

KOOPERATIVE INTERAKTIONEN AN
MUSKARINISCHEN ACETYLCHOLINREZEPTOREN:
SUCHE NACH ESSENTIELLEN AMINOSÄUREN DER
ALLOSTERISCHEN BINDUNGSSTELLE VON
M₂-REZEPTOREN

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Uta Voigtländer

aus

Halle/Saale

Bonn 2003

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

1. Referent: Prof. Dr. med. Klaus Mohr
2. Referent: Prof. Dr. med. Manfred Göthert
Tag der Promotion: 11.September 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2000 bis Juli 2003 in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Institutes der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Professor Dr. med. Klaus Mohr angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Prinzip der allosterischen Modulation	2
1.2	Mögliche therapeutische Vorteile der allosterischen Modulation	3
1.3	Allosterische Interaktionen an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren	4
1.3.1	Rezeptorepitope für die Bindung allosterischer Liganden	5
1.3.2	Bestimmung der Affinität allosterischer Liganden	7
1.4	Zielsetzungen dieser Arbeit	7
2	Methoden, Materialien und Reagenzien	11
2.1	Mutagenese	11
2.1.1	Polymerase-Ketten-Reaktion	12
2.1.2	Transformation in kompetente <i>E.coli</i>	14
2.1.3	Präparation und Aufbewahrung von Plasmid-DNA	19
2.1.4	Kultivierung der COS-7 Zelllinie	22
2.1.5	Transfektion	26
2.2	Kultivierung der stabil transfizierten CHO-Zelllinie	30
2.3	Gleichgewichtsbindungsexperimente	34
2.3.1	Sättigungsexperimente	34
2.3.2	Kompetitionsexperiment	37
2.4	Kinetische Experimente	40
2.4.1	Dissoziationsexperimente	40

2.5	Versuchsaufbau	41
2.5.1	Membranabtrennung mittels des Tomtec-Harvesters	41
2.5.2	Membranabtrennung mittels des Brandel-Harvesters	44
2.6	Statistik	46
2.7	Verwendete Materialien	47
2.7.1	Strukturformeln untersuchter Liganden	50
3	Ergebnisse	53
3.1	Methodische Vorversuche	53
3.1.1	Effektivitätsbestimmung des Szintillationsgerätes unter Anwendung eines Feststoffsintillators	53
3.2	Beitrag zur Validierung eines Filtrationsverfahrens für das Radioalloster . .	55
3.2.1	Bestimmung der Affinität von orthosterischen Liganden	55
3.2.2	Bestimmung der Affinität von allosterischen Liganden	59
3.3	Identifikation essentieller Epitope der allosterischen Bindungsstelle	64
3.3.1	Untersuchungen an NMS-besetzten Rezeptoren	65
3.3.2	Untersuchungen an freien Rezeptoren	77
4	Diskussion	87
4.1	Erörterung der Rezeptormutagenese-Befunde	87
4.1.1	Befunde an NMS-besetzten Rezeptoren	87
4.1.2	3D-Modell eines NMS-besetzten M ₂ -Rezeptors	90
4.1.3	Epitopabhängigkeit der Kooperativität mit N-Methylscopolamin . .	93
5	Zusammenfassung	101
	Literaturverzeichnis	103
A	Ergebnisse orientierender Mutageneseuntersuchungen	111
A.1	Epitopabhängigkeit des allosterischen Modulators Gallamin	111

B	Formeln	119
B.1	Die Hill-Gleichung	119
B.2	Von der Hill-Gleichung zur 4-Parameter-logistischen-Gleichung	120
B.3	Bestimmung des Wendepunktes der Ehlert-Gleichung	120
C	Publikationsliste	123

Abbildungsverzeichnis

1.1	Essentielle Epitope der allosterischen Bindungsstelle des M ₂ -Rezeptors . . .	9
2.1	Strukturformel des Radioliganden [³ H]N-Methylscopolamin	50
2.2	Strukturformel des allosterischen Modulators Diallylcaracurin V	51
2.3	Strukturformel des allosterischen Modulators W84	51
2.4	Strukturformel des allosterischen Modulators Dimethyl-W84	51
2.5	Strukturformel des allosterischen Modulators OS-72	52
3.1	Homologe Konkurrenzexperimente mit [³ H]NMS (0,4nM) an humanen M ₂ -Rezeptoren	56
3.2	Einfluss von verschiedenen Liganden auf die Gleichgewichtsbindung von [³ H]NMS an humanen M ₂ -Rezeptoren	57
3.3	Dissoziationsverläufe des Radioliganden [³ H]NMS an M ₂ -Rezeptoren in Ab- und Anwesenheit von Magnesium-Ionen steigender Konzentration	59
3.4	Effekt von Magnesium-Ionen auf die Dissoziation von [³ H]NMS	60
3.5	Effekte von Hexamethonium und Obidoxim auf die Dissoziation von [³ H]NMS	61
3.6	Effekt von Magnesium-Ionen auf die Gleichgewichtsbindung von [³ H]NMS	63
3.7	Effekte von Hexamethonium und Obidoxim auf die Gleichgewichtsbindung von [³ H]NMS	63
3.8	Effekte von Dimethyl-W84 an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und der angegebenen Rezeptormutante	67
3.9	Effekte von Dimethyl-W84 an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Punktmutanten	68

3.10	Effekte von Dimethyl-W84 an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rezeptormutanten	70
3.11	Effekte von Dimethyl-W84 an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und an der Doppelmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}+^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$	71
3.12	Effekte von Dimethyl-W84 an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rückmutanten	72
3.13	Effekte von Diallylcaracurin V an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und der angegebenen Punktmutante	73
3.14	Effekte von Diallylcaracurin V an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und der angegebenen Doppelmutante	74
3.15	Effekte von Diallylcaracurin V an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rückmutanten	76
3.16	Effekte von Diallylcaracurin V auf die ^3H NMS-Bindung an M_2 -Wildtyp-Rezeptoren und an den angegebenen Rezeptormutanten	79
3.17	Effekte von Diallylcaracurin V auf die ^3H NMS-Bindung an M_2 - und M_5 -Wildtyp-Rezeptoren und an der angegebenen Rezeptormutante	79
3.18	Effekte von OS-72 auf die ^3H NMS-Bindung an M_2 -Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rezeptormutanten	82
3.19	Effekte von OS-72 auf die ^3H NMS-Bindung an M_2 -Wildtyp-Rezeptoren und der angegebenen Rezeptormutante	82
3.20	Effekte von W84 auf die ^3H NMS-Bindung an M_2 -Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rezeptormutanten	83
3.21	Effekte von W84 auf die ^3H NMS-Bindung an M_2 - und M_5 -Wildtyp-Rezeptoren und der angegebenen Rezeptormutante	84
3.22	Effekte von Dimethyl-W84 auf die ^3H NMS-Bindung an M_2 -Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rezeptormutanten	85
3.23	Effekte von Dimethyl-W84 auf die ^3H NMS-Bindung an M_2 -Wildtyp-Rezeptoren und der angegebenen Rezeptormutante	85
4.1	Modell des Diallylcaracurin V/NMS/ M_2 -Rezeptor-Komplexes	92
4.2	Affinität von Diallylcaracurin V zu freien und zu NMS-besetzten Rezeptoren	94
4.3	Affinität von OS-72 zu freien und zu NMS-besetzten Rezeptoren	96

4.4	Affinität von W84 zu freien und zu NMS-besetzten Rezeptoren	97
4.5	Affinität von Dimethyl-W84 zu freien und zu NMS-besetzten Rezeptoren .	98
A.1	Strukturformel des allosterischen Modulators Gallamin	112
A.2	Effekte von Gallamin an NMS-besetzten M_2 -Rezeptoren und an der angegebenen Rezeptormutante	113
A.3	Effekte von Gallamin an NMS-besetzten M_2 -Rezeptoren und an den angegebenen Punktmutanten	113
A.4	Interaktion von Gallamin mit NMS-besetzten M_2 - und M_5 -Wildtyp-Rezeptoren und der angegebenen Rezeptormutante	115
A.5	Interaktion von Gallamin mit NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rezeptormutanten	116

Tabellenverzeichnis

2.1	Ansätze für Polymerase-Ketten-Reaktion.	13
2.2	Ansatzvolumina für Konkurrenzexperimente am Tomtec-Harvester. . . .	42
2.3	Ansatzvolumina für Dissoziationsexperimente am Tomtec-Harvester. . . .	43
2.4	Ansatzvolumina für Konkurrenzexperimente am Brandel-Harvester. . . .	45
2.5	Ansatzvolumina pro Reaktionsgefäß bei Dissoziationsexperimenten am Brandel-Harvester.	46
2.6	Ansatzvolumina für Startlösungen bei Dissoziationsexperimenten am Brandel-Harvester.	46
3.1	Bestimmung der Aktivität des Standards	54
3.2	Affinität verschiedener Liganden zum M ₂ -Rezeptor	58
3.3	Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Magnesium-Ionen, He- xamethonium und Obidoxim an NMS-besetzten M ₂ -Rezeptoren.	62
3.4	Affinität allosterischer Liganden zum M ₂ -Rezeptor.	64
3.5	Halbwertszeiten der Dissoziation von [³ H]NMS an den aufgeführten Wildtyp-Rezeptoren und Rezeptormutanten in Abwesenheit allosterischer Modulatoren.	66
3.6	Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Dimethyl-W84 an NMS- besetzten Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rezeptormutanten . .	69
3.7	Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Diallylcaracurin V an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rezeptormutanten	75
3.8	Affinität von [³ H]NMS zu den aufgeführten Wildtyp-Rezeptoren und Re- zeptormutanten.	77

3.9	Affinität (pK_A) der allosterischen Modulatoren zu den genannten Wildtyp-Rezeptoren und Rezeptormutanten und Kooperativitätsfaktor ($p\alpha$) für die Interaktion mit NMS.	81
A.1	Kenndaten für die Interaktion des Modulators Gallamin mit NMS-besetzten M_2 -Wildtyp-Rezeptoren und den aufgeführten Rezeptormutanten	114

Kapitel 1

Einleitung

Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren (mACh-Rezeptoren) gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese Rezeptor-Familie ist strukturell gekennzeichnet durch ihren Aufbau aus sieben transmembranären Domänen (TM1-TM7), die durch intra- und extrazelluläre Schleifen verbunden sind und einen intrazellulären Carboxyl- und einen extrazellulären Amino-Terminus besitzen (Wess, 1993). Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren modulieren in der Peripherie unter anderem die Kontraktion der glatten Muskulatur, die Drüsensekretion und beeinflussen die Herzfunktion. Im Zentralnervensystem sind die muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren involviert im Bereich des motorischen Systems, der Regulation der Körpertemperatur und der Gedächtnisfunktion (Caulfield and Birdsall, 1998). Es konnten fünf Muskarinrezeptor-Subtypen (M_1 - M_5) nachgewiesen werden (Kubo et al., 1986a; Kubo et al., 1986b; Bonner et al., 1987; Bonner et al., 1988). Die Klassifikation der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren mit ihren unterschiedlichen Funktionen an verschiedenen Orten ist von Interesse für die potentielle therapeutische Nutzung zum Beispiel bei Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Asthma bronchiale, Analgesie und Störungen der Herz- und Blasenfunktion. Sie unterscheiden sich in ihrer Gewebeverteilung und in der Art der G-Protein-Kopplung. Mithilfe von Autoradiographie (Flynn et al., 1995) und subtypselektiven Antikörpern (Dörje et al., 1991; Li et al., 1991) wurde die Gewebeverteilung der Subtypen aufgeklärt. M_1 -Rezeptoren sind vor allem im Zentralnervensystem (ZNS) zu finden, M_2 -Rezeptoren vor allem im Herzen aber auch an der glatten Muskulatur und im ZNS, M_3 -Rezeptoren wurden in glatter Muskulatur und in Drüsen identifiziert, während M_4 -Rezeptoren im Vorderhirn und Striatum und M_5 -Rezeptoren in der Substantia nigra nachgewiesen wurden (Caulfield and Birdsall, 1998). Bei der G-Protein-Kopplung unterschieden sich die "geradzahligen" von den "ungerad-

zahligen“ M-Rezeptoren. M_2 - und M_4 -Rezeptoren aktivieren typischerweise G-Proteine mit der α -Untereinheit $G_{i/o}$, währenddessen die Rezeptoren M_1 , M_3 und M_5 bevorzugt $G_{q/11}$ aktivieren (Wess, 1998). Die verschiedenen Transduktionsmechanismen beruhen auf molekularen Unterschieden in der zweiten und dritten intrazellulären Schleife der verschiedenen Rezeptorsubtypen (Wess, 1993), wobei die “geradzahligen“ Rezeptoren sich von den “ungeradzahligen“ Rezeptoren unterscheiden, währenddessen innerhalb der zwei Gruppen kein Unterschied festzustellen ist (Hulme et al., 1990; Wess et al., 1997). Als Effektorprotein der “geradzahligen“ Rezeptoren dient meist Adenylatcyclase und als Effektorprotein der “ungeradzahligen“ Rezeptoren ist Phospholipase C identifiziert worden (Caulfield, 1993).

Die orthosterische Acetylcholin-Bindungsstelle der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren scheint durch die transmembranären Domänen gebildet zu werden (Wess, 1993) und ist innerhalb der fünf Subtypen konserviert (Hulme et al., 1990). Durch Mutagenese-Untersuchungen sind essentielle Aminosäuren identifiziert worden, die für die Bindung von orthosterischen Liganden wichtig und innerhalb der fünf Subtypen konserviert sind (Fraser et al., 1989; Page et al., 1995). Die Entwicklung von subtypselektiven orthosterischem Liganden ist durch die hohe Konservierung dieser Bindungsstelle sehr schwierig. Es existieren bisher keine Agonisten mit Selektivität und auch Antagonisten zeigen nur mäßige Selektivität für einzelne Rezeptorsubtypen (Caulfield and Birdsall, 1998). Subtypselektivität ist eigentlich immer konzentrationsabhängig, wie auch zum Beispiel die Subtypselektivität von Pirenzepin zum M_1 -Rezeptor, die mit zunehmender Konzentration von Pirenzepin schwindet. Man spricht daher eher von Subtyp-Prävalenz, da bei entsprechend hohen Konzentrationen des orthosterischen Liganden Affinität zu allen Subtypen gegeben ist.

1.1 Prinzip der allosterischen Modulation

Alle fünf Muskarin-Rezeptor-Subtypen weisen neben der orthosterischen Bindungsstelle eine zweite, allosterische, Bindungsstelle auf. Diese allosterische Bindungsstelle wurde sowohl durch Gleichgewichtsbindungsexperimente und kinetische Bindungsstudien (Stockton et al., 1983; Ellis et al., 1991; Lazareno and Birdsall, 1995; Proška and Tuček, 1995) als auch durch funktionelle Studien charakterisiert (Ehlert, 1988; Lazareno and Birdsall, 1995). Über diese allosterische Bindungsstelle kann die Bindung von Liganden der orthosterischen Bindungsstelle moduliert werden (Ellis et al., 1991; Holzgrabe and Mohr, 1998). Allosterischen Liganden beeinflussen sowohl die Dissoziation als auch die Assozia-

tion von orthosterischen Liganden. Das Verhältnis der Beeinflussung bestimmt den Effekt auf die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden. Die Assoziation von orthosterischen Liganden kann aber auch durch konventionelle kompetitive Liganden reduziert werden. Deshalb ist nur die Veränderung der Dissoziation eines orthosterischen Liganden oder die Beschleunigung von dessen Assoziation ein eindeutiger Hinweis auf allosterische Eigenschaften. Es existieren drei Möglichkeiten, wie die Bindung eines allosterischen Liganden die Bindung des orthosterischen Liganden beeinflussen kann (Ehlert, 1988)(siehe Abschnitt 2.3.2). Erstens kann das Alloster die Bindung des Orthosters fördern. Durch eine höhere Affinität des Allosters zum Orthoster-besetzten Rezeptor als zum freien Rezeptor fällt die Hemmung der Dissoziation des orthosterischen Liganden stärker aus als die Hemmung der Assoziation. Es resultiert eine Bindungsförderung des Orthosters durch das Alloster (positive Kooperativität). Zweitens kann die Bindung des Orthosters gehemmt werden. In diesem Fall besitzt das Alloster eine höhere Affinität zum freien Rezeptor als zum Orthoster-besetzten Rezeptor, wodurch die Hemmung der Dissoziation des orthosterischen Liganden schwächer ausfällt als die Hemmung der Assoziation. Es resultiert eine Bindungshemmung des Orthosters durch das Alloster (negative Kooperativität). Die dritte Möglichkeit ist, dass die Bindung des Orthosters durch die Bindung des Allosters nicht beeinflusst wird, da die Affinität des Allosters zum freien Rezeptor der zum Orthoster-besetzten Rezeptor entspricht. Die Hemmung der Dissoziation und die Hemmung der Assoziation des Orthosters durch das Alloster halten sich die Waage und beeinflussen dadurch nicht das Bindungsgleichgewicht des Orthosters (neutrale Kooperativität). Diese allosterischen Interaktionen sind abhängig vom allosterischen Modulator, dem orthosterischen Liganden und dem Rezeptor-Subtyp (Lee and El-Fakahany, 1988).

1.2 Mögliche therapeutische Vorteile der allosterischen Modulation

Die allosterische Bindungsstelle ist am Eingang der orthosterischen Bindungsstelle im extrazellulären Bereich des Rezeptors lokalisiert (Leppik et al., 1994; Ellis et al., 1993) und ist nicht so stark konserviert, wie die orthosterische Bindungsstelle. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, allosterische Liganden mit Subtypselektivität zu entwickeln (Tuček and Proška, 1995), die die Bindungsaffinität von Acetylcholin an spezifischen muskarinischen Rezeptor-Subtypen steigern oder reduzieren können. Das Prinzip der allosterischen Interaktion macht es auch möglich, Allosterie mit einer absoluten Subtyp-Selektivität (Birdsall

et al., 1997) zu entwickeln. So kann ein allosterischer Modulator die gleiche Affinität zu allen Subtypen besitzen, aber trotzdem durch eine unterschiedliche Kooperativität an jedem Subtyp einen selektiven Effekt zeigen. Das bedeutet, dass ein Alloster eine absolute Subtypselektivität besitzt, wenn es sich neutral kooperativ gegenüber Acetylcholin an allen Rezeptor-Subtypen verhält, mit Ausnahme des Ziel-Rezeptor-Subtyps. Diese Selektivität ist unabhängig von der Konzentration des Allostere.

Ein zweiter Vorteil der allosterischen Modulatoren ist, dass das Ausmass des Allostereffektes limitiert wird durch eine spezifische Kooperativität zwischen dem jeweiligen Alloster und einem endogenen Liganden. Damit ist mit einem bestimmten Alloster nur ein bestimmter maximaler Effekt ("ceiling-Effekt") erreichbar, der weniger dosisabhängig ist als der Effekt eines kompetitiven Wirkstoffes. Das Alloster wäre in Bezug auf eine Überdosierung sicherer als der orthosterische Ligand, und könnte wenn nötig in sehr hohen Dosen gegeben werden ohne Gefahr einer zu starken Beeinflussung der Rezeptoren.

Ein dritter Vorteil ist die Fähigkeit der positiv-kooperativen allosterischen Modulatoren die Effekte von Agonisten nur selektiv in den Geweben zu verstärken, in welchen der endogene Agonist freigesetzt wird, um physiologische Effekte auszulösen (Birdsall et al., 1996). Bei pulsativer Freisetzung von Hormonen zum Beispiel, würde der allosterische Modulator nur dann Effekte auslösen, wenn der endogene Agonist anwesend ist.

Die Vorteile von allosterisch-wirkenden Arzneistoffen werden mittels der Benzodiazepine schon seit längerer Zeit therapeutisch genutzt. Die Wirkungen der Benzodiazepine, die den Effekt des endogenen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) potenzieren, sind abhängig von der Anwesenheit des Neurotransmitters GABA. Dadurch erhalten die allosterischen Modulatoren die physiologischen Effekte der Signaltransduktion, sowohl in Bezug auf die Gewebeverteilung als auch auf das zeitliche Muster.

1.3 Allosterische Interaktionen an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren

Zahlreiche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind allosterisch modulierbar. Hierzu zählen neben den muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren (Clark and Mitchelson, 1976) zum Beispiel α_1 -Adrenozeptoren (Vaughn et al., 1999), Serotonin-Rezeptoren (Fillion et al., 1996), Dopamin-Rezeptoren (Hoare and Strange, 1996), Adenosin-Rezeptoren (Bruns and Fergus, 1990), Glutamat-Rezeptoren (Litschig et al., 1999) und Chemokin-Rezeptoren

(Cox et al., 2001; Soudijn et al., 2001). Die Familie der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren ist im Hinblick auf die allosterische Modulation die am häufigsten untersuchte Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Christopoulos and Kenakin, 2002). Die frühesten Hinweise, die nahelegten, dass eine allosterische Bindungsstelle an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren existiert, wurde durch funktionelle Studien mit Gallamin (Clark and Mitchelson, 1976) und Alkan-Bisammonium-Verbindungen (Lüllmann et al., 1969) an M₂-Rezeptoren aus isolierten Meerschweinchenherzen erbracht. Wiederum durch Einsatz des allosterischen Modulators Gallamin wurde die allosterische Modulation erstmals in Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien direkt gezeigt und es wurde das ternäre Modell allosterischer Interaktionen postuliert (Stockton et al., 1983). Nach Klonierung der fünf Rezeptor-Subtypen wurde der Effekt von Gallamin und einer großen Anzahl strukturell verschiedener allosterischer Liganden in Radioligandbindungsstudien (Ellis et al., 1991; Lazareno and Birdsall, 1995) und funktionellen Studien detailliert untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die meisten allosterischen Modulatoren - darunter auch Gallamin und Alcuronium (Lanzafame et al., 1997) - an einer gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle der muskarinischen Rezeptoren binden (Ellis and Seidenberg, 1992; Waelbroeck, 1994; Tränkle and Mohr, 1997). Die Existenz einer zusätzlichen, zweiten allosterischen Bindungsstelle für einige Substanzen ist jedoch wahrscheinlich (Lazareno et al., 2000).

1.3.1 Rezeptorepitope für die Bindung allosterischer Liganden

Essentiell für das Verständnis der allosterischen Rezeptormodulation ist das Wissen über miteinander interagierende Strukturelemente von allosterischem Ligand und Rezeptorprotein. Aus diesem Grund wird mithilfe von Mutagenese-Techniken versucht, Rezeptorepitope der allosterischen Bindungsstelle zu identifizieren, die für die Affinität von allosterischen Modulatoren von Bedeutung sind. Durch eine genaue Charakterisierung der allosterischen Bindungsstelle erhofft man sich Einblicke in die Interaktionsmuster zwischen Ligand und Rezeptor, um schließlich allosterische Modulatoren mit gewünschten Eigenschaften gezielt entwickeln zu können.

Da alle 5 Rezeptor-Subtypen allosterisch modulierbar sind und somit eine gewisse Basisaffinität für allosterische Modulatoren existiert (Ellis, 1997), müssen einige Bindungsepitope innerhalb der allosterischen Bindungsstelle in allen fünf Subtypen konserviert sein und zusätzlich subtypspezifische Epitope existieren. Daher sind zwei verschiedene Methoden zur Auffindung von essentiellen Rezeptorepitopen der allosterischen Bindungsstelle

le anwendbar. Einerseits kann nach den konservierten allosterischen Bindungsepitopen durch Mutation konservierter Aminosäuren gesucht werden. So wurden durch zahlreiche Mutagenesestudien einige konservierte Aminosäuren der allosterischen Bindungsstelle identifiziert (Lee et al., 1992; Matsui et al., 1995). Andererseits sind Rezeptor-Subtypspezifisch zusätzliche Bindungsstellen zu erwarten, die verantwortlich sind für die Subtyp-Selektivität der allosterischen Liganden. Durch Mutation dieser Subtyp-spezifischen Bindungsepitope in korrespondierende Aminosäuren eines anderen Subtypes kann diese Selektivität verändert werden. Bei diesem Ansatz wird hauptsächlich mit Untersuchungen an chimären Rezeptoren gearbeitet, um anschließend gezieltere Untersuchungen mit Punktmutanten durchzuführen (Ellis et al., 1993; Leppik et al., 1994; Gnagey et al., 1999; Krejčí and Tuček, 2001).

Fast alle allosterischen Modulatoren zeigen die höchste Affinität zum M_2 -Rezeptor-Subtyp und die niedrigste zum M_5 -Rezeptor-Subtyp (Ellis et al., 1991; Lee and El-Fakahany, 1991; Jakubik et al., 1995; Holzgrabe and Mohr, 1998; Ellis and Seidenberg, 2000). Daraus ergibt sich die Frage, welche Epitope des M_2 -Rezeptors für die im Vergleich zum M_5 -Rezeptor hohe Affinität der allosterischen Modulatoren verantwortlich sind. Um die subtypspezifischen Rezeptorepitope für die hohe Affinität der allosterischen Modulatoren zum M_2 -Rezeptor zu identifizieren, wurden Untersuchungen mit M_2/M_5 -chimären Rezeptoren durchgeführt. Bei dieser Art chimärer Rezeptoren sind Aminosäuresequenzen des M_2 -Rezeptors durch korrespondierende Aminosäuresequenzen des M_5 -Rezeptors, oder umgekehrt, ersetzt wurden. In den meisten Studien wurden kinetische Bindungsexperimente, in Form von Dissoziationsexperimenten (siehe Abschnitt 2.4.1), durchgeführt, da diese den Vorteil haben, nur allosterische Effekte zu erfassen.

Für einige allosterische Modulatoren wurden Epitope im Bereich der zweiten extrazellulären Schleife und am Beginn der siebenten transmembranären Domäne identifiziert (Ellis and Seidenberg, 2000). Für allosterische Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ (zum Beispiel W84 und Dimethyl-W84) und allosterische Liganden aus der Gruppe der Caracurin V Derivate (darunter Diallylcaracurin V) sind bislang zwei Epitope identifiziert worden, die für die M_2/M_5 -Selektivität an NMS-besetzten Rezeptoren verantwortlich sind (siehe Abbildung 1.1): eine einzelne Aminosäure am Beginn der siebenten transmembranären Domäne, $M_2^{423}\text{Thr}$ (Buller et al., 2002), und eine Sequenz aus sechs Aminosäuren, $M_2^{172-177}\text{Glu-Asp-Gly-Glu-Cys-Tyr}$, im Bereich der zweiten extrazellulären Schleife (Buller, 2002).

1.3.2 Bestimmung der Affinität allosterischer Liganden

Die Affinität von Liganden der allosterischen Bindungsstelle konnte bis vor kurzem nur mithilfe eines orthosterischen Radioliganden bestimmt werden. Dabei musste die Affinität der allosterischen Modulatoren aus ihren Effekten auf die Bindung des orthosterischen Radioliganden abgeleitet werden. Das ternäre Modell der allosterischen Interaktionen (Stockton et al., 1983; Ehlert, 1988; Lazareno and Birdsall, 1995) (siehe Abschnitt 2.3.2) wurde damit ständig angewendet, konnte aber bisher nicht direkt überprüft werden. Die Synthese des ersten Radioallosters [^3H]Dimethyl-W84 (Tränkle et al., 1998) ermöglichte erstmals die direkte Bestimmung der Affinität von allosterischen Liganden durch Kompetitionsexperimente (siehe Abschnitt 2.3.2). In ersten Untersuchungen mit [^3H]Dimethyl-W84 konnte das Kooperativitätsmodell mit Gallamin an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren bestätigt werden (Tränkle et al., 1999). Auch konnte mit dem Radioaloster erstmals jeglicher Zweifel ausgeräumt werden, dass es sich bei der allosterischen Modulation um unspezifische Effekte an Membran- oder Rezeptor-Interphasen handelt.

1.4 Zielsetzungen dieser Arbeit

Das *ternäre Modell allosterischer Interaktionen* (siehe Abschnitt 2.3.2) ist die erste Näherung, um die Bindung von zwei Liganden an unterschiedlichen, aber kommunizierenden Bindungsstellen eines Rezeptors zu beschreiben. Die Bindung von orthosterischen Liganden wird durch Kompetitionsexperimente mit einem Radioorthoster bestimmt ([^3H]Orthoster-Orthoster). Um Bindungsuntersuchungen mit allosterischen Liganden durchzuführen, musste bis vor kurzem durch Ermangelung eines Radioallosters ebenfalls ein orthosterischer Radioligand eingesetzt werden ([^3H]Orthoster-Alloster). Deshalb konnte die Bindung und Wirkung von Liganden der allosterischen Bindungsstelle nur aus den Effekten auf die Kinetik und die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Radioliganden abgeleitet werden. Die Entwicklung des Radioallosters [^3H]Dimethyl-W84 erlaubte es nun, die Bindung von allosterischen Liganden an die allosterische Bindungsstelle direkt zu erfassen ([^3H]Alloster-Alloster).

Für das vom Arbeitskreis um Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe entwickelte Radioaloster [^3H]Dimethyl-W84 sollte ein Filtrationsverfahren validiert werden. Dieses Filtrationsverfahren wurde von Herrn Dr. C. Tränkle während eines Aufenthaltes im Arbeitskreis von Herrn Prof. NJM. Birdsall (National Institute for Medical Research, London, UK) entwickelt. Es unterscheidet sich von bisher angewandten Filtrationsverfahren

durch die automatisierte Filtrationstechnik und durch die Inkubations-Pufferbedingungen. Um dieses Filtrationsverfahren zu validieren, sollte die Affinität von verschiedenen orthosterischen und allosterischen Liganden einmal mit dem Radioalloster [^3H]Dimethyl-W84 ([^3H]Alloster-Alloster, [^3H]Alloster-Orthoster) und einmal mit dem Radioorthoster [^3H]N-Methylscopolamin ([^3H]Orthoster-Alloster, [^3H]Orthoster-Orthoster) vergleichend bestimmt werden. Die mithilfe des Radioorthosters ermittelten Affinitäten der verschiedenen Liganden sollten bei Gültigkeit des *ternären Modells allosterischer Interaktionen* gleich den mithilfe des Radioallosters bestimmten Affinitäten der verschiedenen Liganden sein. In diesem Fall würde das neue Filtrationsverfahren für das Radioalloster [^3H]Dimethyl-W84 als geeignetes Werkzeug für eine Affinitätsbestimmung validiert sein. Die Bestimmung der Affinität von verschiedenen Liganden mithilfe des Radioalloster [^3H]Dimethyl-W84 führte Oliver Weyand im Rahmen seiner Dissertation (2001) durch. Von ihm wurden die Versuchsgruppen [^3H]Alloster-Alloster und [^3H]Alloster-Orthoster bearbeitet.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Affinitätskonstanten der von Oliver Weyand untersuchten Liganden mit dem Radioorthoster [^3H]N-Methylscopolamin als Sonde bestimmt. Es wurden die zwei Meßreihen [^3H]Orthoster-Alloster und [^3H]Orthoster-Orthoster an humanen M_2 -Rezeptoren durchgeführt. Die dabei erhaltenen Affinitätskonstanten wurden mit den von Oliver Weyand unter Verwendung von [^3H]Dimethyl-W84 erhaltenen Affinitätskonstanten verglichen.

Parallel zu dieser Validierung des Filtrationsverfahrens für tritiiertes Dimethyl-W84 führte Stefan Buller im Labor von Herrn Prof. Dr. J. Ellis, Pennstate University, Pennsylvania (USA) Mutagenese- und Radioligandbindungsexperimente zur Epitopabhängigkeit von Dimethyl-W84 durch. Dimethyl-W84 zeigte wie fast alle allosterischen Modulatoren die höchste Affinität zu M_2 -Rezeptoren und die niedrigste zu M_5 -Rezeptoren. Es sollte untersucht werden, ob diese Affinitätsunterschiede möglicherweise auf spezielle Aminosäuren zurückzuführen sind. Dazu stellte Stefan Buller M_2/M_5 -chimäre Rezeptoren her und bestimmte die Affinität von Dimethyl-W84 zu NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und Rezeptor-Mutanten.

Er identifizierte zwei Epitope, die für die M_2/M_5 -Selektivität der allosterischen Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ an NMS-besetzten Rezeptoren verantwortlich sind: eine einzelne Aminosäure am Beginn der siebenten transmembranären Domäne, $M_2^{423}\text{Thr}$ (Buller et al., 2002), und eine Sequenz aus sechs Aminosäuren, $M_2^{172-177}\text{Glu-Asp-Gly-Glu-Cys-Tyr}$, im Bereich der zweiten extrazellulären Schleife (Buller, 2002)(siehe Abbildung 1.1).

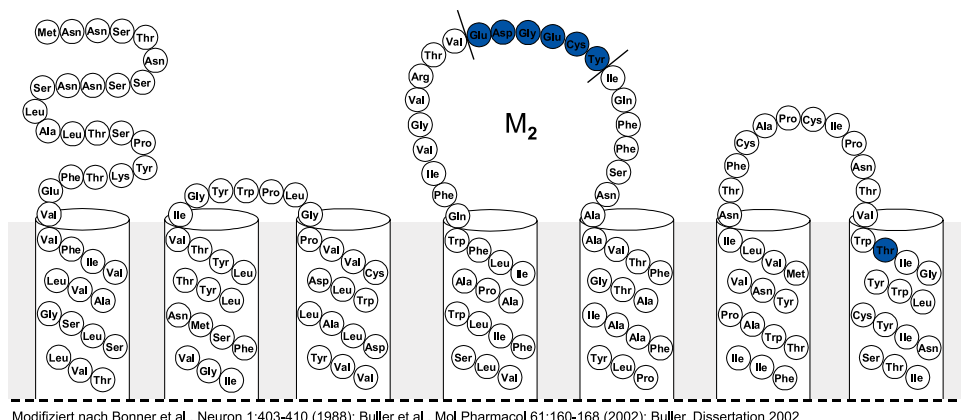


Abbildung 1.1: Essentielle Epitope der allosterischen Bindungsstelle des M_2 -Rezeptors

Bislang identifizierte Epitope des M_2 -Rezeptors, die für die M_2/M_5 -Selektivität allosterischer Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ (zum Beispiel W84 und Dimethyl-W84) und allosterischer Liganden vom Typ der Caracurin V Derivate an NMS-besetzten Rezeptoren verantwortlich sind.

Der Hauptteil der vorliegenden Arbeit bestand in der Fortführung der Mutagenese-Untersuchungen im Bereich der Sequenz $M_2^{172-177}$ Glu-Asp-Gly-Glu-Cys-Tyr. Ziel war die Eingrenzung dieses Epitopes auf sechs Aminosäuren in der zweiten extrazellulären Schleife auf möglichst eine einzelne Aminosäure. Dazu wurden punktmutierte Rezeptoren hergestellt (siehe Abschnitt 2.1), in denen einzelnen Aminosäuren der Sequenz $M_2^{172-177}$ zu den korrespondierenden Aminosäuren des M_5 -Rezeptors mutiert wurden, um so die M_2/M_5 -Selektivität zu untersuchen. Alle negativ geladenen Aminosäuren der $M_2^{172-177}$ EDGECY-Sequenz (M_2^{172} Glu, M_2^{173} Asp und M_2^{175} Glu) und zusätzlich M_2^{177} Tyr wurden mutiert. Bei M_2^{174} Gly als neutraler Aminosäure wurde nicht von einer Beteiligung an der Bindung allosterischer Modulatoren ausgegangen und daher wurde diese Position nicht verändert. M_2^{176} Cys wurde ebenfalls nicht mutiert, da es für die Ausbildung einer Disulfidbrücke benötigt wird. Die hergestellten Rezeptormutanten wurden in Radioligandbindungsexperimenten untersucht. Dabei konnte M_2^{177} Tyrosin als essentielle Aminosäure der $M_2^{172-177}$ EDGECY-Sequenz identifiziert werden. Anschließend wurde eine Doppelmutante hergestellt, in der sowohl die bereits als essentiell identifizierte Aminosäure M_2^{423} Threonin als auch die gerade identifizierte Aminosäure M_2^{177} Tyrosin zu den korrespondierenden Aminosäuren des M_5 -Rezeptors, Histidin und Glutamin, mutiert wurden. Aus den Radioligandbindungsexperimenten mit Dimethyl-W84 an dieser Doppelmutante ergab sich, dass die beiden Aminosäuren die M_2/M_5 -Selektivität der flexiblen Alkan-

Bisammonium-Verbindung Dimethyl-W84 vollständig erklären. Anschließend wurde der rigide allosterische Modulator Diallylcaracurin V als Vertreter der Caracurin V Derivate eingesetzt, um zu klären, ob für die M_2/M_5 -Selektivität dieser rigiden Substanz an NMS-besetzten Rezeptoren die gleichen Aminosäuren essentiell sind. Die Experimente ergaben, dass die beiden Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin ebenfalls vollständig für die M_2/M_5 -Selektivität des rigiden allosterischen Modulators an NMS-besetzten Rezeptoren verantwortlich sind.

