylierung einhergehenden Affinitätssteigerung des Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor gegenüber der Ausgangsverbindung W84 ist außerdem zu schließen, dass die Interaktion des methylierten Modulators mit M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin über die sich von W84 unterscheidende methylierte Molekülhälfte erfolgt. Den geschilderten Betrachtungen zufolge beruht die in diesem Kapitel dargestellte Interpretation der in Experimenten mit $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ erhobenen Befunde auf der Annahme, dass der methylierte Modulator in einer mit W84 vergleichbaren Orientierung am Orthoster-besetzten M_2 -Rezeptor bindet.

Zur Charakterisierung der Epitop-Abhängigkeit der Kooperativität (s. 3.5) sollten im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen an von Ellis et al. (1993) beschriebenen M_2/M_5 -chimären Rezeptoren durchgeführt werden. Da die in Kapitel 3.4 dieser Arbeit beschriebenen Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität die Bedeutung der Affinität allosterischer Modulatoren zum Orthoster-besetzten Rezeptor für das Auftreten der angestrebten positiven Kooperativität deutlich hervorhoben, sollten die Untersuchungen zur Epitop-Abhängigkeit der Kooperativität zunächst in Form kinetischer Experimente am Orthoster-besetzten muskarinischen Wildtyp- bzw. mutierten Rezeptor durchgeführt werden. Als Voraussetzung für die Untersuchung des Einflusses allosterischer Modulatoren auf die Dissoziationskinetik des orthosterischen Liganden [^3H]NMS an M_2/M_5 -chimären Rezeptoren mussten die für diese Experimente ausgewählten Verbindungen zunächst auf ihre M_2/M_5 -Selektivität an NMS-besetzten Muskarinrezeptoren geprüft werden. Wie in Kapitel 3.5.1 (s. S. 86 f.) dargestellt, ergaben diese Experimente, dass die untersuchten Modulatoren, die sich durch eine hohe Affinität zum M_2 -Subtyp gegenüber einer deutlich geringeren Affinität zum M_5 -Subtyp auszeichnen, eine ausgeprägte Subtypselektivität an NMS-besetzten Muskarinrezeptoren aufweisen. Durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte Affinität der untersuchten allosterischen Modulatoren vom Alkan-bisammonim-Typ zum Orthoster-besetzten M_2 -Wildtyp-Rezeptor auf die M_2 -Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin zurückzuführen ist. Da diese affinitätssteigernden Epitope in den korrespondierenden Positionen des M_5 -Rezeptors nicht vorkommen, besitzen die genannten Verbindungen eine deutlich geringere Affinität zum M_5 -Wildtyp-Rezeptor gegenüber dem M_2 -Wildtyp-Rezeptor.

Bei Betrachtung der in Tab. 20 (s. 3.5.1, S. 87) aufgeführten $pEC_{0,5,diss}$ -Werte, die als Maß für die Affinität des jeweiligen allosterischen Modulators zum [3H]NMS-besetzten Rezeptor gelten, fällt auf, dass die Subtypselektivität der methylierten Verbindung CH_3,H,CH_3,H deutlich stärker ausgeprägt ist als die entsprechende M_2/M_5 -Selektivität der Ausgangsverbindung W84. Dies wird durch die Verschiebung der $pEC_{0,5,diss}$ -Werte der in Gegenwart des jeweiligen allosterischen Modulators aufgenommenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Verzögerung der [3H]NMS-Dissoziation von M_2 - bzw. M_5 -Wildtyp-Rezeptoren veranschaulicht: der Verschiebungsfaktor in Untersuchungen mit dem Modulator CH_3,H,CH_3,H beträgt 511, wohingegen der entsprechende Faktor für W84 nur den Wert 77 annimmt.

Die ausgeprägtere Subtypselektivität des methylierten Modulators im Vergleich zum Prototyp-Modulator W84 beruht hauptsächlich auf einer mit der Methylierung einhergehenden starken Affinitätszunahme des Modulators CH_3,H,CH_3,H zum [3H]NMS-besetzten M_2 -Rezeptor. Dies fällt bei Vergleich der $pEC_{0,5,diss}$ -Werte (s. Tab. 20, 3.5.1, S. 87) für den dissoziationsverzögernden Effekt der Modulatoren CH_3,H,CH_3,H bzw. W84 am M_2 -Wildtyp-Rezeptor auf (Verschiebungsfaktor 20). Dahingegen zeigen die entsprechenden am M_5 -Wildtyp-Rezeptor erhobenen $pEC_{0,5,diss}$ -Werte, dass die beschriebene Strukturmodifikation des allosterischen Modulators an diesem Rezeptorsubtyp nur eine schwache Affinitätssteigerung von CH_3,H,CH_3,H im Vergleich zu W84 bewirkt (Verschiebungsfaktor 3).

Wie bereits zuvor erwähnt wurde, belegen die in dieser Arbeit erhobenen Befunde eindeutig, dass die M_2 -Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin für die hohe Affinität des allosterischen Modulators CH_3,H,CH_3,H wie auch des Prototyp-Modulators W84 zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor verantwortlich sind. Hinsichtlich des gegenüber W84 beobachteten Affinitätsgewinnes des methylierten Modulators zum M_2 -Rezeptor liegt deshalb die Vermutung nahe, dass die Verbindung CH_3,H,CH_3,H aufgrund ihrer Methylgruppen die für die Affinität beider Modulatoren zum Orthoster-besetzten M_2 -Rezeptor entscheidenden Epitope, M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin, besser auszunutzen vermag als der nicht methylierte Prototyp-Modulator W84. Ein Vergleich der durch den Austausch einer der Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin oder M_2^{423} Threonin bzw. durch den Austausch beider Epitope bedingten Verschiebungsfaktoren der $pEC_{0,5,diss}$ -Werte der in Gegenwart von W84 bzw. CH_3,H,CH_3,H aufgenommenen Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die Verzögerung der [3H]NMS-Dissoziation gegenüber dem M_2 -Wildtyp-Rezeptor untermauert diese Annahme. Die Substitution der Aminosäure

M_2^{177} Tyrosin durch die korrespondierende M_5 -Aminosäure Glutamin lässt die Affinität des methylierten Modulators zum Orthoster-besetzten M_2 -Wildtyp-Rezeptor um den Faktor 55 abnehmen, während die Affinität des Prototyp-Modulators bei entsprechender Mutation des M_2 -Rezeptors nur um den Faktor 17 verringert wird. Untersuchungen von CH_3,H,CH_3,H an der Punktmutante $M_2^{423}Thr \rightarrow His$ zeigen eine Verschiebung der Affinität des Modulators gegenüber dem M_2 -Wildtyp-Rezeptor um den Faktor 21, wohingegen die Affinität von W84 nur um den Faktor 7 abgesenkt wird. Die Substitution beider Epitope, M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin, lässt die Affinität von CH_3,H,CH_3,H zu der M_2 -Doppelmutante $M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln + ^{423}Thr \rightarrow His$ verglichen mit der Affinität des Modulators zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor um den Faktor 175 abnehmen. Die Affinität der Ausgangsverbindung W84 wird durch die zweifache Punktmutation hingegen um den Faktor 77 vermindert.

Der Vergleich der Verschiebungsfaktoren verdeutlicht, dass der Verlust der Epitope M_2^{177} Tyrosin und/ oder M_2^{423} Threonin die Affinität des methylierten Modulators CH_3,H,CH_3,H zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor deutlich stärker beeinflusst als die entsprechende Affinität des Prototyp-Modulators W84. Die Epitope M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin scheinen eine größere Bedeutung für die Affinität des methylierten Modulators zum M_2 -Rezeptor zu besitzen als für die entsprechende Affinität der nicht methylierten Ausgangsverbindung. Die zuvor formulierte Vermutung, dass der Modulator CH_3,H,CH_3,H aufgrund seiner Methylgruppen die entscheidenden Epitope, M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin, besser auszunutzen vermag als die nicht methylierte Ausgangsverbindung W84, wird folglich durch diesen Befund bestätigt.