Schließlich wurde auch die Epitopabhängigkeit der Bindung allosterischer Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ und von Diallylcaracurin V an freien muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren untersucht. Es sollte geklärt werden, ob die an NMS-besetzten Rezeptoren als essentiell identifizierten Aminosäuren auch an freien Rezeptoren eine Rolle spielen. Die Untersuchungen ergaben, dass das Aminosäurepaar an der M_2/M_5 -Selektivität an freien Rezeptoren beteiligt ist, diese aber nicht vollständig erklären kann. Im Gegensatz zu den Ergebnissen an NMS-besetzten Rezeptoren spielt M_2^{177} Tyrosin an freien Rezeptoren kaum eine Rolle für die Affinität der untersuchten Modulatoren. Damit ist M_2^{177} Tyrosin essentiell für die M_2/M_5 -Subtyp-abhängige Kooperativität der untersuchten allosterischer Modulatoren mit N-Methylscopolamin.

Kapitel 2

Methoden, Materialien und Reagenzien

Dieses Kapitel beinhaltet alle theoretischen und praktischen Grundlagen zu den durchgeführten Arbeiten. Die benötigten Materialien und verwendeten Reagenzien sind in Abschnitt 2.7 detailliert aufgeführt. Die Herstellung von Lösungen und Puffern ist bei der jeweiligen Methode beschrieben, wobei für die genaue Bezeichnung der Materialien und Reagenzien (Herstellerfirma, Artikel-Nr., Menge) auf die jeweilige Referenz [M1-Mx] in Abschnitt 2.7 verwiesen wird.

2.1 Mutagenese

Ziel der gentechnischen Arbeiten war der gezielte Austausch einzelner Aminosäuren des Rezeptorproteins. Als Ausgangspunkt dienten pCD-Plasmidvektoren (Okahyama and Berg, 1983), die die cDNA der jeweiligen humanen Rezeptoren und ein Resistenzgen gegen Ampicillin enthalten. Diese Vektoren wurden dankenswerterweise von Prof. Dr. John Ellis¹ zur Verfügung gestellt.

Es wurden Oligonukleotid-Primer entwickelt, um mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion die gewünschten Mutationen in die Plasmidvektoren einzuführen. Die mutierte Plasmid-DNA wurde mittels Hitzeschock in kompetente *E.coli*-Bakterien transferriert. Anschließend wurden die Bakterien auf Ampicillin-haltigem Agar ausplattiert und damit

¹Depts. of Psychiatry and Pharmacology, College of Medicine, Penn State University, Hershey PA, USA

selektiert. Mit ausgewählten Bakterienkolonien wurden Bakterienmedien angeimpft und die Bakterien - und damit die Plasmid-DNA - amplifiziert. Durch anschließende Bakterienlyse wurde die Plasmid-DNA gewonnen und transient in COS-7 Zellen transfiziert. Nach der heterologen Expression der mutierten Rezeptorproteine durch die COS-7 Zellen wurden die Zellen geerntet und einer Membranpräparation unterworfen. Im folgenden werden alle Schritte explizit erläutert.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten chimären Rezeptoren wurden nicht selbst hergestellt, sondern dankenswerterweise von Prof. Dr. J. Ellis zur Verfügung gestellt.

2.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde mithilfe eines Kits [M1] durchgeführt. Lediglich Plasmid-DNA als Matrize und zwei Oligonukleotid-Primer (einen Strang- und einen Gegenstrangprimer) mit gewünschter Mutation wurden noch zusätzlich benötigt.

Oligonukleotid-Primer. Die benötigten cDNA-Sequenzen sind in der Online-Datenbank GPCR [I1] erhältlich. Ein Oligonukleotid-Primer und ein dazu komplementärer wurden für die gewünschte Mutation individuell konstruiert. Die Länge der Primer betrug 25-40 Basenpaare. Die Mutation lag möglichst in der Mitte der Primer. Auch wurde ein Minimumgehalt an Guanosin und Cytidin von 40% eingehalten. Die Aufreinigung der Primer erfolgte durch HPLC. Die Bestellung der Primer erfolgte online bei SigmaArk [I2].

Verdünnungen der Primer und Matrizen. Die gelieferten Oligonukleotid-Primer wurden in 1ml steril-filtrierte Aqua dest. aufgenommen. Die benötigte Konzentration der Oligonukleotid-Primer für die PCR betrug 62,5ng/ μ l. Es wurden 100 μ l der geforderten Oligonukleotid-Primer-Konzentration hergestellt.

Die benötigte Konzentration der Plasmid-DNA-Matrize für die PCR beträgt 5ng/ μ l. Von dieser Verdünnung wurden 500 μ l hergestellt.

Durchführung der PCR

In spezielle PCR-Reaktionsgefäße [M3] mit einem Fassungsvermögen von 0,2ml wurden wie in Tabelle 2.1 aufgeführt die PCR-Kontrolle und die PCR-Reaktionsansätze einpipettiert. Die Kontroll-Reaktion dient zur Überprüfung der Effizienz der Mutationen. Das Kontroll-Plasmid enthält ein β -Galaktosidase-Gen, bei welchem anstelle ei-

nes Glutamin-Codons (CAA) ein Stop-Codon (TAA) eingefügt ist. Dadurch ist keine β -Galaktosidase-Aktivität vorhanden. Der Kontroll-Primer erzeugt eine Punktmutation im Kontroll-Plasmid, die den Thymidin-Rest des Stop-Codons (TAA) in den Cytidin-Rest des Glutamin-Codons (CAA) mutiert. Das β -Galaktosidase-Gen wird funktionsfähig und die mit der Kontroll-PCR-Reaktion transformierten Bakterien zeigen β -Galaktosidase Aktivität (siehe Abschnitt 2.1.2).

Kontrolle		Reaktionen	
	5 μ l	Reaktionspuffer	
2 μ l	Kontroll-Plasmid	2 μ l	Plasmid-DNA-Matrize
1,2 μ l	Kontroll-Primer 1	2 μ l	Oligonukleotid-Primer 1
1,2 μ l	Kontroll-Primer 2	2 μ l	Oligonukleotid-Primer 2
	1 μ l	dNTP-Mix	
	ad 50 μ l	Aqua purificata	

Tabelle 2.1: Ansätze für Polymerase-Ketten-Reaktion.

Im Kit [M1] enthalten: Reaktionspuffer, Kontroll-Plasmid, Kontroll-Primer 1+2 und dNTP-Mix (Mischung aus DesoxyNukleotidtriphosphaten). Zusätzlich benötigt: Plasmid-DNA-Matrize und Oligonukleotid-Primer 1+2.

Das PCR-Gerät [M2] wurde folgendermassen programmiert:

95°C	30sec
55°C	1min
68°C	12min (2min/kb Plasmid)

Nach Zugabe von je 1 μ l Pfu-Polymerase (einer Polymerase mit Korrekturaktivität aus *Pyrococcus furiosus*) zu allen Reaktionsansätzen wurden alle Reaktionsgefäße in das PCR-Gerät gestellt und das eingestellte Programm durchlaufen. Innerhalb der 30sec-Phase bei 95°C erfolgte die Denaturierung. Nach Abkühlung auf 55°C lagerten sich die Oligonukleotid-Primer an die Matrize an (Annealing). Schließlich erfolgte bei 68°C die Elongation der Primer. Die Dauer von 12min wurde gewählt, da 2min pro kb des Plasmides laut der Gebrauchsanweisung des verwendeten Kits veranschlagt werden sollten und

die Länge des Matrizen-Plasmides 6kb betrug.

Dieser programmierte Zyklus wurde 12 mal für die Kontrollreaktion und die Reaktionsansätze mit Austausch von nur einer Base durchlaufen. Die Reaktionsansätze mit Austausch von mehr als nur einer Base durchliefen den Zyklus 16 mal.

Nach Abkühlung auf 4°C wurde zu jedem Ansatz 1µl DpnI pipettiert und 1h bei 37°C inkubiert. DpnI schneidet spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA, so dass nur die DNA-Matrize (gewonnen aus Bakterienstamm mit Methylierungssystem) abgebaut wird. Nach Beendigung der Inkubationszeit lagen nur noch mutierte Plasmid-DNA-Fragmente in den Reaktionsgefäßen vor. Diese Fragmente wurden im nächsten Schritt in kompetente *E.coli*-Bakterien transferriert und von diesen schließlich zur intakten mutierten Plasmid-DNA ligiert.

2.1.2 Transformation in kompetente *E.coli*

Die Transformation erfolgte nach dem Prinzip des Hitzeschocks. Die benötigten kompetenten Bakterien wurden im Kit [M1] mitgeliefert. Zur Selektion der Bakterienklone wurde auf Ampicillin-haltigen Luria-Bertani-Agarplatten ausplattiert und mithilfe einer blau/weiß-Selektion überprüft, ob Polymerase-Ketten-Reaktion und Transformation erfolgreich waren. Am nächsten Tag wurde mit einer Bakterienkolonie ein Ampicillin-haltiges Bakterienmedium angeimpft und damit die Amplifikation der gewonnenen Plasmid-DNA begonnen.

Alle durchgeführten Schritte werden im folgenden näher erläutert.

Benötigte Utensilien für Transformation.

- XL-1 superkompetente *E.coli*-Bakterien (aus Kit [M1])
- pUC18-Kontroll-Plasmid (aus Kit [M1])
- 10mM IPTG-Lösung
- 2%ige X-Gal-Lösung
- NZY⁺-Lösung
- hitzebeständige Falcon-Gefäße [M10]
- Eis

Herstellung der Lösungen für Transformation.

10mM IPTG-Lösung (Isopropyl- β -D-thiogalakto-pyranosid):

- 24mg IPTG [M4]
- in 10ml steril-filtriertem Aqua dest. lösen

2%ige X-Gal-Lösung (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galakto-pyranosid):

- 20mg X-Gal [M5]
- in 1ml Dimethylformamid lösen

NZY-Broth

- 4,2g NZY-Broth [M6]
- in 200ml Aqua dest. lösen
- pH-Wert von 7,5 mit 1N-NaOH einstellen
- autoklavieren bei 121°C, 15min

20%ige Glucose-Lösung :

- 4g Glucose [M7]
- in 20ml steril-filtriertem Aqua dest. lösen

NZY⁺-Lösung (NZY-Broth + 20%ige Glucose-Lösung):

- 10ml NZY-Broth (Herstellung: siehe oben)
- 200 μ l 20%ige Glucose-Lösung dazupipettieren

Ampicillin-Lösung (50mg/ml) verwendet für LB-Medium und LB-Agar:

- 750mg Ampicillin-Natrium [M8]
- in 15ml Aqua dest. lösen
- sterilfiltrieren in 50ml Falcon-Gefäß [M9]
- a 550 μ l aliquotieren in sterile Eppendorf-Gefäße
- einfrieren bei -20°C

Herstellung von Luria-Bertani-Agarplatten

Die Herstellung der Luria-Bertani(LB)-Agarplatten sollte einen Tag vor deren Einsatz und zwar am besten morgens durchgeführt werden, da das Autoklavieren und anschließende Abkühlen viel Zeit in Anspruch nimmt.

Zur Herstellung des LB-Agars wurde Fertigpulver [M11] verwendet. Pro Agarplatte (Durchmesser: 10cm) werden 25g LB-Agar benötigt.

Es wurde LB-Agar für 20 Agar-Platten hergestellt. Dazu wurden folgende Schritte vollzogen:

- 18,5g des LB-Agar-Fertigpulvers [M11] in ein Becherglas einwiegen
- 500ml Aqua dest. zufügen
- pH-Wert von 7,0 überprüfen
- in Mikrowelle erhitzen bis klare Lösung entsteht
- Becherglas mit Alufolie abdecken und autoklavieren bei 121°C, 25min
- abkühlen lassen auf 55°C (bis Becherglas mit Händen gehalten werden kann)
- 200µl Ampicillin [50mg/ml] mit steriler Pipette dazugeben (für 500ml LB-Agar)
- 25ml LB-Agar mit steriler Pipette in jede Platte ausgießen

Alle Platten zur Aufbewahrung in den Kühlschrank stellen. Dabei bildet sich Kondenswasser, welches aber am nächsten Tag durch Aufbewahren der Platten im Inkubator entfernt wird.

Herstellung von Luria-Bertani-Medium

Das autoklavierte Luria-Bertani(LB)-Medium muss einen Tag vor der Präparation der Plasmid-DNA hergestellt werden.

Die Herstellung erfolgte mit Fertigpulver [M12]:

- 25g des LB-Medium-Fertigpulvers [M12] in 800ml Aqua dest. lösen
- pH-Wert mit 1N-NaOH auf 7,0 einstellen

- auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen

Je 500ml des hergestellten LB-Mediums wurden in einen 2-Liter-Erlenmeyerkolben gefüllt. Die gefüllten Erlenmeyerkolben wurden mit Alufolie abgedeckt und autoklaviert (121°C, 25min).

Durchführung der Transformation

- XL-1 superkompetente *E.coli*-Bakterien (**auf Eis auftauen!**), pUC18-Kontroll-Plasmid und PCR-Produkte auftauen
- Falcon-Gefäße [M10] (Anzahl der PCR-Reaktionsprodukte + 2 für Kontrollen) auf Eis stellen und beschriften
- LB-Agarplatten aus Kühlschrank in den Inkubator stellen (Platten geöffnet, zum Verdunsten des Kondenswassers)
- 20%ige Glucose-Lösung, 10mM IPTG-Lösung und 2%ige X-Gal-Lösung auftauen
- 50µl der XL-1-Bakterien in jedes Falcon-Gefäß pipettieren
- je 1µl der PCR-Reaktionsprodukte, der PCR-Kontrolle und des pUC18-Kontroll-Plasmids zu den XL-1-Bakterien in jedes Falcon-Gefäß pipettieren
- alle Falcon-Gefäße 30min auf Eis stehen lassen (**währenddessen NZY⁺-Lösung herstellen**)
- Wasserbad auf 42°C temperieren
- jedes Falcon-Gefäß durch Eintauchen in das temperierte Wasserbad einem **45sec anhaltenden Hitzeschock** aussetzen
- alle Falcon-Gefäße 2min auf Eis stellen
- anschließend 0,5ml NZY⁺-Lösung (**42°C warm**) in jedes Falcon-Gefäß pipettieren
- alle Falcon-Gefäße 1h bei 37°C und 225-250rpm schütteln

Ausplattieren der transformierten Bakterien

Die während der Transformation im Inkubator stehenden Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten wurden auf den Tisch gestellt.

Zwei LB-Agarplatten wurden für die Kontrollreaktionen mit je 100 μ l 10mM IPTG und 100 μ l 2%igem X-Gal beladen. Auf die erste Platte wurden 250 μ l der mit der PCR-Kontrolle transformierten Bakterien ausgestrichen. Wenn die Mutation erfolgreich war, zeigten die mit der PCR-Kontrolle transformierten Bakterien β -Galaktosidase-Aktivität (siehe Abschnitt 2.1.1). IPTG als Induktor der Lactose-Gene regt die Transkription der Lactose-Gene und damit auch die des β -Galaktosidase-Gens an. X-Gal ist eine farblose Verbindung, welche durch β -Galaktosidase gespalten wird. Es entsteht das tiefblaue 5-Brom-4-chlor-indigo. Entstandene blaue Kolonien wiesen daher sowohl auf eine erfolgreiche Punktmutation als auch erfolgreiche Transformation hin. Die zweite Platte wurde mit einer Mischung aus 195 μ l NZY⁺-Lösung und 5 μ l der mit pUC18-Kontroll-Plasmid transformierten Bakterien bestrichen. Die darauf später entstandenen blauen Kolonien gaben den Nachweis für eine erfolgreiche Transformation.

Auf die restlichen unbeladenen Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten wurden je 150 μ l der mit den PCR-Reaktionsprodukten transformierten Bakterien ausplattiert.

Alle LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C in den Inkubator gestellt (16-18h). Am nächsten Morgen wurden die Agarplatten zur Aufbewahrung in den Kühlschrank überführt.

Amplifikation der transformierten *E. coli*-Bakterien

Alle Agarplatten wurden aus dem Kühlschrank herausgeholt. Die zwei Agarplatten mit der PCR-Kontrolle und dem pUC18-Kontroll-Plasmid wiesen blaue Kolonien auf und wurden verworfen. Von den restlichen Agarplatten wurden mithilfe einer sterilen 1000 μ l Pipette je zwei Klone gepickt und diese in je ein steriles mit 12ml LB-Medium und 12 μ l Ampicillin [50mg/ml] beschicktes 50ml Falcon-Gefäß [M9] überführt. Die Deckel der Falcon-Gefäße wurden lediglich aufgelegt und mit Klebeband fixiert, um eine Luftzufuhr in die Falcon-Gefäße zu gewährleisten. Anschließend wurden alle Falcon-Gefäße acht Stunden bei 37°C und 200rpm geschüttelt.

Nach diesen acht Stunden wurde der Inhalt der Falcon-Gefäße in je einen mit 500ml LB-Medium und 500 μ l Ampicillin [50mg/ml] beschickten 2Liter-Erlenmeyerkolben gegeben. Mit diesen Ansätzen wurde schließlich die Amplifikation der Bakterien - und damit der Plasmid-DNA - gestartet. Dafür wurde bei 37°C und 200rpm 16h geschüttelt.

Am nächsten Morgen folgte die Präparation der Plasmid-DNA.

Animpfen des Bakterienmediums mithilfe von Glycerol-Stocks

Bakterien-Klone, die bei früheren Amplifikationen von transformierten *E.coli*-Bakterien gewonnen wurden, sind in Form von Glycerol-Stocks (1-2 Jahre haltbar) aufbewahrt worden. Glycerol-Stocks enthalten eine Mischung aus klonierten *E.coli*-Bakterien und 60%igem Glycerol. Mithilfe dieser Glycerol-Stocks können die mit 500ml LB-Medium und 500 μ l Ampicillin [50mg/ml] beschickten 2Liter-Erlenmeyerkolben direkt angeimpft werden. Dazu wurde aus den gerade auftauenden Glycerol-Stocks mithilfe einer sterilen 10ml Glaspipette etwas von dem gefrorenen *E.coli*-Glycerol-Gemisch herausgekratzt. Die Spitze dieser Glaspipette wurde vorsichtig in das Ampicillin-haltige LB-Medium getaucht. Der Erlenmeyerkolben wurde wieder mit Alufolie abgedeckt und bei 37°C und 200rpm circa 17 Stunden geschüttelt.

Am nächsten Morgen folgte die Präparation der Plasmid-DNA.

2.1.3 Präparation und Aufbewahrung von Plasmid-DNA

Die Präparation der Plasmid-DNA wurde mithilfe eines Kits [M13] durchgeführt. Die Amplifikation der Bakterien sollte am vorherigen Tag gestartet worden sein. Dies kann durch Verwendung von Glycerol-Stocks oder durch Animpfen des LB-Mediums mit den von LB-Agarplatten selektierten Klonen geschehen sein. Die Plasmid-DNA-Gewinnung erfolgt dann am nächsten Tag (Amplifikationsdauer circa 17h).

Zusätzlich zum Kit benötigte Utensilien. Benötigt werden (für 5 Plasmid-DNA's) noch:

- 5 autoklavierte 500ml Zentrifugenbehältnisse
- 10 autoklavierte kleine Zentrifugenbehältnisse
- 5 50ml Falcon-Gefäße [M9]
- 2-Propanol
- 70% Ethanol
- steriler TE-Puffer

- Eis
- Stoppuhr
- sterile Glaspipetten (10ml und 20ml)

Herstellung des Tris-EDTA(TE)-Puffers.

10mM Te-Puffer (100ml herstellen):

- 1mM EDTA [M14] unter NAOH-Zugabe in Aqua dest. lösen
- 10mM Tris-Base [M15] dazugeben
- pH mit HCl auf 8,0 einstellen
- sterilfiltrieren in 50ml Falcon-Gefäß [M9]

Durchführung der Präparation von Plasmid-DNA

- RNase A (kurz zentrifugieren [M16]; 2500rpm, 30 Sekunden) mit steriler Pipettenspitze in Puffer P1 pipettieren
- Puffer P1 und P3 in den Kühlschrank stellen
- Zentrifuge [M17] auf 4°C kühlen und Rotor einsetzen
- jede 500ml LB-Medium-Bakterienkultur in ein autoklaviertes 500ml Zentrifugenbehältnis überführen (etwas für Glycerol-Stocks aufheben)
- Zentrifugieren (Rotor JLA 10.500, 7000rpm, 30min, 4°C)
- Resuspendieren mithilfe von sterilen 10ml Glaspipetten und 10ml Puffer P1 (mit Pipettenspitze Pellet vom Rand kratzen)
- Überführen der resuspendierten Bakterien in kleine autoklavierte Zentrifugenbehältnisse
- Zugabe von 10ml Puffer P2 und **5min** inkubieren (Stoppuhr!); **gut schwenken**
- Zugabe von **vorgekühltem** Puffer P3 (10ml), umschütteln und **auf Eis** stellen (20min)

- Zentrifugieren (Rotor JA 25.5, 12000rpm, 30min, 4°C)
- Überstand schnellstmöglichst in die 2.Serie der kleinen Zentrifugenbehältnisse abdekantieren
- nochmals (den Überstand) Zentrifugieren (Rotor JA 25.5, 12000rpm, 15min, 4°C)
während der Zentrifugation: Säulen äquilibrieren mit 10ml QBT-Puffer (dauert ungefähr 5 Minuten)
- Überstand zügig auf Säulen geben (ohne Protein-Reste!); Durchfluss verwerfen
- Waschen der Säule mit 2x30ml QC-Puffer; Durchfluss verwerfen
- **jetzt 50ml Falcon-Gefäß unter jede Säule** stellen, Eluieren der DNA mit 15ml QF-Puffer
- in jedes 50ml Falcon-Gefäß 10,5ml 2-Propanol geben, schwenken
- Zentrifugieren (Rotor JS 7.5, 5000xg, 80min, 4°C)
- Überstand vorsichtig abgießen, Falcon-Gefäß umgedreht lagern
- 5ml 70% Ethanol auf jedes Pellet geben (vorsichtig am Rand runterlaufen lassen!)
- Zentrifugieren (Rotor JS 7.5, 5000xg, 15min, 4°C)
- Überstand vorsichtig abgießen und **Falcon-Gefäß nicht wieder umdrehen**; Pellets in Falcon-Gefäßen in umgedrehter Schräglage an der Luft trocknen (höchstens 10min)
- Resuspendieren der Pellets mit je 600µl sterilem TE-Puffer, in Eppendorf-Gefäße überführen und bei -20°C einfrieren

Plasmid-DNA Konzentrationsbestimmung

Es wurden 8µl von der in 600µl sterilem TE-Puffer aufgenommenen Plasmid-DNA für die Gehaltsbestimmung benötigt. Diese 8µl wurden durch Zugabe von 392µl Aqua dest. um den Faktor 50 verdünnt. Für diese Verdünnung wurde bei den Wellenlängen 260nm und 280nm die Absorption vermessen.

Der Gehalt in µg/µl ergab sich aus:

$$\text{Absorption (260nm)} \cdot 0,05 \cdot 50$$

und die Reinheit aus:

$$\frac{\text{Absorption}(260\text{nm})}{\text{Absorption}(280\text{nm})}$$

Aufbewahrung der Bakterien-Klone

Bei Schritt vier der Durchführung der Präparation der Plasmid-DNA wurde etwas von jeder 500ml LB-Medium-Bakterienkultur aufbewahrt. Davon wurden je 900 μ l mit einer sterilen Pipettespitze in ein Kryovial [M23] pipettiert. Nach Zugabe von je 300 μ l 60%igem Glycerol [M27] in jedes Kryovial wurden diese geschüttelt und zügig bei -80°C eingefroren.

Sequenzierung

Die hergestellten punktmutierten Plasmid-DNA's wurden nach der Methode von Sanger et al. (1977) mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen sequenziert. Dazu wurden für jede Punktmutation Sequenzierungsprimer entworfen. Diese sollten im Gegensatz zu den Oligonukleotidprimern für die PCR nur 20-30 Basenpaare lang sein und circa 100 Basenpaare vor der Mutation liegen. Die Bestellung und Aufreinigung erfolgte wie in Abschnitt 2.1.1 beschrieben. Die gelieferten Sequenzierungsprimer wurden in 1ml steril-filtriertem Aqua dest. aufgenommen. Die benötigte Konzentration der Primer für die Sequenzierung betrug 10 μ M. Es wurden 100 μ l dieser Konzentration hergestellt. Die benötigte Menge der jeweiligen DNA-Matrize für die Sequenzierung beträgt 1,5 μ g.

2.1.4 Kultivierung der COS-7 Zelllinie

Für die transiente Transfektion von mutierter Plasmid-DNA wurde eine COS-7 Zelllinie (Herkunft: Nierengewebe der Grünen Meerkatze (*cercopithecus aethiops*)) verwendet. Die Fibroblasten-ähnlichen Zellen wachsen einschichtig. Mehr Informationen, z.B. zur Wachstumsrate, sind in der Online-Datenbank der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH [I3] zu finden.

Nährmedium und Lösungen für COS-7 Zellen

Vorbereitungen für die Herstellung. Vier 500ml Glasflaschen mit Deckel (je 2 Stück für das Nährmedium [DMEM] und für die Spüllösung [PBS]) müssen einen Tag vor der Herstellung autoklaviert worden sein. Dazu wurden je 2 Deckel in kleine Bechergläser

gelegt und diese Bechergläser mit Alufolie abgedeckt. Die offenen Glasflaschen wurden ebenfalls mit Alufolie verschlossen. Anschließend wurde 25min bei 121°C autoklaviert.

Herstellung des Nährmediums Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM). Die Herstellung von 1 Liter DMEM erfolgte mithilfe von Fertigpulver [M18] in einem 2-Liter-Becherglas:

- 1 Packung Fertigpulver DMEM [M18]
- 900ml Aqua dest.
- 10ml Penstrep [M19]
- 3,7g NaHCO₃
- pH-Wert von 7,2 einstellen (mit HCl)
- auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen
- 100ml 10%-iges fetales Kälberserum (FKS)[M20] dazugeben

Der Liter Flüssigkeit wurde mithilfe eines speziellen Filters [M21] unter der Laminar-Flow-Bank in zwei 500ml autoklavierte Glas-Flaschen sterilfiltriert.

Herstellung der Spüllösung Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS). Die Herstellung von 1 Liter PBS erfolgte mithilfe von Fertigpulver [M22] in einem 2-Liter-Becherglas:

- 1 Packung Fertigpulver PBS [M22]
- 1000ml Aqua dest.

Der Liter Flüssigkeit wurde mithilfe eines speziellen Filters [M21] unter der Laminar-Flow-Bank in zwei 500ml autoklavierte Glas-Flaschen sterilfiltriert.

Ausfrieren der COS-7 Zellen

Morgens wurde 1 Kryovial [M23] mit COS-7 Zellen aufgetaut und in eine kleine mit 15ml DMEM beschickte Zellkulturschale [M24] überführt. Nach circa 8 Stunden sollten die Zellen auf dem Boden der Kulturschale angehaftet sein. Dann wurde das alte Nährmedium abgesaugt, mit 10ml PBS gespült und den Zellen neues DMEM (15ml) zugeführt. Zweck ist die Eliminierung von DMSO, welches den Zellen beim Einfrieren zugesetzt wurde.

Vermehren der COS-7 Zellen

Die COS-7 Zellen wurden in großen Zellkulturschalen [M25] vermehrt. Alle folgenden Mengenangaben sind für große Zellkulturschalen angegeben. In Klammern sind die Mengenangaben für kleine Zellkulturschalen [M24] aufgeführt.

- Nährmedium absaugen
- 15ml (10ml) PBS pro Kulturschale zugeben
- PBS absaugen
- 5ml (3ml) Trypsin [M26] pro Kulturschale zugeben
- Kulturschale 5 Minuten in den Inkubator stellen

In jede neu zu beschickende Kulturschale wurden circa 25ml (12ml) DMEM vorgelegt. Parallel wurde in einem Becherglas DMEM vorgelegt (Volumen: Menge des insgesamt verwendeten Trypsins in ml). Aus der mit Trypsin inkubierten Kulturschale wurde die gesamte Flüssigkeit aufgenommen und in das DMEM-befüllte Becherglas überführt. So wurde mit jeder Trypsin-inkubierten Kulturschale verfahren. Anschließend wurde jede Kulturschale mit etwas Flüssigkeit aus dem Becherglas gespült. In dem Becherglas lag dann ein Nährmedium-Trypsin-Zellen-Gemisch mit einem Volumen von 10mal den behandelten Kulturschalen vor (bei 8 großen Kulturschalen also 80ml). Abschließend wurde in jede neue Kulturschale (enthielt 25ml vorgelegtes DMEM) circa 5ml (berechnet aus dem Quotient: Volumen des Becherglases/Anzahl der neuen Kulturschalen) aus dem Becherglas gegeben.

Beispiel: 8 große Kulturschalen sollten auf 16 neue große Kulturschalen verteilt werden. In jede der 8 großen Kulturschalen wurden 5ml Trypsin pipettiert. Also mußten in das Becherglas 5x8ml (=40ml) DMEM vorgelegt werden. Nach der Inkubation der

Trypsin-beschickten Kulturschalen wurde das Trypsin-Zellen-Gemisch, 5x8ml (=40ml), in das mit DMEM-befüllte Becherglas überführt. Damit lagen letztendlich im Becherglas 80ml DMEM-Trypsin-Zellen-Gemisch vor. Diese 80ml wurden nun auf die 16 neuen großen Kulturschalen gleichmäßig verteilt. Damit erhielt jede neue Kulturschale 80ml/16 (=5ml) DMEM-Trypsin-Zellen-Gemisch.

Einfrieren der COS-7 Zellen

Aus dem Inhalt einer großen Zellkulturschale kann man 3 Kryovials füllen. Um 12 Kryovials mit COS-7 Zellen einzufrieren, wurden 4 große Kulturschalen folgendermaßen behandelt:

- Nährmedium absaugen
- 15ml PBS pro Kulturschale zugeben
- PBS absaugen
- 5ml Trypsin pro Kulturschale zugeben
- Kulturschale 5 Minuten in den Inkubator stellen
- in ein Becherglas 20ml DMEM vorlegen (Trypsin soll durch 1:1 Verhältnis mit DMEM inaktiviert werden: 4 Kulturschalen x 5ml Trypsin ergeben 20ml)
- 1.Kulturschale mit 10ml DMEM aus dem Becherglas spülen und alles wieder ins Becherglas überführen
- 2.Kulturschale mit 10ml DMEM aus dem Becherglas spülenetc.

Letztendlich waren circa 40 ml im Becherglas. Dieses Volumen wurde in ein steriles 50ml Falcon-Gefäß überführt und 5 min bei 1000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert (Rotor JS 7.5, [M17]). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 12ml DMEM (da 12 Kryovials a 1ml Volumen gefüllt werden sollten) resuspendiert. In jedes Kryovial wurden 100 μ l DMSO [M28] vorgelegt und 900 μ l Zellsuspension dazugegeben. Jedes Kryovial wurde einmal umgedreht, damit das DMSO mit der Zellsuspension vermischt wurde. Anschließend wurden die Kryovials in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.1.5 Transfektion

Die Transfektion umfasst insgesamt 4 Tage:

- 1.Tag:** COS-7 Zellen zählen und ausplattieren (Freitag)
- 2.Tag:** Transfektion (Montag)
- 3.Tag:** Nährmedium der transfizierten Zellen wechseln (Dienstag)
- 4.Tag:** Membranpräparation (Donnerstag)

Zählen und Ausplattieren der COS-7 Zellen

Im besten Fall hat man 30 große Kulturschalen vorliegen. Für die Behandlung der COS-7 Zellen ist die Aufteilung in 3 Chargen am günstigsten.

Eine Charge große Kulturschalen (10 Stück) wurde unter die Laminar-Flow-Bank gestellt.

- Nährmedium absaugen
- 15ml PBS pro Kulturschale zugeben
- PBS absaugen
- 5ml Trypsin pro Kulturschale zugeben
- Kulturschale 5 Minuten in den Inkubator stellen

In ein Becherglas wurden 3x50ml (da insgesamt für die 3 Chargen 150ml Trypsin verwendet werden) DMEM vorgelegt. Die 10 Kulturschalen wurden aus dem Inkubator geholt und der Inhalt aller 10 Kulturschalen wurde in das Becherglas überführt. Anschließend wurde jede der 10 Kulturschalen mit dem DMEM-Trypsin-Zellen-Gemisch aus dem Becherglas gespült. Das Becherglas wurde gut geschwenkt, um den Inhalt (200ml nach Behandlung der 1.Charge) zu homogenisieren.

Mit der 2. und 3. Charge wurde ebenso verfahren. Es lagen abschließend im Becherglas 300ml DMEM-Trypsin-Zellen-Gemisch vor.

Von diesem 300ml DMEM-Trypsin-Zellen-Gemisch wurden 50 μ l in ein Eppendorf-Gefäß (zum Zählen der Zellen) pipettiert und der Rest wurde gleichmäßig in 50ml Falcon-Gefäße verteilt (z.B. je 37,5ml in 8 Falcon-Gefäße) und 4min bei 1000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert (Rotor JS 7.5, [M17]).

Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurden die COS-7 Zellen gezählt. Die erhaltene Anzahl der COS-7 Zellen (z.B. 37.500.000) in dem 300ml DMEM-Trypsin-Zellen-Gemisch wurde durch 625.000 (gewünschte Anzahl der COS-7 Zellen pro neu zu beschickende Kulturschale) geteilt. Damit erhielt man die Menge an neu zu beschickenden kleinen Kulturschalen (z.B. 60 Stück). In jede kleine Kulturschale wurden 10ml DMEM vorgelegt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand der Falcon-Gefäße abgesaugt und die Pellets mit neuem DMEM resuspendiert. Die Menge des zur Resuspension einzusetzenden DMEM's entsprach der Anzahl der zu beschickenden kleinen Kulturschalen (z.B. 60ml). Abschließend wurde in jede kleine Kulturschale 1ml der resuspendierten COS-7 Zellen pipettiert.

Benötigte Utensilien für Transfektion

- 20 μ g pro zu transfizierender Plasmid-DNA
- sterile 0,25M Calciumchlorid-Lösung
- sterile BBS-Lösung
- 5ml Rundbodenröhrchen [M31]
- sterile Pasteurpipetten (und Gummipfropf)
- Stopuhr

Herstellung der Lösungen.

0,25M Calciumchlorid-Lösung (500ml herstellen):

- 0,25M Calciumchlorid [M29] lösen
- sterilfiltrieren in 50ml Falcon-Gefäße [M9]
- einfrieren bei -20°C

BBS-Lösung (500ml herstellen):

- 50mM BES [M30], 1,5mM Na₂HPO₄ [M55] und 0,28mM NaCl in Aqua dest. lösen
- pH-Wert von 6,95 einstellen (essentiell für Gelingen der Transfektion!)

- mit Aqua dest. auf 500ml auffüllen
- sterilfiltrieren in 50ml Falcon-Gefäße [M9]
- einfrieren bei -20°C

Durchführung der Transfektion

Die Transfektion erfolgte nach der Methode der Calciumphosphat-Präzipitation und wurde unter der Laminar-Flow-Bank durchgeführt. Die Transfektion einer Plasmid-DNA-Charge wurde folgendermassen durchgeführt:

In 10 kleine Zellkulturschalen wurde je eine Charge Plasmid-DNA transfiziert. Dazu wurde pro Zellkulturschale ein 5ml Rundbodenröhrchen (also für 10 Schalen 10 Rundbodenröhrchen) in einen passenden Ständer gestellt. Die Plasmid-DNA wurde in der Zwischenzeit aus dem Tiefkühlschrank genommen. In jedes der Röhrchen wurden zuerst 500 μ l CaCl₂-Lösung und anschließend je 20 μ g Plasmid-DNA pipettiert (Pipette an der Wand des Röhrchens abstützen).

Die einzusetzende Menge Plasmid-DNA in μ l wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{20\mu\text{g}}{\text{Gehalt}[\mu\text{g}/\mu\text{l}]}$$

Tatsächlich wurden 2-3 μ l DNA mehr als errechnet verwendet. Nachdem die DNA durch leichtes Aufstossen auf die Laminar-Flow-Bank auf den Boden des Röhrchens gebracht wurde, wurden in jedes Röhrchen 500 μ l BBS-Lösung pipettiert. Danach wurde jedes Röhrchen gut geschüttelt (vorsichtig!) und die Ansätze 10 bis 15 min stehen gelassen. In dieser Zeit wurde am Inkubator der CO₂-Gehalt von 5% auf 3% reduziert.