Die Fragestellung, weshalb die für die Affinität der Modulatoren zum NMS-besetzten M_2 -Rezeptor essentiellen Epitope, M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin, durch die methylierte Verbindung CH_3,H,CH_3,H besser ausgenutzt werden können als durch die nicht methylierte Ausgangsverbindung W84, kann derzeit nicht abschließend beantwortet werden. Aus den in Tab. 18 (s. 3.4.2, S. 79) aufgeführten und in Kapitel 4.1 (s. S. 116 f.) bereits diskutierten Kenndaten aus Untersuchungen der Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Kooperativität anhand methylierter W84-Derivate geht hervor, dass die Affinität des Prototyp-Modulators W84 zum Orthoster-freien sowie zum -besetzten M_2 -Wildtyp-Rezeptor durch Einführung von Methylgruppen gesteigert werden kann. Offen bleibt jedoch die Frage, auf welche Weise die Methylgruppen des in dieser Arbeit eingehend untersuchten Modulators CH_3,H,CH_3,H zu einer besseren Ausnutzung der Epitope M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin und somit zu der hohen

Affinität der entsprechenden Verbindung zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor führen können. Ferner ist unbekannt, welchen Beitrag die Methylierungen von CH_3, H, CH_3, H am Phthalimidring bzw. an der Propylseitenkette separat betrachtet in Hinblick auf den durch einseitige Methylierung beider Positionen erreichten Affinitätsgewinn des Modulators verglichen mit W84 am M_2 -Wildtyp-Rezeptor leisten. Zur Klärung dieser Fragestellung müsste die Affinität der methylierten W84-Derivate CH_3, H, H, H sowie H, H, CH_3, H , die ausschließlich eine einseitige Phthalimidring- oder Seitenketten-Methylierung tragen, zu den einfach punktmutierten Rezeptoren $M_2^{177Tyr \rightarrow Gln}$, $M_2^{423Thr \rightarrow His}$, der M_2 -Doppelmutante $M_2^{177Tyr \rightarrow Gln + 423Thr \rightarrow His}$ sowie zu den Wildtyp-Rezeptoren M_2 und M_5 bestimmt werden. Ein Vergleich der Affinität der allosterischen Modulatoren CH_3, H, H, H sowie H, H, CH_3, H zu den genannten Punktmutanten und Wildtyp-Rezeptoren mit den entsprechenden Kenndaten aus Untersuchungen der Ausgangsverbindung W84 sowie des einseitig Phthalimidring- und Seitenketten-methylierten Modulators CH_3, H, CH_3, H würde vermutlich Aufschluss über die Rolle der Methylierungen in den verschiedenen Positionen geben.

4.4.1.2 Erkenntnisse zur Basisaffinität

Im Rahmen der Untersuchungen an punktmutierten M_2 -Rezeptoren wurden Experimente zur Verzögerung der [3H]NMS-Dissoziation von der Rezeptormutante $M_2^{175Glu \rightarrow Ala}$ in Gegenwart der allosterischen Modulatoren W84 bzw. CH_3, H, CH_3, H durchgeführt. M_2^{175} Glutamat stellt eine der drei negativ geladenen Aminosäuren der von Leppik et al. (1994) beschriebenen EDGE-Region, $M_2^{172-175Glu-Asp-Gly-Glu}$, in der zweiten extrazellulären Schleife des M_2 -Rezeptors dar und ist zwischen den Rezeptorsubtypen M_2 , M_3 und M_5 konserviert. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Punktmutanten - mit Ausnahme des hier genannten punktmutierten Rezeptors $M_2^{175Glu \rightarrow Ala}$ - sollten durch Austausch nicht konservierter Aminosäuren zur Untersuchung der Subtypselektivität allosterischer Modulatoren an Muskarinrezeptoren beitragen. Durch den Austausch einer konservierten Aminosäure konnte dahingegen geprüft werden, ob diese Aminosäure einen Beitrag zur Basisaffinität der in dieser Arbeit untersuchten Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ zu muskarinischen Rezeptoren leistet. Die für die Basisaffinität allosterischer Modulatoren essentiellen Rezeptorepitope müssen zu den Bereichen der Aminosäuresequenz von Muskarinrezeptoren gehören, die in den verschiedenen Rezeptorsubtypen konserviert

vorliegen. Den experimentellen Ansatz, durch Mutation konservierter Aminosäuren Einblick in die Basisaffinität allosterischer Modulatoren zu Muskarinrezeptoren zu erhalten, beschrieben bereits Leppik et al. (1994) sowie Matsui et al. (1995).

Wie aus der Schilderung der in Untersuchungen an der Punktmutante $M_2^{175}\text{Glu}\rightarrow\text{Ala}$ erhobenen Befunde (s. 3.5.4.1, Abb. 13) bereits hervorgeht, zeigte W84 eine schwach verminderte Affinität zu der Rezeptormutante $M_2^{175}\text{Glu}\rightarrow\text{Ala}$ gegenüber dem Wildtyp-Rezeptor M_2 . Der in Experimenten mit dem methylierten Modulator $\text{CH}_3\text{,H,CH}_3\text{,H}$ beobachtete Affinitätsverlust zu der beschriebenen Punktmutante gegenüber dem M_2 -Rezeptor fiel hingegen stärker aus. Der beobachtete Einfluss des Austausches der konservierten Aminosäure $M_2^{175}\text{Glutamat}$ auf die Affinität der untersuchten allosterischen Modulatoren könnte darauf hindeuten, dass diese Aminosäure ein für die Basisaffinität der Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ essentielles Epitop darstellt.

Über Hinweise auf die Bedeutung dieser Aminosäure berichteten bereits Gnagey et al. (1999) in einer Arbeit, die die Subtypselektivität der allosterischen Interaktion von Gallamin an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren untersuchte. Gnagey et al. vermuteten aufgrund ihrer Befunde, dass die von Leppik et al. (1994) gefundene Bedeutung der EDGE-Sequenz ($M_2^{172-175}\text{Glu-Asp-Gly-Glu}$) für die Bindung des Modulators Gallamin am NMS-besetzten M_2 -Rezeptor maßgeblich auf der Aminosäure $M_2^{175}\text{Glutamat}$ beruht. Experimente an M_2/M_5 -chimären Rezeptoren konnten aufgrund der Konservierung der betreffenden Aminosäure in diesen Subtypen keinen Aufschluss erbringen. Weitere Erkenntnisse zur Bedeutung des in M_2 und M_5 vorliegenden Glutamates wurden von Gnagey et al. (1999) in Experimenten an einer M_5 -Doppelmutante gewonnen, in der die beiden negativ geladenen M_5 -Aminosäuren $M_5^{181}\text{Aspartat}$ und $M_5^{182}\text{Glutamat}$ gegen die korrespondierenden neutralen M_1 -Aminosäuren Glycin und Glutamin ausgetauscht wurden. Die bereits geringe Affinität von Gallamin zum NMS-besetzten M_5 -Rezeptor wurde durch diese Mutation nochmals stark reduziert. Die Autoren sahen daraufhin die Annahme bestätigt, dass $M_2^{175}\text{Glutamat}$ bzw. in korrespondierender Position $M_5^{182}\text{Glutamat}$ ein für die Bindung von Gallamin wichtiges Epitop darstellt. Da die entsprechende Aminosäure in verschiedenen Rezeptorsubtypen konserviert vorliegt, erscheint es unwahrscheinlich, dass sie einen Beitrag zur Subtypselektivität des Modulators leistet. Eine Beteiligung an der Basisaffinität des Modulators zu Muskarinrezeptoren scheint hingegen nahezuliegen.