Nachdem die Inkubationszeit von 10 bis 15 min vorüber war, wurden 10 Kulturschalen aus dem Inkubator herausgeholt und unter die Laminar-Flow-Bank gestellt. Mithilfe einer sterilen Pasteurpipette wurde der Inhalt **eines** Röhrchens tropfenweise in **eine** Kulturschale (schütteln!) überführt. Die Zellkulturschale wurde über Nacht in den Inkubator gestellt. Genauso wurde mit den restlichen 9 Kulturschalen verfahren.

Nährmedium der COS-7 Zellen wechseln

Das Nährmedium der transfizierten COS-7 Zellen wurde abgesaugt, mit 10ml PBS gespült und neues Nährmedium (10ml) zugesetzt. Der CO₂-**Gehalt** des Inkubators wurde von von **3% auf 5%** gesteigert.

Benötigte Utensilien für Membranpräparation

- Eis
- 1 kleines Becherglas für auf 37°C temperiertes PBS
- 1 kleines Becherglas für eisgekühlten 5mM Na, K, P_i(PB)-Puffer (Herstellung siehe Abschnitt 2.5.2)
- 1 großes Becherglas für den Abfall

Durchführung der Membranpräparation

Die limitierende Größe ist die Anzahl der Zentrifugengläser, die in den Rotor JA 25.5 der Zentrifuge [M17] passen.

Es wurden 10 kleine Kulturschalen [1 Charge DNA] (ergeben 2 kleine Zentrifugenbehälter) genommen und auf den Tisch gestellt (ab jetzt ist das Arbeiten unsteril).

- alle 10 Kulturschalen ausleeren (DMEM in großes Becherglas abkippen)
- alle 10 Kulturschalen mit warmer PBS-Lösung (unsteril) waschen (circa 2ml warme PBS-Lösung aus kleinem Becherglas in jede Platte an den Rand kippen)
- PBS wieder abkippen in großes Becherglas
- jetzt in jede Kulturschale 4ml eisgekühlten 5mM PB-Puffer geben (5ml Plastikpipette)
- alle 10 Kulturschalen mit Zellschaber [M32] schaben
- Inhalt von je 5 Kulturschalen (jede enthält ungefähr 4ml, also insgesamt 20 ml) in 1 kleines Zentrifugenglas überführen - dabei jede Kulturschalen spülen (**auf EIS** stellen)
- die anderen 5 Kulturschalen in 2. Zentrifugenglas geben - ebenfalls jede spülen (**auf EIS** stellen)
- Homogenisieren des Zentrifugeninhaltes mit Polytron [M33] - Stufe 6, 3 mal 10 sec jedes Zentrifugenglas (**auf EIS** stellen)
- Zentrifugieren (Rotor JA 25.5, 18000rpm, 30min, 4°C)

- Überstand verwerfen
- Pellets (2 Stück aus 2 Zentrifugengläsern) resuspendieren in 2ml 5mM PB-Puffer
- in Glas-Homogenisator überführen
- jedes Zentrifugenglas 3 mal mit je 2ml 5mM PB-Puffer ausspülen (alles in den Glas-Homogenisator überführen)
- zusammengeführtes Volumen (16ml) auf maximal 18ml mit 5mM PB auffüllen und im Glas-Homogenisator durchmischen
- in Becherglas überführen und restliches Puffervolumen zugeben, so dass Aliquot-Menge stimmt; x-Kulturschalen mal 3ml = Gesamtvolumen zum Aliquotieren
- aliquotieren und bei -80°C einfrieren

2.2 Kultivierung der stabil transfizierten CHO-Zelllinie

Die verwendete stabil transfizierte Chinese-hamster-ovary(CHO)-Zelllinie exprimierte den humanen M₂-Rezeptor. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. NJM. Birdsall² zur Verfügung gestellt.

Nährmedium für CHO-Zellen

In eine 500ml Nährmedium-Flasche [M34] wurde Folgendes gegeben:

- 3ml L-Glutamin (200mM)[M35]
- 5ml Penicillin-Streptomycin-Lösung [M19]
- 50ml 10%iges Fetales Kälberserum (FKS)[M20]
- 1ml (100mg) G418 (Geneticin-disulfat) [M36]

²Division of Physical Biochemistry, National Institute for Medical Research, Mill Hill, London, UK

Ausfrieren

Es wurde ein Kryovial mit CHO-Zellen aufgetaut und der Inhalt in ein 50ml Falcon-Gefäß überführt, in welchem 20ml Nährmedium vorgelegt wurden. Anschließend wurde 4min bei 1000rpm und 4°C zentrifugiert (Rotor: JS 7,5 [M17]). Zweck war die Eliminierung von DMSO, welches den Zellen beim Einfrieren zugesetzt wurde. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 25ml frischem Nährmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche [M37] überführt.

Vermehren

Die CHO-Zellen wurden in Kulturflaschen [M37] vermehrt. Mit einer Kulturflasche wurde folgendermaßen verfahren:

- Nährmedium absaugen
- 5ml Trypsin [M26] pro Kulturflasche zugeben
- Kulturflasche 5 Minuten in den Inkubator stellen

Zu der mit Trypsin inkubierten Zellkultur wurden 10ml Nährmedium gegeben und damit die Zellen vom Boden gelöst. Der Inhalt dieser Kulturflasche wurde in ein 50ml Falcon-Gefäß überführt.

So wurde mit jeder Kulturflasche verfahren und anschließend das Trypsin-Zellen-Nährmedium Gemisch 4min bei 1000rpm und 4°C zentrifugiert (Rotor: JS 7,5 [M17]). Inzwischen waren in jeder neu zu beschickenden Kulturflasche 20ml Nährmedium vorgelegt worden. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem Nährmedium resuspendiert. Die Menge des einzusetzenden Nährmediums ergab sich aus: 2ml x Anzahl der neu beschickten Kulturflaschen. Die resuspendierten Zellen wurden in beschickte Kulturflaschen a 2ml verteilt.

Einfrieren

Mit dem Inhalt einer Kulturflasche kann man 4 Kryovials füllen. Die Schritte des Einfrierens gleichen denen beim Vermehren bis hin zur Zentrifugation. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet mit frischem Nährmedium resuspendiert. Die Menge des einzusetzenden Nährmediums ergab sich aus der Anzahl der gewünschten Kryovials [M23], da jedes

nur 1ml Fassungsvermögen besitzt. In jedes Kryovial wurden 100 μ l DMSO vorgelegt und 900 μ l der Zellsuspension dazugegeben. Jedes Kryovial wurde einmal umgedreht, damit sich das DMSO mit der Zellsuspension vermischte. Anschließend wurden die Kryovials in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Membranpräparation

Die Membranpräparation wurde mit dem Inhalt von 16 Kulturflaschen durchgeführt. Am Vortag der Membranpräparation (circa 18 Stunden davor) wurde den CHO-Zellen Butyrat-haltiges Nährmedium zugegeben, um die Proteinexpression zu steigern. Dazu wurden 250ml Nährmedium mit 12,5ml sterilfiltriertem Butyrat [M38] versetzt. Das Nährmedium wurde aus den 16 Flaschen abgesaugt und durch 15ml Butyrat-haltiges Nährmedium pro Flasche ersetzt.

Herstellung der Puffer für Membranpräparation.

Homogenisierungspuffer (20mM HEPES, 10mM Na₂EDTA):

- 50ml HEPES (200mM) [2/3 M39 und 1/3 M40]
- 50ml Na₂EDTA(100mM) [M56]
- ad 500ml Aqua dest.

End-Puffer (20mM HEPES, 0,1mM Na₂EDTA):

- 50ml HEPES (200mM)
- 0,5ml Na₂EDTA (100mM)
- ad 500ml Aqua dest.

Durchführung der Membranpräparation

Es wurden 16 Kulturflaschen für die Membranpräparation genutzt. Diese 16 Flaschen wurden in Chargen a 4 Flaschen behandelt. Das folgende Protokoll zur Durchführung der Membranpräparation beschreibt die Behandlung einer Charge.

Es wurden 4 Kulturflaschen aus dem Inkubator genommen.

- Absaugen des Nährmediums aus allen 4 Flaschen

- je 3ml Homogenisierungspuffer in jede Flasche pipettieren
- alle 4 Flaschen mit Zellschaber [M32] bearbeiten
- Inhalt der 4 Flaschen in ein 50ml Falcon-Gefäß überführen (Falcon-Gefäß **auf EIS** stellen)
- 1,5ml Homogenisierungspuffer in erste Flasche pipettieren, mit 10ml Pipette spülen; diesen Flascheninhalt in die nächste Flasche überführen und dort auch spülen etc.
- nach dem Spülen der 4. Flasche den Inhalt dieser auch in das 50ml Falcon-Gefäß geben
- Homogenisieren der Suspension im Falcon-Gefäß mit Polytron [M33] - Stufe 6, 2 mal 10 sec pro Falcon-Gefäß (**auf EIS** stellen)
- Zentrifugieren (Rotor JA 25.5 [M17], 40000 x g, 10min, 4°C)
- Überstand absaugen
- auf das Zellpellet 30ml End-Puffer geben und resuspendieren
- Zentrifugieren (Rotor JA 25.5, 40000 x g, 10min, 4°C)
- auf das Zellpellet wiederum 30ml End-Puffer geben und resuspendieren
- Zentrifugieren (Rotor JA 25.5, 40000 x g, 10min, 4°C)
- Überstand absaugen
- mit 10ml End-Puffer resuspendieren
- in Kryovials a 550µl überführen
- bei -80°C einfrieren

Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der aus CHO-Zellen gewonnenen Membransuspensionen wurde mithilfe der Folin-Ciocalteu-Methode nach Lowry (Lowry et al., 1951) bestimmt.

2.3 Gleichgewichtsbindungsexperimente

Eine reversible Ligand-Rezeptor-Interaktion lässt sich beschreiben durch



[L] entspricht der Konzentration an freiem Liganden, [R] der Konzentration an freien Rezeptoren und [RL] der Konzentration an Rezeptor-Ligand-Komplexen. k_{+1} bzw. k_{-1} stellen die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation bzw. der Dissoziation dar. Die zeitliche Änderung der Konzentration des Ligand-Rezeptor-Komplexes ist

$$\frac{d}{dt}[RL] = k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] - k_{-1} \cdot [RL] \quad (2.2)$$

Die Reaktion befindet sich im Gleichgewicht, wenn sich die Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe nicht mehr ändert.

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt}[RL] &= 0 \\ \implies k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] &= k_{-1} \cdot [RL] \end{aligned} \quad (2.3)$$

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_D) ergibt sich aus

$$\frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} = K_D = \frac{1}{K_A} \quad (2.4)$$

und ist der Kehrwert der Gleichgewichts-Assoziationskonstante (K_A). Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (mit der Einheit mol/l) ist ein Maß für die Affinität einer Substanz zum Rezeptor. Je kleiner K_D einer Substanz ist, desto größer ist ihre Affinität zum Rezeptor.

2.3.1 Sättigungsexperimente

Ziel der Sättigungsexperimente ist die Charakterisierung der Bindungseigenschaften einer Membransuspension durch Bestimmung ihrer Rezeptorkonzentration (R_{total} oder B_{max}) und die Bestimmung der Affinität des verwendeten Liganden zu diesen Rezeptoren (K_D).

Zu diesem Zweck wird eine fixe Konzentration einer Membransuspension mit verschiedenen Radioligandkonzentrationen versetzt. Durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Verwendung der Langmuir'sche-Sättigungsisotherme (Gleichung 2.5) können R_{total} und K_D bestimmt werden:

$$[RL] = \frac{R_{total} \cdot [L]}{K_D + [L]} \quad (2.5)$$

$[RL]$ entspricht der spezifischen Bindung des Radioliganden, $[L]$ der freien Konzentration des Radioliganden und K_D ist die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Radioligandbindung. Folgenden Bedingungen müssen für die Bestimmung von R_{total} und K_D eingehalten werden (Bennett and Yamamura, 1985):

- das Massenwirkungsgesetz gilt und die Reaktion ist damit reversibel
- es liegt ein Bindungsgleichgewicht vor
- es existiert eine einheitliche Population von nicht-interagierenden Rezeptoren
- $R_{total} \leq \frac{1}{10} K_D$
- der gebundene Anteil des Radioliganden beträgt maximal 10%, so dass die freie Ligand-Konzentration näherungsweise der eingesetzten entspricht

Die begrenzte Anzahl von Rezeptoren, R_{total} (oder B_{max}), setzt sich zusammen aus:

$$R_{total} = [R] + [RL] \quad (2.6)$$

Die fraktionelle Rezeptorbesetzung (B_f) ist eine Funktion der Ligandkonzentration und der Affinität. Sie gibt den Anteil der Rezeptoren an, der durch den Liganden besetzt ist:

$$B_f = \frac{[RL]}{R_{total}} = \frac{[RL]}{[R] + [RL]} = \frac{[L]}{[L] + K_D} \quad (2.7)$$

Wenn die Ligandkonzentration den gleichen Betrag wie die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante annimmt, liegt die fraktionelle Rezeptorbesetzung bei 50%. Der K_D -Wert entspricht somit derjenigen Ligandkonzentration, bei der die Hälfte aller Rezeptoren besetzt sind.

Durch Linearisierung der Sättigungsisotherme (Gleichung 2.5) erhält man die Scatchard-Gleichung:

$$\frac{[RL]}{[L]} = -\frac{1}{K_D} \cdot [RL] + \frac{R_{total}}{K_D} \quad (2.8)$$

Auch die folgende Darstellung wird oft verwendet:

$$\implies \frac{B}{F} = -\frac{1}{K_D} \cdot B + \frac{B_{max}}{K_D}$$

B(ound) steht hier für den gebundenen Anteil und F(ree) für den freien Anteil des Radioliganden.

Bei der linearen Regressionsanalyse der Daten wird die spezifische Bindung [RL] oder B(ound) (Abszisse) gegen den Quotienten aus spezifischer Bindung und freier Radioligandkonzentration ([RL]/[L] oder B/F) (Ordinate) aufgetragen. K_D ist der negative Kehrwert der Steigung der resultierenden Geraden. R_{total} (oder B_{max}) ist der Schnittpunkt mit der X-Achse.

Die spezifische Bindung kann im Experiment nicht direkt ermittelt werden. Stattdessen werden Gesamtbindung und unspezifische Bindung bestimmt und aus deren Differenz die spezifische Bindung errechnet.

Die unspezifische Bindung ist meist eine nichtsättigbare Bindung (in dem Konzentrationsbereich der spezifischen Bindung). Sie setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen:

1. unspezifische Bindung an der Membranpräparation
2. beim Abfiltrieren der Membranen zurückbleibender freier Radioligand (durch ungenügendes Spülen)
3. unspezifische Bindung an Filter und andere verwendete Materialien

Die Komponenten 1, 2 und 3 können durch geeignete Maßnahmen während des Versuches (optimierte "Waschzeit" mit der Spüllösung und Behandlung des Filters mit einem Antiadsorbens) stark reduziert werden.

Die unspezifische Bindung wird für jeden Versuch direkt bestimmt. Dazu wird eine gut charakterisierte Substanz eingesetzt, die sich strukturell vom Radioliganden unterscheidet, aber mit hoher Affinität mit derselben Bindungsstelle wie der Radioligand am Rezeptor interagiert. Diese kompetitive Substanz wird in sehr hohen Konzentrationen eingesetzt, so dass der Radioligand lediglich noch in unspezifischer Bindung (Punkt 1-3) vorhanden sein kann.

2.3.2 Konkurrenzexperiment

Eine fixe Konzentration eines Radioliganden wird mit steigenden Konzentrationen eines unmarkierten Liganden versetzt. Ausgehend von einer Gesamtbindung B_0 des Radioliganden unter Abwesenheit des unmarkierten Liganden, fällt die Bindung bei Einsatz ansteigender Konzentrationen des Kompetitors bei einer halblogarithmischen Auftragung der Meßwerte in einem sigmoiden Kurvenverlauf auf die Höhe der unspezifischen Bindung ab.

Die Kurve wird durch die "4 Parameter logistische Gleichung" (Barlow and Blake, 1989) (siehe Anhang B.2) beschrieben.

$$[L] = \text{MIN} + \frac{(\text{MAX} - \text{MIN})}{1 + 10^{(\log IC_{50} - \log[L]) \cdot n}} \quad (2.9)$$

Das obere Plateau (MAX) entspricht der Gesamtbindung B_0 des Radioliganden. Das untere Plateau (MIN) ist gleich der unspezifischen Bindung. Die spezifische Bindung berechnet sich als Differenz aus MAX und MIN. Der Wendepunkt der Kurve ergibt den IC_{50} -Wert, d.h. die Konzentration des Kompetitors, bei der 50% der Rezeptoren besetzt sind.

Bei Verwendung von strukturell unterschiedlichen Liganden spricht man von einem *heterologen Konkurrenzexperiment*. Die Affinität des Kompetitors (K_I) wird mit Hilfe der Gleichung nach Cheng & Prusoff (Cheng and Prusoff, 1973) bestimmt.

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad (2.10)$$

$[L]$ entspricht der eingesetzten Radioligandkonzentration, und K_D ist ein Maß für die Affinität des Radioliganden zu den Rezeptoren der verwendeten Membransuspension (Bestimmung durch *homologe Konkurrenzexperimente*). K_I ist im Gegensatz zu IC_{50} ein vom Radioliganden unabhängiges Affinitätsmaß für den Kompetitor.

Wenn Radioligand und Kompetitor strukturell identisch sind, handelt es sich um *homologe Konkurrenzexperimente*. Ziele dieser Versuchsart sind die Charakterisierung der maximalen Rezeptoranzahl einer Membransuspension (B_{max}) und die Bestimmung der Affinität des Liganden zu den Rezeptoren dieser Membransuspension (K_D). Bei Sättigungsexperimenten werden die gleichen Größen bestimmt. Die homologen Konkurrenzexperimente haben aber zwei Vorteile: Die Verwendung von lediglich einer Radioligandkonzentration - es sind deswegen wesentlich weniger aufwendige Experimente. Und die unspezifischen Bindung muss nur für eine Radioligandkonzentration bestimmt werden. Da in homologen Konkurrenzexperimenten $K_I = K_D$, vereinfacht sich Gleichung 2.10

zu

$$K_D = IC_{50} - [L] \quad (2.11)$$

und B_{max} lässt sich nach DeBlasi (DeBlasi et al., 1989) berechnen:

$$B_{max} = \frac{B_0 \cdot IC_{50}}{[L]} \quad (2.12)$$

Dabei entspricht B_0 der spezifischen Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des unmarkierten Liganden, IC_{50} der Konzentration des Kompetitors, bei der die Hälfte der Rezeptoren besetzt ist und $[L]$ der Konzentration des Radioliganden.

Kompetition an der orthosterischen Bindungsstelle

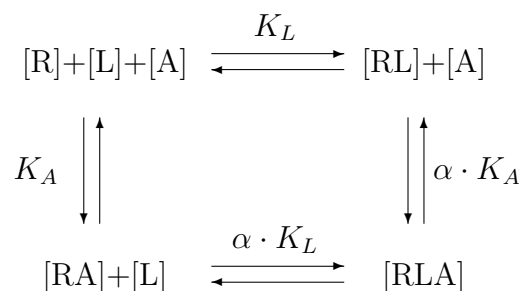
Die Kompetition um die orthosterische Bindungsstelle erfolgt zwischen einem Radioorthoster (zum Beispiel $[^3\text{H}]N$ -Methylscopolamin, Strukturformel siehe Abbildung 2.1) und einem orthosterischen Liganden. Bestimmt wird die Affinität des Inhibitors (K_I) mithilfe der oben genannten Gleichung 2.10 nach Cheng & Prusoff.

Kompetition an der allosterischen Bindungsstelle

Die Kompetition um die allosterische Bindungsstelle erfolgt zwischen dem Radioalloster $[^3\text{H}]$ Dimethyl – W84 (Strukturformel der unmarkierten Verbindung siehe Abbildung 2.4) und einem allosterischen Liganden. Die Affinität des Inhibitors (K_I) wird ebenfalls mithilfe der oben genannten Gleichung 2.10 nach Cheng & Prusoff bestimmt.

Versuche unter Einbeziehung beider Bindungsstellen

Bei gleichzeitiger Betrachtung beider Bindungsstellen, sowohl der orthosterischen als auch der allosterischen Bindungsstelle, wird das von Ehlert (Ehlert, 1988) postulierte Bindungsmodell angewandt: das *ternäre Modell allosterischer Interaktionen*.



[R] entspricht der freien Rezeptorkonzentration, [L] der Konzentration des orthosterischen Liganden und [A] der Konzentration des allosterischen Liganden. K_L bzw. K_A sind die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten der Bindung des orthosterischen bzw. des allosterischen Liganden und geben die Affinität des jeweiligen Liganden zum unbesetzten Rezeptor wieder. Wenn ein binärer Komplex [RA] vorliegt, kann die Affinität des orthosterischen Liganden (K_L) zum nun besetzten Rezeptor im Gegensatz zum freien verändert sein. Das Ausmaß dieser Veränderung wird durch den Kooperativitätsfaktor α angegeben. Die veränderte Affinität ergibt sich aus dem Produkt $\alpha \cdot K_L$. Da sich die beiden Liganden gegenseitig und im gleichen Ausmass beeinflussen, ist beim Vorliegen eines Komplexes [RL] die veränderte Affinität von A gegeben durch $\alpha \cdot K_A$. Die Kooperativität der beiden Liganden kann positiv ($\alpha < 1$), negativ ($\alpha > 1$) oder neutral ($\alpha = 1$) sein. Bei positiver Kooperativität wirken die Liganden aufeinander bindungsfördernd. Bei negativer Kooperativität dagegen wirken sie aufeinander bindungshemmend. Keine sichtbare Beeinflussung findet bei neutraler Kooperativität statt. Kooperativität läßt sich im Prinzip durch Radioligand-Bindungsuntersuchungen in zweierlei Weise messen.

1. [³H]Alloster in fixer Konzentration gegen Orthoster in steigender Konzentration
2. [³H]Orthoster in fixer Konzentration gegen Alloster in steigender Konzentration

Die Auswertung erfolgt unter Verwendung der Ehlert-Gleichung, hier dargestellt für die zweite Meßmethodik:

$$B_A = B_0 \cdot \frac{[L] + K_L}{[L] + K_L \cdot \frac{K_A + [A]}{K_A + \frac{[A]}{\alpha}}} \quad (2.13)$$

[L] entspricht der fixen Radioligandkonzentration und K_L ist die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante von L, ermittelt in einem homologen Wettbewerbsexperiment. [A] gibt die eingesetzte Konzentration des allosterischen Modulators an. K_A ist die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Allosters. B_A gibt die spezifische Bindung des Radioliganden bei Anwesenheit von A an, B_0 die spezifische Bindung in Abwesenheit von A.

Durch die *Ehlert-Gleichung* können sowohl die Affinität des allosterischen Modulators (in Form von K_A) als auch der Kooperativitätsfaktor (α) bestimmt werden. Dazu wird die nichtlineare Regressionsanalyse der Meßpunkte nach der folgenden logarithmierten Ehlert-Gleichung durch den Computer ausgeführt:

$$B_A = B_0 \cdot \frac{10^{\log[L]} + 10^{\log K_L}}{10^{\log[L]} + 10^{\log K_L} \cdot \frac{10^{\log K_A} + 10^{\log[A]}}{10^{\log K_A} + \frac{10^{\log[A]}}{\alpha}}} \quad (2.14)$$

Zum Zeitpunkt der Messung müssen Gleichgewichtsbedingungen vorliegen. Die Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung ($t_{1/2_{\text{obs}}}$) errechnet sich nach folgender Gleichung (Lazarenno and Birdsall, 1995):

$$t_{1/2_{\text{obs}}} = t_{1/2_{\text{off}}} \cdot \left(1 + X \cdot \frac{1}{\text{EC}_{50_{\text{Diss}}}}\right) \quad (2.15)$$

Dabei gibt $t_{1/2_{\text{off}}}$ die Halbwertszeit der Radioligand-Dissoziation unter Kontrollbedingungen an, X steht für die Allosterkonzentration und $\text{EC}_{50_{\text{Diss}}}$ beschreibt die Allosterkonzentration bei halbmaximaler Reduktion der Radioligand-Dissoziation. In der vorliegenden Arbeit wurde für das Erreichen des Bindungsgleichgewichtes $5 \cdot t_{1/2_{\text{obs}}}$ als ausreichend angenommen.

2.4 Kinetische Experimente

Bei dieser Art von Versuchen werden die Assoziation oder Dissoziation von Ligand-Rezeptor-Komplexen untersucht. Ziele der Versuche sind:

- die Kinetik der Radioligand-Bindung zu erfassen und den Effekt allosterischer Modulatoren hierauf
- Bestimmung der Zeit zur Einstellung des Bindungsgleichgewichtes für Gleichgewichtsbindungsversuche

2.4.1 Dissoziationsexperimente

Nach Erreichen des Gleichgewichtes für den zu untersuchenden Radioligand-Rezeptor-Komplex wurde die Assoziation des Radioliganden durch Zugabe eines Überschusses eines kompetitiven Antagonisten verhindert.

$$k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] \ll -k_{-1} \cdot [RL] \quad (2.16)$$

$$\Rightarrow \frac{d}{dt}[RL] = -k_{-1} \cdot [RL] \quad (2.17)$$

$$\Rightarrow [RL]_t = [RL]_0 \cdot e^{-k_{-1} \cdot t} + u \quad (2.18)$$

Es resultiert eine Abnahme der Radioligandbindung $[RL]$ über die Zeit, die mit Gleichung 2.18 beschrieben wird. $[RL]_t$ gibt die Gesamtbindung des Radioliganden zum Zeitpunkt

t an. $[RL]_0$ steht für die spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt $t = 0$ und u gibt die unspezifische Radioligandbindung an.

Die Dissoziations-Halbwertszeit errechnet sich aus:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{-1}} \quad (2.19)$$

und gibt die Zeit an, in der der Ligand-Rezeptor-Komplex auf die Hälfte des Wertes fällt, der zum Zeitpunkt $t = 0$ ermittelt wird.

Die erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation (k_{-1}) in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des allosterischen Modulators wurden ermittelt und durch die Geschwindigkeitskonstante der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation in Abwesenheit des allosterischen Modulators dividiert. Diese Quotienten wurden gegen die logarithmierte Konzentrationen des allosterischen Modulators aufgetragen, um eine Konzentrations-Effekt-Kurve zu erhalten.

2.5 Versuchsaufbau

2.5.1 Membranabtrennung mittels des Tomtec-Harvesters

Der verwendete Harvester 96[©] der Firma Tomtec [M41] bietet die Möglichkeit, sechsundneunzig Filtrationen gleichzeitig vorzunehmen. Die verwendeten Mikrotiterplatten aus Polyethylen [M42] haben 96 Bohrungen mit einem Fassungsvermögen von je $1200\mu\text{l}$ pro Bohrung. Die verwendeten Glasfaserfilter [M43] wurden jeweils eine Stunde vor Beginn des Versuches in 0,2%ige Polyethylenimin-Lösung [M44] eingelegt und kurz vor der Abfiltration des Versuches in den Tomtec-Harvester eingebracht. Durch dieses Antiadsorbens erfolgte eine Reduktion der unspezifischen Bindung des Radioliganden am Filter. Nach der Filtration des Versuchsansatzes wurde einmal mit 0,1%iger Natriumchlorid-Lösung gespült, um die unspezifische Bindung weiter zu reduzieren. Zur Elimination des Restwassers wurde der Filter drei Minuten bei 400 Watt in einer Mikrowelle getrocknet. Anschließend wurde mit Hilfe eines Heizblockes der Filter mit einem Feststoffszintillator [M45], eingebettet in ein Wachs, verschmolzen. Nach dem Erstarren des Wachses wurden Filter und Wachsplatte in eine Schutzhülle aus Plastik [M46] gelegt und abschließend in einem Szintillationszähler [M47] vermessen.

Herstellung des HEPES-Puffers.

15,5mM HEPES-Puffer (500ml herstellen):

- 1,23g HEPES [M39] und 0,67g HEPES-Natrium-Salz [M40] einwiegen
- in 500ml Meßkolben mit Aqua dest. lösen

Versuchsansatz für Konkurrenzexperimente

Das Ansatzvolumen für die Versuche betrug $310\mu\text{l}$ pro Bohrung. Dieses setzte sich für Konkurrenzexperimente wie in Tabelle 2.2 aufgeführt zusammen. In die Mikrotiterplatte wurden zuerst die verschiedenen Ligandkonzentrationen einpipettiert (für die Bestimmung der Gesamtbindung des Radioliganden stattdessen Aqua dest. und für die unspezifische Bindung Atropin $3 \cdot 10^{-5}\text{M}$, Endkonzentration $1 \cdot 10^{-4}\text{M}$). Die restlichen fünf Bestandteile wurden in den Volumina des kompletten Versuchsansatzes in ein 50ml Falcon-Gefäß [M9] zusammengegeben, geschüttelt und anschließend den zuvor mit Ligand-Lösung befüllten Bohrungen zugesetzt. Es folgte eine Inkubationszeit von zwei Stunden bei 23°C . Anschließend wurde abfiltriert und die membrangebundene Radioaktivität wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben ermittelt.

Volumen	Bestandteil	Endkonzentration
$10\mu\text{l}$	Ligand	1/30 der eingesetzt. Konz.
$20\mu\text{l}$	$[^3\text{H}]\text{NMS}$	$4 \cdot 10^{-9}\text{M}$
$200\mu\text{l}$	HEPES-Puffer	$1 \cdot 10^{-2}\text{M}$
$20\mu\text{l}$	NaCl-Lösung	$1,7 \cdot 10^{-2}\text{M}$
$30\mu\text{l}$	BSA-Lösung	0,01%
$30\mu\text{l}$	Homogenat	$25\mu\text{g}/\text{ml}$

Tabelle 2.2: Ansatzvolumina für Konkurrenzexperimente am Tomtec-Harvester.

Gesamtansatzvolumen $310\mu\text{l}$, BSA: bovines Serumalbumin [M48], Homogenat: Membransuspension aus stabil transfizierten CHO- $M_2\text{wt}$ -Zellen in Endpuffer (20mM HEPES, 0,1mM Na_2EDTA)

Versuchsansatz für Dissoziationsexperimente

In Tabelle 2.3 sind die Ansatzvolumina für die Dissoziationversuche am Tomtec-Harvester aufgeführt. Zuerst wurden die verschiedenen Ligandkonzentrationen und Atropin in die Mikrotiterplatte einpipettiert (für die Kontrolle: Aqua dest und Atropin; für die Gesamtbindung: nur Aqua dest.). Anschließend wurden die restlichen fünf Bestandteile in den Mengen des kompletten Versuchsansatzes in ein 50ml Falcon-Gefäß [M9] zusammengegeben, geschüttelt und eine halbe Stunde inkubiert (Gleichgewichtseinstellung für [³H]NMS am unbesetzten Rezeptor). Nach Ablauf der halben Stunde wurde die Dissoziationsmessung gestartet. Dies geschah durch Zugabe von jeweils 290 μ l der inkubierten Lösung zu den zuvor wie oben beschrieben befüllten Bohrungen zu insgesamt acht festgesetzten Zeitpunkten. Alle Ansätze wurden schließlich zum gleichen Zeitpunkt filtriert. Die acht Zeitpunkte der Dissoziationsmessung wurden so gewählt, daß sie den Kurvenverlauf gut beschrieben.

Volumen	Bestandteil	Endkonzentration
10 μ l	Ligand	1/30 der eingesetzt. Konz.
10 μ l	Atropin	$1 \cdot 10^{-6}$ M
20 μ l	[³ H]NMS	$4 \cdot 10^{-9}$ M
190 μ l	HEPES-Puffer	$1 \cdot 10^{-2}$ M
20 μ l	NaCl-Lösung	$1,7 \cdot 10^{-2}$ M
30 μ l	BSA-Lösung	0,01%
30 μ l	Homogenat	25 μ g/ml

Tabelle 2.3: Ansatzvolumina für Dissoziationsexperimente am Tomtec-Harvester.

BSA: bovines Serumalbumin [M48], Homogenat: Membransuspension aus stabil transfizierten CHO- M₂wt-Zellen in Endpuffer (20mM HEPES, 0,1mM Na₂EDTA)

2.5.2 Membranabtrennung mittels des Brandel-Harvesters

Der verwendete Harvester der Firma Brandel [M49] bietet die Möglichkeit, achtundvierzig Filtrationen gleichzeitig vorzunehmen. Zum Ansetzen der Versuche wurden Reagenzgläser [M50] benutzt. Die verwendeten Glasfaserfilter [51] wurden jeweils eine halbe Stunde vor der Filtration des Versuches in 0,1%ige Polyethylenimin-Lösung eingelegt und kurz vor der Abfiltration des Versuches in den Brandel-Harvester eingebracht. Durch dieses Antiadsorbens erfolgte eine Reduktion der unspezifischen Bindung des Radioliganden am Filter. Nach der Filtration des Versuchsansatzes wurde dreimal mit 40mM Na, K, P_i-Puffer (4-8°C) gespült, um die unspezifische Bindung durch Auswaschen zu reduzieren. Anschließend wurden die durch den Harvester ausgestanzten Filterstücke mithilfe einer Pinzette in Szintillationsgefäße [M52] überführt und nach Zugabe von Szintillationscocktail [M53] in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler [M54] vermessen.

Zusammensetzung des Puffers.

40mM Na, K, P_i-Puffer :

- 32mM Na₂HPO₄ [M55] und
- 8mM KH₂PO₄ [M57]

Alle anderen eingesetzten Konzentrationen des Na, K, P_i-Puffers wurden durch Verdünnung des 40mM Na, K, P_i-Puffers hergestellt.

Versuchsansatz für Konkurrenzexperimente

Das Ansatzvolumen für die Konkurrenzexperimente betrug 1,5ml pro Reagenzglas. Dieses setzte sich wie in Tabelle 2.4 aufgeführt zusammen. Es wurde zuerst der Radioligand und anschließend die verschiedenen Ligandkonzentrationen in die Ansätze pipettiert (für die Gesamtbindung stattdessen Aqua dest. und für die unspezifische Bindung Atropin $9 \cdot 10^{-5}$ M). Anschließend folgte die Zugabe von 1100 μ l Na, K, P_i-Puffer in alle Ansätze. Der Start der Konkurrenzexperimente erfolgte schließlich durch Zugabe von 250 μ l Homogenat zu allen Ansätzen. Es folgte eine mithilfe der Gleichung 2.15 bestimmte Inkubationszeit bei 23°C. Anschließend wurde abfiltriert und die membrangebundene Radioaktivität wie in Abschnitt 2.5.2 beschrieben ermittelt.

Volumen	Bestandteil	Endkonzentration
100 μ l	[³ H]NMS	0,2nM
50 μ l	Aqua dest. (Gesamt-Bindung)	
	oder Atropin ($9 \cdot 10^{-5}$ M) (unspezif. Bindung)	3 μ M
	oder Ligand	1/30 der eingesetzt. Konz.
1100 μ l	Na, K, P _i -Puffer (5, 68mM)	5mM
250 μ l	Homogenat	

Tabelle 2.4: Ansatzvolumina für Konkurrenzexperimente am Brandel-Harvester. Gesamtansatzvolumen 1,5ml, Homogenat: Membransuspension aus transient transfizierten COS-7 Zellen in 5mM Na, K, P_i-Puffer.