Ob die Aminosäure M₂¹⁷⁵Glutamat tatsächlich einen Beitrag zur Basisaffinität der in dieser Arbeit untersuchten allosterischen Modulatoren zu Muskarinrezeptoren leistet, könnte durch Untersuchungen an dem punktmutierten Rezeptor M₅¹⁸²Glu→Ala geklärt werden. Falls die konservierte Aminosäure M₂¹⁷⁵Glutamat ein für die Basisaffinität allosterischer Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ essentielles Epitop darstellt, sollte die Substitution dieser Aminosäure im M₅-Rezeptor den gleichen Einfluss auf die Affinität des untersuchten Modulators zeigen wie die Substitution der entsprechenden Aminosäure im M₂-Rezeptor. Dementsprechend müsste an der Punktmutante M₅¹⁸²Glu→Ala eine Affinitätsabnahme des allosterischen Modulators gegenüber dem M₅-Wildtyp-Rezeptor beobachtet werden können, die dem Affinitätsverlust des Modulators an der Rezeptormutante M₂¹⁷⁵Glu→Ala im Vergleich zum M₂-Wildtyp-Rezeptor entspricht. Die von Gnagey et al. (1999) beschriebenen Befunde aus Untersuchungen des allosterischen Modulators Gallamin an der M₅-Doppelmutante M₅¹⁸¹⁻¹⁸²Asp-Glu→Gly-Gln weisen darauf hin, dass die Substitution der Aminosäure M₅¹⁸²Glutamat eine entsprechende Affinitätsabnahme des allosterischen Modulators gegenüber dem M₅-Wildtyp-Rezeptor bedingen könnte.

Wie bereits in Kapitel 4.1 berichtet wurde, stellten Jöhren und Höltje (2002) ein dreidimensionales Modell des NMS-besetzten M₂-Rezeptors vor. In Anlehnung an dieses 3D-Modell äußerten Voigtländer et al. (2003) kürzlich die Vermutung, dass bestimmte in allen muskarinischen Rezeptorsubtypen konserviert vorliegende Aminosäuren eine sogenannte „Kern-Bindungsregion“ bilden. Diese „Kern-Bindungsregion“ scheint aus zwei lipophilen Bindungstaschen zu bestehen, die auch wenige polare Aminosäuren enthalten. Aus dem 3D-Modell von Jöhren und Höltje entnahmen Voigtländer et al. (2003), dass eine der Bindungstaschen von den Aminosäuren M₂¹³Alanin, ²³Valin, ²²Glutamat, ²⁶Isoleucin und ⁸⁵Valin gebildet wird, während zu der zweiten Bindungstasche die Aminosäuren M₂¹Methionin, ⁶Asparagin, ¹⁷⁰Threonin, ¹⁷¹Valin und ⁴¹⁷Isoleucin gehören.

Eine von konservierten Aminosäuren gebildete „Kern-Bindungsregion“, die allen muskarinischen Rezeptorsubtypen gemeinsam ist, wurde bereits von Ellis (1997) postuliert. Er vermutete, dass ein allosterischer Ligand aufgrund seiner Basisaffinität zu der allen Rezeptorsubtypen gemeinsamen „Kern-Bindungsregion“ an den verschiedenen Subtypen mit ähnlicher Orientierung bindet. Die bei einigen allosterischen Modulatoren beobachtete Subtyp-Selektivität wurde von Ellis durch

zusätzliche Subtyp-spezifische Bindungsstellen in Form nicht konservierter Aminosäuren erklärt, die von dem entsprechenden Modulator am jeweiligen Rezeptorsubtyp genutzt werden.

Die von Ellis (1997) dargestellten Betrachtungen sowie die von Voigtländer et al. (2003) beschriebene Interpretation des zuvor erwähnten dreidimensionalen Modells des NMS-besetzten M₂-Rezeptors ergänzen sich wie folgt: Die zu der „Kern-Bindungsregion“ gehörenden, konservierten Aminosäuren, die im Gegensatz zu der zuvor diskutierten negativ geladenen Aminosäure M₂¹⁷⁵Glutamat mehrheitlich keine Ladung aufweisen, scheinen ein den Rezeptorsubtypen M₁ bis M₅ gemeinsames, aus den genannten lipophilen Bindungstaschen mit polaren Aminosäuren bestehendes Bindungsareal zu bilden. Zu diesem Bindungsareal besitzen allosterische Modulatoren unterschiedlicher Struktur vermutlich eine vom Rezeptorsubtyp unabhängige Basisaffinität. Zukünftige Untersuchungen an Rezeptormutanten werden zeigen, ob ein für die Basisaffinität allosterischer Modulatoren zu Muskarinrezeptoren essentielles „Kern-Bindungsareal“, bestehend aus zwei von konservierten Aminosäuren gebildeten lipophilen Bindungstaschen mit wenigen polaren Aminosäuren, wie von Ellis (1997) und von Voigtländer et al. (2003) postuliert, bestätigt werden kann.

Interessant erscheint der Aspekt, dass sich frühere Untersuchungen zur Basisaffinität allosterischer Modulatoren zu muskarinischen Rezeptoren vornehmlich auf konservierte Aminosäuren mit negativer Ladung konzentrierten (Leppik et al., 1994), da bekannte Prototyp-Modulatoren wie Alcuronium, Gallamin und die Alkan-bisammonium-Verbindung W84 quartäre Stickstoff-Atome aufweisen. Nach Voigtländer et al. (2003) könnten jedoch auch konservierte Aminosäuren mit lipophilem Charakter für die Basisaffinität der Modulatoren mitverantwortlich sein. Die in den lipophilen Bindungstaschen enthaltenen polaren Aminosäuren tragen vermutlich ebenfalls zur Basisaffinität der untersuchten allosterischen Modulatoren zu Muskarinrezeptoren bei. Diese Annahme basiert auf der in Kapitel 4.3.1 (s. S. 124 f.) bereits beschriebenen Erkenntnis, dass die quartären Stickstoff-Atome allosterischer Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ in den lipophilen Bindungstaschen liegen und dort über ihre positive Ladung bevorzugt mit der negativen Ladung der Aminosäure M₂²²Glutamat bzw. mit der polaren Aminosäure M₂⁶Asparagin interagieren.

In Kapitel 4.1 (s. S. 116 f.) wurde die Beobachtung beschrieben, dass eine Förderung der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung nur durch Methylierung der dominanten

Molekülhälfte von Alkan-bisammonium-Verbindungen zu erreichen ist, während der mit der Methylierung der Modulatoren einhergehende affinitätssteigernde Effekt unabhängig von der Position der eingeführten Methylgruppen auftritt. Die Untersuchung des methylierten Modulators CH₃,H,H,CH₃ bestätigte diesen Aspekt. Die unsymmetrische Phthalimidring- und Seitenketten-Methylierung in verschiedenen Molekülhälften bewirkt eine Affinitätssteigerung der Verbindung CH₃,H,H,CH₃ zum freien sowie zum Orthosterbesetzten M₂-Rezeptor gegenüber der nicht-methylierten Ausgangsverbindung W84. Die Verbindung zeigt jedoch in Analogie zu W84 einen hemmenden Einfluss auf die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung.

Anhand des von Jöhren und Höltje (2002) beschriebenen 3D-Modells des NMS-besetzten M₂-Rezeptors konnte am Beispiel des Prototyp-Modulators W84 gezeigt werden, dass die Interaktion der in dieser Arbeit untersuchten Alkan-bisammonium-Modulatoren mit den für die M₂/M₅-Selektivität dieser Verbindungen verantwortlichen Epitopen, M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin, über eine dominante Molekülhälfte erfolgt (s. 4.1). Dementsprechend kann eine durch Methylierung der entgegengesetzten Molekülhälfte hervorgerufene Steigerung der Affinität des methylierten Modulators aufgrund der Entfernung der diese Methylierung tragenden Molekülhälfte von den für die Subtyp-Selektivität essentiellen Rezeptorepitopen M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin keine Zunahme der M₂/M₅-Selektivität bewirken. Aus dieser Betrachtung resultiert die Schlussfolgerung, dass eine durch Methylierung der nicht-dominanten Molekülhälfte bedingte Affinitätssteigerung eines allosterischen Modulators vom Alkan-bisammonium-Typ gegenüber der nicht-methylierten Ausgangsverbindung W84 auf einer Steigerung der Basisaffinität der Verbindung zu muskarinischen Acetylcholinrezeptoren beruhen müsste.

Ein allosterischer Modulator, dessen Basisaffinität zu Muskarinrezeptoren durch Methylierung seiner nicht-dominanten Molekülhälfte im Vergleich zu W84 gesteigert wurde, sollte diese Affinitätszunahme gegenüber der Ausgangsverbindung unabhängig vom betrachteten Rezeptorsubtyp zeigen. Falls es sich tatsächlich um eine Steigerung der Basisaffinität handelt, sollte die in Untersuchungen am M₂-Rezeptor festgestellte Affinitätssteigerung des methylierten Modulators CH₃,H,H,CH₃ gegenüber W84 in gleichem Maße am M₅-Rezeptor zu beobachten sein. Der Modulator CH₃,H,H,CH₃ bzw. andere W84-Derivate, die eine Affinitätszunahme gegenüber W84 aufgrund von Methylierungen der nicht-dominanten Molekülhälfte zeigen (s. 3.4.2, Tab. 18, S. 79), wurden jedoch bisher nicht am M₅-Rezeptor untersucht.

4.4.2 Erörterung der am Orthoster-freien Rezeptor erhobenen Befunde

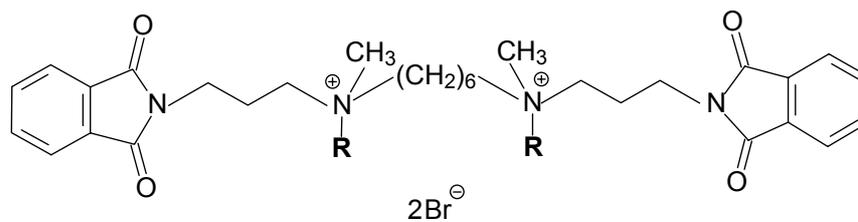
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die heterologe Interaktion des methylierten Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ mit $[\text{}^3\text{H}]\text{N}$ -Methylscopolamin an der M_2 -Doppelmutante $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ untersucht (s. 3.5.6). Die zur Orientierung durchgeführten Gleichgewichtsbindungsexperimente sollten zeigen, ob die Substitution der für die Affinität des methylierten Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ zum Orthoster-besetzten M_2 -Rezeptor essentiellen Epitope, M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin, einen Einfluss auf das Kooperativitätsverhalten dieser Verbindung am Orthoster-freien M_2 -Rezeptor zeigt. Unter entsprechenden experimentellen Bedingungen verhielt sich $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ am freien M_2 -Rezeptor neutral bis schwach positiv kooperativ mit dem orthosterischen Liganden $[\text{}^3\text{H}]\text{NMS}$ (s. 3.4.3, Tab. 19, S. 83). Die in Kapitel 3.5.6 (s. S. 111 f.) beschriebenen Befunde aus heterologen Interaktionsexperimenten verdeutlichen, dass die annähernd neutrale Kooperativität von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ mit $[\text{}^3\text{H}]\text{NMS}$ am M_2 -Wildtyp-Rezeptor durch den Austausch der Epitope M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin gegen die korrespondierenden M_5 -Aminosäuren in negative Kooperativität des Modulators an der M_2 -Doppelmutante umgewandelt wird. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen ersten Erkenntnisse zur Epitop-Abhängigkeit der Kooperativität allosterischer Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ am Orthoster-freien Muskarinrezeptor sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

Die am M_2 -Wildtyp-Rezeptor beobachtete annähernd neutrale Kooperativität des methylierten Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ mit $[\text{}^3\text{H}]\text{NMS}$ bedeutet, dass die Affinität der Verbindung zum freien Rezeptor ungefähr derjenigen zum Orthoster-besetzten M_2 -Rezeptor entspricht (s. 2.4.3.1). Das negative Kooperativitätsverhalten von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ gegenüber $[\text{}^3\text{H}]\text{NMS}$ an der M_2 -Doppelmutante veranschaulicht hingegen, dass die Affinität des Modulators zum freien Rezeptor dessen Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor bei Vorliegen der doppelten Punktmutation überwiegt. Durch die in Kapitel 3.5.5 dieser Arbeit beschriebenen Befunde aus Experimenten am Orthoster-besetzten Rezeptor ist bekannt, dass das Affinitätsniveau von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ an der M_2 -Doppelmutante durch die erfolgte Substitution der für die M_2/M_5 -Selektivität am Orthoster-besetzten Rezeptor verantwortlichen Aminosäuren, M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin, auf das am M_5 -Wildtyp-Rezeptor gemessene Niveau absinkt. Um den in Kapitel 3.5.6 geschilderten Befund der negativen Kooperativität von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ mit $[\text{}^3\text{H}]\text{NMS}$ an der M_2 -Doppelmutante $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ erklären zu können, sollte eine durch die genannten Punktmutationen bedingte Abnahme der Affinität des

Modulators zum Orthoster-freien Rezeptor - im Vergleich zu der durch die entsprechenden Mutationen hervorgerufenen Abnahme der Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor - geringer ausfallen.

Bei der in diesem Kapitel dargestellten Betrachtung der Befunde aus Untersuchungen des allosterischen Modulators CH₃,H,CH₃,H am M₂-Wildtyp-Rezeptor bzw. an der M₂-Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His muss berücksichtigt werden, dass den die Affinität des Modulators zum freien bzw. zum Orthoster-besetzten Rezeptor beschreibenden Parametern pK_A, p(α·K_A) bzw. pEC_{0,5,diss} unterschiedliche experimentelle Ansätze von Gleichgewichtsbindungs- bzw. Dissoziationsexperimenten zugrunde liegen. Die Parameter pK_A und p(α·K_A) beschreiben die Affinität des allosterischen Modulators zum freien bzw. zum Orthoster-besetzten Rezeptor, wurden jedoch beide auf der Grundlage von Gleichgewichtsbindungsexperimenten erhoben. Die Größe pEC_{0,5,diss}, die analog zu der Größe p(α·K_A) die Affinität des Modulators zum Orthoster-besetzten Rezeptor widerspiegelt, wird dahingegen in kinetischen Experimenten bestimmt.

Wie in Kapitel 2.4.3.1 (s. Gleichung 16) beschrieben, hängt die in Gleichgewichtsbindungsexperimenten gewählte Inkubationszeit von der im jeweiligen Experiment maximalen eingesetzten Konzentration des allosterischen Modulators ab. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten heterologen Interaktionsexperimenten am M₂-Wildtyp-Rezeptor sowie an der M₂-Doppelmutante unterlag der die Testsubstanz enthaltende Versuchsansatz einer Inkubationszeit von 26 h bzw. 25 h. Schulz (1998) untersuchte die Stabilität des Prototyp-Modulators W84 sowie des W84-Derivates tetra-W84. Die folgende Abbildung (Abb. 21) zeigt die Strukturformeln von W84 sowie von tetra-W84.



W84: R = CH₃

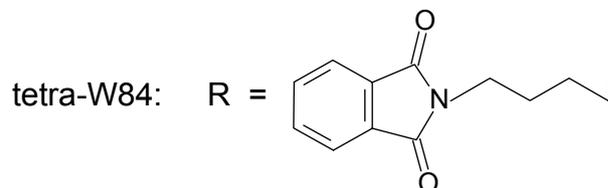


Abb. 21: Darstellung des Prototyp-Modulators W84 sowie des von W84 abgeleiteten allosterischen Modulators tetra-W84.

Schulz (1998) fand in Abhängigkeit von der Struktur des Modulators deutliche Unterschiede in den gemessenen Halbwertszeiten der Zersetzungsreaktion. Ferner hing die Halbwertszeit des Abbaus eines Modulators von dem verwendeten Inkubationsmedium sowie der Anwesenheit von Membransuspension ab. Die von Schulz beschriebene Halbwertszeit der Zersetzungsreaktion von W84 in Na,K,P_i-Puffer nach Zugabe der Membransuspension betrug 11 h. Die Untersuchung des W84-Derivates tetra-W84 unter gleichen experimentellen Bedingungen ergab eine Halbwertszeit der Zersetzung von 32 h. Da die Geschwindigkeiten der Zersetzungsreaktion der sich in der Anzahl der Phthalimidsubstituenten unterscheidenden untersuchten Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ deutlich voneinander abwichen, konnte von den beschriebenen Daten kein Rückschluss auf die Halbwertszeit des Abbaus des methylierten W84-Derivates CH₃,H,CH₃,H gezogen werden. Allerdings wurde aufgrund des geringen strukturellen Unterschiedes zwischen W84 und seinem methylierten Derivat angenommen, dass CH₃,H,CH₃,H eine Zersetzung im Rahmen der für W84 gemessenen Halbwertszeit erfahren würde.