Versuchsansatz für Dissoziationsexperimente

Alle Dissoziationsexperimente mit dem Brandel-Harvester wurden als Zweipunkt-Kinetik-Experimente (Kostenis and Mohr, 1996) durchgeführt. Bei dieser Methode wird neben der Gesamtbindung (Zeitpunkt $t=0$) und der unspezifischen Bindung nur zu einem Zeitpunkt ($t=x$) die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch das Alloster bestimmt. Durch Abzug der unspezifischen Bindung von der Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt $t=0$ und $t=x$, erhält man dessen spezifische Bindung zu den genannten Zeitpunkten. Unter der Annahme, dass die [³H]NMS-Dissoziation monoexponentiell verläuft, sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit eines allosterischen Modulators, wurde eine monoexponentielle Kurve durch die beiden Punkte gelegt, unter Anwendung der Gleichung 2.18. Die erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten der [³H]NMS-Dissoziation (k_{-1}) in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des allosterischen Modulators wurden wie im Abschnitt 2.4.1 beschrieben in Bezug auf den Kontrollwert ausgedrückt und anschließend gegen die logarithmierten Konzentrationen des jeweiligen allosterischen Modulators aufgetragen. Zunächst wurden die in Tabelle 2.5 aufgeführten Bestandteile des Reaktionsansatzes in die Reaktionsgläser pipettiert. Es folgte die Zugabe von 500 μ l Homogenat zu den Ansätzen, mit Ausnahme der Reaktionsgläser für die Messung der Gesamtbindung ($t=0$) und der unspezifischen Bindung (hier erfolgte die Zugabe des Homogenates 30min

Volumen	Bestandteil	Endkonzentration
10 μ l	[³ H]NMS	1nM
10 μ l	Aqua dest.	
	oder Atropin ($3 \cdot 10^{-4}$ M) (unspezif. Bindung)	3 μ M
480 μ l	Na, K, P _i -Puffer (5, 21mM)	5mM

Tabelle 2.5: Ansatzvolumina pro Reaktionsgefäß bei Dissoziationsexperimenten am Brandel-Harvester.

vor der Filtration). Die Ansätze wurden 30min vorinkubiert. Nach dieser halben Stunde wurde die Dissoziationsmessung durch Zugabe der Startlösungen, deren Zusammensetzung in Tabelle 2.6 aufgeführt ist, zu den vorinkubierten Reaktionsansätzen begonnen. Nach einer definierten Zeit ($t=x$) wurde die Dissoziationsmessung mithilfe einer Filtration durch Glasfaserfilter beendet und die membrangebundene Radioaktivität wie unter 2.5.2 beschrieben bestimmt.

Volumen	Bestandteil	Endkonzentration
1100ml	Ligand	1/4 der eingesetzt. Konz.
	oder Aqua dest. (für Kontrolle)	
1100ml	Atropin ($1,2 \cdot 10^{-5}$ M)	3 μ M

Tabelle 2.6: Ansatzvolumina für Startlösungen bei Dissoziationsexperimenten am Brandel-Harvester.

2.6 Statistik

Bei allen Messungen wurde die Grundgesamtheit als normalverteilt angenommen. Das arithmetische Mittel wurde aus der Summe aller Daten eines Datensatzes berechnet. Um Datensätze mit unterschiedlichem Datenumfang vergleichbar zu machen, wurde die Sum-

me durch den Datenumfang n geteilt:

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

Mithilfe des arithmetischen Mittels wurde die Varianz berechnet:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

und durch Ziehen der positiven Wurzel aus der Varianz die Standardabweichung bestimmt:

$$s = \sqrt{s^2}.$$

Letztendlich wurde als Streuungsmaß die Standardabweichung des Mittelwerts berechnet:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}.$$

Alle in dieser Arbeit angegebenen Werte entsprechen $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.

Es wurden Signifikanztests mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zur Beurteilung von Mittelwerten und Standardabweichungen herangezogen. Der Vergleich der Mittelwerte zweier Datensätze wurde mithilfe des t-Tests untersucht. Der Vergleich der Standardabweichung zweier Datensätze wurde mithilfe des F-Tests vollzogen (Bronstein and Semendjajew, 1991).

2.7 Verwendete Materialien

In der folgenden Liste sind alle verwendeten Materialien aufgeführt. Die Lieferfirmen sind mit einer Kurzbezeichnung genannt. Die Kodierung dieser Kurzbezeichnungen ist unterhalb der Liste aufgeführt.

	Bezeichnung	Menge	Artikel-Nr.	Firma
M1	Quikchange site-directed mutagenesis kit		200519	Stra
M2	GeneAmp-PCR-System 2400			Per
M3	“Micro-Amp“-Gefäße mit Deckel	1000 Stück	N8010540	App
M4	IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalakto-pyranosid)	250mg	I-6758	Sig
M5	X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galakto-pyranosid)	100mg	B-4252	Sig

M6	NZY-Broth	500g	13635-024	Gib
M7	Glucose	1kg	8346	Mer
M8	Ampicillin Natrium	5g	A-9518	Sig
M9	Falcon-tubes, 50ml, steril	500 Stück	227261	Grei
M10	Falcon tubes 2059	500 Stück	9401352	Fish
M11	Luria-Bertani-Agar	1kg	L-3027	Sig
M12	Luria-Bertani-Medium	1kg	L-3522	Sig
M13	Qiagen Plasmid Maxi Kit		12162	Qui
M14	Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)		E-9884	Sig
M15	Tris(hydroxymethyl)aminomethan		108382	Mer
M16	Ultrazentrifuge 5417C			Epp
M17	Zentrifuge, Avanti J.25			Bec1
M18	DMEM	10 x 1Liter	D-5648	Sig
M19	Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml Penicillin; 10.000 μ g/ml Streptomycin)	100ml	P-0781	Sig
M20	FKS	500ml	F-7524	Sig
M21	MF Bottle Top Filter	12 Stück	9045953	Fish
M22	PBS	10 x 1Liter	D-5652	Sig
M23	Kryovial	500 Stück	123263	Grei
M24	Gewebekulturschale steril 100/20 mm		664160	Grei
M25	Gewebekulturschale steril 145/20mm	120 Stück	639160	Grei
M26	Trypsin-EDTA-Lösung	100ml	T-3924	Sig
M27	Glycerol	500ml	G-5516	Sig
M28	Dimethylsulfoxid (DMSO)	100ml	41640	Sig
M29	Calciumchlorid	500g	C-3881	Sig
M30	BES	25g	B-6266	Sig
M31	Rundbodenröhrchen, Polystyrol, 5ml		352054	Fish
M32	Zellschaber 30cm, Klingbreite 20mm		9903	Fish
M33	Polytron PT 10-35			Pt
M34	Nutrient Mixture F-12 HAM	500ml	N-4888	Sig
M35	L-Glutamin, 200mM	100ml	G-7513	Sig
M36	Geneticin-disulfat (G418)	5g	G-9516	Sig
M37	T175-Zellkulturflasche, Bodenfläche:182cm ²		660175	Grei
M38	Butyrat, 100mM	25g	263190250	Ac
M39	HEPES: N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'- [2-ethansulfonic acid]		H3375	Sig

M40	HEPES-Natriumsalz: [2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethansulfonic acid]-Natrium-Salz		H7006	Sig
M41	Harvester 96 [©] Mach III M			Tom
M42	Deep Well Plates 96		AB-0564	Abg
M43	Printed Filtermat A	100 Stück	1450-421	Wal
M44	Polyethylenimin	100ml	P-3143	Sig
M45	Meltilex A	100 Stück	1450-441	Wal
M46	Sample Bag	100 Stück	1450-432	Wal
M47	LSC "1450-Microbeta"			Wal
M48	BSA: bovines Serumalbumin (Albumin Fraktion V aus Rinderserum)	10g	A-7906	Sig
M49	Brandel Harvester, M-24			Bio
M50	Boratglas-Kulturröhrchen, 16x100 mm		FB51330	Fish
M51	Whatman-Filter GF/B 148L			
M52	Szintillationsgefäße aus PE, 21 ml			Rat
M53	Szintillationscocktail Ready Protein			Bec2
M54	Beckmann LS 6000 SC			Bec2
M55	Na ₂ HPO ₄	1kg	S-0876	Sig
M56	Na ₂ EDTA, 0,1mol/l	1Liter	20271	Grü
M57	KH ₂ PO ₄	500g	P-5379	Sig
M58	NaCl	1kg	106404	Mer

Kurzbezeichnungen der Firmen.

Sig	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Grei	Greiner-Bio-One, Solingen, Deutschland
Fish	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Per	Perkin Elmer Life Sciences, Freiburg, Deutschland
App	Applied Biosystems, Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
Gib	Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
Qui	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Stra	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
Mer	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bec1	Beckman Instruments, Palo Alto, USA
Bec2	Beckman Coulter GmbH, Unterschleissheim, Deutschland

Pt	PT-Kinematica AG, Littau, Schweiz
Tom	Tomtec, Hamden, USA
Abg	Abgene House, Epsom, UK
Wal	Wallac, Turku, Finnland
Bio	Biomedical Research and Development Laboratories, Gaithersburg MD, USA
Rat	Ratiolab, Dreieich, Deutschland
Grü	Grüssing, Filsum, Deutschland
Ac	Acros Organics, Geel, Belgien
Epp	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Online-Datenbanken.

- I1** cDNA-Sequenzen (auch im 3-Buchstaben-Aminosäuren-Code) der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren: www.gpcr.org/7tm/seq/dna.html oder www.expasy.org/cgi-bin/sprot-search-de
- I2** Oligonukloetid-Primer-Bestellung: www.sigma-ark.com
- I3** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH: www.dsmz.de

2.7.1 Strukturformeln untersuchter Liganden

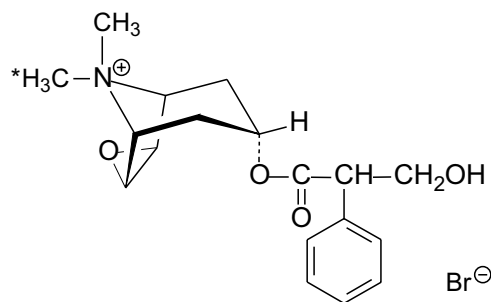


Abbildung 2.1: Strukturformel des orthosterischen Radioliganden [³H]N-Methylscopolamin
* Position der radioaktiven Markierung

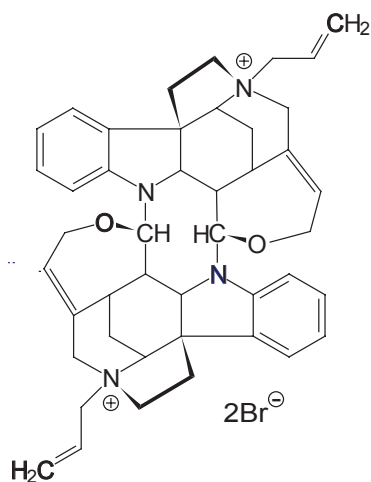


Abbildung 2.2: Strukturformel des allosterischen Modulators Diallylcaracurin V

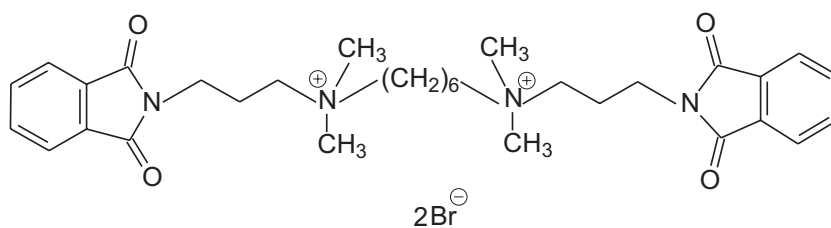


Abbildung 2.3: Strukturformel des allosterischen Modulators W84

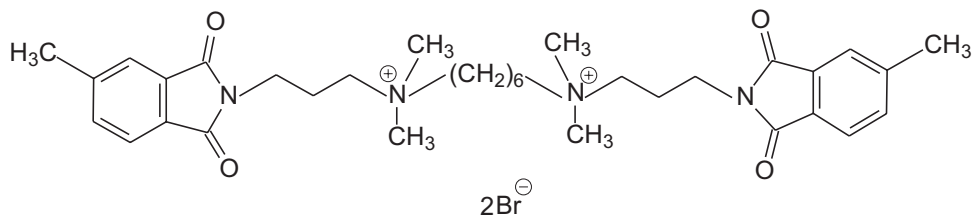


Abbildung 2.4: Strukturformel des allosterischen Modulators Dimethyl-W84

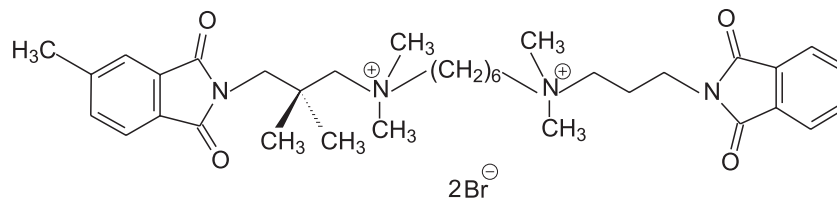


Abbildung 2.5: Strukturformel des allosterischen Modulators OS-72

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Methodische Vorversuche

3.1.1 Effektivitätsbestimmung des Szintillationsgerätes unter Anwendung eines Feststoffszintillators

Es sollte die Effektivität des 1450-Microbeta-Szintillationsgerätes unter Anwendung von Glasfaserfiltern und Feststoffszintillator bestimmt werden. Dieses Szintillationsgerät wurde nach Membranabtrennungen mittels des Tomtec-Harvesters verwendet. Unter der Effektivität versteht man die Wahrscheinlichkeit der Detektion eines radioaktiven Zerfalls. Diese Wahrscheinlichkeit ergibt sich aus dem Quotienten der gemessenen Zerfälle und der tatsächlichen Zerfälle eines Radioisotopes bekannter Aktivität, eines Standards.

Herstellung eines Standards. Als Standard wurde die Konzentration von [³H]NMS verwendet, die auch in den normalen Bindungsversuchen zum Einsatz kam. Der benutzte Radioligand hatte in seiner Stammlösung eine Volumenaktivität von 1mCi/ml. Als Konzentration des Standards wurde die in den normalen Versuchen eingesetzte Verdünnung (1:4500) verwendet. Die Volumenaktivität der Verdünnung war dann mit 1/4,5 μ Ci/ml gegeben. Analog den normalen Versuchen wurden 20 μ l eingesetzt, was einer endgültigen Volumenaktivität von 4,45nCi/20 μ l entsprach. Die Volumenaktivität der Verdünnung wurde in Zerfälle pro Minute (desintegrations per minute, kurz: dpm) wie folgt umgerechnet:

$$1\text{nCi} = 37\text{Bq}$$

Mit $1\text{Bq} = \frac{1}{\text{s}}$ folgt $1\text{nCi} = 37\frac{1}{\text{s}} = 2220\frac{1}{\text{min}}$. Der erhaltene Faktor 2220 ermöglicht die Umrechnung von nCi in dpm.

$$1\text{nCi} \cdot 2220 = 2220\text{dpm}$$

Die Volumenaktivität des Standards wurde wie oben beschrieben in dpm umgerechnet:

$$4,45\text{nCi} \cdot 2220 = 9867\text{dpm}$$

Die tatsächliche Zerfallsrate betrug für $20\mu\text{l}$ des Standards somit 9867dpm.

Messung des Standards. Der hergestellte Standard wurde insgesamt vierzehnmal auf den Filter pipettiert. Dafür wurden die $20\mu\text{l}$ des Standards zu je $5\mu\text{l}$ auf 4 Filterfelder verteilt. Auf einem Glasfaserfilter wurden $7 \cdot 20\mu\text{l}$ des Standards aufgebracht. Nach dem Trocknen an der Luft wurde der Filter 1 Minute bei 400 Watt in der Mikrowelle behandelt. Anschließend wurde wie im regulären Versuch verfahren: Verschmelzen mit Szintillator-Wachs, trocknen, in Plastikhülle geben und im Szintillationszähler vermessen. Insgesamt wurden 2 Filter, also $14 \cdot 20\mu\text{l}$ vermessen. Die gemessenen Zerfälle sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Die detektierte Aktivität für $20\mu\text{l}$ des Standards betrug im Mittel 3399 Zählungen

	Aktivität* [dpm]							Mittelwert
Filter1	3553	3516	3402	3331	3337	3355	3463	3422
Filter2	3373	3428	3332	3317	3325	3432	3348	3365

Tabelle 3.1: Bestimmung der Aktivität des Standards

*Aktivität von je $20\mu\text{l}$ des Standards in dpm. Es wurden 2 Filter mit je $7 \cdot 20\mu\text{l}$ des Standards vermessen und für jeden Filter der Mittelwert gebildet. Die Mittelung über alle Messungen ergibt 3394dpm.

pro Minute. Die Effektivität des gesamten Versuchsaufbaus in Prozent ergibt sich aus:

$$\frac{\text{gemessene Aktivität}}{\text{tatsächliche Aktivität}} = \frac{3394}{9867} = 34\%.$$

Daraus folgt, dass die unter den beschriebenen Versuchsbedingungen gemessenen Zerfälle pro Minute mit dem Faktor 2,9 multipliziert werden müssen, um die tatsächlichen Zerfallsrate zu erhalten.

3.2 Beitrag zur Validierung eines Filtrationsverfahrens für das Radioalloster

Für das neu entwickelte Radioalloster [^3H]Dimethyl-W84 sollte ein Filtrationsverfahren validiert werden, welches sich durch eine automatische Filtration und neue Pufferbedingungen (siehe Abschnitt 2.5.1) von dem bisher angewendeten unterschied. Dafür sollte die Affinität von verschiedenen orthosterischen und allosterischen Liganden einmal mit dem Radioalloster [^3H]Dimethyl-W84 und einmal mit dem Radioorthoster [^3H]N-Methylscopolamin unter Anwendung dieses Filtrationsverfahrens bestimmt werden. Die ermittelten Affinitäten der verschiedenen Liganden mithilfe des Radioorthosters sollten bei Gültigkeit des *ternären Modells allosterischer Interaktionen* gleich den mithilfe des Radioallosters bestimmten Affinitäten der verschiedenen Liganden sein.

Die ausgewählten orthosterischen Liganden waren *Atropin*, *Scopolamin*, *N-Methylscopolamin*, *N-Butylscopolamin*, die Enantiomere *Levetimid* und *Dextimid* und zusätzlich *AF-DX 384*. Als allosterische Liganden wurden *Obidoxim*, *Hexamethonium* und *Magnesium-Ionen* untersucht.

Die Bestimmung der Affinität der oben aufgeführten Liganden an humanen M_2 -Rezeptoren mithilfe des Radioallosters [^3H]Dimethyl-W84 wurde von Oliver Weyand während seiner Dissertation (Weyand, 2001) durchgeführt. Die Affinitätskonstanten der orthosterischen Liganden aus der von Weyand durchgeführten ersten Versuchsgruppe wurden nach Kurvenanpassung durch nichtlineare Regressionsanalyse auf der Basis der Ehlert-Gleichung erhalten. Diese sind in Form des negativen dekadischen Logarithmus (pK_A -Werte) in Tabelle 3.2 aufgeführt. In der zweiten Versuchsgruppe ermittelte Weyand Affinitätskonstanten der Allosterie durch nichtlineare Regressionanalyse auf der Basis der 4-Parameter logistischen Gleichung und anschließende Umrechnung der IC_{50} -Werte in K_I -Werte unter Anwendung der Gleichung 2.10 nach Cheng & Prusoff (1973). Die Affinitätskonstanten sind in Form des negativen dekadischen Logarithmus (pK_I -Werte) in Tabelle 3.4 aufgeführt.

3.2.1 Bestimmung der Affinität von orthosterischen Liganden

In ersten Versuchen wurden homologe Konkurrenzexperimente mit [^3H]NMS durchgeführt. Ziel war die Charakterisierung der Bindungseigenschaften der verwendeten Membransuspensionen durch Bestimmung der Rezeptorkonzentration (maximale Bindung,

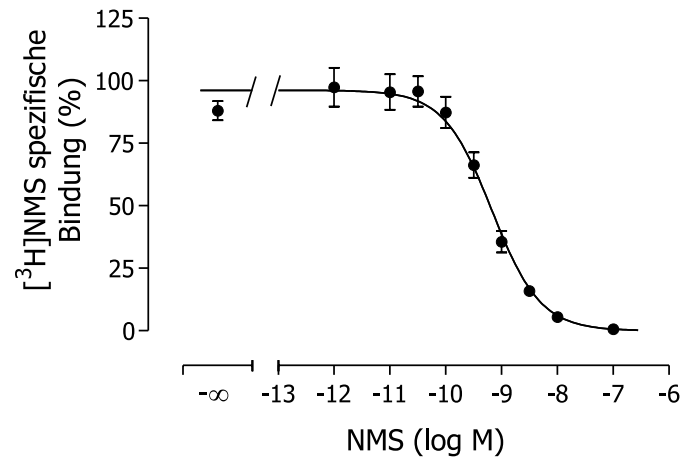


Abbildung 3.1: Homologe Konkurrenzexperimente mit [³H]NMS (0,4nM) an humanen M₂-Rezeptoren

Ordinate: spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent der Bindung in Abwesenheit eines Inhibitors. *Abszisse:* Logarithmus der NMS-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils drei Versuchen in Dreifachbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Kurvenanpassung erfolgte durch nichtlineare Regressionsanalyse auf der Basis der "4 Parameter logistischen Gleichung".

B_{max}) und die Bestimmung der Affinität von NMS zu diesen Rezeptoren (K_D). In Abbildung 3.1 ist das Ergebnis aus drei unabhängigen homologen Konkurrenzexperimenten dargestellt. Die unspezifische Bindung betrug 2% und die Affinitätskonstante wurde mit pK_D=9,4 ermittelt. Die Rezeptorkonzentration betrug 3994 fmol/mg Protein. Dies ist ein repräsentatives Ergebnis und spiegelt die durchschnittlichen Werte für alle verwendeten M₂-Rezeptor-Membransuspensionen aus stabil transfizierten CHO-Zellen wider.

[³H]NMS-Orthoster. Die Bestimmung der Affinität der Liganden *Atropin*, *Scopolamin*, *N-Methylscopolamin*, *N-Butylscopolamin*, *Levetimid*, *Dexetimid* und *AF-DX 384* erfolgte anschließend durch Konkurrenzexperimente (siehe Abschnitt 2.3.2) mithilfe des Radioorthosters [³H]NMS. Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt. Die Anpassung der Kurve an die Meßwerte erfolgte mit Hilfe der 4-Parameter logistischen Gleichung (Gleichung 2.9). Das Steigungsmaß der Kurve betrug bei allen eingesetzten Substanzen n_H = -1 und das untere Plateau der Kurve lag bei allen untersuchten Liganden bei MIN=0%, so dass von einer rein kompetitiven Interaktion an der orthosterischen Bindungsstelle ausgegangen werden konnte.

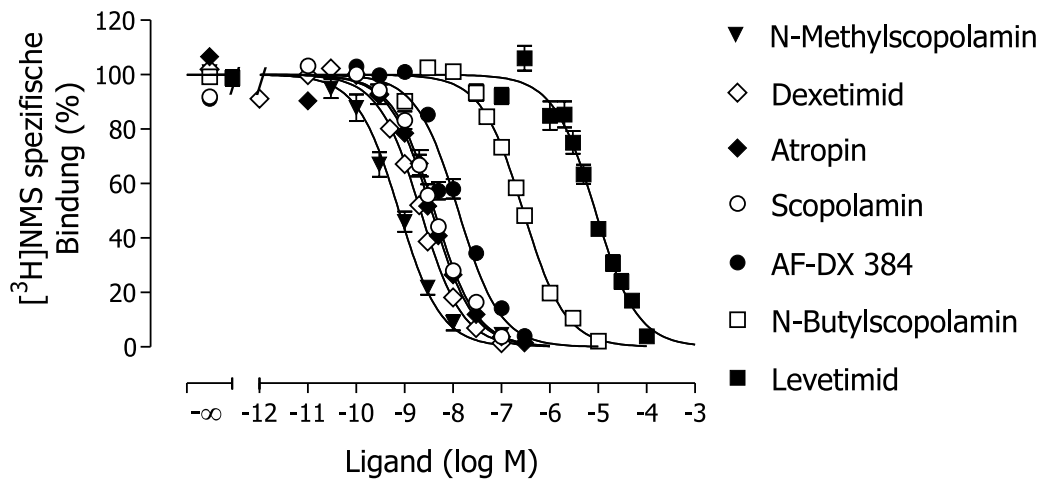


Abbildung 3.2: Einfluss von verschiedenen Liganden auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an humanen M_2 -Rezeptoren

Ordinate: spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent der Bindung in Abwesenheit eines Inhibitors. *Abszisse:* Logarithmus der Ligand-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils drei Versuchen in Dreifachbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Kurvenanpassung erfolgte durch nichtlineare Regressionsanalyse auf der Basis der "4 Parameter logistischen Gleichung".

Es wurde die spezifische Bindung ermittelt und in Prozent der Bindung in Abwesenheit eines Inhibitors umgeformt. Die Meßwerte in Prozent aus den jeweils drei Versuchen wurden gemittelt und die Standardabweichung vom Mittelwert bestimmt. Diese Mittelwerte und ihre Abweichungen sind in Abbildung 3.2 aufgetragen. Die jeweils ermittelten IC_{50} -Werte wurden mit Hilfe der Gleichung 2.10 nach Cheng & Prusoff (1973) in K_I -Werte umgerechnet und sind in Form des negativen dekadischen Logarithmus (pK_I -Werte) in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Der Vergleich der in Tabelle 3.2 aufgeführten Affinitätskonstanten der verschiedenen Liganden zum M_2 -Rezeptor - einmal bestimmt mit einem Radioorthoster (diese Arbeit) und einmal mit einem Radioalloster (Weyand, 2001) - zeigt, dass keine Unterschiede der Affinitätskonstanten durch die unterschiedliche Art der Bestimmung der Affinität der Liganden auftreten. Mit dem Radioalloster $[^3\text{H}]\text{Dimethyl-W84}$ kann demzufolge die Affinität orthosterischer Liganden unter Anwendung des Filtrationsverfahrens bestimmt werden. Das *ternäre Modell allosterischer Interaktionen* ist durch diese Untersuchung bestätigt worden.

Ligand	pK _I -Werte bestimmt mit [³ H]N-Methylscopolamin	pK _A -Werte bestimmt mit [³ H]Dimethyl-W84 (Daten von O. Weyand)
NMS	9,37 ± 0,16	9,34 ± 0,07
Atropin	8,66 ± 0,20	8,36 ± 0,07
Scopolamin	8,59 ± 0,19	8,66 ± 0,07
N-Butylscopolamin	6,78 ± 0,20	6,77 ± 0,07
AF-DX 384	8,09 ± 0,26	8,03 ± 0,06
Dexetimid	8,93 ± 0,19	9,03 ± 0,07
Levetimid	5,32 ± 0,17	5,34 ± 0,10

Tabelle 3.2: Affinität verschiedener Liganden zum M₂-Rezeptor

Erste Spalte: eingesetzter Ligand; zweite Spalte: Affinität der Liganden ermittelt mithilfe des Radioorthosters [³H]NMS (pK_I-Werte); dritte Spalte: Affinität der Liganden ermittelt mithilfe des Radioallosters [³H]Dimethyl-W84 (pK_A-Werte), Werte aus Weyand, 2001. Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus n=3 Versuchen in Dreifachbestimmung. Die verwendeten M₂-Rezeptor-Membransuspensionen wurden aus stabil transfizierten CHO-Zellen gewonnen.

3.2.2 Bestimmung der Affinität von allosterischen Liganden

Es wurden die allosterischen Modulatoren *Obidoxim*, *Hexamethonium* und *Magnesium-Ionen* untersucht. Bevor die Gleichgewichtsbindungsexperimente durchgeführt werden konnten, mussten zur Bestimmung der Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung Dissoziationsexperimente mit diesen Liganden durchgeführt werden.

Bestimmung der Halbwertszeiten der Gleichgewichtseinstellung. Die Verzögerung der Dissoziation von [^3H]NMS durch Magnesium-Ionen in steigender Konzentration ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Halbwertszeit der [^3H]NMS-Dissoziation unter Kontrollbedingungen betrug 4,5min. Mit steigenden Konzentrationen der Magnesium-Ionen wurde die Dissoziation von [^3H]NMS verzögert. Bei einer Magnesium-Ionen-Konzentration von $9 \cdot 10^{-3}\text{M}$ betrug die Dissoziationshalbwertszeit von [^3H]NMS 5,6min, bei $9 \cdot 10^{-2}\text{M}$ 8min, bei $9 \cdot 10^{-1}\text{M}$ 14min und bei 3M 4,4min. Die erhaltenen apparenten Geschwindigkeitskonstanten der [^3H]NMS-Dissoziation (k_{-1}) in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen Magnesium-Ionen wurden ermittelt und durch die Geschwindigkeitskonstante der [^3H]NMS-Dissoziation in Abwesenheit von Magnesium-Ionen (Kontrolle) dividiert. Diese Quotienten wurden gegen die logarithmierten Konzentrationen der Magnesium-Ionen aufgetragen. Es resultierte eine Konzentrations-Effekt-Kurve wie in Abbildung 3.4 darge-

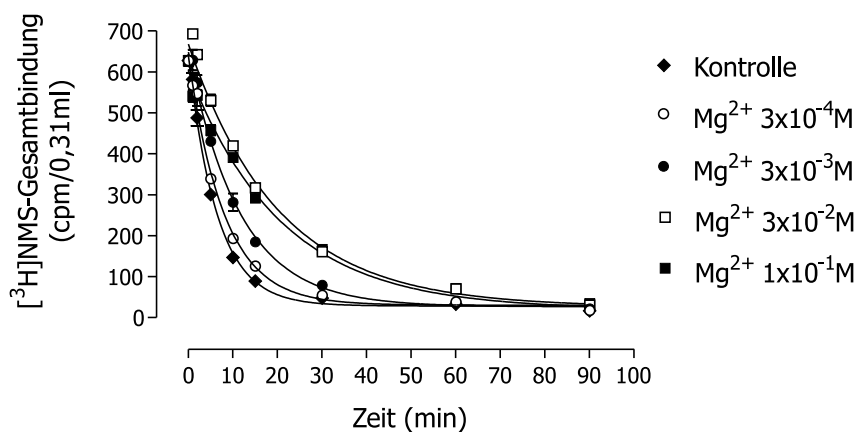


Abbildung 3.3: Dissoziationsverläufe des Radioliganden [^3H]NMS an M_2 -Rezeptoren in Ab- und Anwesenheit von Magnesium-Ionen steigender Konzentration

Ordinate: [^3H]NMS-Gesamtbindung in cpm (counts per minute) pro 0,31ml. *Abszisse:* Zeit in Minuten. Die Kurvenanpassung erfolgte durch nichtlineare Regressionsanalyse auf der Basis der monoexponentiellen Zerfallsgleichung.

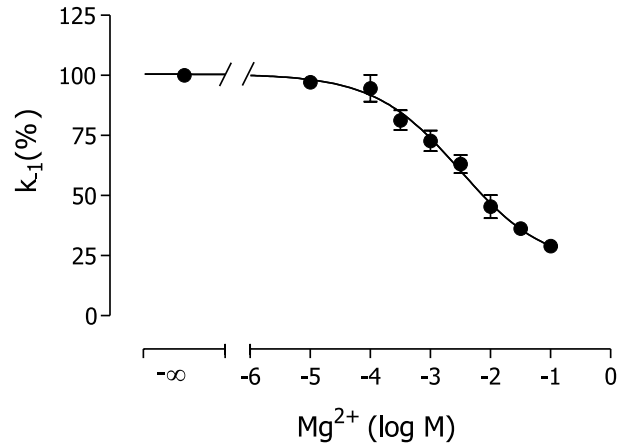


Abbildung 3.4: Effekt von Magnesium-Ionen auf die Dissoziation von [³H]NMS

Ordinate: Apparente Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit von Magnesium-Ionen. *Abszisse:* Logarithmus der Magnesiumchlorid-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus drei Versuchen in Dreifachbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Kurvenanpassung erfolgte durch nichtlineare Regressionsanalyse auf der Basis der "4 Parameter logistischen Gleichung".

stellt. Der $pEC_{0,5;diss}$ -Wert (Wendepunkt der Kurve) betrug 2,5. Das Steigungsmaß war signifikant verschieden von $n_H = -1$ und das untere Plateau der Kurve entsprach $k_{-1} = 21\%$ des Kontrollwertes (siehe Tabelle 3.3). Die Halbwertszeit der [³H]NMS-Dissoziation in Anwesenheit der Magnesiumionenkonzentration $10^{-1}M$ war dementsprechend 25 Minuten. Die benötigte Zeit zur Einstellung des Bindungsgleichgewichtes für die Konkurrenzexperimente ergab sich aus: $25\text{min} \cdot 5$.

Die Hemmung der Dissoziation von [³H]NMS durch Hexamethonium bzw. Obidoxim ergab die in Abbildung 3.5 aufgetragenen Konzentrations-Effekt-Kurven, die wie für Magnesium-Ionen exemplarisch oben erklärt erhalten wurden. Die nichtlineare Regressionsanalyse der Meßwerte auf der Basis der 4-Parameter logistischen Gleichung ergab $pEC_{0,5;diss}$ -Werte von 3,83 für Hexamethonium und 4,05 für Obidoxim. Das Steigungsmaß war für beide Modulatoren nicht signifikant verschieden von $n_H = -1$ (siehe Tabelle 3.3). Das untere Plateau der Kurve von Hexamethonium lag bei $k_{-1} = 20\%$, das von Obidoxim bei $k_{-1} = 25\%$ des Kontrollwertes. Dies entsprach einer Verminderung der Dissoziationsgeschwindigkeit von [³H]NMS um den Faktor 5 für Hexamethonium und um den Faktor 4 für Obidoxim. Die Halbwertszeit der [³H]NMS-Dissoziation in Anwesenheit

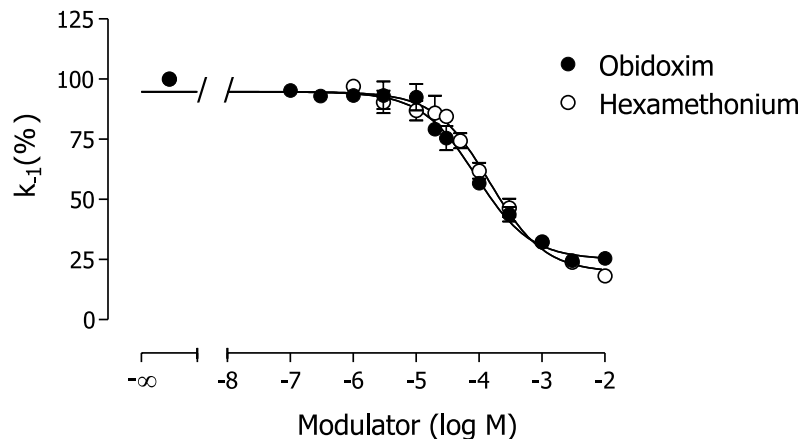


Abbildung 3.5: Effekte von Hexamethonium und Obidoxim auf die Dissoziation von $[^3\text{H}]\text{NMS}$. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit der Modulatoren. *Abszisse:* Logarithmus der Modulator-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus drei Versuchen in Dreifachbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die Kurvenanpassung erfolgte durch nichtlineare Regressionsanalyse auf der Basis der “4 Parameter logistischen Gleichung”.

der Hexamethonium-Konzentration 10^{-2}M war dementsprechend 25min und in Anwesenheit der Obidoxim-Konzentration 10^{-2}M 20min. Die benötigte Zeit zur Einstellung des Bindungsgleichgewichtes für die Konkurrenzexperimente zwischen $[^3\text{H}]\text{NMS}$ und Hexamethonium bzw. Obidoxim ergab sich aus: $25\text{min} \cdot 5$ bzw. $20\text{min} \cdot 5$.

Effekte der allosterischen Modulatoren auf die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung. Die Bestimmung der Affinität der allosterischen Modulatoren *Obidoxim*, *Hexamethonium* und *Magnesium-Ionen* erfolgte unter Einbeziehung der orthosterischen und allosterischen Bindungsstelle mithilfe des Radioorthosters $[^3\text{H}]\text{NMS}$. Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt. Die Anpassung der Kurve an die Meßwerte erfolgte mit Hilfe der Ehlert-Gleichung (Gleichung 2.13). Es wurde die spezifische Bindung ermittelt und in Prozent der Bindung in Abwesenheit eines allosterischen Modulators umgeformt. Die Meßwerte in Prozent aus den jeweils drei Versuchen wurden gemittelt und die Standardabweichung vom Mittelwert bestimmt.

Die Effekte von Magnesium-Ionen auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Im Konzentrationsbereich von $1 \cdot 10^{-5}\text{M}$ bis $1 \cdot 10^{-1,5}\text{M}$ ergaben

Ligand	$pEC_{0,5;diss}$	Steigungsmaß n_H	unteres Plateau (MIN)
Magnesium-Ionen	$2,50 \pm 0,14$	$-0,6 \pm 0,1^*$	$21 \pm 5^*$
Hexamethonium	$3,83 \pm 0,06$	$-0,8 \pm 0,1$	$20 \pm 2^*$
Obidoxim	$4,05 \pm 0,05$	$-0,9 \pm 0,1$	$25 \pm 1^*$

Tabelle 3.3: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Magnesium-Ionen, Hexamethonium und Obidoxim an NMS-besetzten M_2 -Rezeptoren.