Basierend auf den hier geschilderten Betrachtungen muss davon ausgegangen werden, dass der allosterische Modulator CH₃,H,CH₃,H im Verlauf der 25- bis 26-stündigen Inkubationszeit der in Kapitel 3.5.6 (s. S. 111 f.) beschriebenen heterologen Interaktionsexperimente an der M₂-Doppelmutante bzw. am M₂-Wildtyp-Rezeptor einen nicht vernachlässigbaren Substanzabbau erfährt. Eine Quantifizierung dieses Substanzabbaus wäre nur in Kenntnis der Halbwertszeit der Zersetzung von CH₃,H,CH₃,H unter den entsprechenden Versuchsbedingungen möglich. In heterologen

Interaktionsexperimenten führt eine im Vergleich zu der angenommenen Modulator-Konzentration deutlich verringerte, tatsächlich nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeit noch vorliegende Konzentration der Testsubstanz zu einem falsch niedrigen pK_A -Wert. Gleichermäßen fehlerbehaftet ist dementsprechend die die Affinität des Modulators zum Orthoster-besetzten Rezeptor widerspiegelnde Größe $p(\alpha \cdot K_A)$, in deren Berechnung der infolge des Abbaus der Testsubstanz verfälschte K_A -Wert aus Gleichgewichtsbindungsexperimenten einfließt. In Dissoziationsexperimenten entfällt die lange Inkubationszeit zur Einstellung des Bindungsgleichgewichtes. Der allosterische Modulator erfährt keine entsprechende Zersetzung, so dass der aus diesem experimentellen Ansatz resultierende $pEC_{0,5,diss}$ -Wert als unverfälscht angesehen werden kann.

Aus den zuvor geschilderten Überlegungen bezüglich des Einflusses der Zersetzung des allosterischen Modulators CH_3,H,CH_3,H während der Inkubationszeit von Gleichgewichtsbindungsexperimenten auf die in diesen Experimenten erhobenen pK_A - und $p(\alpha \cdot K_A)$ -Werte geht hervor, dass die Kenntnis der Halbwertszeit der Zersetzung eines Modulators von zentraler Bedeutung für die Interpretation der in Gegenwart dieses Modulators erhobenen Kenndaten ist. Folglich sollte die Bestimmung der Halbwertszeit der Zersetzung eines allosterischen Modulators unter den entsprechenden experimentellen Bedingungen zukünftig in die Charakterisierung einer Verbindung miteinbezogen werden.

Unter Berücksichtigung der von Schulz (1998) aufgezeigten Zersetzung allosterischer Modulatoren in Abhängigkeit von der Länge der Inkubationszeit sollen im Folgenden die Befunde aus Untersuchungen des allosterischen Modulators CH_3,H,CH_3,H am M_2 -Wildtyp-Rezeptor bzw. an der M_2 -Doppelmutante $M_2^{177Tyr \rightarrow Gln + 423Thr \rightarrow His}$ näher betrachtet werden. Die folgende Tabelle (Tab. 25) stellt die pK_A -Werte, die die Affinität des allosterischen Modulators CH_3,H,CH_3,H zum Orthoster-freien M_2 -Wildtyp-Rezeptor bzw. zur M_2 -Doppelmutante $M_2^{177Tyr \rightarrow Gln + 423Thr \rightarrow His}$ beschreiben, den $p(\alpha \cdot K_A)$ -Werten sowie $pEC_{0,5,diss}$ -Werten gegenüber, durch die die Affinität von CH_3,H,CH_3,H zu den entsprechenden Orthoster-besetzten Rezeptoren veranschaulicht wird. Die angegebenen pK_A -, $p(\alpha \cdot K_A)$ - und $pEC_{0,5,diss}$ -Werte wurden in Gleichgewichtsbindungs- bzw. Dissoziationsexperimenten an den genannten Rezeptoren unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen erhoben. Ferner sind in Tab. 25 Verschiebungsfaktoren

aufgeführt, die aus den entsprechenden entlogarithmierten K_A - bzw. $EC_{0,5,diss}$ -Werten berechnet wurden.

	pK_A	$p(\alpha \cdot K_A)$	$pEC_{0,5,diss}$
M₂ wt	8,07 ± 0,15	8,18 ± 0,15	8,74 ± 0,08
M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His	6,09 ± 0,16	n.b.	6,49 ± 0,12
Verschiebungsfaktor	95	-	175

Tab. 25: Gegenüberstellung der in dieser Arbeit ermittelten pK_A -, $p(\alpha \cdot K_A)$ - und $pEC_{0,5,diss}$ -Werte des allosterischen Modulators CH₃,H,CH₃,H aus heterologen Interaktions- bzw. Dissoziationsexperimenten am M₂-Wildtyp (wt)-Rezeptor sowie an der M₂-Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His. Die aufgeführten Verschiebungsfaktoren wurden aus den entlogarithmierten K_A - bzw. $EC_{0,5,diss}$ -Werten berechnet.

n.b.: Dieser Wert konnte nicht korrekt bestimmt werden. Zur näheren Erläuterung siehe Text.

Die in Tab. 25 aufgeführten Kenndaten zur Affinität zum [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptor, $p(\alpha \cdot K_A)$ und $pEC_{0,5,diss}$, zeigen die zuvor geschilderte Diskrepanz zwischen den experimentellen Ansätzen von Gleichgewichtsbindungs- bzw. Dissoziationsexperimenten. Der während der 26-stündigen Inkubationszeit fortschreitende Substanzabbau zeigt sich darin, dass der in diesen Experimenten erhobene Wert $p(\alpha \cdot K_A)$ des Modulators CH₃,H,CH₃,H am M₂-Wildtyp-Rezeptor deutlich unterhalb des in kinetischen Experimenten ohne entsprechende Inkubationszeit bestimmten $pEC_{0,5,diss}$ -wertes liegt. Der statistisch signifikante Unterschied zwischen den Größen $pEC_{0,5,diss}$ und $p(\alpha \cdot K_A)$, die beide die Affinität des methylierten Modulators zum Orthoster-besetzten M₂-Rezeptor widerspiegeln, veranschaulicht, dass ein Vergleich von Kenndaten aus den verschiedenen Versuchsansätzen aufgrund der stark abweichenden Inkubationszeiten nicht möglich ist.

Die Parameter pK_A und $p(\alpha \cdot K_A)$, die auf der Basis von heterologen Interaktionsexperimenten am M₂-Rezeptor mit 26-stündiger Inkubationszeit ermittelt wurden, sind infolge der mutmaßlichen Zersetzung der Testsubstanz innerhalb der Inkubationsphase wahrscheinlich gleichermaßen fehlerbehaftet. Ein somit zulässiger Vergleich dieser beiden Werte ergibt keinen signifikanten Unterschied zwischen pK_A

und $p(\alpha \cdot K_A)$. Dies steht in Einklang mit der am M_2 -Rezeptor beobachteten annähernd neutralen Kooperativität des methylierten Modulators mit [^3H]NMS.

$p(\alpha \cdot K_A)$ von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ an der M_2 -Doppelmutante konnte wegen der starken [^3H]NMS-Bindungshemmung nicht sicher bestimmt werden. Rein rechnerisch ergab sich ein Wert für $p(\alpha \cdot K_A)$ von $3,67 \pm 1,56$ (Mittelwert \pm Standardfehler), dessen Streuung auf stark variierende, hohe Einzelwerte für α zurückzuführen ist. Dies lässt keine sichere Quantifizierung der Affinität des untersuchten allosterischen Modulators zu der Orthoster-besetzten M_2 -Doppelmutante zu. Die hohen α -Werte zeigen aber, dass die Bildung ternärer Komplexe aus dem allosterischen Modulator, dem orthosterischen Liganden und der Rezeptormutante erst in sehr hohen Konzentrationen des Modulators erfolgt.