Wirksamkeit ($pEC_{0,5;diss}$) der allosterischen Modulatoren in Bezug auf die Verzögerung der Dissoziation von $[^3H]NMS$ an M_2 -Rezeptoren. $pEC_{0,5;diss}$ ist der negative dekadische Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die die Dissoziationsgeschwindigkeit von $[^3H]NMS$ halbmaximal verzögert. Die Kenndaten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse auf der Basis der 4 Parameter logistischen Gleichung erhalten. * signifikant verschieden von $n_H = -1$ bzw. $MIN = 0\%$. Gezeigt sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ erhalten aus zwei bis vier unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung.

sich keine Änderungen der spezifischen Bindung von $[^3H]NMS$. In diesem Konzentrationsbereich fand die Dissoziationsverzögerung von $[^3H]NMS$ durch Magnesium-Ionen statt (siehe Abbildung 3.4). Da keine Veränderung der spezifischen $[^3H]NMS$ -Bindung im Gleichgewichtsbindungsexperiment zu beobachten war, lag demzufolge zwischen $[^3H]NMS$ und Magnesium-Ionen neutrale Kooperativität vor. Die Assoziationshemmung von $[^3H]NMS$ durch Magnesium-Ionen besaß somit das gleiche Ausmaß wie die Dissoziationshemmung. Die Kurven der Assoziationshemmung und der Dissoziationshemmung sollten deckungsgleich sein. Die Affinität von Magnesium-Ionen zum unbesetzten Rezeptor kann mithilfe der obigen Erklärung aus dem $EC_{0,5;diss}$ -Wert erhalten werden, da: $pEC_{0,5;ass} = pEC_{0,5;diss} = 2,5$.

Abbildung 3.7 zeigt die Abnahme der spezifischen Bindung von $[^3H]NMS$ unter Einfluß von Hexamethonium und Obidoxim. Die Auswertung mithilfe der Ehlert-Gleichung (siehe Abschnitt 2.3.2) ergab für Hexamethonium eine negative Kooperativität mit einem Kooperativitätsfaktor von $\alpha = 37$ und eine Affinitätskonstante $pK_A = 4,64$. Für Obidoxim ergab sich aus der nichtlinearen Regressionsanalyse der Meßwerte $pK_A = 5,38$ und $\alpha = 45$. In Tabelle 3.4 sind die mit $[^3H]NMS$ ermittelten Affinitätskonstanten von Magnesium-Ionen, Hexamethonium und Obidoxim am freien Rezeptor in Form von pK_A -Werten aufgeführt.

Der Vergleich der in Tabelle 3.4 aufgeführten Affinitätskonstanten der allosterischen Li-

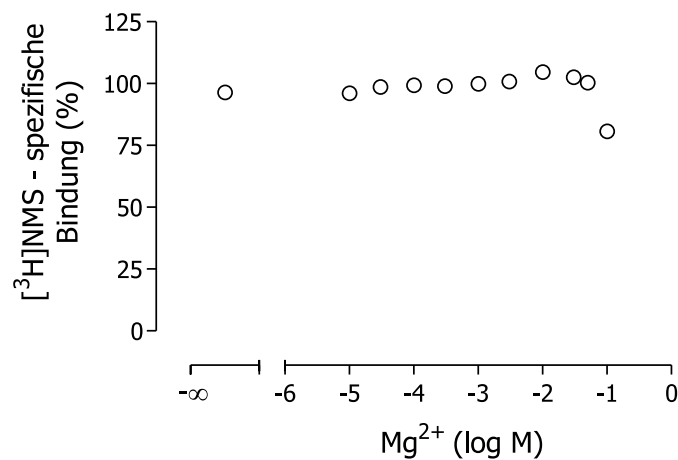


Abbildung 3.6: Effekt von Magnesium-Ionen auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$
Ordinate: spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent der Bindung in Abwesenheit eines Inhibitors.
Abszisse: Logarithmus der Magnesiumchlorid-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus drei Versuchen in Dreifachbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

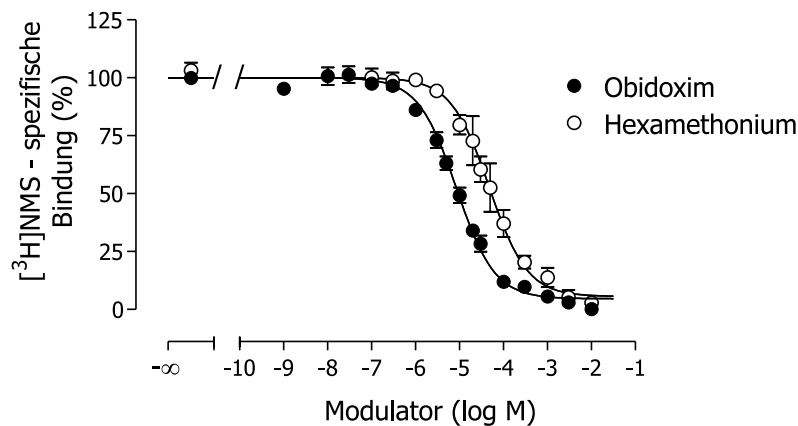


Abbildung 3.7: Effekte von Hexamethonium und Obidoxim auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$

Ordinate: spezifische $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent der Bindung in Abwesenheit eines Inhibitors.
Abszisse: Logarithmus der Modulator-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus drei Versuchen in Dreifachbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen. Die nichtlineare Regressionsanalyse erfolgte durch Anpassung der Parameter der Ehlert-Gleichung an die Meßwerte.

Ligand	pK _A - Werte bestimmt mit [³ H]N-Methylscopolamin	pK _I - Werte bestimmt mit [³ H]Dimethyl-W84 (Daten von O. Weyand)
Magnesium-Ionen	2,50 ± 0,02*	2,87 ± 0,16
Hexamethonium	4,64 ± 0,02	4,45 ± 0,08
Obidoxim	5,38 ± 0,03	5,09 ± 0,09

Tabelle 3.4: Affinität allosterischer Liganden zum M₂-Rezeptor.

Erste Spalte: eingesetzter Ligand; zweite Spalte: Affinität der Liganden ermittelt mithilfe des Radioorthosters [³H]NMS (pK_A-Werte, * im Falle von Mg²⁺ ist pEC_{0,5;ass} angegeben, s. Text); dritte Spalte: Affinität der Liganden ermittelt mithilfe des Radioallosters [³H]Dimethyl-W84 (pK_I-Werte), Werte aus Weyand, 2001. Angegeben sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus n=3 Versuchen in Dreifachbestimmung. Die verwendeten M₂-Rezeptor-Membransuspensionen wurden aus stabil transfizierten CHO-Zellen gewonnen.

ganden zum M₂-Rezeptor - einmal bestimmt mit einem Radioorthoster (diese Arbeit) und einmal mit einem Radioalloster (Weyand, 2001) - zeigt, dass keine Unterschiede der Affinitätskonstanten durch die unterschiedliche Art der Bestimmung der Affinität der Liganden auftreten. Das *ternäre Modell allosterischer Interaktionen* ist auch durch diese zweite Gruppe von Untersuchungen bestätigt worden.

3.3 Identifikation essentieller Epitope der allosterischen Bindungsstelle

Die meisten allosterischen Modulatoren zeigen die höchste Affinität zum M₂-Rezeptor-Subtyp und die niedrigste zum M₅-Rezeptor-Subtyp (Holzgrabe and Mohr, 1998; Ellis and Seidenberg, 2000). Um die subtypspezifischen Rezeptorepitope für die hohe Affinität der allosterischen Modulatoren zum M₂-Rezeptor zu identifizieren, wurden Untersuchungen mit M₂/M₅-chimären Rezeptoren durchgeführt. Bisher konnten für die allosterischen Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ und vom Typ der Caracurin V Derivate zwei Epitope für die M₂/M₅-Selektivität an NMS-besetzten Rezeptoren identifiziert werden: eine einzelne Aminosäure am Beginn der siebenten transmembranären Domäne, M₂⁴²³Thr (Buller et al., 2002), und eine Sequenz aus sechs Aminosäuren im Bereich der zweiten ex-

trazellulären Schleife, M₂^{172–177}Glu-Asp-Gly-Glu-Cys-Tyr (Buller, 2002). Es sollten nun weitere Mutagenese- und Radioligandbindungsexperimente durchgeführt werden, um eine Eingrenzung dieses Epitopes aus sechs Aminosäuren in der zweiten extrazellulären Schleife auf möglichst eine einzelne Aminosäure zu erreichen. Dazu wurden punktmutierte Rezeptoren hergestellt (siehe Abschnitt 2.1), in denen einzelne Aminosäuren der Sequenz M₂^{172–177}Glu-Asp-Gly-Glu-Cys-Tyr (kurz: M₂^{172–177}EDGECY) zu den korrespondierenden Aminosäuren des M₅-Rezeptors mutiert wurden, um so die M₂/M₅-Selektivität untersuchen zu können.

3.3.1 Untersuchungen an NMS-besetzten Rezeptoren

Im Folgenden wurden an M₂- und M₅-Wildtyp-Rezeptoren und an den hergestellten Punktmutanten Dissoziationsexperimente durchgeführt, um die Affinität der allosterischen Liganden zu den NMS-besetzten Rezeptoren bzw. Rezeptormutanten zu bestimmen. Ein Maß für die Affinität von allosterischen Modulatoren zu NMS-besetzten Rezeptoren ist die Konzentration des allosterischen Modulators, bei welcher die Dissoziationsgeschwindigkeit von [³H]NMS halbmaximal verzögert wird. Dieser Wert wird als EC_{0,5;diss} bezeichnet. Die Membranabtrennung erfolgte bei allen Versuchen mittels des Brandel-Harvesters (siehe Abschnitt 2.5.2).

Die Halbwertszeiten der [³H]NMS-Dissoziation in Abwesenheit der allosterischen Modulatoren an M₂- und M₅-Wildtyp-Rezeptoren und an den Rezeptormutanten sind in Tabelle 3.5 zusammengefasst. Die Geschwindigkeit der Dissoziation von [³H]NMS ist an M₂-Rezeptoren erheblich größer als an M₅-Rezeptoren, was im Einklang mit früheren Studien steht (Ellis et al., 1991). Die Dissoziationsgeschwindigkeiten an den M₂-Punktmutanten liegen im Bereich des M₂-Wildtyp-Rezeptors und sind damit auch größer als die Geschwindigkeiten der Dissoziation an den M₅-Punktmutanten.

Die Untersuchungen an NMS-besetzten Rezeptoren wurden begonnen mit einem flexiblen allosterischen Modulator vom Alkan-Bisammonium-Typ, Dimethyl-W84 (Strukturformel siehe Abbildung 2.4). Anschließend wurde Diallylcaracurin V (Strukturformel siehe Abbildung 2.2) als rigider allosterischer Modulator untersucht.

Dimethyl-W84

In Abbildung 3.8 ist der Effekt von Dimethyl-W84 auf die Dissoziation von [³H]NMS an M₂- und M₅-Wildtyp-Rezeptoren und an der Rezeptormutante, in der die

Rezeptor/Mutation	Dissoziations - $t_{1/2}$ [³ H]NMS (min)
M_2 wt	5,1 ± 0,2
M_5 wt	93 ± 1
$M_2^{172-177}$ EDGE [®] CY [®] PLDECQ	4,6 ± 0,2
M_2^{172} E [®] A	4,5 ± 0,2
M_2^{173} D [®] L	3,7 ± 0,2
M_2^{175} E [®] A	5,3 ± 0,4
M_2^{177} Y [®] Q	5,9 ± 0,2
M_2^{177} Y [®] Q + 423 T [®] H	28 ± 1
M_5^{184} Q [®] Y	151 ± 19
M_5^{184} Q [®] Y + 478 H [®] T	58 ± 3

Tabelle 3.5: Halbwertszeiten der Dissoziation von [³H]NMS an den aufgeführten Wildtyp-Rezeptoren und Rezeptormutanten in Abwesenheit allosterischer Modulatoren.

Gezeigt sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, erhalten aus vier bis acht unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

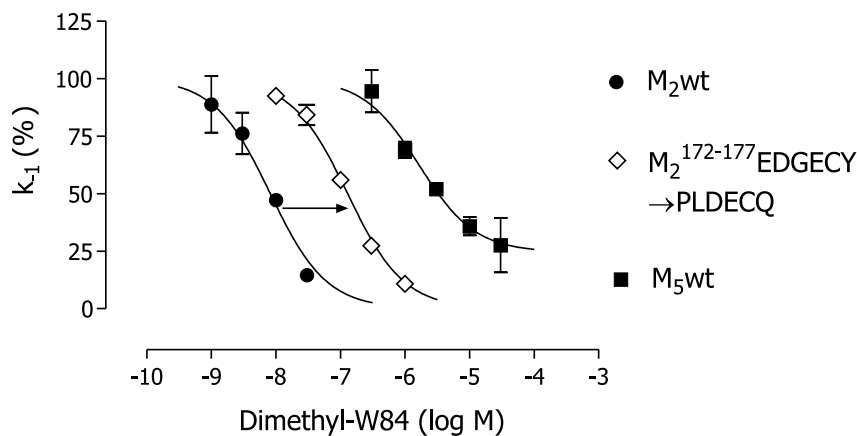


Abbildung 3.8: Effekte von Dimethyl-W84 an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und der angegebenen Rezeptormutante

Effekte von Dimethyl-W84 auf die Dissoziation von [³H]NMS an M₂- und M₅-Wildtyp-Rezeptoren und an dem chimären Rezeptor M₂¹⁷²⁻¹⁷⁷EDGECY→PLDECQ. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit von Dimethyl-W84. *Abszisse:* Logarithmus der Dimethyl-W84-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils drei Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

M₂¹⁷²⁻¹⁷⁷EDGECY-Sequenz gegen die korrespondierende Aminosäure-Sequenz des M₅-Rezeptors ausgetauscht wurde, M₂¹⁷²⁻¹⁷⁷EDGECY→PLDECQ, dargestellt. Diese Untersuchungen trugen zur Validierung der im Arbeitskreis neu etablierten Methode der Membranabtrennung mittels des Brandel-Harvesters bei. Stefan Buller hatte analoge Versuche bereits während seines Auslandsaufenthaltes in Hershey (USA) durchgeführt (Buller, 2002). Die in Bonn erhaltenen Kurvenverläufe waren deckungsgleich mit den zuvor gefundenen, so dass eine unmittelbare Vergleichbarkeit der neuen Befunde dieser Arbeit mit den Befunden von Buller (2002) gewährleistet war. Anschließende Untersuchungen an Punktmutanten sollte klären, welche Aminosäure der M₂¹⁷²⁻¹⁷⁷EDGECY-Sequenz für den Affinitätsverlust von Dimethyl-W84 im Vergleich zum M₂-Wildtyp-Rezeptor verantwortlich ist.

Punktmutanten: M₂¹⁷²Glu→Ala, M₂¹⁷³Asp→Leu, M₂¹⁷⁵Glu→Ala. In Abbildung 3.9 sind die Ergebnisse der Untersuchung an den drei Punktmutanten M₂¹⁷²Glu→Ala, M₂¹⁷³Asp→Leu und M₂¹⁷⁵Glu→Ala dargestellt. Die allosterische Wirksamkeit (pEC_{0,5;diss}) von Dimethyl-W84 an den Wildtyp-Rezeptoren und Rezeptormu-

tanten und die weiteren Kenndaten der Kurven, d.h. Steigungsmaß (n_H) und unteres Plateau der Kurve (MIN), sind in Tabelle 3.6 aufgeführt. Die Mutation von M_2^{172} Glu zu Ala verursachte einen geringen Affinitätsverlust von Dimethyl-W84 im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor. Der Austausch von M_2^{173} Asp zur korrespondierenden Aminosäure in M_5 , Leu, führte zu keiner Änderung der Affinität von Dimethyl-W84 im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor. Ein Affinitätsverlust von Dimethyl-W84 resultierte hingegen beim Austausch von M_2^{175} Glu durch Ala im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor. Da im M_5 -Rezeptor korrespondierend zu M_2^{175} Glu jedoch auch Glu vorliegt, konnte dieser Affinitätsverlust nicht den Affinitätsverlust von Dimethyl-W84 zum chimären Rezeptor $M_2^{172-177}$ EDGE CY \rightarrow PLDECQ erklären (siehe Diskussion). Keine der in Abbildung 3.9 aufgeführten Punktmutanten erklärte das Ausmaß des Affinitätsverlustes, welches durch den Austausch der kompletten $M_2^{172-177}$ EDGE CY-Sequenz zur korrespondierenden Aminosäuresequenz des M_5 -Rezeptors auftrat.

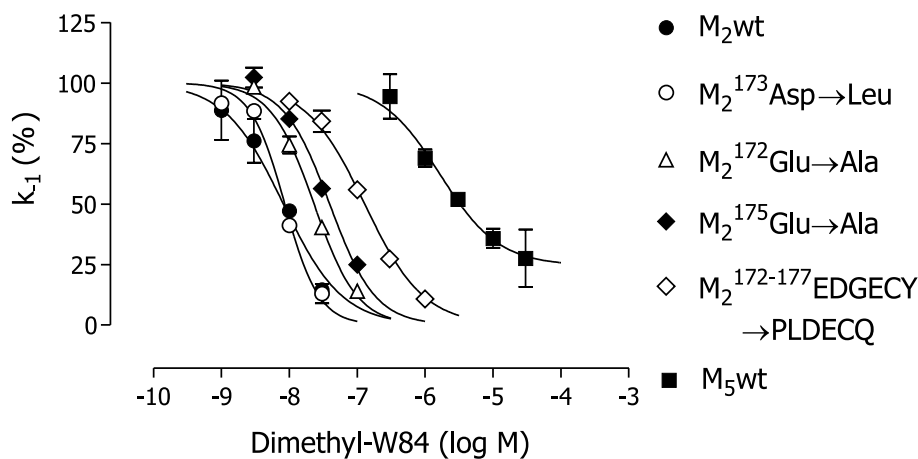


Abbildung 3.9: Effekte von Dimethyl-W84 an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Punktmutanten

Effekte von Dimethyl-W84 auf die Dissoziation von $[^3\text{H}]$ NMS an M_2 - und M_5 -Wildtyp-Rezeptoren und an den Punktmutanten M_2^{172} Glu \rightarrow Ala, M_2^{173} Asp \rightarrow Leu, M_2^{175} Glu \rightarrow Ala. Zur Orientierung ist der Effekt von Dimethyl-W84 am chimären Rezeptor $M_2^{172-177}$ EDGE CY \rightarrow PLDECQ aus Abbildung 3.8 mit eingetragen. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante der $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit von Dimethyl-W84. *Abszisse:* Logarithmus der Dimethyl-W84-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils drei Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

	M₂wt	M₅wt	M₂¹⁷²⁻¹⁷⁷EDGEY →PLDECQ	M₂¹⁷²E→A	M₂¹⁷³D→L
pEC _{0,5;diss}	8,09 (±0,08)	5,78 (±0,10)	6,89 (±0,03)	7,63 (±0,03)	8,07 (±0,03)
Steigungsmaß n _H	-1,16 (±0,22)	-1,08 (±0,30)	-1,09 (±0,07)	-1,36* (±0,11)	-1,71* (±0,19)
unteres Plateau (MIN)	-19,3 (±19,5)	24,6* (±4,9)	-2,2 (±3,7)	-17,1 (±10,9)	-37,9 (±24,6)

	M₂¹⁷⁵E→A	M₂¹⁷⁷Y→Q	M₂¹⁷⁷Y→Q +⁴²³T→H	M₅¹⁸⁴Q→Y	M₅¹⁸⁴Q→Y +⁴⁷⁸H→T
pEC _{0,5;diss}	7,41 (±0,04)	6,57 (±0,04)	6,02 (±0,26)	6,39 (±0,11)	6,87 (±0,07)
Steigungsmaß n _H	-1,29* (±0,13)	-1,04 (±0,12)	-2,17 (±1,08)	-1,49 (±0,52)	-1,31 (±0,22)
unteres Plateau (MIN)	-23,9 (±20,2)	-7,5 (±11,7)	11,83* (±14,9)	32,57* (±6,64)	-16,4 (±12,1)

Tabelle 3.6: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Dimethyl-W84 an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rezeptormutanten

Wirksamkeit (pEC_{0,5;diss}) des allosterischen Modulators Dimethyl-W84 in Bezug auf die Verzögerung der Dissoziation von [³H]NMS an den aufgeführten Wildtyp-Rezeptoren und Rezeptormutanten. pEC_{0,5;diss} ist der negative dekadische Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die die Dissoziationsgeschwindigkeit von [³H]NMS halbmaximal verzögert. Steigungsmaß n_H und unteres Plateau (MIN) der Kurve wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse auf der Basis der 4 Parameter logistischen Gleichung erhalten. * signifikant verschieden von n_H=-1 bzw. MIN=0%. Gezeigt sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ erhalten aus zwei bis vier unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

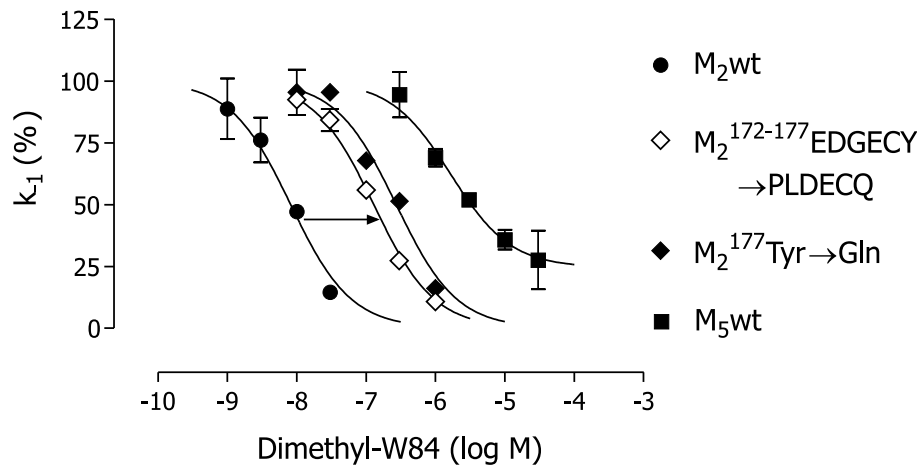


Abbildung 3.10: Effekte von Dimethyl-W84 an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rezeptormutanten

Effekte von Dimethyl-W84 auf die Dissoziation von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an M_2 - und M_5 -Wildtyp-Rezeptoren und an der Punktmutante $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$. Zur Orientierung ist der Effekt von Dimethyl-W84 am chimären Rezeptor $\text{M}_2^{172-177}\text{EDGEICY}\rightarrow\text{PLDECQ}$ aus Abbildung 3.8 mit eingetragen. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit von Dimethyl-W84. *Abszisse:* Logarithmus der Dimethyl-W84-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils drei Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

Punktmutante: $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$. Als nächstes wurde der Effekt von Dimethyl-W84 an der Rezeptormutante $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ untersucht. Wie in Abbildung 3.10 dargestellt, wurde durch den Austausch der Aminosäure $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}$ gegen die korrespondierende Aminosäure in M_5 , Gln, die Affinität von Dimethyl-W84 in erheblichem Ausmaß im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor reduziert. Der Affinitätsverlust, der durch den Austausch der kompletten $\text{M}_2^{172-177}\text{EDGEICY}$ -Sequenz zur korrespondierenden Aminosäuresequenz des M_5 -Rezeptors auftrat, konnte vollständig durch den Austausch der einzelnen Aminosäure $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}$ erklärt werden.

Doppelmutante: $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$. Um zu prüfen, ob $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}$ und $\text{M}_2^{423}\text{Thr}$ allein die M_2/M_5 -Selektivität bedingen, wurde eine Doppelmutante hergestellt, in der sowohl die bereits als essentiell identifizierte Aminosäure $\text{M}_2^{423}\text{Thr}$ als auch die gerade identifizierte Aminosäure $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}$ zu den korrespondierenden Aminosäuren des M_5 -Rezeptors, His und Gln, mutiert wurden. Der Effekt von Dimethyl-W84 an dieser Dop-

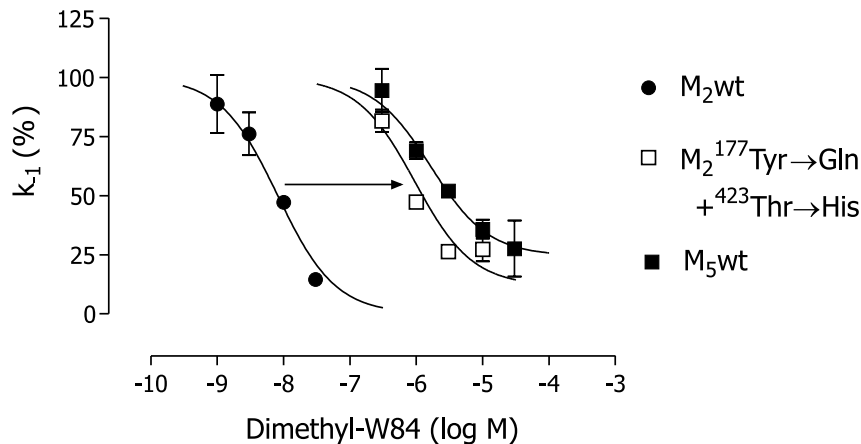


Abbildung 3.11: Effekte von Dimethyl-W84 an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und an der Doppelmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}+^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$

Effekte von Dimethyl-W84 auf die Dissoziation von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an M_2 - und M_5 -Wildtyp-Rezeptoren und an der Doppelmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}+^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit von Dimethyl-W84. *Abszisse:* Logarithmus der Dimethyl-W84-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils drei Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

pelmutante ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Durch Austausch von nur zwei Aminosäuren des M_2 -Rezeptors in die korrespondierenden Aminosäuren des M_5 -Rezeptors wurde die Affinität von Dimethyl-W84 auf das Niveau des M_5 -Rezeptors reduziert, was einem mehr als 100-fachem Affinitätsverlust entsprach. Die beiden Aminosäuren $M_2^{177}\text{Tyr}$ und $M_2^{423}\text{Thr}$ sind damit vollständig für die M_2/M_5 -Selektivität von Dimethyl-W84 an NMS-besetzten Rezeptoren verantwortlich. Es wurde eine Rückmutante hergestellt, in der $M_2^{177}\text{Tyr}$ an korrespondierender Stelle anstelle von $M_5^{184}\text{Gln}$ in den M_5 -Rezeptor eingesetzt wurde. Ebenfalls wurde eine Doppelrückmutante hergestellt, in der sowohl $M_2^{177}\text{Tyr}$ als auch $M_2^{423}\text{Thr}$ anstelle der korrespondierenden Aminosäuren im M_5 -Rezeptor, $M_5^{184}\text{Gln}$ und $M_5^{478}\text{His}$, eingeführt wurden.

Rückmutanten: $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}$ und $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}+^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$. Die allosterischen Effekte von Dimethyl-W84 an den Rückmutanten $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}$ und $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}+^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$ sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Der Austausch von $M_5^{184}\text{Gln}$ durch die korrespondierende Aminosäure des M_2 -Rezeptors, Tyr, resultierte

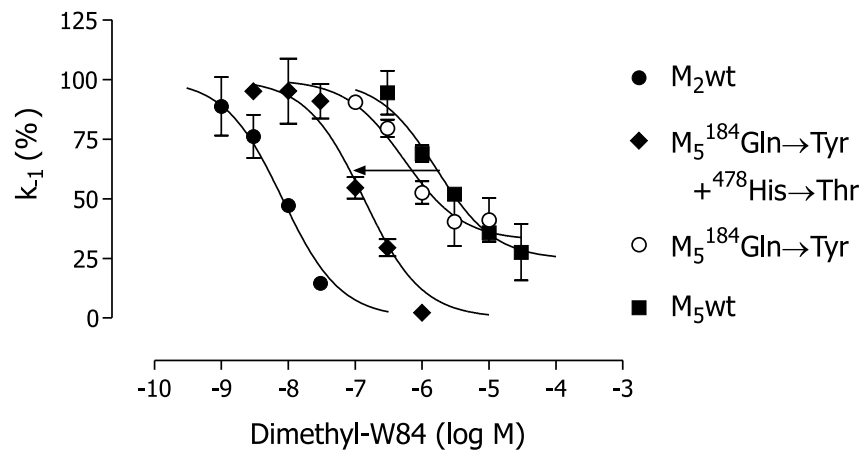


Abbildung 3.12: Effekte von Dimethyl-W84 an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rückmutanten

Effekte von Dimethyl-W84 auf die Dissoziation von [³H]NMS an M₂- und M₅-Wildtyp-Rezeptoren, an der Rückmutante M₅¹⁸⁴Gln→Tyr und der Doppelrückmutante M₅¹⁸⁴Gln→Tyr+⁴⁷⁸His→Thr. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit von Dimethyl-W84. *Abszisse:* Logarithmus der Dimethyl-W84-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils drei Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

in einer nur geringen Affinitätszunahme von Dimethyl-W84 zu dieser Punktmutante im Vergleich zum M₅-Wildtyp-Rezeptor. Der Austausch von M₅¹⁸⁴Gln und M₅⁴⁷⁸His zu den korrespondierenden Aminosäuren des M₂-Rezeptors, Tyr und Thr, führte zu einem deutlichen Anstieg der Affinität von Dimethyl-W84 im Vergleich zum M₅-Wildtyp-Rezeptor, wobei allerdings - nicht ganz unerwartet - das M₂-Niveau unerreicht blieb (siehe Diskussion). Entsprechende Ergebnisse wurden auch mit weiteren allosterischen Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ erhalten (Raasch, 2003). Es kann damit für die allosterischen Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ festgehalten werden, dass nur zwei Aminosäuren für die M₂/M₅-Selektivität an NMS-besetzten Rezeptoren vollständig verantwortlich sind: M₂¹⁷⁷Tyr und M₂⁴²³Thr.

Diallylcaracurin V

Diallylcaracurin V wurde als Vertreter der Caracurin V Derivate ausgewählt, um zu klären, ob für die M₂/M₅-Selektivität dieser rigiden Substanz an NMS-besetzten Rezep-

toren die gleichen Aminosäuren essentiell sind, wie für die flexiblen Alkan-Bisammonium-Verbindungen.

Punktmutante: $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$. In Abbildung 3.13 sind die Ergebnisse der Untersuchung mit Diallylcaracurin V an der Punktmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ dargestellt. Die allosterische Wirksamkeit ($pEC_{0,5;\text{diss}}$) von Diallylcaracurin V an den Wildtyp-Rezeptoren und Rezeptormutanten und die weiteren Kenndaten der Kurven, d.h. Steigungsmaß (n_H) und unteres Plateau der Kurve (MIN), sind in Tabelle 3.7 aufgeführt. Der Austausch der Aminosäure $M_2^{177}\text{Tyr}$ zur korrespondierenden Aminosäure in M_5 , Gln, verursachte einen starken Affinitätsverlust von Diallylcaracurin V im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor.

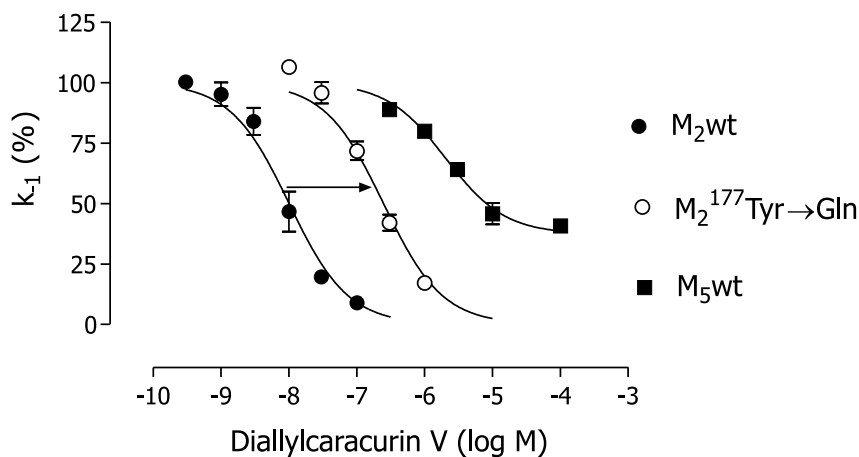


Abbildung 3.13: Effekte von Diallylcaracurin V an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und der angegebenen Punktmutante

Effekte von Diallylcaracurin V auf die Dissoziation von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an M_2 - und M_5 -Wildtyp-Rezeptoren und an der Punktmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit von Diallylcaracurin V. *Abszisse:* Logarithmus der Diallylcaracurin V Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils drei Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

Doppelmutante: $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}+^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$. Der allosterische Effekt von Diallylcaracurin V an der Doppelmutante, in der sowohl $M_2^{423}\text{Thr}$ als auch $M_2^{177}\text{Tyr}$ zu den korrespondierenden Aminosäuren im M_5 -Rezeptor, His und Gln, mutiert wurden, ist in

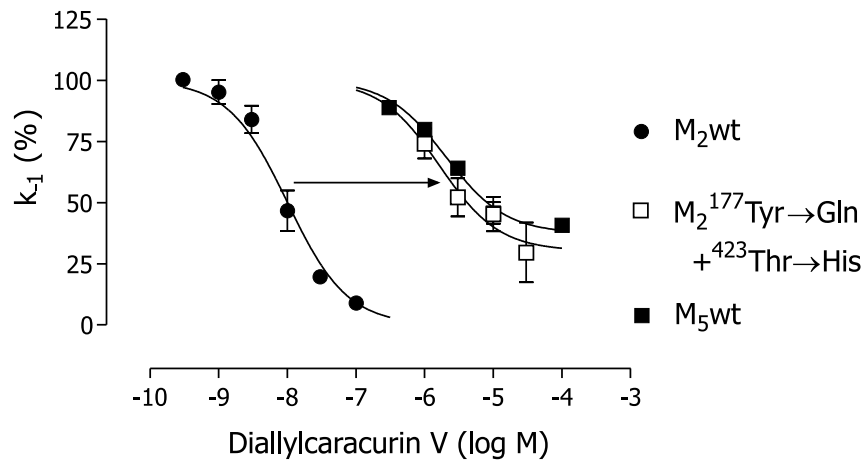


Abbildung 3.14: Effekte von Diallylcaracurin V an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und der angegebenen Doppelmutante

Effekte von Diallylcaracurin V auf die Dissoziation von [³H]NMS an M₂- und M₅-Wildtyp-Rezeptoren und an der Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln+⁴²³Thr→His. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit von Diallylcaracurin V. *Abszisse:* Logarithmus der Diallylcaracurin V Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils drei Versuchen in Doppelbestimmung. Streubalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

Abbildung 3.14 dargestellt. Durch Austausch von nur zwei Aminosäuren des M₂-Rezeptors in die korrespondierenden Aminosäuren des M₅-Rezeptors wurde die Affinität von Diallylcaracurin V auf das Niveau des M₅-Rezeptors reduziert. Die beiden Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyr und M₂⁴²³Thr sind damit vollständig für die M₂/M₅-Selektivität von Diallylcaracurin V an NMS-besetzten Rezeptoren verantwortlich.

Rückmutanten: M₅¹⁸⁴Gln→Tyr und M₅¹⁸⁴Gln→Tyr+⁴⁷⁸His→Thr. Es wurde der Effekt von Diallylcaracurin V an der Rückmutante M₅¹⁸⁴Gln→Tyr und an der Doppelrückmutante M₅¹⁸⁴Gln→Tyr+⁴⁷⁸His→Thr bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 dargestellt. Die Einführung der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyr an korrespondierender Stelle des M₅-Rezeptors resultierte in einer geringen Affinitätszunahme von Diallylcaracurin V im Vergleich zum M₅-Wildtyp-Rezeptor. Das Einbringen der beiden Aminosäuren Tyr und Thr in den M₅-Rezeptor, anstelle von M₅¹⁸⁴Gln und M₅⁴⁷⁸His, führte zu einer starken Affinitätszunahme von Diallylcaracurin V. Der Anstieg der Affinität von Diallylcaracurin V im Vergleich zum M₅-Wildtyp-Rezeptor erreichte aber wie bei den Alkan-Bisammonium-Verbindungen nicht das M₂-Niveau (siehe Diskussion).

	M₂wt	M₅wt	M₂¹⁷⁷Y[®]Q	M₂¹⁷⁷Y[®]Q +⁴²³T[®]H	M₅¹⁸⁴Q[®]Y	M₅¹⁸⁴Q[®]Y +⁴⁷⁸H[®]T
pEC _{0,5;diss}	8,0 (±0,06)	5,69 (±0,07)	6,61 (±0,06)	5,72 (±0,2)	6,0 (±0,18)	6,82 (±0,05)
Steigungsmaß n _H	-1,31 (±0,18)	-1,08 (±0,30)	-1,24 (±0,16)	-0,77 (±0,63)	-1,77 (±0,72)	-1,26* (±0,12)
unteres Plateau (MIN)	-7,88 (±9,40)	37,40* (±3,01)	-11,01 (±14,92)	30,21* (±8,11)	37,15* (±5,23)	-9,78 (±9,10)

Tabelle 3.7: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Diallylcaracurin V an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rezeptormutanten

Wirksamkeit (pEC_{0,5;diss}) des allosterischen Modulators Diallylcaracurin V in Bezug auf die Verzögerung der Dissoziation von [³H]NMS an den aufgeführten Wildtyp-Rezeptoren und Rezeptormutanten. pEC_{0,5;diss} ist der negative dekadische Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die die Dissoziationsgeschwindigkeit von [³H]NMS halbmaximal verzögert. Steigungsmaß n_H und unteres Plateau (MIN) der Kurve wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse auf der Basis der 4 Parameter logistischen Gleichung erhalten. * signifikant verschieden von n_H=-1 bzw. MIN=0%. Gezeigt sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ erhalten aus zwei bis vier unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

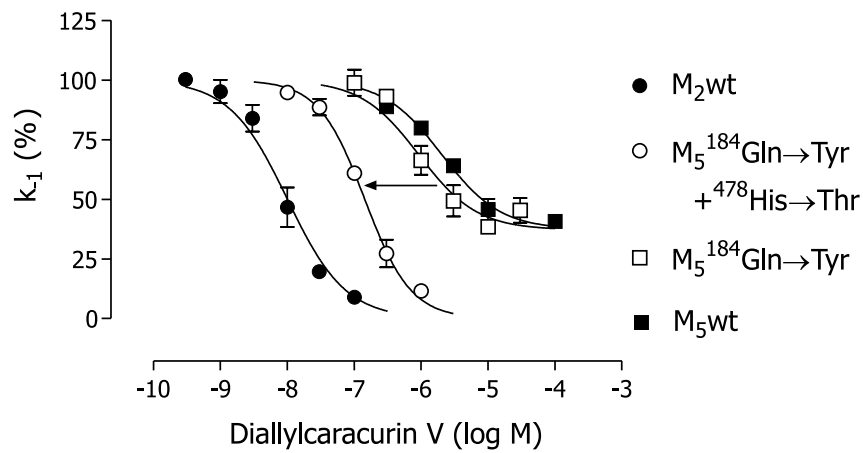


Abbildung 3.15: Effekte von Diallylcaracurin V an NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rückmutanten

Effekte von Diallylcaracurin V auf die Dissoziation von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an M_2 - und M_5 -Wildtyp-Rezeptoren, an der Rückmutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}$ und der Doppelrückmutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr} + ^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit von Diallylcaracurin V. *Abszisse:* Logarithmus der Diallylcaracurin V Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils drei Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

3.3.2 Untersuchungen an freien Rezeptoren

Nachdem an NMS-besetzten Rezeptoren die beiden essentiellen Aminosäuren für die M₂/M₅-Selektivität der allosterischen Modulatoren Dimethyl-W84 und Diallylcaracurin V identifiziert worden waren, sollte nun die Rolle von M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin an freien Rezeptoren untersucht werden. Dafür wurden Gleichgewichtsbindungsexperimente mit [³H]NMS durchgeführt, wobei die Membranabtrennung mittels eines Brandel-Harvesters (siehe Abschnitt 2.5.2) erfolgte. In ersten Experimenten wurde die Affinität von [³H]NMS (Strukturformel siehe Abbildung 2.1) zu den Rezeptormutanten ermittelt (siehe Tabelle 3.8).

	M ₂ wt	M ₅ wt	M ₂ ¹⁷⁷ Y® Q	M ₂ ⁴²³ T® H	M ₂ ¹⁷⁷ Y® Q + ⁴²³ T® H
pK_D	10,36 (±0,06)	9,89 (±0,01)	11,09 (±0,18)	10,28 (±0,26)	10,47 (±0,47)

Tabelle 3.8: Affinität von [³H]NMS zu den aufgeführten Wildtyp-Rezeptoren und Rezeptormutanten.

Gezeigt sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, erhalten aus zwei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

Anschließend wurden ausgewählte allosterische Modulatoren an M₂- und M₅-Wildtyp-Rezeptoren, den Punktmutanten M₂¹⁷⁷Tyr→Gln und M₂⁴²³Thr→His und an der Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln+⁴²³Thr→His untersucht. Die Affinität der allosterischen Modulatoren zum freien Rezeptor wird in Form von pK_A-Werten angegeben, welche durch nichtlineare Regressionsanalyse mithilfe der Ehlert-Gleichung (siehe Abschnitt 2.3.2) erhalten werden. Die Affinitätskonstante der allosterischen Modulatoren zum freien Rezeptor (pK_A) entspricht im Gegensatz zur Affinitätskonstante der allosterischen Modulatoren zum besetzten Rezeptor (pEC_{0,5;diss}-Wert), nicht dem Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve. Der Wendepunkt (x_W) der durch nichtlineare Regressionsanalyse mithilfe der Ehlert-Gleichung erhaltenen Kurven ist gegeben durch (siehe Anhang B.3)

$$x_W = \frac{\ln \frac{\alpha \cdot K_A \cdot (K_L + L)}{\alpha \cdot K_L + L}}{\ln 10} \quad (3.1)$$

Wenn ein allosterischer Modulator die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung nur leicht verändert, ist eine Kurvenanpassung an die Messwerte mit α und K_A als variable Parameter problematisch. In diesem Fall wurde K_A in Gleichung 2.13 durch EC_{0,5;diss}/ α

ersetzt, in der Annahme, dass $\alpha \cdot K_A / EC_{0,5;diss} = 1$ (Raasch et al., 2002). $EC_{0,5;diss}$ war aus Dissoziationsexperimenten bekannt und die nichtlineare Regressionsanalyse ergab α . K_A wurde anschließend aus $EC_{0,5;diss} / \alpha$ berechnet.

Als allosterische Modulatoren wurden zwei negativ kooperative Substanzen, Dimethyl-W84 und W84, und zwei neutrale bzw. leicht positiv kooperative Substanzen, Diallylcaracurin V und OS-72, ausgewählt.

Mit Diallylcaracurin V wurden die Untersuchungen an freien Rezeptoren begonnen, da diese Substanz im Gegensatz zu den Alkan-Bisammonium-Verbindungen stabil ist (Wedig et al., 2002). Die Alkan-Bisammonium-Verbindungen neigen zu spontanem Zerfall während der für Gleichgewichtsbindungsexperimente an M_5 -Wildtyp-Rezeptoren benötigten Inkubationszeit von circa 24 Stunden ($t_{1/2}$ des Zerfalls von W84 in PB-Puffer: 10-14 Stunden; (Schulz, 1998)). Aus diesem Grund wurde von den drei am freien Rezeptor untersuchten allosterischen Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ (W84, Dimethyl-W84 und OS-72) nur die Affinität von W84 an M_5 -Wildtyp-Rezeptoren orientierend ermittelt. Um aussagekräftigere Untersuchungen über diese instabilen Modulatoren an M_5 -Rezeptoren zu erhalten, könnte die Affinität der Alkan-Bisammonium-Verbindungen an freien M_5 -Rezeptoren mithilfe des Agonisten [3H]Oxotremorin M erfasst werden. Da W84 und Dimethyl-W84 mit [3H]Oxotremorin M vermutlich eine sehr stark ausgeprägte negative Kooperativität an M_2 -Rezeptoren zeigen (Grossmüller, 2003), könnte die nötige Inkubationszeit an M_5 -Rezeptoren die Halbwertszeit des Zerfalls der beiden Substanzen unterschreiten.

Diallylcaracurin V. In ersten Experimenten wurde die Affinität von Diallylcaracurin V zu freien M_2 -Wildtyp-Rezeptoren ermittelt. Es ergab sich ein pK_A -Wert von 7,76. Diallylcaracurin V erhöhte die Bindung von [3H]NMS leicht ($p\alpha=0,24$) und zeigte damit eine schwache positive Kooperativität mit NMS an M_2 -Wildtyp-Rezeptoren (siehe Abbildung 3.16 und Tabelle 3.9). Als nächstes wurde die Affinität von Diallylcaracurin V zur Punktmutante $M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln$ untersucht. Der Austausch der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin zur korrespondierenden Aminosäure in M_5 , Glutamin, resultierte in einer leichten Affinitätssteigerung von Diallylcaracurin V im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor ($pK_A=8,06$; siehe Tabelle 3.9). Die [3H]NMS-Bindung wurde hingegen deutlich reduziert ($p\alpha=-1,23$), so dass durch diese Mutation eine Änderung der Kooperativität von schwach positiv zu negativ entstand. Durch den Austausch der Aminosäure M_2^{423} Threonin zur korrespondierenden Aminosäure in M_5 , Histidin, ergab sich für Diallylcaracurin V eine leichte Affinitätsabnahme im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor ($pK_A=7,5$). Die Bindung von [3H]NMS

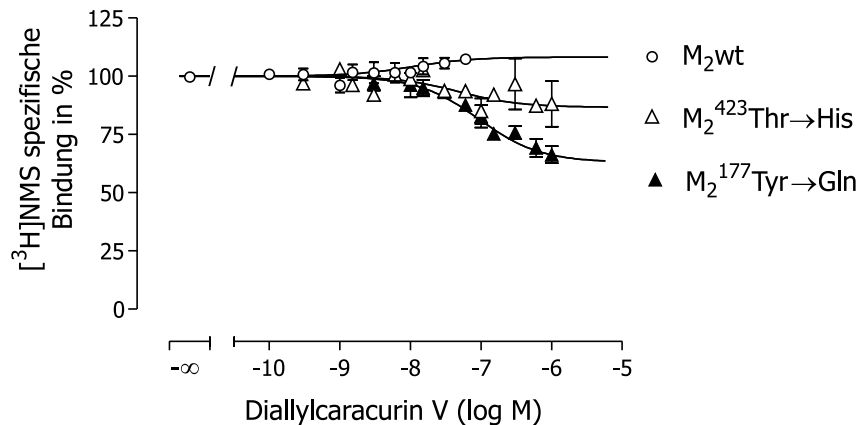


Abbildung 3.16: Effekte von Diallylcaracurin V auf die $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung an M_2 -Wildtyp-Rezeptoren und an den angegebenen Rezeptormutanten

Die nichtlineare Regressionsanalyse erfolgte durch Anpassung der Parameter der Ehlert-Gleichung an die Meßwerte. *Ordinate:* spezifische $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung in Prozent der Bindung in Abwesenheit eines Inhibitors. *Abszisse:* Logarithmus der Diallylcaracurin V Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus drei bis vier Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

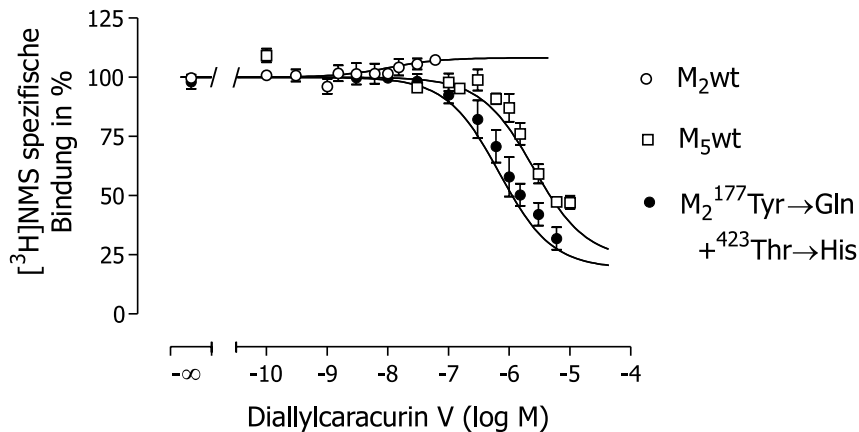


Abbildung 3.17: Effekte von Diallylcaracurin V auf die $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung an M_2 - und M_5 -Wildtyp-Rezeptoren und an der angegebenen Rezeptormutante

Die nichtlineare Regressionsanalyse erfolgte durch Anpassung der Parameter der Ehlert-Gleichung an die Meßwerte. *Ordinate:* spezifische $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung in Prozent der Bindung in Abwesenheit eines Inhibitors. *Abszisse:* Logarithmus der Diallylcaracurin V Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus drei bis vier Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

wurde leicht reduziert ($p\alpha=-0,25$). Der gleichzeitige Austausch der beiden Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin in der Doppelmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}+^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$, verursachte einen starken Affinitätsverlust von Diallylcaracurin V im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor ($pK_A=6,93$). Auch wurde die Bindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ durch diese Mutation stark reduziert ($p\alpha=-1,47$) (siehe Abbildung 3.17). In abschließenden Versuchen wurde die Affinität von Diallylcaracurin V zu freien M_5 -Wildtyp-Rezeptoren untersucht. Hierbei ergab sich ein pK_A -Wert von 5,95 und ein $p\alpha$ von -0,99.

OS-72. Für den allosterischen Modulator OS-72 (Strukturformel siehe Abbildung 2.5) wurde wie bei Diallylcaracurin V zuerst die Affinität zu freien M_2 -Wildtyp-Rezeptoren ermittelt. Es ergab sich ein pK_A -Wert von 8,77. Die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung wurde durch OS-72 kaum beeinflusst, so dass neutrale Kooperativität zwischen NMS und OS-72 an M_2 -Wildtyp-Rezeptoren angenommen wurde (siehe Abbildung 3.18 und Tabelle 3.9). Nachfolgende Untersuchungen an der Punktmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ ergaben eine leichte Affinitätsabnahme von OS-72 im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor ($pK_A=8,36$; siehe Tabelle 3.9). Die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung wurde durch diese Mutation stark reduziert ($p\alpha=-1,68$). Die neutrale Kooperativität an M_2 -Rezeptoren wurde also durch Austausch der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin zur korrespondierenden Aminosäure in M_5 , Glutamin, in eine negative Kooperativität umgewandelt. Der Austausch der Aminosäure M_2^{423} Threonin zur korrespondierenden Aminosäure in M_5 , Histidin, ergab eine starke Affinitätsabnahme von OS-72 im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor ($pK_A=7,53$). Die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung wurde hingegen kaum beeinflusst ($p\alpha=-0,11$). Die Affinität von OS-72 zur Doppelmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}+^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ wurde ebenfalls bestimmt (siehe Abbildung 3.19). Es ergab sich ein pK_A -Wert von 7,16. Ein Einfluss auf die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung durch Austausch der beiden Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin war ebenfalls festzustellen, die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung wurde reduziert ($p\alpha=-0,96$).

W84 und Dimethyl-W84. Die allosterischen Modulatoren W84 und Dimethyl-W84 zeigen in der Regel negative Kooperativität mit NMS an M_2 -Rezeptoren. Dies ergaben auch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an M_2 -Wildtyp-Rezeptoren (W84: $p\alpha=-0,81$; Dimethyl-W84: $p\alpha=-1,04$; siehe Tabelle 3.9). Für die Affinität zu freien M_2 -Rezeptoren wurden pK_A -Werte von 8,15 für W84 und 9,02 für Dimethyl-W84 ermittelt. Der Austausch der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin zur korrespondierenden Aminosäure in M_5 , Glutamin, resultierte für beide Modulatoren in einer erheblichen Affinitätsabnahme (siehe Tabelle 3.9). Ebenfalls wurde die $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung reduziert und damit die

		M₂wt	M₂¹⁷⁷Y® Q	M₂⁴²³T® H	M₂¹⁷⁷Y® Q + ⁴²³T® H	M₅wt
Diallyl-caracurin V	pK _A	7,76* (±0,06)	8,06 (±0,19)	7,50* (±0,07)	6,93 (±0,09)	5,95 (±0,06)
	pα	0,24 (±0,06)	-1,23 (±0,12)	-0,25 (±0,07)	-1,47 (±0,003)	-0,99 (±0,06)
OS-72	pK _A	8,77* (±0,05)	8,36 (±0,06)	7,53* (±0,07)	7,16 (±0,08)	n.b.
	pα	-0,04 (±0,05)	-1,68 (±0,04)	-0,11 (±0,07)	-0,96 (±0,03)	n.b.
W84	pK _A	8,15 (±0,12)	7,44 (±0,05)	6,92* (±0,09)	6,84 (±0,06)	5,69* (±0,02)
	pα	-0,81 (±0,08)	-2,32 (±0,07)	-0,32 (±0,09)	-1,01 (±0,13)	-0,15 (±0,02)
Dimethyl-W84	pK _A	9,02 (±0,01)	8,55 (±0,07)	8,16 (±0,06)	7,57 (±0,05)	n.b.
	pα	-1,04 (±0,04)	-2,47 (±0,09)	-0,89 (±0,06)	-1,61 (±0,08)	n.b.

Tabelle 3.9: Affinität (pK_A) der allosterischen Modulatoren zu den genannten Wildtyp-Rezeptoren und Rezeptormutanten und Kooperativitätsfaktor (pα) für die Interaktion mit NMS. pK_A: negativ dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des allosterischen Modulators an freien Rezeptoren, * mit EC_{0,5;diss} wie im Text beschrieben erhalten, pα: negativ dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors, ein positiver pα-Wert reflektiert eine Zunahme der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung, ein negativer pα-Wert eine Abnahme der [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung. Gezeigt sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ erhalten aus zwei bis sechs unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. n.b., nicht bestimmt.

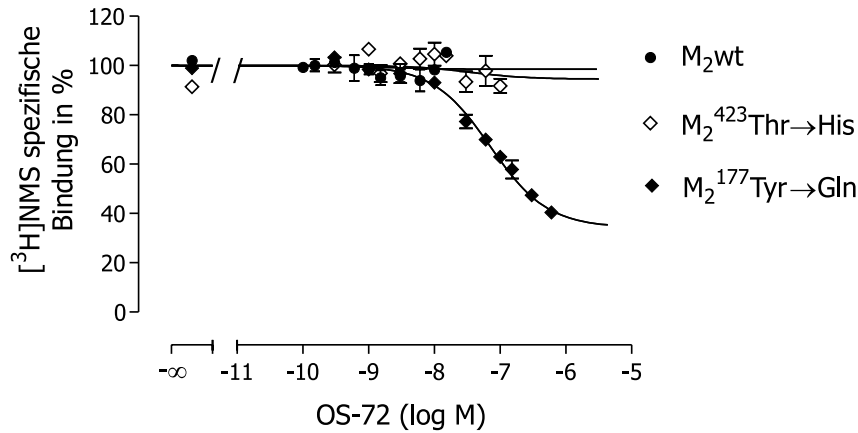


Abbildung 3.18: Effekte von OS-72 auf die $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung an M_2 -Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rezeptormutanten

Die nichtlineare Regressionsanalyse erfolgte durch Anpassung der Parameter der Ehlert-Gleichung an die Meßwerte. *Ordinate*: spezifische $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung in Prozent der Bindung in Abwesenheit eines Inhibitors. *Abszisse*: Logarithmus der OS-72 Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus drei bis sechs Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

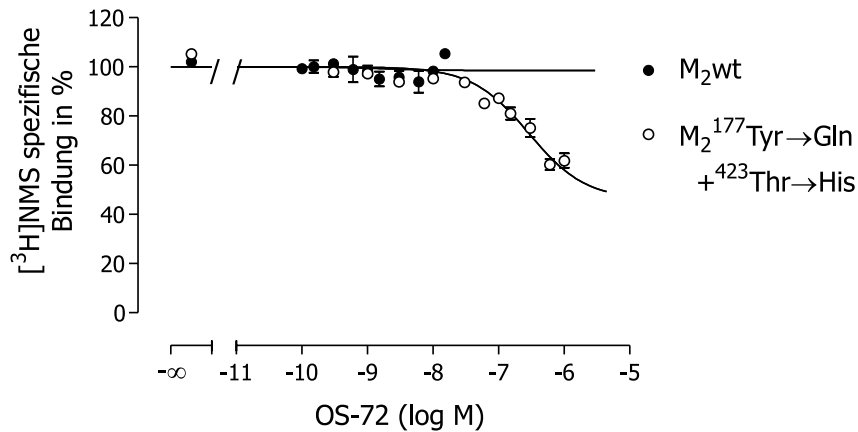


Abbildung 3.19: Effekte von OS-72 auf die $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung an M_2 -Wildtyp-Rezeptoren und der angegebenen Rezeptormutante

Die nichtlineare Regressionsanalyse erfolgte durch Anpassung der Parameter der Ehlert-Gleichung an die Meßwerte. *Ordinate*: spezifische $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung in Prozent der Bindung in Abwesenheit eines Inhibitors. *Abszisse*: Logarithmus der OS-72 Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus drei bis sechs Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

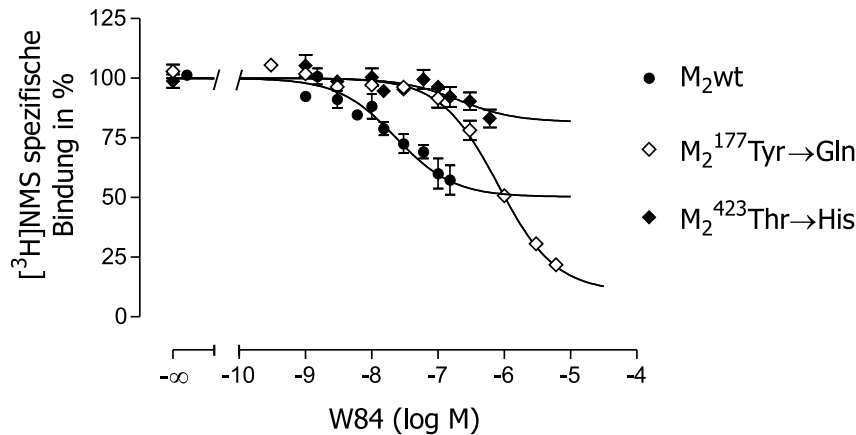


Abbildung 3.20: Effekte von W84 auf die [³H]NMS-Bindung an M₂-Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rezeptormutanten

Die nichtlineare Regressionsanalyse erfolgte durch Anpassung der Parameter der Ehlert-Gleichung an die Meßwerte. *Ordinate:* spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent der Bindung in Abwesenheit eines Inhibitors. *Abszisse:* Logarithmus der W84-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus drei bis vier Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

negative Kooperativität im Vergleich zum M₂-Wildtyp-Rezeptor noch verstärkt (siehe Abbildungen 3.20 und 3.22). Die Untersuchungen an der Punktmutante M₂⁴²³Thr→His ergaben, dass durch Austausch von M₂⁴²³Threonin zur korrespondierenden Aminosäure in M₅, Histidin, ein erheblich größerer Affinitätsverlust für W84 und Dimethyl-W84 im Vergleich zum M₂-Wildtyp-Rezeptor auftrat, als es beim Austausch von M₂¹⁷⁷Tyrosin zur korrespondierenden Aminosäure in M₅, Glutamin, der Fall war. Auch wurde die Affinität der beiden allosterischen Modulatoren zur Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln+⁴²³Thr→His bestimmt (siehe Abbildungen 3.21 und 3.23). Der gleichzeitige Austausch der beiden Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin verursachte eine sehr starke Affinitätsabnahme von W84 und Dimethyl-W84 im Vergleich zum M₂-Rezeptor-Wildtyp. Die [³H]NMS-Bindung wurde ebenfalls reduziert, allerdings nicht in so erheblichem Ausmaß, wie es bei der Punktmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln der Fall war. Abschließend wurde W84 trotz seiner t_{1/2} von 11h in Gleichgewichtsbindungsexperimenten an M₅-Wildtyp-Rezeptoren mit einer Inkubationszeit von 24h untersucht. Diese Experimente sollten Anhaltspunkte geben, ob an freien Rezeptoren ebenfalls nur die beiden Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin für die M₂/M₅-Selektivität der Alkan-Bisammonium-Verbindungen verantwortlich sind, so wie es an NMS-besetzten Rezeptoren der Fall ist. Die Affinität

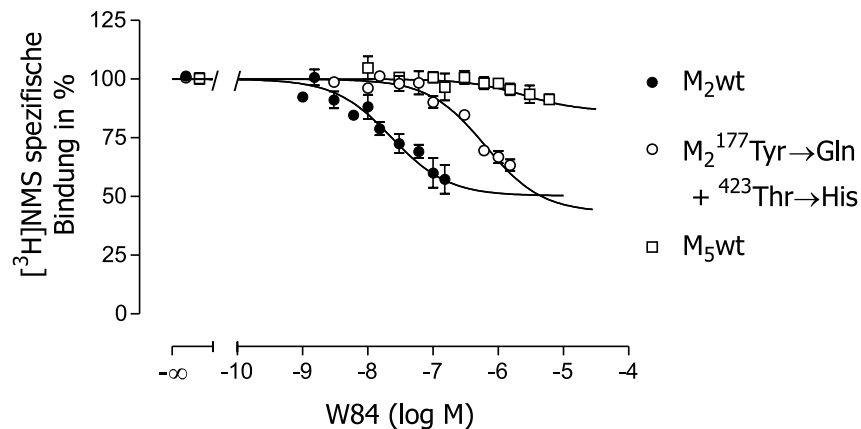


Abbildung 3.21: Effekte von W84 auf die [³H]NMS-Bindung an M₂- und M₅-Wildtyp-Rezeptoren und der angegebenen Rezeptormutante

Die nichtlineare Regressionsanalyse erfolgte durch Anpassung der Parameter der Ehlert-Gleichung an die Meßwerte. *Ordinate*: spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent der Bindung in Abwesenheit eines Inhibitors. *Abszisse*: Logarithmus der W84-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus drei bis vier Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

von W84 zu M₅-Wildtyp-Rezeptoren war geringer als die Affinität zur Doppelmutante M₂^{177Tyr→Gln}+⁴²³Thr→His. Es trat ein Unterschied um circa ein Dekade auf (siehe Tabelle 3.9). Zusammenfassend kann damit festgestellt werden, dass die beiden Aminosäuren auch an freien Rezeptoren eine Rolle spielen, hier allerdings nicht wie an NMS-besetzten Rezeptoren für die M₂/M₅-Selektivität vollständig verantwortlich sind.

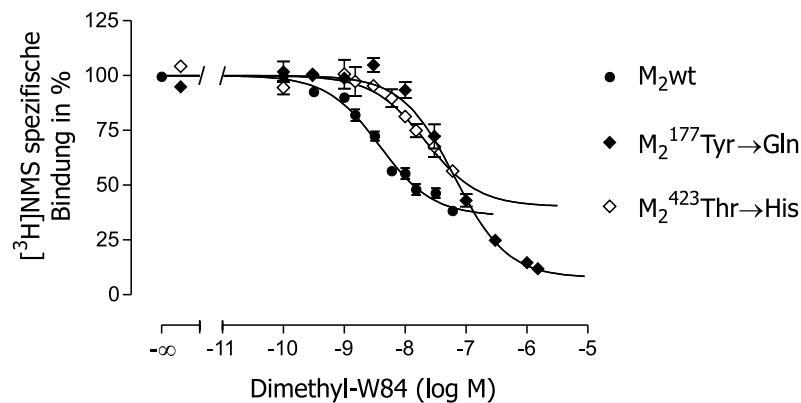


Abbildung 3.22: Effekte von Dimethyl-W84 auf die [³H]NMS-Bindung an M₂-Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rezeptormutanten

Die nichtlineare Regressionsanalyse erfolgte durch Anpassung der Parameter der Ehlert-Gleichung an die Meßwerte. *Ordinate:* spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent der Bindung in Abwesenheit eines Inhibitors. *Abszisse:* Logarithmus der Dimethyl-W84-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus drei bis vier Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

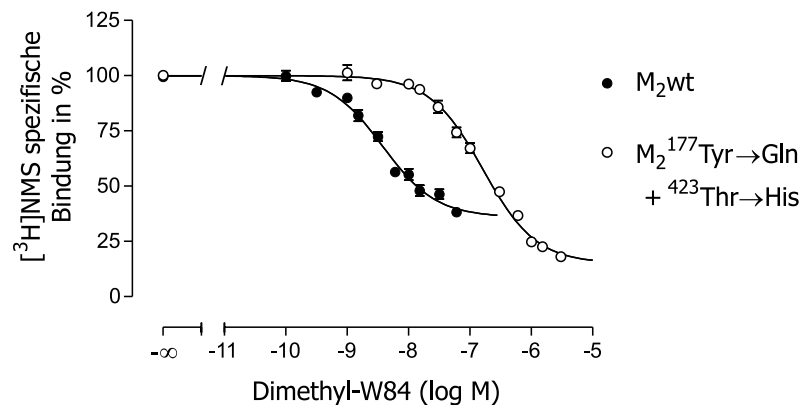


Abbildung 3.23: Effekte von Dimethyl-W84 auf die [³H]NMS-Bindung an M₂-Wildtyp-Rezeptoren und der angegebenen Rezeptormutante

Die nichtlineare Regressionsanalyse erfolgte durch Anpassung der Parameter der Ehlert-Gleichung an die Meßwerte. *Ordinate:* spezifische [³H]NMS-Bindung in Prozent der Bindung in Abwesenheit eines Inhibitors. *Abszisse:* Logarithmus der Dimethyl-W84-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus drei bis vier Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Erörterung der Rezeptormutagenese-Befunde

Fast alle allosterischen Modulatoren zeigen die höchste Affinität zum M₂-Rezeptor-Subtyp und die niedrigste zum M₅-Rezeptor-Subtyp (Holzgrabe and Mohr, 1998; Ellis and Seidenberg, 2000). Daraus ergibt sich die Frage, welche Epitope des M₂-Rezeptors für die im Vergleich zum M₅-Rezeptor hohe Affinität der allosterischen Modulatoren verantwortlich sind. Um die subtypspezifischen Rezeptorepitope für die hohe Affinität der allosterischen Modulatoren zum M₂-Rezeptor zu identifizieren, wurden Untersuchungen mit M₂/M₅-chimären Rezeptoren durchgeführt. Bei dieser Art chimärer Rezeptoren sind Aminosäuresequenzen des M₂-Rezeptors durch korrespondierende Aminosäuresequenzen des M₅-Rezeptors, oder umgekehrt, ersetzt worden.

4.1.1 Befunde an NMS-besetzten Rezeptoren

In der vorliegenden Arbeit konnte durch Herstellung von Punktmutanten und deren Untersuchung in Radioligandbindungsexperimenten M₂¹⁷⁷Tyrosin in der zweiten extrazellulären Schleife des M₂-Rezeptors als zweites wesentliches Epitop für die hohe Bindungsaffinität zweier strukturell verschiedener muskarinischer allosterischer Liganden am M₂-Rezeptor, dessen orthosterische Bindungsstelle durch den muskarinischen Antagonisten N-Methylscopolamin besetzt ist, identifiziert werden. Diese Aminosäure, zusammen mit dem schon identifizierten M₂⁴²³Threonin am Anfang von TM7 (Buller et al., 2002), erklären völlig die M₂/M₅-Selektivität an NMS-besetzten Rezeptoren für allosterische Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ und allosterische Modulatoren aus der Gruppe

der Caracurin V Derivate. Der Austausch von M_2^{177} Tyrosin ergab einen erheblich stärkeren Verlust der Affinität als der Austausch von M_2^{423} Threonin. So scheint M_2^{177} Tyrosin für die Bindungsaffinität der untersuchten allosterischen Modulatoren wichtiger zu sein als das vorher identifizierte M_2^{423} Threonin. Das ist allerdings kein allgemeines Phänomen, da zum Beispiel die Affinität des Methyl-Analogons von Diallylcaracurin V mehr durch den Austausch von M_2^{423} Threonin als durch den Austausch der gesamten zweiten extrazellulären Schleife, welche M_2^{177} Tyrosin enthält (Buller et al., 2002) beeinflusst wurde. Für NMS-besetzte Rezeptoren ist die vorliegende Untersuchung die erste, die Epitope identifiziert, welche die M_2/M_5 -Selektivität der oben genannten strukturell unterschiedlichen allosterischen Liganden vollständig erklären.

Erörterung der Befunde mit Dimethyl-W84 an Punktmutanten

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Punktmutanten waren im Hinblick auf Untersuchungen zur M_2/M_5 -Selektivität von allosterischen Modulatoren entwickelt worden (siehe Abbildung 3.9). Lediglich die Punktmutante $M_2^{175}\text{Glu}\rightarrow\text{Ala}$ wurde zur Untersuchung der Basisaffinität hergestellt. Unter Epitopen für die Basisaffinität allosterischer Modulatoren versteht man Aminosäuren, die zwischen Rezeptorsubtypen konserviert sind und somit zu einer gewissen Grundaffinität der allosterischen Modulatoren beitragen. M_2^{175} Glutamat ist innerhalb der mACh-Rezeptoren in den Subtypen M_2 ($M_2^{175}\text{Glu}$), M_3 ($M_3^{220}\text{Glu}$) und M_5 ($M_5^{182}\text{Glu}$) konserviert. An den korrespondierenden Positionen des M_1 - und M_4 -Rezeptors liegen dagegen M_1^{177} Glutamin und M_4^{184} Glutamin vor. In der Arbeit von Gnagey et al. (1999) wurden erste Befunde zur Basisaffinität an M_2 - und M_5 -Rezeptoren erhoben. In dieser Studie wurden Untersuchungen zur Affinität des allosterischen Prototypmodulators Gallamin an mACh-Rezeptoren durchgeführt. Die von Leppik et al. (1994) für Gallamin als essentiell identifizierte $M_2^{172-175}$ EDGE-Sequenz wurde eingehend untersucht. Experimente mit M_2/M_5 -chimären Rezeptoren brachten das Ergebnis, dass das essentielle Epitop im Bereich der $M_2^{172-175}$ EDGE-Sequenz sowohl im M_2 -Rezeptor als auch im M_5 -Rezeptor vorliegen müsste. Es wurde vermutet, dass M_2^{175} Glutamat bzw. M_5^{182} Glutamat diesen Beitrag zur Basisaffinität an mACh-Rezeptoren leisten. Es wurde in dieser Studie auch eine Doppelpunktmutante hergestellt, in der die beiden in der zweiten extrazellulären Schleife des M_5 -Rezeptors nebeneinanderliegenden Aminosäuren M_5^{181} Aspartat und M_5^{182} Glutamat in die korrespondierenden Aminosäuren des M_1 -Rezeptors, Glycin und Glutamin, mutiert wurden. Es resultierte ein erheblicher Affinitätsverlust des allosterischen Prototypmodulators Gallamin zu dieser Doppelpunktmutante. Von den Autoren wurde daraus geschlossen, dass M_5^{182} Glutamat zur

Basisaffinität von allosterischen Modulatoren an M_5 -Rezeptoren beiträgt.

Dimethyl-W84 zeigte bei Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit an der Punktmutante $M_2^{175}\text{Glu}\rightarrow\text{Ala}$ einen Affinitätsverlust im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor. Der Verlust der Affinität von Dimethyl-W84 durch Austausch von M_2^{175} Glutamat zu Alanin weist darauf hin, dass diese Aminosäure ein Epitop für die Basisaffinität von Dimethyl-W84 an M_2 -Rezeptoren darstellen könnte. Um eine klarere Aussage zur Beteiligung der Aminosäure Glutamat an der Basisaffinität von allosterischen Modulatoren an M_2 - und M_5 -Rezeptoren treffen zu können, wären Untersuchungen an einer Punktmutante sinnvoll, in der M_5^{182} Glutamat gegen das neutrale Alanin ausgetauscht ist.