Der als Folge des Austausches der Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin zu beobachtende Wechsel im Kooperativitätsverhalten von neutral nach negativ kann anhand des unterschiedlich stark ausgeprägten Einflusses der beschriebenen Punktmutationen auf die Affinität des Modulators zum Orthoster-freien bzw. -besetzten Rezeptor nachvollzogen werden. Hierzu dienen die in Tab. 25 (s. S. 145) aufgeführten Verschiebungsfaktoren. Der Einfluss des Austausches der Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin auf die Affinität des methylierten Modulators zum freien Rezeptor lässt sich durch den Faktor 95 quantifizieren. Die die Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor widerspiegelnden $\text{EC}_{0,5, \text{diss}}$ -Werte von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ am M_2 -Wildtyp-Rezeptor bzw. an der M_2 -Doppelmutante zeigen einen Verschiebungsfaktor von 175. Anhand der genannten Verschiebungsfaktoren wird deutlich, dass der Verlust der Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin die Affinität von $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ zum Orthoster-besetzten M_2 -Rezeptor stärker absinken lässt als die Affinität des Modulators zum freien M_2 -Rezeptor. Der Vergleich der Verschiebungsfaktoren erklärt somit den Wechsel von der neutralen Kooperativität des Modulators $\text{CH}_3, \text{H}, \text{CH}_3, \text{H}$ mit [^3H]NMS am M_2 -Wildtyp-Rezeptor zu der negativen Kooperativität an der M_2 -Doppelmutante.

Ein dreidimensionales Modell des Orthoster-freien Muskarinrezeptors vom Subtyp M_2 wurde bisher nicht erstellt. Eine konkrete Vorstellung von der Topographie der Bindungstaschen der in dieser Arbeit untersuchten allosterischen Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ in binären Komplexen mit dem freien M_2 -Rezeptor konnte dementsprechend bisher nicht entwickelt werden.

Hinsichtlich der für die Affinität des untersuchten Modulators CH₃,H,CH₃,H zum Orthoster-freien bzw. -besetzten Rezeptor essentiellen Epitope des M₂-Wildtyp-Rezeptors können aus den dargestellten Befunden folgende Schlussfolgerungen gezogen werden: Die als Folge des Austausches der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin beobachtete Abnahme der Affinität des Modulators CH₃,H,CH₃,H zum freien Rezeptor bestätigt, dass das Paar der genannten Epitope, das die M₂/M₅-Selektivität von CH₃,H,CH₃,H am NMS-besetzten Muskarinrezeptor vollständig erklärt, auch für die Affinität der Verbindung zum freien Rezeptor eine entscheidende Rolle spielt. Diesen Aspekt beschrieben Voigtländer et al. (2003) auch für andere allosterische Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ (W84 und DMW) sowie für Caracurin V-Derivate.

Zur Untersuchung der Epitop-Abhängigkeit des allosterischen Modulators CH₃,H,CH₃,H am freien M₂-Rezeptor wurden im Rahmen dieser Arbeit orientierende Gleichgewichtsbindungsexperimente am M₂-Wildtyp-Rezeptor sowie an der M₂-Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His, nicht jedoch an den einfach punktmutierten Rezeptoren M₂¹⁷⁷Tyr→Gln bzw. M₂⁴²³Thr→His durchgeführt. Voigtländer (2003) untersuchte den Modulator CH₃,H,CH₃,H in heterologen Interaktionsexperimenten auch an den einfach punktmutierten Rezeptoren M₂¹⁷⁷Tyr→Gln und M₂⁴²³Thr→His. Bisher nicht veröffentlichte Befunde aus ersten orientierenden Untersuchungen von Voigtländer (2003) deuten darauf hin, dass die Aminosäure M₂⁴²³Threonin ein für die Affinität von CH₃,H,CH₃,H zum freien M₂-Rezeptor essentielles Epitop darstellt, wohingegen M₂¹⁷⁷Tyrosin hinsichtlich der Affinität des Modulators zum freien M₂-Rezeptor anscheinend eine untergeordnete Rolle spielt. Auf der Basis der vorliegenden Befunde kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der M₂-Rezeptor neben der Aminosäure M₂⁴²³Threonin ein weiteres - von M₂¹⁷⁷Tyrosin verschiedenes - Epitop besitzt, das für die Affinität von CH₃,H,CH₃,H zum freien M₂-Rezeptor mitverantwortlich ist.

Werden die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Bedeutung der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin für die Affinität des allosterischen Modulators CH₃,H,CH₃,H zum Orthoster-besetzten bzw. freien M₂-Rezeptor im Zusammenhang mit den von Voigtländer (2003) mitgeteilten Befunden betrachtet, entwickelt sich folgende Vorstellung: Die Aminosäure M₂⁴²³Threonin scheint für die Affinität des methylierten Modulators CH₃,H,CH₃,H zum freien und NMS-besetzten M₂-Rezeptor in gleichem Maße essentiell zu sein. Dementsprechend zeigt die Substitution

dieses Epitopes keinen Einfluss auf die am M₂-Wildtyp-Rezeptor beobachtete neutrale Kooperativität des Modulators mit [³H]NMS. Aus den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur M₂/M₅-Selektivität von CH₃,H,CH₃,H am NMS-besetzten Muskarinrezeptor ist bekannt, dass die Substitution der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin zu einer stärkeren Abnahme der Affinität des Modulators zum besetzten M₂-Rezeptor führt als der Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin (s. 3.5.5, Abb. 15, S. 106). Da M₂¹⁷⁷Tyrosin jedoch keinen nennenswerten Einfluss auf die Affinität von CH₃,H,CH₃,H zum freien M₂-Rezeptor zu haben scheint, zeigte der Modulator in jüngsten Untersuchungen von Voigtländer (2003) an der Punktmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln negative Kooperativität mit [³H]NMS. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin für den Wechsel von der am M₂-Wildtyp-Rezeptor beobachteten neutralen Kooperativität des Modulators CH₃,H,CH₃,H mit [³H]NMS zu der negativen Kooperativität dieser Liganden an der M₂-Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²³Thr→His verantwortlich ist.

5 Zusammenfassung

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und besitzen neben der orthosterischen Bindungsstelle für konventionelle Liganden wie Acetylcholin oder *N*-Methylscopolamin eine zweite, allosterische Bindungsstelle. Über diese können Muskarinrezeptoren aller fünf Subtypen allosterisch moduliert werden. Einen Prototyp-Modulator stellt die Alkan-bisammonium-Verbindung W84 [N,N'-Bis[3-(1,3-dihydro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)propyl]-N,N,N',N'-tetramethyl-1,6-hexan-diammoniumdibromid] dar. Vorangegangene Untersuchungen ergaben, dass die Affinität von W84 zu Muskarinrezeptoren durch strukturelle Abwandlung dieser Verbindung deutlich gesteigert werden kann. Es gelang jedoch nicht, den hemmenden Einfluss von W84 auf die Bindung eines orthosterischen Liganden (negative Kooperativität) in eine allosterische Bindungsförderung (positive Kooperativität) zu überführen.