Erörterung der Befunde mit Dimethyl-W84 an Rückmutanten

Die inverse Substitution der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin in den M_5 -Rezeptor führte zu einer Affinitätssteigerung von Dimethyl-W84 zu dieser Mutante im Vergleich zum M_5 -Wildtyp-Rezeptor (siehe Tabelle 3.6). Die Einführung von beiden essentiellen Aminosäuren des M_2 -Rezeptors, M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin, an den korrespondierenden Positionen des M_5 -Rezeptors brachte ebenfalls einen Affinitätsgewinn von Dimethyl-W84 im Vergleich zum M_5 -Wildtyp-Rezeptor. Das Affinitätsniveau des M_2 -Rezeptors wurde allerdings nicht erreicht. Dies war auch kaum zu erwarten. Denn die Effektivität der eingefügten Aminosäure kann von der Konformation des Rezeptors, in welchen sie eingebracht wird, abhängen. Im vorliegenden Fall war der Grund für den geringen Affinitätsgewinn im konformativen Unterschied zwischen der zweiten extrazellulären Schleife des M_2 -Rezeptors und der zweiten extrazellulären Schleife des M_5 -Rezeptors zu suchen. Denn Untersuchungen an einer Rezeptormutante, in der die komplette zweite extrazelluläre Schleife des M_2 -Rezeptors und die einzelne Aminosäure M_2^{423} Threonin in den M_5 -Rezeptor eingebracht wurden, ergaben für Dimethyl-W84 eine Affinitätskonstante an dieser Rezeptormutante annähernd gleich der am M_2 -Wildtyp-Rezeptor (Buller, 2002). Durch den kompletten Austausch der zweiten extrazellulären Schleife wurde der Unterschied zwischen den Konformationen der zweiten extrazellulären Schleifen des M_2 - und des M_5 -Rezeptors nicht sichtbar. Eine Erklärung für den schwachen Affinitätsgewinn von Dimethyl-W84 an der Doppelrückmutante $M_2^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr} + ^{478}\text{His}\rightarrow\text{Thr}$ liegt wohl in der Aminosäure Prolin in der zweiten extrazellulären Schleife des M_5 -Rezeptors. Prolin ist eine Aminosäure mit strukturbrechenden Eigenschaften (MacArthur and Thornton, 1991) und es ist dadurch sehr wahrscheinlich, dass die zweite extrazelluläre Schleife des M_5 -Rezeptors eine andere Konformation besitzt als die des M_2 -Rezeptors. So könnte M_5^{179} Prolin zu einer ungünsti-

geren Orientierung des eingesetzten Tyrosin in Position 184 beitragen. Das Einbringen dieser einzelnen Aminosäure des M_2 -Rezeptors in die konformativ abweichende Schleife des M_5 -Rezeptors würde daher zu keiner effektiven Ausnutzung der eingebrachten essentiellen Aminosäure durch den allosterischen Modulator führen können.

Erörterung der Befunde mit Diallylcaracurin V an Rückmutanten

Die Einführung der im M_2 -Rezeptor als essentiell für die Affinität von Diallylcaracurin V identifizierten Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin in die korrespondierenden Positionen des M_5 -Rezeptors resultierte in einer Affinitätszunahme von Diallylcaracurin V im Vergleich zum M_5 -Wildtyp-Rezeptor. Das Affinitätsniveau des M_2 -Rezeptors wurde allerdings wie bei Dimethyl-W84 nicht erreicht. Das deutete sich schon durch die fehlende Affinitätszunahme von Diallylcaracurin V an der Rückmutante $M_5^{184}\text{Gln}\rightarrow\text{Tyr}$ im Vergleich zum M_5 -Rezeptor an. Wie oben für Dimethyl-W84 diskutiert, war die Art der Präsentation der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin im M_5 -Rezeptor anscheinend nicht optimal für die rigide Substanz Diallylcaracurin V. Dimethyl-W84 konnte sich als flexibler allosterischer Modulator möglicherweise etwas besser an die veränderte Präsentation der eingeführten Aminosäure anpassen, während bei Diallylcaracurin V dieser mögliche Haftpunkt durch die ungünstige Präsentation anscheinend völlig ungenutzt blieb.

4.1.2 3D-Modell eines NMS-besetzten M_2 -Rezeptors

Von Jöhren und Höltje (2002) wurde ein dreidimensionales Modell des NMS-besetzten M_2 -Rezeptors entwickelt. Dieses Modell wurde von der Kristallstruktur des Rinder-Rhodopsins im inaktivierten Zustand (Palczewski et al., 2000) abgeleitet. Demzufolge sollten die transmembranären Domänen in der gleichen Position sein, als ob sie durch einen orthosterischen Antagonisten stabilisiert wären. Auf der Basis der Befunde der vorliegenden Arbeit konnte ein Alloster/Orthoster/Rezeptor-Modell erstellt werden. Um den ternären Komplex zu modellieren, der für allosterische Interaktionen charakteristisch ist, wurde Diallylcaracurin V in den Eingang der Ligandbindungstasche eingebracht. In Abbildung 4.1 ist dieser Alloster/Orthoster/Rezeptor-Komplex dargestellt. Die beiden essentiellen Aminosäuren sind in grün hervorgehoben. Tyrosin geht mit einem aromatischen Ring des Diallylcaracurin V eine π - π -Interaktion ein. Threonin hingegen bildet mit einem Ethersauerstoff des Diallylcaracurin V eine Wasserstoff-Brückenbindung. Die beiden durch Mutagenese-Befunde identifizierten Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin

stellen dem Modell zufolge also spezifische Haftpunkte für den allosterischen Modulator Diallylcaracurin V am NMS-besetzten M₂-Rezeptor dar und sind nicht allgemein konformationsgebend in Richtung einer optimal geformten allosterischen Bindungsstelle für Diallylcaracurin V. Die zwei quartären Stickstoff-Atome des Diallylcaracurin V sind in zwei Bindungstaschen eingebettet. Die erste besteht aus den Aminosäuren M₂¹³Ala, ²³Val, ²²Glu, ²⁶Ile und ⁸⁵Val, und die zweite Bindungstasche wird durch M₂¹Met, ⁶Asn, ¹⁷⁰Thr, ¹⁷¹Val und ⁴¹⁷Ile gebildet. Die positiven Ladungen der beiden quartären Stickstoff-Atome, die auf die umgebenden aliphatischen Kohlenstoffatome verteilt sind, gehen mit der negativ geladenen Aminosäure ²²Glu bzw. der polaren Aminosäure ⁶Asn Wechselwirkungen ein. Mit Ausnahme der drei nahe dem N-terminus lokalisierten Aminosäuren (¹Met, ⁶Asn und ¹³Ala) liegen die Aminosäuren, die diese Bindungstaschen formen, in Regionen des Rezeptors, die in erheblichem Ausmaß innerhalb der Familie der muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren konserviert sind. Diese Regionen könnten einen Beitrag zur Basisaffinität von allosterischen Modulatoren an mACh-Rezeptoren leisten. Die Existenz solcher konservierter Regionen innerhalb der mACh-Rezeptoren wurde schon von Ellis (1997) postuliert. In jener Arbeit wurde vermutet, dass allosterische Modulatoren an allen mACh-Rezeptor-Subtypen in ähnlicher Orientierung mit einer Basisaffinität binden und die Subtypselektivität durch zusätzliche subtypspezifische Rezeptor-Epitope erzeugt wird.

Eine durchgeführte Moleküldynamik-Simulation am Modell des Diallylcaracurin V/NMS/M₂-Rezeptor-Komplexes ergab, dass der aromatische Ring von M₂¹⁷⁷Tyrosin eine Aufwärtsbewegung in Richtung des allosterischen Modulators durchführt. Dadurch nähert sich der aromatische Ring von M₂¹⁷⁷Tyrosin dem angrenzenden aromatischen Ring des allosterischen Liganden Diallylcaracurin V. Als Folge dieses 'induced fit' wird der freie Raum zwischen der orthosterischen und der allosterischen Bindungsstelle geschlossen und NMS in der orthosterischen Bindungsstelle gefangen. Bei Mutation von M₂¹⁷⁷Tyrosin zur korrespondierenden Aminosäure in M₅, Glutamin, ergibt sich keine Änderung der Konformation der allosterischen Bindungsstelle im Vergleich zum M₂-Wildtyp-Rezeptor. In dieser Rezeptor-Mutante erfolgt allerdings nach Bindung von Diallylcaracurin V eine Abwärtsbewegung von Glutamin, d.h. eine Bewegung in die entgegengesetzte Richtung verglichen mit der Bewegung des Tyrosin im M₂-Wildtyp-Rezeptor. Diese Abwärtsbewegung von Glutamin ist mit einem erheblichen Verlust von Interaktionsenergie verbunden. Auch die Mutation von Threonin zur korrespondierenden Aminosäure in M₅, Histidin wurde modelliert. Threonin ist sehr nah an einem der Ether-Sauerstoffe von Diallylcaracurin V lokalisiert. Durch die Mutation zu Histidin wandelt sich die Interaktionsenergie

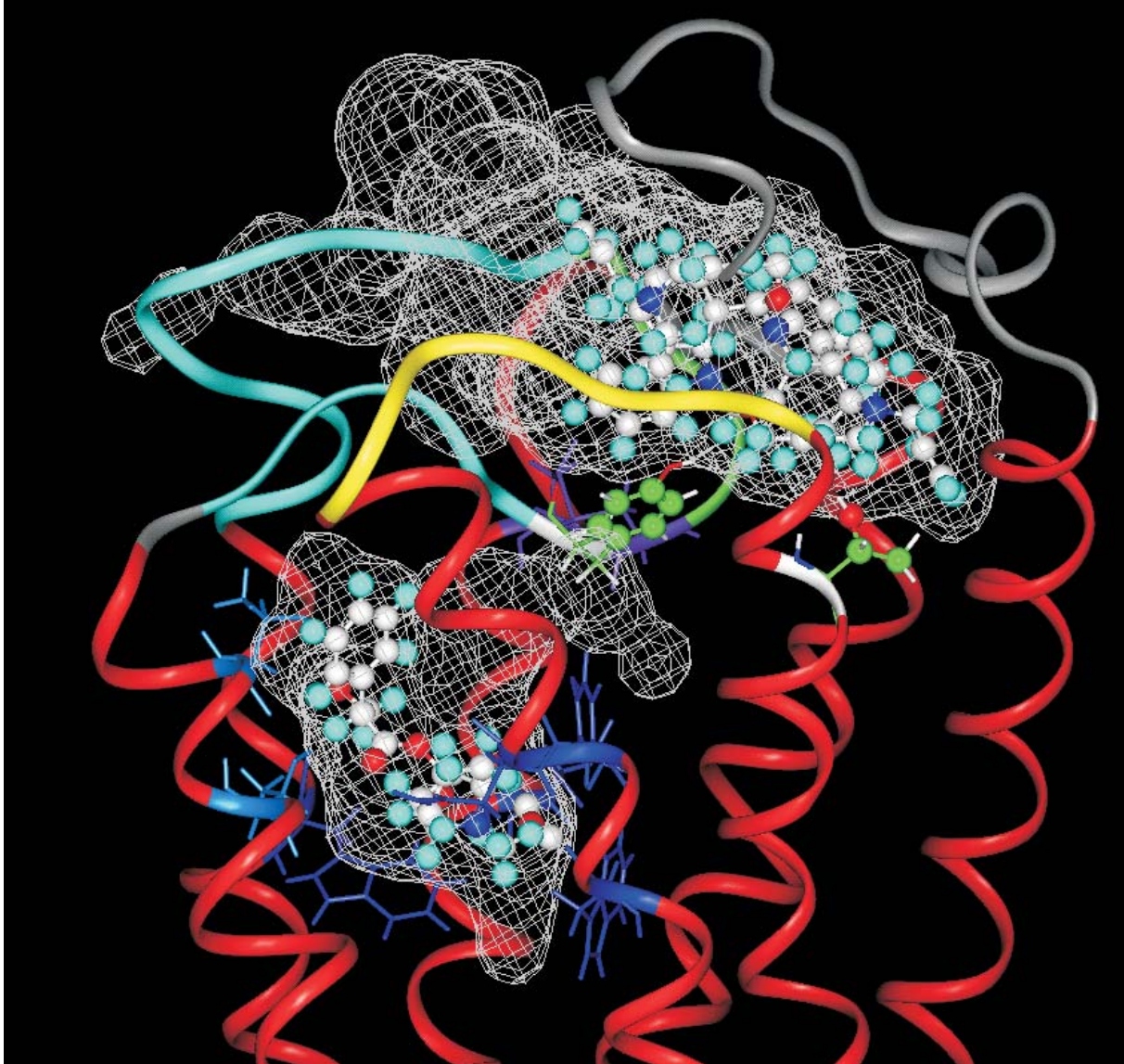


Abbildung 4.1: Modell des Diallylcaracurin V/NMS/M₂-Rezeptor-Komplexes

Blick von der Membran. Farbkodierung: **Protein:** Helices rot, o1 and N-terminus grau, o2 cyan, M₂^{172–175}EDGE grün, o3 gelb, Disulfid-Brücke magenta, orthosterische Bindungsstelle blau, freies Volumen graues Gitter. **M₂¹⁷⁷Tyr / M₂⁴²³Thr:** Kohlenstoff grün, Stickstoff dunkelblau, Sauerstoff rot, Wasserstoff weiß. **NMS / Diallylcaracurin V:** Kohlenstoff weiß, Stickstoff dunkelblau, Sauerstoff rot, Wasserstoff cyan.

von anziehenden Kräften in abstoßende um. Zusammengefasst stimmen diese Resultate mit den experimentellen Befunden überein, d.h. der Verlust der Bindungsaffinität von Diallylcaracurin V ist größer beim Austausch von M₂¹⁷⁷Tyrosin zu Glutamin als beim Austausch von M₂⁴²³Threonin zu Histidin.

In das Modell wurde ebenfalls die Alkan-Bisammonium-Verbindung W84 eingebracht und eine Moleküldynamik-Simulation durchgeführt (Raasch, 2003). Dabei wurden die experimentellen Befunde bestätigt. Die Alkan-Bisammonium-Verbindung W84 und das rigide Diallylcaracurin V interagieren, obgleich strukturell völlig verschieden, mit den gleichen zwei Epitopen: M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin.

4.1.3 Epitopabhängigkeit der Kooperativität mit N-Methylscopolamin

Das *ternäre Modell allosterischer Interaktionen* beschreibt die unterschiedlichen Bindungsmöglichkeiten von orthosterischen Liganden und allosterischen Liganden am Rezeptor. In dieser Arbeit wurde die Affinität der allosterischer Modulatoren zum freien und zum NMS-besetzten Rezeptor mit dem Orthoster [³H]NMS als Sonde bestimmt. Das Verhältnis zwischen der Affinitätskonstanten des Allosters am freien Rezeptor (pK_A-Wert) und der Affinitätskonstanten am NMS-besetzten Rezeptor (pEC_{0,5;diss}-Wert) ergibt die Kooperativität der Interaktion. Ist die Affinität des Allosters zum freien Rezeptor größer als zum NMS-besetzten Rezeptor (pK_A > pEC_{0,5;diss}) liegt negative Kooperativität vor. Positive Kooperativität ergibt sich, wenn das Alloster eine größere Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor als zum freien Rezeptor aufweist (pEC_{0,5;diss} > pK_A). Ist die Affinität zu beiden Rezeptorzuständen gleich, spricht man von neutraler Kooperativität.

Diallylcaracurin V. In Abbildung 4.2 ist die Affinität von Diallylcaracurin V zu freien Rezeptoren in Form offener Balken und die Affinität zu NMS-besetzten Rezeptoren in Form geschlossener Balken aufgetragen. Am M₂-Wildtyp-Rezeptor war die Affinität von Diallylcaracurin V zu NMS-besetzten Rezeptoren etwas höher als an freien M₂-Rezeptoren. Damit verhielt sich Diallylcaracurin V mit NMS an M₂-Wildtyp-Rezeptoren schwach positiv kooperativ. Durch Mutation der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin zur korrespondierenden Aminosäure in M₅, Glutamin, wurde die Affinität von Diallylcaracurin V zu NMS-besetzten Rezeptoren stark reduziert, wohingegen die Affinität an freien Rezeptoren sich nicht signifikant veränderte. Durch Austausch dieser Aminosäure veränderte sich die schwach positive Kooperativität an M₂-Wildtyp-Rezeptoren in eine deutliche

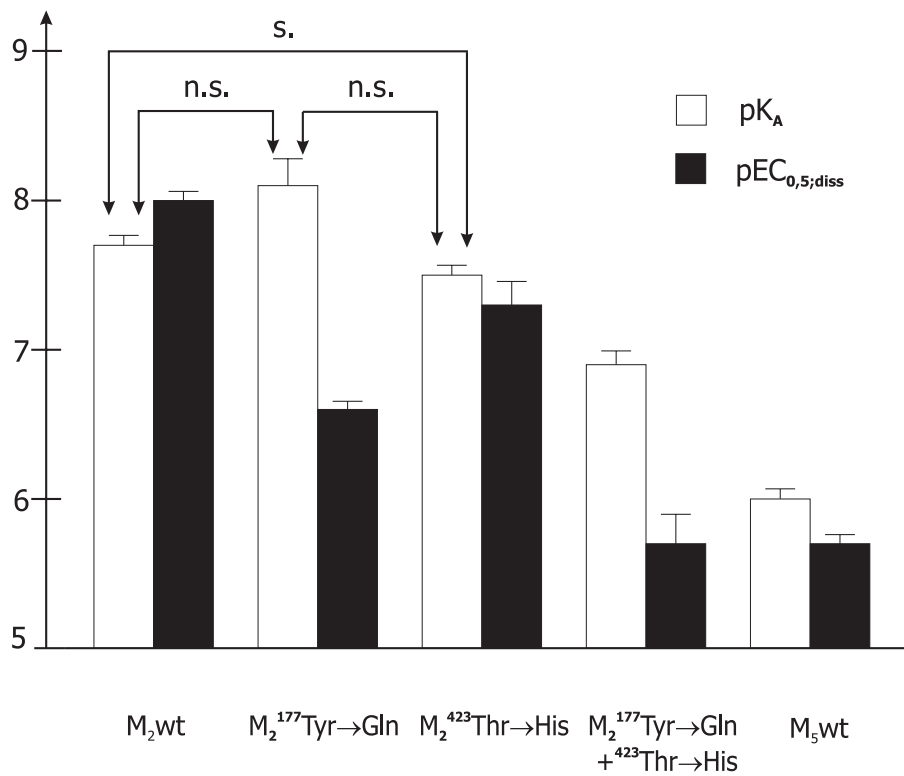


Abbildung 4.2: Affinität von Diallylcaracurin V zu freien und zu NMS-besetzten Rezeptoren pK_A-Werte für die Affinität von Diallylcaracurin V zu freien Rezeptoren (offene Balken) und pEC_{0,5;diss}-Werte für die Affinität von Diallylcaracurin V zu NMS-besetzten Rezeptoren (schwarze Balken); s., signifikant verschieden; n.s., nicht signifikant verschieden

negative Kooperativität. Durch Austausch der Aminosäure M_2^{423} Threonin gegen die korrespondierende Aminosäure in M_5 , Histidin, wurde die Affinität von Diallylcaracurin V zu freien Rezeptoren und zu NMS-besetzten Rezeptoren reduziert. Die Kooperativität wurde durch Austausch dieser Aminosäure fast nicht beeinflusst. An der Doppelmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}+^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ ergab sich ein ähnliches Muster wie bei der Punktmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$: die Affinität zum freien Rezeptor war größer als die Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor. Es lag damit negative Kooperativität zwischen Diallylcaracurin V und NMS an der Doppelmutante vor. Die absoluten Werte der Affinitätskonstanten waren allerdings niedriger als bei der Punktmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$, offenbar weil der Austausch von M_2^{423} Threonin durch Histidin ebenfalls einen Beitrag zum Affinitätsverlust von Diallylcaracurin V leistete, jedoch die Kooperativität nicht beeinflusste. Am M_5 -Wildtyp-Rezeptor wies Diallylcaracurin V eine größere Affinität zu freien als zu NMS-besetzten Rezeptoren auf, so dass Diallylcaracurin V mit NMS an M_5 -Rezeptoren eine schwach negative Kooperativität, wie an der Punktmutante $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ zeigte.

OS-72. In Abbildung 4.3 sind die Verhältnisse für OS-72 dargestellt. OS-72 besaß an freien und NMS-besetzten M_2 -Wildtyp-Rezeptoren die gleiche Affinität: neutrale Kooperativität. Durch Mutation der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin zur korrespondierenden Aminosäure in M_5 , Glutamin, reduzierte sich die Affinität von OS-72 zum NMS-besetzten Rezeptor erheblich, währenddessen sich die Affinität zur freien Punktmutante im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor kaum änderte. Es ergab sich dadurch eine Änderung der Kooperativität zwischen OS-72 und NMS von neutral kooperativ zu stark negativ kooperativ. Der Austausch der Aminosäure M_2^{423} Threonin gegen die korrespondierende Aminosäure in M_5 , Histidin, resultierte in einer Affinitätsreduktion zu freien und NMS-besetzten Rezeptoren in gleichem Ausmaß. Die Kooperativität blieb dementsprechend im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor unverändert. Durch gleichzeitigen Austausch beider Aminosäuren, M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin, wurde die Affinität von OS-72 zu NMS-besetzten Rezeptoren stärker reduziert als zu freien Rezeptoren. OS-72 zeigte damit an der Doppelmutante negative Kooperativität mit NMS. Wie schon für Diallylcaracurin V, beruhte offenbar diese Änderung der Kooperativität zwischen OS-72 und NMS an der Doppelmutante allein auf dem Verlust der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin.

W84 und Dimethyl-W84. Die beiden allosterischen Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ zeigten an M_2 -Wildtyp-Rezeptoren negative Kooperativität mit NMS, d.h. die Affinität zu freien Rezeptoren war größer als zu NMS-besetzten Rezeptoren (sie-

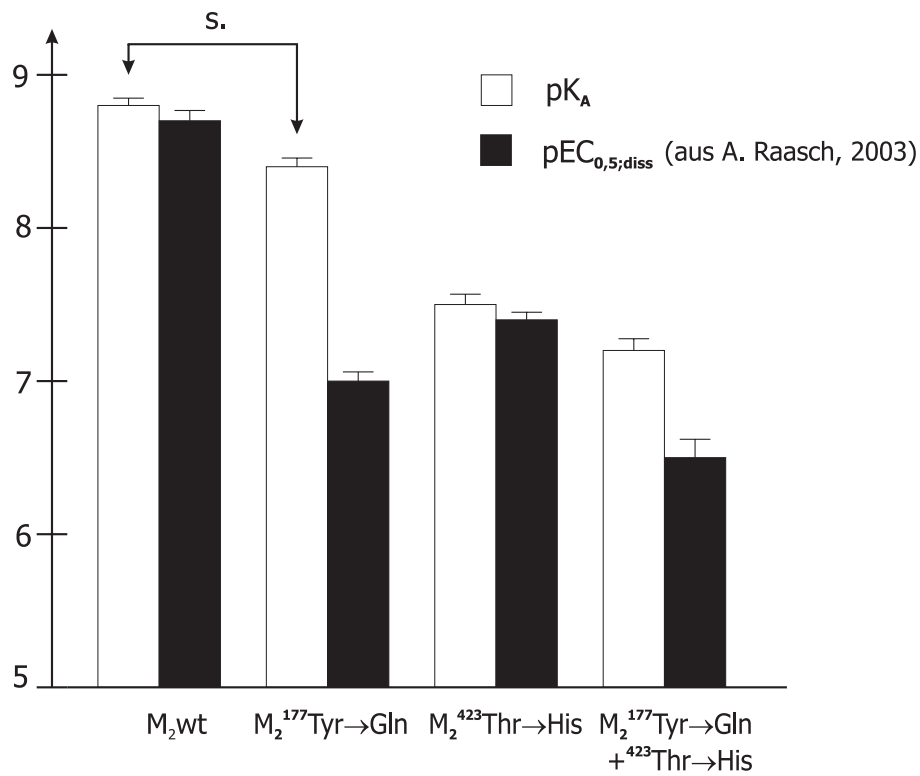


Abbildung 4.3: Affinität von OS-72 zu freien und zu NMS-besetzten Rezeptoren
 pK_A-Werte für die Affinität von OS-72 zu freien Rezeptoren (offene Balken) und pEC_{0,5;diss}-
 Werte (aus A.Raasch, 2003) für die Affinität von OS-72 zu NMS-besetzten Rezeptoren (schwarze
 Balken); s., signifikant verschieden

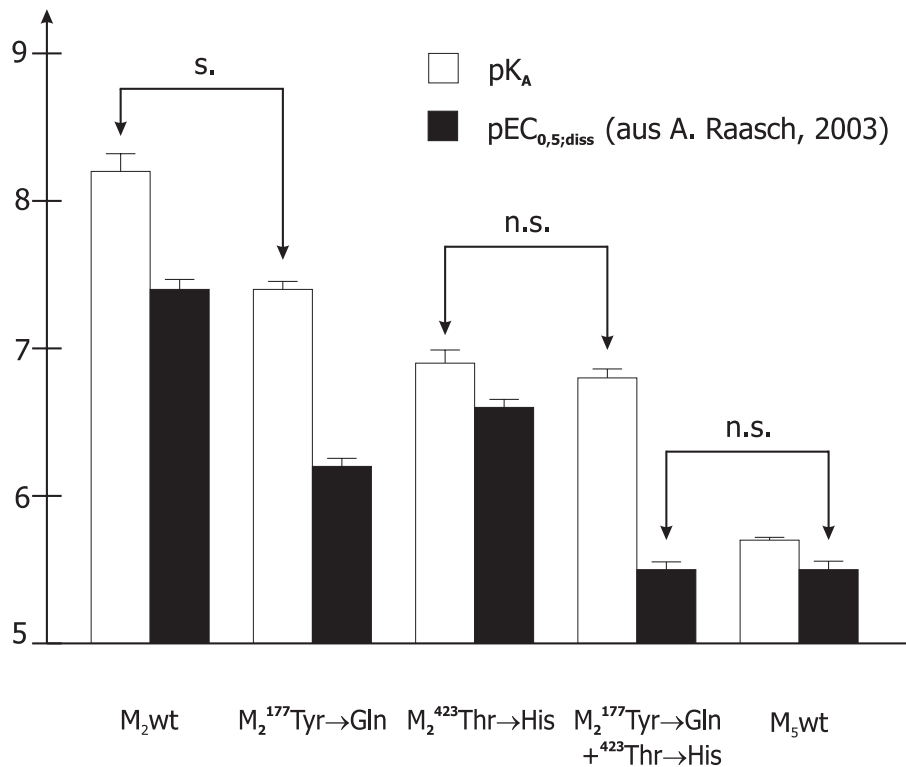


Abbildung 4.4: Affinität von W84 zu freien und zu NMS-besetzten Rezeptoren
 pK_A-Werte für die Affinität von W84 zu freien Rezeptoren (offene Balken) und pEC_{0,5;diss}-Werte (aus A. Raasch, 2003) für die Affinität von W84 zu NMS-besetzten Rezeptoren (schwarze Balken); s., signifikant verschieden; n.s., nicht signifikant verschieden;

he Abbildung 4.4 und 4.5). Durch die Mutation von M₂¹⁷⁷Tyrosin zur korrespondierenden Aminosäure in M₅, Glutamin, wurde die Affinität von W84 und Dimethyl-W84 zu NMS-besetzten Rezeptoren stärker reduziert als die Affinität zu freien Rezeptoren. Die Kooperativität der beiden Modulatoren mit NMS an der Punktmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln war dementsprechend stärker negativ als an M₂-Wildtyp-Rezeptoren. Durch den Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin gegen die korrespondierende Aminosäure in M₅, Histidin, nahm die Affinität von W84 und Dimethyl-W84 zu freien Rezeptoren stärker ab als die Affinität zu NMS-besetzten Rezeptoren. Die negative Kooperativität blieb allerdings erhalten. Die Affinitätskonstanten von W84 und Dimethyl-W84 waren an der freien Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln+⁴²³Thr→His erheblich größer als an der NMS-besetzten: negative Kooperativität. Diese war offenbar allein durch die Mutation der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin zu Glutamin bedingt; denn der Austausch von M₂⁴²³Threonin zu Histidin

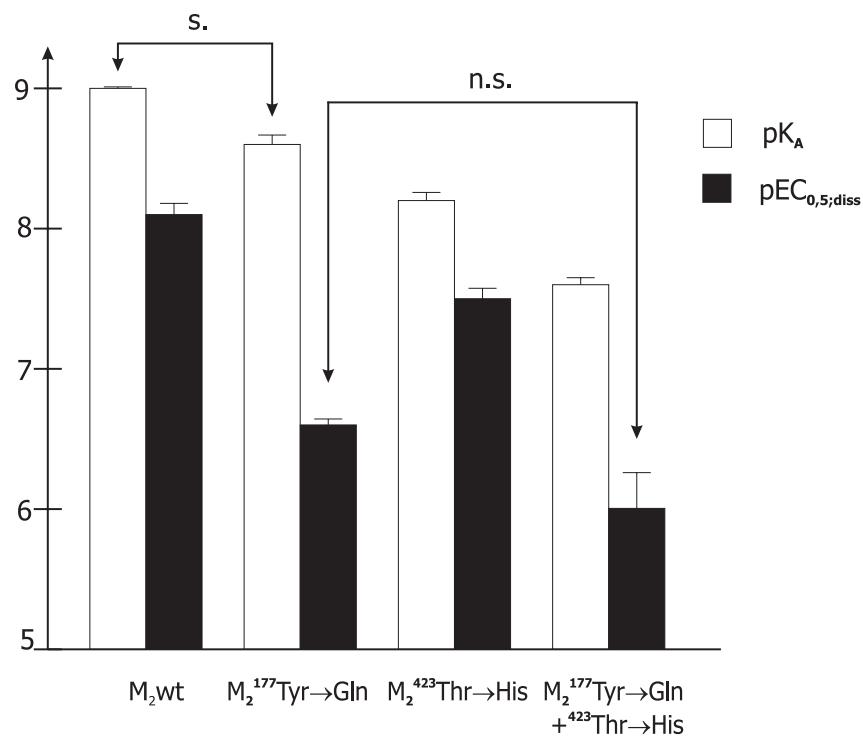


Abbildung 4.5: Affinität von Dimethyl-W84 zu freien und zu NMS-besetzten Rezeptoren pK_A-Werte für die Affinität von Dimethyl-W84 zu freien Rezeptoren (offene Balken) und pEC_{0,5;diss}-Werte für die Affinität von Dimethyl-W84 zu NMS-besetzten Rezeptoren (schwarze Balken); s., signifikant verschieden; n.s., nicht signifikant verschieden

reduzierte die Affinität zu freien und NMS-besetzten Rezeptoren in ähnlichem Ausmaß, währenddessen der Verlust von Tyrosin die Affinität von W84 bzw. Dimethyl-W84 zu NMS-besetzten Rezeptoren sehr stark reduzierte, die Affinität zu freien Rezeptoren aber nur in geringem Maß beeinflusste. Am M₅-Wildtyp-Rezeptor wies W84 eine größere Affinität zu freien als zu NMS-besetzten Rezeptoren auf, so dass wie auch für Diallylcaracurin V beobachtet eine schwach negative Kooperativität mit NMS an M₅-Rezeptoren vorlag.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass für alle vier allosterischen Modulatoren eine etwa gleiche Kooperativität an M₂-Rezeptoren und an der Punktmutante M₂⁴²³Thr→His vorlag, da der Verlust der Aminosäure M₂⁴²³Threonin die Affinität an freien und NMS-besetzten Rezeptoren in ähnlichem Ausmaß reduzierte. Die Kooperativität wurde durch Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin für die an M₂-Rezeptoren leicht positiv bzw. neutral kooperativen Modulatoren negativ und für die an M₂-Rezeptoren negativ kooperativen Modulatoren deutlich stärker negativ. Die Affinität zu freien Rezeptoren änderte sich durch Mutation von M₂¹⁷⁷Tyrosin zu Glutamin in geringem Ausmaß, so dass diese Aminosäure am freien Rezeptor ein weniger wichtiges Epitop darstellte. Möglicherweise ist die mithilfe des NMS-besetzten M₂-Rezeptormodells beschriebene Aufwärtsbewegung von Tyrosin in Richtung des allosterischen Modulators am freien Rezeptor nicht möglich. Dies könnte zu einer ungünstigeren Präsentation von Tyrosin führen im Vergleich zum NMS-besetzten Rezeptor. Ein Modell für den freien M₂-Rezeptor könnte diese Frage möglicherweise klären. Jedoch müßte bei einer Modellierung des freien Rezeptors berücksichtigt werden, dass inaktive und aktive Zustände nebeneinander bestehen können.

Am M₅-Rezeptor zeigten Diallylcaracurin V und Dimethyl-W84 eine weniger stark ausgeprägte negative Kooperativität als an der Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyr→Gln+⁴²³Thr→His; denn die Affinität zu freien M₅-Rezeptoren war deutlich geringer ausgeprägt als zur freien Doppelmutante, die Affinität zu NMS-besetzten Rezeptoren aber gleich. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass der M₂-Rezeptor ein Epitop besitzt, welches nur am freien, aber nicht am NMS-besetzten Rezeptor genutzt wird und dass dieses zusätzliche Epitop zusammen mit M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin die M₂/M₅-Selektivität an freien Rezeptoren erklärt.

Ein Ansatz für die Suche dieses zusätzlichen Epitopes wären Gleichgewichtsbindungsexperimente mit chimären Rezeptoren, in denen jeweils die erste, zweite oder dritte extrazelluläre Schleife des M₂-Rezeptors gegen die korrespondierende Schleife des M₅-Rezeptors ausgetauscht würde. Nach Identifizierung der relevanten extrazellulären Schleife wäre eine Aufteilung der extrazellulären Schleife in mehrere Sequenzen aus sechs bis acht Aminosäuren und anschließender Mutation dieser kurzen Sequenzen zu den korrespondie-

renden M_5 -Sequenzen angebracht, um eine Eingrenzung auf kleinere Rezeptorepitope zu erreichen. Innerhalb eines als relevant identifizierten kleineren Rezeptorepitopes könnten schließlich mithilfe von Punktmutationen die essentiellen Aminosäuren ermittelt werden. Letztendlich kann festgehalten werden, dass in dieser Arbeit erstmalig die M_2/M_5 -Selektivität der Alkan-Bisammonium-Verbindung Dimethyl-W84 und des Caracurin V Derivates Diallylcaracurin V an NMS-besetzten Rezeptoren vollständig auf zwei Aminosäuren zurückgeführt werden konnte: M_2^{177} Tyrosin innerhalb der zweiten extrazellulären Schleife und M_2^{423} Threonin am Beginn der siebenten transmembranären Domäne des M_2 -Rezeptors. Auf der Basis dieser experimentellen Daten wurde ein dreidimensionales Modell des Diallylcaracurin V/NMS/ M_2 -Rezeptor-Komplexes entwickelt, aus welchem hervorgeht, dass die beiden mithilfe von Mutagenese identifizierten Aminosäuren spezifische Haftpunkte für den allosterischen Modulator Diallylcaracurin V darstellen und nicht nur allgemein konformationsgebend für die allosterische Bindungsstelle sind. Auch wurde die Rolle der beiden Aminosäuren im Hinblick auf die M_2/M_5 -Selektivität allosterischer Liganden an freien Rezeptoren untersucht. Hier trägt das Aminosäurepaar M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin ebenfalls zur Bindungsaffinität der untersuchten Modulatoren bei, kann aber die M_2/M_5 -Selektivität nicht komplett erklären. An freien Rezeptoren scheint ein weiteres Epitop des M_2 -Rezeptors zur Affinität der Modulatoren beizutragen, dass an NMS-besetzten Rezeptoren keine Rolle spielt.

Die Aminosäure M_2^{177} Tyrosin verliert ihre Relevanz als Bindungsepitop für die untersuchten allosterischen Modulatoren, sobald der M_2 -Rezeptor nicht mehr mit NMS besetzt ist. Am NMS-besetzten Rezeptor hingegen stellt M_2^{177} Tyrosin für alle untersuchten allosterischen Modulatoren ein essentielles Bindungsepitop dar. Da die Kooperativität der Interaktion mit NMS durch das Verhältnis zwischen den Affinitätskonstanten des Modulators am freien und am NMS-besetzten Rezeptor definiert ist, führte der Austausch der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin gegen die korrespondierende Aminosäure des M_5 -Rezeptors, Glutamin, zu einer Änderung der Kooperativität aller vier untersuchten Substanzen mit NMS.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren weisen neben der orthosterischen Bindungsstelle eine zweite, allosterische, Bindungsstelle auf. Alle fünf Muskarin-Rezeptor-Subtypen können allosterisch moduliert werden. Interessanterweise zeigen fast alle bekannten allosterischen Modulatoren die höchste Affinität zum M₂-Rezeptor-Subtyp und die niedrigste Affinität zum M₅-Rezeptor-Subtyp.

Für allosterische Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ (zum Beispiel W84 und Dimethyl-W84) und allosterische Liganden aus der Gruppe der Caracurin V Derivate (darunter Diallylcaracurin V) sind bislang zwei Epitope identifiziert worden, die für die M₂/M₅-Selektivität an NMS-besetzten Rezeptoren verantwortlich sind: eine einzelne Aminosäure am Beginn der siebenten transmembranären Domäne, M₂⁴²³Thr (Buller et al., Mol Pharmacol, 61:160–168), und eine Sequenz aus sechs Aminosäuren, M₂^{172–177}Glu-Asp-Gly-Glu-Cys-Tyr, im Bereich der zweiten extrazellulären Schleife (Buller, Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn, 2002) des M₂-Rezeptors.