In der vorliegenden Arbeit wurden neue Alkan-bisammonium-Verbindungen mit bisher nicht vorhandenen Strukturmodifikationen hinsichtlich ihres Potentials zur allosterischen Förderung der Ligandbindung an Muskarinrezeptoren untersucht. Die ausgewählten allosterischen Testsubstanzen wiesen eine Phthalimidopropyl-substituierte Hexan-bisammonium-Struktur auf, die durch symmetrische bzw. unsymmetrische Methylierung des Phthalimidringes und/ oder der Propylseitenkette variiert wurde. Es wurden Radioligandbindungsexperimente mit dem orthosterischen Liganden [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS) an M₂-Rezeptoren in Membransuspensionen aus Herzventrikelgewebe vom Hausschwein durchgeführt (Mg, Tris, Cl, P_i-Puffer: 3,6 mM MgHPO₄ × 3 H₂O, 50 mM Tris-HCl; pH 7,3; 37°C). In kinetischen Experimenten (Dissoziationsexperimente) wurde die allosterische Verzögerung der Dissoziation von [³H]NMS-Rezeptor-Komplexen untersucht. Der in diesen Experimenten ermittelte pEC_{0,5,diss}-Wert diente als Maß für die Affinität des allosterischen Modulators zum Orthoster-besetzten Muskarinrezeptor. In Gleichgewichtsbindungsexperimenten wurden die Kenngröße pK_A, die die Affinität des Modulators zum freien Rezeptor beschreibt, sowie der Kooperativitätsfaktor α der allosterischen Interaktion zwischen dem Modulator und dem orthosterischen Liganden [³H]NMS bestimmt. Aus diesen Experimenten wurde ferner die Kenngröße p($\alpha \cdot K_A$) abgeleitet, die als Maß für die Affinität zum Orthoster-besetzten Rezeptor gilt.

Erste orientierende Untersuchungen zeigten, dass einige methylierte Alkan-bisammonium-Verbindungen die Fähigkeit besitzen, die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS zu erhöhen. Ausgewählte, in den Positionen der Phthalimidgruppe und/ oder der Propylseitenkette systematisch unterschiedlich methylierte W84-Derivate wurden zur näheren Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen herangezogen.

Es konnte gezeigt werden, dass positive Kooperativität zwischen den Modulatoren und [³H]NMS mit einer bevorzugten Steigerung der Affinität der Modulatoren zum Orthoster-besetzten M₂-Rezeptor gegenüber einer schwächer ausgeprägten Zunahme der Affinität zum freien M₂-Rezeptor einhergeht. Die Optimierung der Affinitäten der allosterischen Modulatoren zugunsten der Affinität zum Orthoster-besetzten M₂-Rezeptor hängt dabei streng von der Position der Methylierung der betreffenden Verbindung ab. Die negative Kooperativität der nicht methylierten Ausgangsverbindung W84 mit [³H]NMS kann durch kombinierte Phthalimidring- und Seitenketten-Methylierung in nur einer Molekülhälfte des Modulators in positive Kooperativität umgewandelt werden. Eine unabdingbare Voraussetzung für positive Kooperativität scheint die Seitenketten-Methylierung zu sein, denn die alleinige Phthalimidring-Methylierung erhöht zwar die Affinität, lässt aber die negative Kooperativität unverändert. Eine zusätzliche Methylierung der anderen Molekülhälfte besitzt hinsichtlich der allosterischen Förderung der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung keinen zusätzlichen Effekt. Die Methylierung der anderen Molekülhälfte erhöht allerdings das Affinitätsniveau der Interaktion mit dem M₂-Rezeptor.

Als nächstes sollte die Frage geklärt werden, ob die mit [³H]NMS positiv bzw. neutral kooperativen methylierten Alkan-bisammonium-Verbindungen eine gegenüber dem negativ kooperativen Prototyp-Modulator W84 veränderte Abhängigkeit von essentiellen Rezeptorepitopen aufweisen. Diese Untersuchungen wurden an transient in COS 7-Zellen exprimierten humanen Wildtyp- bzw. mutierten Muskarinrezeptoren durchgeführt (Na,K,P_i-Puffer: 4 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄; pH 7,4; 23°C). Der in einer Molekülhälfte Phthalimidring- und Seitenketten-methylierte allosterische Modulator, der in Experimenten an seinen M₂-Rezeptoren in Mg,Tris,Cl,P_i-Puffer sowie in Na,K,P_i-Puffer positive Kooperativität mit [³H]NMS gezeigt hatte, erwies sich an den humanen M₂-Rezeptoren in Na,K,P_i-Puffer als annähernd neutral kooperativ mit diesem orthosterischen Liganden. Das Kooperativitätsverhalten des methylierten Modulators war dementsprechend von der in beiden Puffersystemen beobachteten negativen

Kooperativität zwischen dem Prototyp-Modulator W84 und [^3H]NMS verschieden. In Dissoziationsexperimenten mit [^3H]NMS an M_2/M_5 -chimären sowie punktmutierten Muskarinrezeptoren konnte die Aminosäure M_2^{177} Tyrosin als das zweite (neben der aus vorangegangenen Untersuchungen bereits bekannten Aminosäure M_2^{423} Threonin) für die M_2/M_5 -Selektivität der untersuchten Modulatoren essentielle Epitop identifiziert werden. Diese beiden Aminosäuren tragen alleine die M_2/M_5 -Selektivität am Orthoster-besetzten Rezeptor sowohl der methylierten Verbindung als auch der Muttersubstanz W84.

Nachfolgende Gleichgewichtsbindungsexperimente zeigten, dass die am M_2 -Wildtyp-Rezeptor beobachtete annähernd neutrale Kooperativität des methylierten allosterischen Modulators mit [^3H]NMS durch Austausch des Aminosäure-Paares M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin gegen die korrespondierenden M_5 -Aminosäuren in negative Kooperativität umgewandelt wird. Dieser Befund verdeutlicht, dass dieses Aminosäure-Paar einen Einfluss auf die M_2/M_5 -Selektivität der Kooperativität des methylierten Modulators mit [^3H]NMS besitzt.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit erstmalig gezeigt werden, dass allosterische Modulatoren vom Alkan-bisammonium-Typ die Gleichgewichtsbindung eines orthosterischen Liganden am muskarinischen M_2 -Rezeptor zu fördern vermögen, wenn sie das Strukturelement der Seitenketten-Methylierung enthalten. Diese Strukturvariation verändert jedoch nicht die Abhängigkeit von den beiden essentiellen Rezeptorepitopen, M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin. Aus der Interaktion mit diesen Epitopen kann anscheinend ein solcher Affinitätsgewinn gezogen werden, dass negative in positive Kooperativität übergeht.

6 Literaturverzeichnis

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

Bennett JP and Yamamura HI (1985) Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding methods. *Neurotransmitter receptor binding (2nd ed.)*, edited by Yamamura HI et al., Raven Press, New York, 61-89

Birdsall NJ, Farries T, Gharagozloo P, Kobayashi S, Kuonen D, Lazareno S, Popham A, and Sugimoto M (1997) Selective allosteric enhancement of the binding and actions of acetylcholine at muscarinic receptor subtypes. *Life Sci* **60**:1047-1052

Birdsall NJM, Nathanson NM, and Schwarz RD (2001) Muscarinic receptors: it's a knockout. *Trends Pharmacol Sci* **22**:215-219

Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, and Brann MR (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* **237**:527-532

Bonner TI, Young AC, Brann MR, and Buckley NJ (1988) Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* **1**:403-410

Buller S (2002) Identifizierung von Rezeptorepitopen für die Subtyp-selektive Interaktion allosterischer Modulatoren mit muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren anhand von Mutagenese-Untersuchungen. Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn

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

Burgmer U (1997) Effekte kationischer Pufferkomponenten auf die Wirkung allosterischer Modulatoren an kardialen Muskarinrezeptoren. Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn

Chen C and Okayama H (1988) Calcium phosphate-mediated gene transfer: A highly efficient system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Bio Techniques* **6**:632-638

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

Christopoulos A and Kenakin T (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* **54**:323-374

- Daiss JO, Duda-Johner S, Burschka C, Holzgrabe U, Mohr K, and Tacke R (2002) N⁺/Si replacement as a tool for probing the pharmacophore of allosteric modulators of muscarinic M₂ receptors: synthesis, allosteric potency, and positive cooperativity of silicon-based W84 derivatives. *Organometallics* **21**:803-811
- 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
- Dittmann A (2003) Persönliche Mitteilung
- Dörje F, Wess J, Lambrecht G, Tacke R, Mutschler E, and Brann MR (1990) Antagonist binding profiles of five cloned human muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **256**:727-733
- Dörje F, Levey AI, and Brann MR (1991) Immunological detection of muscarinic receptor subtype proteins (m1-m5) in rabbit peripheral tissues. *Mol Pharmacol* **40**:459-462
- Duda-Johner S (2002) Neuartige Silicium-haltige allosterische Modulatoren als hochpotente, atypische Förderer der Gleichgewichtsbindung eines orthosterischen Liganden an muskarinischen M₂-Acetylcholin-Rezeptoren. Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn
- Eglen RM, Choppin A, and Watson N (2001) Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research. *Trends Pharmacol Sci* **22**:409-414
- 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 JH, and Brann MR (1991) Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* **42**:1927-1932
- 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 Dev Res* **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
- Felder CC, Bymaster FP, Ward J, and DeLapp N (2000) Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. *J Med Chem* **43**:4333-4353
- Gavish M, Bachman I, Shoukrun R, Katz Y, Veenman L, Weisinger G, and Weizman A (1999) Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol Rev* **51**:629-650
- Gluzman Y (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**:175-182

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

Hill AV (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol (Proc)* **40**:iv-vii

Holzgrabe U und Mohr K (1998) Allosteric modulators of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors. *Drug Discovery Today* **3**:214-222

Hulme EC, Birdsall NJ, and Buckley NJ (1990) Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**:633-673

IUPHAR Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification (1998) The IUPHAR compendium of receptor characterization and classification. IUPHAR Media, London:37-45

Jöhren K and Höltje HD (2002) A model of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor. *J Comp Aid Mol Des* **16**:795-801

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

Kostenis E and Mohr K (1996b) Kostenis and Mohr reply: Composite action of allosteric modulators on ligand binding. *Trends Pharmacol Sci* **17**:443-444

Krejčí A and Tuček S (2002) Quantitation of mRNAs for M₁ to M₅ subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. *Mol Pharmacol* **61**:1267-1272

Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, and Numa S (1986) Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **323**: 411-416

Kukuruzinska MA and Lennon K (1998) Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance. *Crit Rev Oral Biol Med* **9**:415-48

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

Leppik RA, Miller RC, Eck M, and Paquet JL (1994) Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m₂ muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* **45**:983-990

Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, and Brann MR (1991) Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* **11**:3218-3226

- 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 action of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *Eur J Pharmacol* **6**:241-247
- MacArthur MW and Thornton JM (1991) Influence of proline residues on protein conformation. *J Mol Biol* **218**:397-412
- Matsui H, Lazareno S, and Birdsall NJ (1995) Probing of the location of the allosteric site on m1 muscarinic receptors by site-directed mutagenesis. *Mol Pharmacol* **47**:88-98
- Mies-Klomfaß E (1997) Suche nach einem potentiellen Radioliganden zur Markierung der allosterischen Bindungsstelle am muskarinischen Acetylcholin-Rezeptor vom Subtyp M₂. Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn
- Motulsky H (1995) Intuitive Biostatistics, 1st ed. Oxford University Press, Inc., New York
- Mutschler E, Moser U, Wess J, and Lambrecht G (1995) Muscarinic receptor subtypes - pharmacological, molecular biological and therapeutical aspects. *Pharmaceutica Acta Helveticae* **69**:243-258
- Okayama H and Berg P (1983) A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **3**:280-289
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: a G Protein-coupled receptor. *Science* **289**:739-745
- Pfeiffer CC (1956) Optical isomerism and pharmacological action, a generalisation. *Science* **124**:19-31
- Raasch A, Scharfenstein O, Tränkle C, Holzgrabe U, and Mohr K (2002) Elevation of ligand binding to muscarinic M₂ acetylcholine receptors by bis(ammonio)alkane-type allosteric modulators. *J Med Chem* **45**:3809-3812
- Raju TS, Briggs JB, Borge SM, and Jones AJ (2000) Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* **10**:477-486
- Sanger F, Nicklen S, and Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:5463-5467
- Scatchard G (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**:660-666

- Scharfenstein O (2000) Allosterische Modulatoren des muskarinischen M₂-Acetylcholinrezeptors – Variationen in den Seitenketten der Leitstruktur W84. Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn
- Schulz U (1998) Antagonismus-Untersuchungen zur Topographie der Bindung allosterischer Modulatoren an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren des Subtyps M₂. Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn
- Tabete Frunjang G (2002) Persönliche Mitteilung
- 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, Mies-Klomfass E, Botero Cid MH, Holzgrabe U, and Mohr K (1998) Identification of a [³H]ligand for the common allosteric site of muscarinic acetylcholine M₂ receptors. *Mol Pharmacol* **54**:139-145
- Tränkle C and Mohr K (1997) Divergent modes of action among cationic allosteric modulators of muscarinic M₂ receptors. *Mol Pharmacol* **51**:674-682
- Tuček S and Proška J (1995) Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* **16**:205-212
- Tuček S, Musílková J, Nedoma J, Proška J, Shelnikov S, and Vorlíček J (1990) Positive cooperativity in the binding of alcuronium and N-methylscopolamine to muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **38**:674-680
- van Koppen CJ and Nathanson NM (1990) Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function. *J Biol Chem* **265**:20887-20892
- Voigtländer U (2003) Persönliche Mitteilung
- 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
- Wess J, Gdula D, and Brann MR (1992) Structural basis of the subtype selectivity of muscarinic antagonists: A study with chimeric m2/m5 muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **41**:369-374
- Wess J (1993) Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci* **14**:308-313
- Wess J (1996) Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Neurobiology* **10**:69-99

7 Veröffentlichungen

7.1 Wissenschaftliche Originalarbeiten

Raasch A, Scharfenstein O, Tränkle C, Holzgrabe U, and Mohr K (2002) Elevation of ligand binding to muscarinic M₂ acetylcholine receptors by bis(ammonio)alkane-type allosteric modulators. *J Med Chem* **45**:3809-3812

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

7.2 Abstrakta/ Kongressmitteilungen

Raasch A, Scharfenstein O, Mies-Klomfaß E, Tränkle C, Holzgrabe U, and Mohr K (2000) Elevation of the muscarinic allosteric potency of alkane-bis-ammonium-type modulators by propyl chain methylation. *Arch Pharm Pharm Med Chem* **333** (suppl 2): 74, P 4.14

Raasch A, Scharfenstein O, Tränkle C, Holzgrabe U, and Mohr K (2001) Allosteric elevation of ligand binding to muscarinic M₂ receptors by alkane-bis-ammonium-type modulators. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **363** (suppl):84, R24

Mohr K, Raasch A, Scharfenstein O, Buller S, Tränkle C, and Holzgrabe U (2001) Allosteric modulation of ligand binding to G protein-coupled receptors – principles and perspectives. *Arch Pharm Pharm Med Chem* **334** (suppl 2):7, 1

Duda-Johner S, Daiß J, Raasch A, Tränkle C, Tacke R, Holzgrabe U, and Mohr K (2001) Switching the allosteric action of W84-type agents on muscarinic ligand binding from negative to positive cooperativity by an N⁺/Si exchange. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **363** (suppl):88, R25

Balatková E, Muth M, Bender W, Scharfenstein O, Raasch A, Tränkle C, Mohr K, and Holzgrabe U (2002) Elevation of ligand binding to muscarinic M₂ acetylcholine receptors by bis(ammonio)alkane-type allosteric modulators. *Drugs Fut 2002*, **27**(suppl A):XVIIth Int. Symp. on Medicinal Chemistry P290

Voigtländer U, Raasch A, Buller S, Ellis J, and Mohr K (2002) Role of the EDGE motif in the second extracellular loop of the muscarinic M₂ receptor for the M₂/M₅ selectivity of alkane-bisammonium type allosteric modulators. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **365**:78, R23

Voigtländer U, Raasch A, Buller S, Ellis J, and Mohr K (2002) Two amino acids fully account for the M₂/M₅ selectivity of a class of allosteric ligands at muscarinic receptors. *Arch Pharm Pharm Med Chem* **335** (suppl 1):134

Voigtländer U, Raasch A, Buller S, Tränkle C, Ellis J, and Mohr K (2003) The M₂/M₅ selectivity of caracurine V type allosteric modulators can be attributed to two specific amino acids. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **367** (suppl 1):91