Ziel dieser Arbeit war die Eingrenzung des Epitopes aus sechs Aminosäuren in der zweiten extrazellulären Schleife auf möglichst eine einzelne Aminosäure. Dazu wurden M₂/M₅-chimäre Punktmutanten hergestellt und zusammen mit M₂- und M₅-Wildtyp-Rezeptoren transient in COS 7-Zellen exprimiert. Die Bestimmung der Affinität des jeweiligen allosterischen Modulators zum entsprechenden Wildtyp-Rezeptor bzw. Rezeptormutante erfolgte in kinetischen Bindungsstudien in Form von Dissoziationsexperimenten mit dem orthosterischen Radioliganden [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS). Der Vorteil dieser Experimente am [³H]NMS-besetzten Rezeptor bestand in ausschließlicher Beobachtung allosterisch vermittelter Effekte. Die konzentrationsabhängigen Effekte des allosterischen Modulators auf die [³H]NMS-Dissoziation spiegelten dessen Besetzung der allosterischen

Bindungsstelle und damit dessen Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor wider.

Mithilfe der M_2/M_5 -chimären Punktmutanten konnte M_2^{177} Tyrosin als relevante Aminosäure innerhalb der $M_2^{172-177}$ Glu-Asp-Gly-Glu-Cys-Tyr-Sequenz in der zweiten extrazellulären Schleife identifiziert werden. Um zu prüfen, ob M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin allein die M_2/M_5 -Selektivität der untersuchten allosterischen Modulatoren bedingen, wurde eine Doppelmutante hergestellt, in der sowohl die bereits als essentiell identifizierte Aminosäure M_2^{423} Threonin als auch die gerade identifizierte Aminosäure M_2^{177} Tyrosin zu den korrespondierenden Aminosäuren des M_5 -Rezeptors, His und Gln, mutiert wurden. Durch die Untersuchungen an der Doppelmutante wurde bestätigt, dass M_2^{177} Tyrosin zusammen mit M_2^{423} Threonin die M_2/M_5 -Selektivität der untersuchten allosterischen Modulatoren an NMS-besetzten Rezeptoren vollständig erklärt.

An die Untersuchungen zur Epitopabhängigkeit der allosterischen Modulatoren an NMS-besetzten Rezeptoren schlossen sich Experimente an freien Rezeptoren an. Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass M_2^{177} Tyrosin im Gegensatz zu M_2^{423} Threonin am freien Rezeptor kaum eine Rolle für die Affinität der allosterischen Modulatoren spielt. Die M_2/M_5 -Selektivität der allosterischen Modulatoren an freien Rezeptoren konnte nicht vollständig durch diese beiden Aminosäuren erklärt werden. Ein zusätzliches, noch unbekanntes Epitop des M_2 -Rezeptors, das am NMS-besetzten Rezeptor nicht zur Alloster-Bindung beiträgt, ist sehr wahrscheinlich für die Affinität der allosterischen Modulatoren an freien M_2 -Rezeptoren mit verantwortlich.

Literaturverzeichnis

- Barlow, R. and Blake, J. (1989). Hill coefficients and the logistic equation. *Trends Pharmacol Sci*, 10:440–441.
- Bennett, J. and Yamamura, H. (1985). Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding methods. *Methods in Neurotransmitter Receptor Binding*, Raven Press.
- Birdsall, N., 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, N., Lazareno, S., and Matsui, H. (1996). Allosteric regulation of muscarinic receptors. *Prog Brain Res*, 109:147–151.
- Bonner, T., Buckley, N., Young, A., and Brann, M. (1987). Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science*, 237:527–532.
- Bonner, T., Young, A., Brann, M., and Buckley, N. (1988). Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron*, 1:403–410.
- Bronstein and Semendjajew (1991). Taschenbuch der Mathematik. *B.G. Teubner Verlagsgesellschaft Stuttgart*, pages 686–688.
- Bruns, R. and Fergus, J. (1990). Allosteric enhancement of adenosine A1 receptor binding and function by 2-amino-3-benzoylthiophenes. *Mol Pharmacol*, 38:939–949.
- Buller, S. (2002). Identifizierung von Rezeptorepitopen für die subtypselektive Interaktion allosterischer Modulatoren mit muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren anhand von Mutagenese-Untersuchungen. *Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn*.

- Buller, S., Zlotos, D., Mohr, K., and Ellis, J. (2002). Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: A single amino acid in transmembrane region 7 is critical to the subtype selectivities of caracurine V derivatives and alkane-bisammonium ligands. *Mol Pharmacol*, 61:160–168.
- Caulfield, M. (1993). Muscarinic receptors: Characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther*, 58:319–379.
- Caulfield, M. and Birdsall, N. (1998). International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacological Reviews*, 50:279–290.
- Cheng, Y. and Prusoff, W. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol*, 22:3099–3108.
- Christopoulos, A. and Kenakin, T. (2002). G-Protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev*, 54:323–374.
- Clark, A. and Mitchelson, F. (1976). The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. *Br J Pharmacol*, 58:323–331.
- Cox, M., Jenh, C., Gonsiorek, W., Fine, J., Narula, S., Zavodny, P., and Hipkin, R. (2001). Human interferon-inducible 10-kDa protein and human interferon-inducible T cell alpha chemoattractant are allotropic ligands for human CXCR3: differential binding to receptor states. *Mol Pharmacol*, 59:707–715.
- DeBlasi, A., O'Reilly, K., and Motulsky, H. (1989). Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci*, 10:227–229.
- Dörje, F., Levey, A., and Brann, M. (1991). Immunological detection of muscarinic receptor subtype proteins (m1-m5) in rabbit peripheral tissues. *Mol Pharmacol*, 40:459–462.
- Ehlert, F. (1988). Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol*, 33:187–194.
- Ellis, J. (1997). Allosteric binding sites on muscarinic receptors. *Drug Dev Res*, 40:193–204.

- Ellis, J., Huyler, J., and Brann, M. (1991). Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes. *Biochem Pharmacol*, 42:1927–1932.
- Ellis, J. and Seidenberg, M. (1992). Two allosteric modulators interact at a common site on cardiac muscarinic receptors. *Mol Pharmacol*, 42:638–641.
- Ellis, J. 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.
- Ellis, J., Seidenberg, M., and Brann, M. (1993). Use of chimeric muscarinic receptors to investigate epitopes involved in allosteric interactions. *Mol Pharmacol*, 44:583–588.
- Fillion, G., Rousselle, J., Massot, O., Zifa, E., Fillion, M., and Prudhomme, N. (1996). A new peptide, 5-HT-moduline, isolated and purified from mammalian brain specifically interacts with 5-HT_{1B}/1D receptors. *Behav Brain Res*, 73:313–317.
- Flynn, D., Reeve, C., and Ferrari-Dileo, G. (1995). Pharmacological strategies to selectively label and localize muscarinic receptor subtypes. *Drug Dev Res*, 40:104–116.
- Fraser, C., Wang, C., Robinson, D., Gocayne, J., and Venter, J. (1989). Site-directed mutagenesis of m1 muscarinic acetylcholine receptors: Conserved aspartic acids play important roles in receptor function. *Mol Pharmacol*, 36:840–847.
- Gnagey, A., 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.
- Grossmüller, M. (2003). Interaktion allosterischer Modulatoren mit dem Agonisten [³H]Oxotremorin M und dem Antagonisten [³H]N-Methylscopolamin an muskarinischen M₂-Rezeptoren. *Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn*.
- Hoare, S. and Strange, P. (1996). Regulation of D2 dopamine receptors by amiloride and amiloride analogs. *Mol Pharmacol*, 50:1295–1308.
- Holzgrabe, U. and Mohr, K. (1998). Allosteric modulators of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors. *Drug Discovery Today*, 3:214–222.
- Hulme, E., Birdsall, N., and Buckley, N. (1990). Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 30:633–673.

- Jakubik, J., Bacakova, L., El-Fakahany, E., and Tuček, S. (1995). Subtype selectivity of the positive allosteric action of alcuronium at cloned M1-M5 muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 274:1077–1083.
- Kostenis, E. and Mohr, K. (1996). Two point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation. *Trends Pharmacol Sci*, 17:280–283.
- Krejčí, A. and Tuček, S. (2001). Changes of cooperativity between N-methyl-scopolamine and allosteric modulators alcuronium and gallamine induced by mutations of external loops of muscarinic M3 receptors. *Mol Pharmacol*, 60:761–767.
- 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. (1986a). Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature*, 323:411–416.
- Kubo, T., Maeda, A., Sugimoto, K., Akiba, I., Mikami, A., Takahashi, H., Haga, T., Haga, K., Ichiyama, A., Kangawa, K., Matsuo, H., Hirose, T., and Numa, S. (1986b). Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett*, 209:367–372.
- Lanzafame, A., Christopoulos, A., and Mitchelson, F. (1997). Three allosteric modulators act at a common site, distinct from that of competitive antagonists, at muscarinic acetylcholine M2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 282:278–285.
- Lazareno, S. and Birdsall, N. (1995). Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors: Interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. *Mol Pharmacol*, 48:362–378.
- Lazareno, S., Popham, A., and Birdsall, N. (2000). Allosteric interactions of staurosporine and other indolocarbazoles with N-[methyl-3H]scopolamine and acetylcholine at muscarinic receptor subtypes: Identification of a second allosteric site. *Mol Pharmacol*, 58:194–207.
- Lee, N. and El-Fakahany, E. (1988). Influence of ligand choice on the apparent binding profile of gallamine to cardiac muscarinic receptors. Identification of three main types of gallamine-muscarinic receptor interaction. *J Pharmacol Exp Ther*, 246:829–838.

- Lee, N. and El-Fakahany, E. (1991). Allosteric interactions at the m1, m2 and m3 muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*, 256:468–479.
- Lee, N., Hu, J., and El-Fakahany, E. (1992). Modulation by certain conserved aspartate residues of the allosteric interaction of gallamine at the m1 muscarinic receptor. *Pharmacol Exp Ther*, 262:312–316.
- Leppik, R., Miller, R., Eck, M., and Paquet, J. (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.
- Li, M., Yasuda, R., Wall, S., Wellstein, A., and Wolfe, B. (1991). Distribution of m2 muscarinic receptors in rat brain using antisera selective for m2 receptors. *Mol Pharmacol*, 40:28–35.
- Litschig, S., Gasparini, F., Rueegg, D., Stoehr, N., Flor, P., Vranesic, I., Prezeau, L., Pin, J., Thomsen, C., and Kuhn, R. (1999). CPCCOEt, a noncompetitive metabotropic glutamate receptor 1 antagonist, inhibits receptor signaling without affecting glutamate binding. *Mol Pharmacol*, 55:453–461.
- Lüllmann, H., Ohnesorge, F., Schauwecker, G., 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.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., and Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193:265–275.
- MacArthur, M. and Thornton, J. (1991). Influence of proline residues on protein conformation. *J Mol Biol*, 218:397–412.
- Matsui, H., Lazareno, S., and Birdsall, N. (1995). Probing of the location of the allosteric site on m1 muscarinic receptors by site-directed mutagenesis. *Mol Pharmacol*, 47:88–98.
- Okahyama, H. and Berg, P. (1983). A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 3:280–289.
- Page, K., Curtis, C., Jones, P., and Hulme, E. (1995). The functional role of the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors, probed by site-directed mutagenesis. *Eur J Pharmacol*, 289:429–437.

- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C., Motoshima, H., Fox, B., Trong, I. L., Teller, D., Okada, T., Stenkamp, R., Yamamoto, M., and Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science*, 289:739–745.
- Proška, J. and Tuček, S. (1995). Competition between positive and negative allosteric effectors on muscarinic receptors. *Mol Pharmacol*, 48:696–702.
- Raasch, A. (2003). Allosterische Modulation an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren des Subtypes M₂: Identifizierung essentieller Strukturelemente für Förderer der N-Methylscopolamin-Bindung vom Alkan-bisammonium-Typ. *Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn*.
- 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.
- Schulz, U. (1998). Antagonismus-Untersuchungen zur Topographie der Bindung allosterischer Modulatoren an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren des Subtyps M₂. *Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn*.
- Soudijn, W., van Wijngaarden, I., and IJzerman, A. (2001). Allosteric modulation of G-Protein-coupled receptors. *Expert Opin Ther Patents*, 11:1889–1904.
- Stockton, J., Birdsall, N., Burgen, A., and Hulme, E. (1983). Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. *Mol Pharmacol*, 23:551–557.
- Tränkle, C., Mies-Klomfass, E., Botero-Cid, M., 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.
- Tränkle, C., Weyand, O., Schröter, A., and Mohr, K. (1999). Using a radioalloster to test predictions of the cooperativity model for gallamine binding to the allosteric site of muscarinic acetylcholine M₂ receptors. *Mol Pharmacol*, 56:962–965.
- Tuček, S. and Proška, J. (1995). Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 16:205–212.

- Waelbroeck, M. (1994). Identification of drugs competing with d-tubocurarine for an allosteric site on cardiac muscarinic receptors. *Mol Pharmacol*, 46:685–692.
- Waugh, D., Gaivin, R., Damron, D., Murray, P., and Perez, D. (1999). Binding, partial agonism and potentiation of alpha-1-adrenergic receptor function by benzodiazepines: a potential site of allosteric modulation. *J Pharmacol Exp Ther*, 291:1164–1171.
- Wedig, M., Novatchev, N., Worch, T., Laug, S., and Holzgrabe, U. (2002). Evaluation of the impurity profile of alcuronium by means of capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal*, 28:983–990.
- Wess, J. (1993). Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci*, 14:308–313.
- Wess, J. (1998). Molecular basis of receptor G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther*, 80:231–264.
- Wess, J., Liu, J., Blin, N., Yun, J., Lerche, C., and Kostenis, E. (1997). Structural basis of receptor/G protein coupling selectivity studied with muscarinic receptors as model systems. *Life Sci*, 60:1007–1014.
- Weyand, O. (2001). Allosterische Modulation an muskarinischen M2-Acetylcholin-Rezeptoren: Nutzung des Radioallosters [3H]Dimethyl-W84 zur Überprüfung grundlegender Modellvorstellungen und Eröffnung neuer Einsichten. *Dissertationsschrift, Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn*.

Anhang A

Ergebnisse orientierender Mutageneseuntersuchungen

A.1 Epitopabhängigkeit des allosterischen Modulators Gallamin

Gallamin (Strukturformel siehe Abbildung A.1) ist der bisher am häufigsten untersuchte allosterische Modulator. 1976 fanden Clark und Mitchelson in funktionellen Experimenten an M_2 -Rezeptoren aus isolierten Meerschweinchenherzen, dass Gallamin an muskarinischen Rezeptoren auf eine nicht kompetitive Art und Weise interagiert. Einige Jahre später beschrieben Stockton et al. (1983) als erste die Existenz einer allosterischen Bindungsstelle für Gallamin und postulierten das *ternäre Modell allosterischer Interaktionen*. 1994 identifizierten Leppik und Mitarbeiter wichtige Epitope für die Affinität von Gallamin an M_2 -Rezeptoren. In dieser Arbeit wurde die saure Aminosäuresequenz $M_2^{172-175}$ Glu-Asp-Gly-Glu (EDGE) durch die korrespondierende neutrale Aminosäuresequenz des M_1 -Rezeptors Leu-Ala-Gly-Gln (LAGQ) ersetzt. Diese Mutation verringerte die Affinität von Gallamin um 0,8 Dekaden. Daraus schlossen die Autoren, dass die saure Aminosäuresequenz $M_2^{172-175}$ EDGE ein wichtiges Epitop für die Affinität von Gallamin an M_2 -Rezeptoren darstellt. Gnagey et al. (1999) reproduzierten die Ergebnisse von Leppik und entdeckten ein zusätzliches wichtiges Epitop für die Affinität von Gallamin am M_2 -Rezeptor: M_2^{419} Asparagin im Bereich der dritten extrazellulären Schleife. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, welche der Aminosäuren der $M_2^{172-175}$ EDGE-Sequenz für die Affinität von Gallamin an NMS-besetzten Rezep-

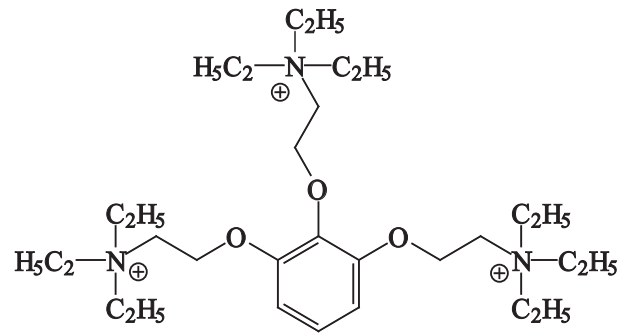


Abbildung A.1: Strukturformel des allosterischen Modulators Gallamin

toren verantwortlich ist. Dafür wurden Untersuchungen an M_2 -Wildtyp-Rezeptoren und den Punktmutanten $M_2^{172}\text{Glu}\rightarrow\text{Ala}$, $M_2^{173}\text{Asp}\rightarrow\text{Leu}$ und $M_2^{175}\text{Glu}\rightarrow\text{Ala}$ vorgenommen. Die Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden unter den gleichen Versuchsbedingungen wie bei Gnagey et al. (1999) durchgeführt. In ersten Versuchen wurden die Effekte von Gallamin an M_2 -Wildtyp-Rezeptoren untersucht und die erhaltenen Kurvenverläufe mit denen von Gnagey et al. (1999) publizierten verglichen. Dazu wurden die Parameter $pEC_{0,5;\text{diss}}$, MAX und MIN aus Gnagey et al. (1999) entnommen und die aus diesen Daten erhaltenen Kurven aufgetragen. Diese und die eigenen Kurven waren deckungsgleich, so dass eine unmittelbare Vergleichbarkeit der in dieser Arbeit erhobenen Befunde mit denen von Gnagey et al. (1999) gewährleistet war. In Abbildung A.2 sind die Effekte von Gallamin am M_2 -Wildtyp-Rezeptor und an der Mutante $M_2^{172-175}\text{EDGE}\rightarrow\text{LAGQ}$ - erstellt mit den Parametern von Gnagey et al. (1999) - aufgetragen und zusätzlich die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Effekte von Gallamin am M_2 -Wildtyp-Rezeptor dargestellt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an den Punktmutanten $M_2^{172}\text{Glu}\rightarrow\text{Ala}$, $M_2^{173}\text{Asp}\rightarrow\text{Leu}$ und $M_2^{175}\text{Glu}\rightarrow\text{Ala}$ sind in Abbildung A.3 dargestellt. Die allosterische Wirksamkeit ($pEC_{0,5;\text{diss}}$) von Gallamin am M_2 -Wildtyp-Rezeptor bzw. Rezeptormutanten und die weiteren Kenndaten der Kurven, d.h. Steigungsmaß (n_H) und unteres Plateau der Kurve (MIN), sind in Tabelle A.1 aufgeführt. Sowohl durch Mutation von M_2^{172} Glutamin zu Alanin als auch durch die Mutation von M_2^{175} Glutamin zu Alanin wurde die Affinität von Gallamin im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor reduziert. Der Austausch von M_2^{173} Aspartat zu Leucin ließ hingegen die Affinität von Gallamin unbeeinflusst. Von den drei sauren Aminosäuren der $M_2^{172-175}\text{EDGE}$ -Sequenz sind damit zwei für die Affinität von Gallamin an NMS-besetzten M_2 -Rezeptoren verantwortlich: M_2^{172} Glutamin und M_2^{175} Glutamin.

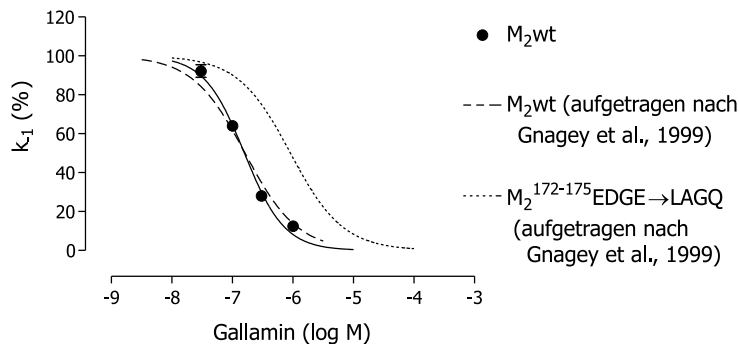


Abbildung A.2: Effekte von Gallamin an NMS-besetzten M₂-Rezeptoren und an der angegebenen Rezeptormutante

Effekte von Gallamin auf die Dissoziation von [³H]NMS an M₂-Wildtyp-Rezeptoren (Ergebnis aus der vorliegenden Arbeit und Kurve aufgetragen nach den Daten von Gnagey et al., 1999) und an dem chimären Rezeptor M₂¹⁷²⁻¹⁷⁵EDGE→LAGQ (ebenfalls aufgetragen nach den Daten von Gnagey et al., 1999). *Ordinate*: Apparente Geschwindigkeitskonstante der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit von Gallamin. *Abszisse*: Logarithmus der Gallamin-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils drei Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

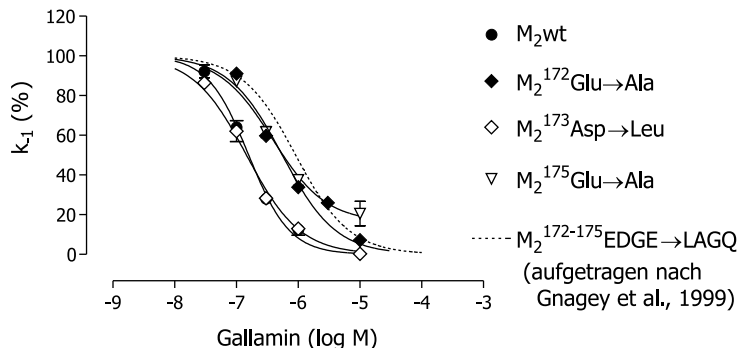


Abbildung A.3: Effekte von Gallamin an NMS-besetzten M₂-Rezeptoren und an den angegebenen Punktmutanten

Effekte von Gallamin auf die Dissoziation von [³H]NMS an M₂-Wildtyp-Rezeptoren und an den angegebenen Punktmutanten M₂¹⁷²Glu→Ala, M₂¹⁷³Asp→Leu und M₂¹⁷⁵Glu→Ala. Zur Orientierung ist der Effekt von Gallamin am chimären Rezeptor M₂¹⁷²⁻¹⁷⁵EDGE→LAGQ aus Abbildung A.2 mit eingetragen. *Ordinate*: Apparente Geschwindigkeitskonstante der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit von Gallamin. *Abszisse*: Logarithmus der Gallamin-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils drei Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

	M ₂ wt	M ₂ ¹⁷²⁻¹⁷⁷ EDGE CY®PLDECQ	M ₂ ¹⁷² E®A	M ₂ ¹⁷³ D®L	M ₂ ¹⁷⁵ E®A	M ₂ ¹⁷⁷ Y®Q
pEC _{0,5;diss}	6,80 (±0,03)	6,09 (±0,04)	6,26 (±0,05)	6,84 (±0,04)	6,42 (±0,07)	6,21 (±0,11)
Steigungsmaß n _H	-1,31* (±0,11)	-1,07 (±0,10)	-0,97 (±0,13)	-1,14 (±0,11)	-1,26 (±0,20)	-1,09 (±0,31)
unteres Plateau (MIN)	-7,67 (±7,57)	-0,24 (±7,97)	-5,62 (±5,63)	-2,04 (±3,66)	16,18* (±3,91)	9,77 (±19,46)

Tabelle A.1: Kenndaten für die Interaktion des Modulators Gallamin mit NMS-besetzten M₂-Wildtyp-Rezeptoren und den aufgeführten Rezeptormutanten

Wirksamkeit (pEC_{0,5;diss}) von Gallamin in Bezug auf die Verzögerung der Dissoziation von [³H]NMS an M₂-Wildtyp-Rezeptoren und den aufgeführten Rezeptormutanten. pEC_{0,5;diss} ist der negative dekadische Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die die Dissoziationsgeschwindigkeit von [³H]NMS halbmaximal verzögert. Steigungsmaß n_H und unteres Plateau (MIN) der Kurve wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse auf der Basis der 4 Parameter logistischen Gleichung erhalten. * signifikant verschieden von n_H=-1 bzw. MIN=0%. Gezeigt sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ erhalten aus drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

In folgenden Untersuchungen sollten orientierende Experimente zur M₂/M₅-Selektivität von Gallamin durchgeführt werden. Dafür wurde der Effekt von Gallamin an der Rezeptormutante, in der die M₂¹⁷²⁻¹⁷⁷EDGE CY-Sequenz gegen die korrespondierende Aminosäuresequenz des M₅-Rezeptors ausgetauscht wurde, M₂¹⁷²⁻¹⁷⁷EDGE CY→PLDECQ, untersucht. Es ergab sich ein Affinitätsverlust von Gallamin im Vergleich zum M₂-Wildtyp-Rezeptor (siehe Abbildung A.4 und Tabelle A.1). Nachfolgend wurden Untersuchungen an Punktmutanten durchgeführt, in denen die sauren Aminosäuren innerhalb der M₂¹⁷²⁻¹⁷⁷EDGE CY-Sequenz und zusätzlich M₂¹⁷⁷Tyr mutiert wurden: M₂¹⁷²Glu→Ala, M₂¹⁷³Asp→Leu, M₂¹⁷⁵Glu→Ala und M₂¹⁷⁷Tyr→Gln. Der Austausch der Aminosäure M₂¹⁷³Asp zu Leu führte zu keiner Änderung der Affinität von Gallamin im Vergleich zum M₂-Wildtyp-Rezeptor (siehe Abbildung A.5). Die Mutationen der Aminosäuren M₂¹⁷²Glu, M₂¹⁷⁵Glu und M₂¹⁷⁷Tyr hingegen verursachten eine Affinitätsabnahme von Gallamin. Die Aminosäure M₂¹⁷⁵Glu ist allerdings auch korrespondierend im M₅-Rezeptor enthalten: M₅¹⁸²Glu. Demzufolge konnte der Affinitätsverlust von Gallamin verursacht durch die Mutation M₂¹⁷⁵Glu→Ala nicht die Affinitätsabnahme von Gallamin an der Mutante M₂¹⁷²⁻¹⁷⁷EDGE CY→PLDECQ erklären. M₂¹⁷⁵Glu leistet damit keinen Beitrag zur M₂/M₅-Selektivität von Gallamin an NMS-besetzten Rezeptoren, sondern trägt sehr

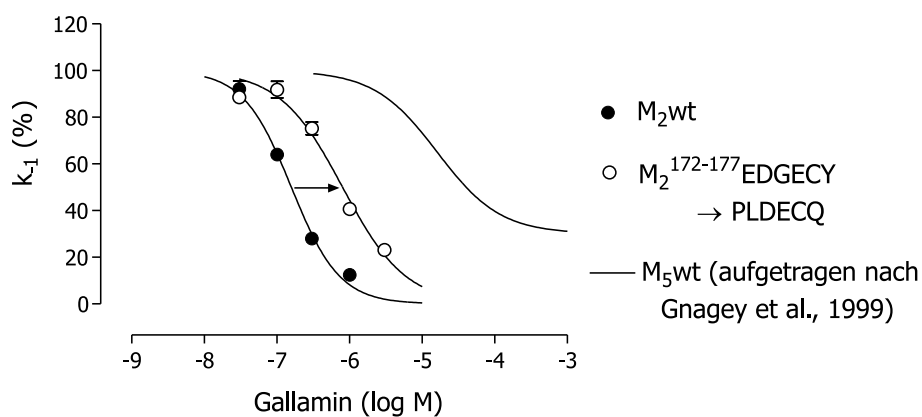


Abbildung A.4: Interaktion von Gallamin mit NMS-besetzten M₂- und M₅-Wildtyp-Rezeptoren und der angegebenen Rezeptormutante

Effekte von Gallamin auf die Dissoziation von [³H]NMS an M₂- und M₅-Wildtyp-Rezeptoren (M₅-Kurve erhalten nach den Daten von Gnagey et al., 1999) und an der Rezeptormutante M₂¹⁷²⁻¹⁷⁷EDGE CY → PLDECQ. *Ordinate*: Apparente Geschwindigkeitskonstante der [³H]NMS-Dissoziation in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit von Gallamin. *Abszisse*: Logarithmus der Gallamin-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils drei Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

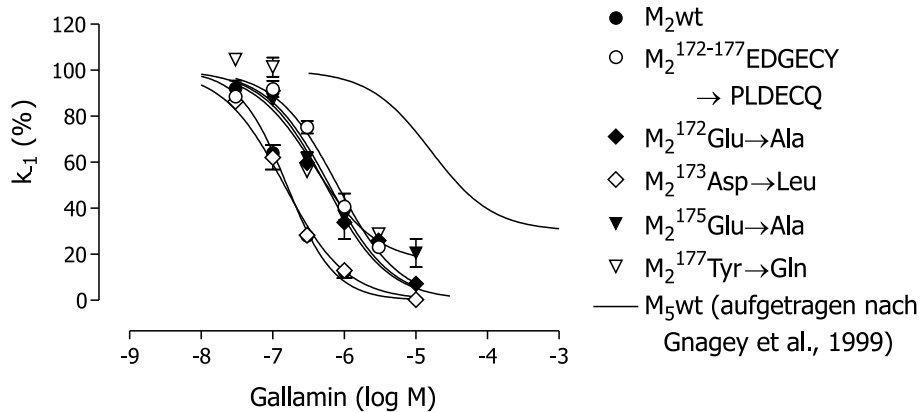


Abbildung A.5: Interaktion von Gallamin mit NMS-besetzten Wildtyp-Rezeptoren und den angegebenen Rezeptormutanten

Effekte von Gallamin auf die Dissoziation von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an M_2 - und M_5 -Wildtyp-Rezeptoren (M_5 -Kurve erhalten nach den Daten von Gnagey et al., 1999) und an den Rezeptormutanten $\text{M}_2^{172-177}\text{EDGECY} \rightarrow \text{PLDECQ}$, $\text{M}_2^{172}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$, $\text{M}_2^{173}\text{Asp} \rightarrow \text{Leu}$ und $\text{M}_2^{175}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$ und $\text{M}_2^{177}\text{Tyr} \rightarrow \text{Gln}$. *Ordinate:* Apparente Geschwindigkeitskonstante der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit von Gallamin. *Abszisse:* Logarithmus der Gallamin-Konzentration. Aufgetragen sind $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ aus jeweils drei Versuchen in Doppelbestimmung. Streuungsbalken sind nur gezeigt, wenn sie über die Größe des Symbols hinausgehen.

wahrscheinlich zur Basisaffinität von Gallamin an M_2 - und M_5 -Rezeptoren bei (Gnagey et al., 1999). Die Affinität von Gallamin wurde durch Mutation der Aminosäure $\text{M}_2^{177}\text{Tyrosin}$ zu Glutamin deutlich reduziert, so dass das Niveau der Affinität zur Rezeptormutante $\text{M}_2^{172-177}\text{EDGECY} \rightarrow \text{PLDECQ}$ erreicht wurde. Auch der Austausch der Aminosäure $\text{M}_2^{172}\text{Glutamin}$ gegen Alanin führte zu einer Affinitätsabnahme von Gallamin im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor. Für die Affinität von Gallamin an NMS-besetzten M_2 -Rezeptoren ist damit innerhalb der $\text{M}_2^{172-177}\text{EDGECY}$ -Sequenz keine einzelne Aminosäure verantwortlich zu machen. Es stehen anscheinend die zwei Aminosäuren $\text{M}_2^{172}\text{Glutamin}$ und $\text{M}_2^{177}\text{Tyrosin}$ als mögliche Haftpunkte für Gallamin an M_2 -Rezeptoren zur Verfügung. Da der Austausch von $\text{M}_2^{172}\text{Glutamin}$ zu Alanin die Affinität von Gallamin in ähnlichem Ausmaß reduzierte wie der Austausch von $\text{M}_2^{177}\text{Tyrosin}$ durch Glutamin, ist es möglich, dass Gallamin bei Entfernung einer dieser genannten Aminosäuren seine Orientierung ändert und den Verlust des einen Haftpunktes durch die zweite Bindungsmöglichkeit ausgleicht.

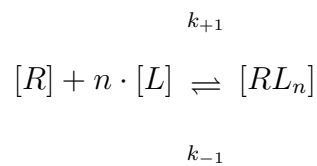
Die Betrachtung der M_2/M_5 -Selektivität erfordert weitere Untersuchungen. Aus den

erhaltenen Ergebnissen kann lediglich geschlossen werden, dass M₂¹⁷²Glutamin und M₂¹⁷⁷Tyrosin wichtige Bindungsepitope für Gallamin in der zweiten extrazellulären Schleife des M₂-Rezeptors sind und zusammen mit dem von Gnagey et al. (1999) identifizierten M₂⁴¹⁹Asparagin zur hohen Affinität von Gallamin an NMS-besetzten M₂-Rezeptoren beitragen.

Anhang B

Formeln

B.1 Die Hill-Gleichung



$$\frac{d}{dt}[RL_n] = k_{+1} \cdot [R] \cdot [L]^n - k_{-1} \cdot [RL_n] = 0$$

$$\frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]^n}{[RL_n]} = K_D = \frac{1}{K_A}$$

$$\begin{aligned} R_{total} &= [R] + [RL_n] \\ \iff [R] &= R_{total} - [RL_n] \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} K_L &= \frac{(R_{total} - [RL_n]) \cdot [L]^n}{[RL_n]} \\ K_L &= \frac{R_{total} \cdot [L]^n - [RL_n] \cdot [L]^n}{[RL_n]} = \frac{R_{total} \cdot [L]^n}{[RL_n]} - [L]^n \end{aligned}$$

$$K_L + [L]^n = \frac{R_{total} \cdot [L]^n}{[RL_n]}$$

$$[RL_n] = \frac{R_{total} \cdot [L]^n}{K_L + [L]^n} \quad (B.1)$$

B.2 Von der Hill-Gleichung zur 4-Parameter-logistischen-Gleichung

$$[RL_n] = \frac{R_{total} \cdot 10^{\log([L]^n)}}{K_L + 10^{\log([L]^n)}} = \frac{R_{total} \cdot 10^{n \cdot \log[L]}}{K_L + 10^{n \cdot \log[L]}}$$

die Konzentration der Dissoziationskonstante K_L ist gleich dem EC_{50}^n :

$$[RL_n](EC_{50}) = \frac{R_{total}}{2} = \frac{R_{total} \cdot EC_{50}^n}{K_L + EC_{50}^n}$$

$$K_L + EC_{50}^n = 2 \cdot EC_{50}^n$$

$$EC_{50}^n = K_L$$

setzt man nun EC_{50}^n für K_L ein, folgt:

$$[RL_n] = \frac{R_{total}}{(10^{n \cdot \log EC_{50}} + 10^{n \cdot \log [L]}) \cdot 10^{-n \cdot \log [L]}}$$

$$[RL_n] = \frac{R_{total}}{10^{(n \cdot \log EC_{50} - n \cdot \log [L])} + 10^{(n \cdot \log [L] - n \cdot \log [L])}}$$

$$[RL_n] = \frac{R_{total}}{1 + 10^{(n \cdot \log EC_{50} - n \cdot \log [L])}} \quad (B.2)$$

statt R_{total} kann nun MAX-MIN in die Gleichung eingesetzt werden, es resultiert bei zusätzlicher Angabe des y-Achsen-Abschnittes (MIN) die 4-Parameter-logistische Gleichung:

$$[RL_n] = \frac{\text{MAX} - \text{MIN}}{1 + 10^{n(\log EC_{50} - \log [L])}} + \text{MIN} \quad (B.3)$$

B.3 Bestimmung des Wendepunktes der Ehlert-Gleichung

Die Funktion

$$B_A(x) = B_0 \frac{L + K_L}{L + K_L \frac{K_A + 10^x}{K_A + \frac{10^x}{\alpha}}}$$

hat für $\alpha \neq 1$ genau einen Wendepunkt. Für $\alpha = 1$ ist $B_A(x) = \text{const.}$ und besitzt daher keinen Wendepunkt. Der Wendepunkt kann über die Nullstelle der zweiten Ableitung von $B_A(x)$ nach x bestimmt werden.

Für die erste Ableitung von $B_A(x)$ nach x ergibt sich:

$$B'_A(x) = \frac{10^x(\alpha - 1)\alpha B_0 K_A K_L (K_L + L) \ln 10}{\{10^x L + \alpha [(10^x + K_A)K_L + K_A L]\}^2}$$

Die zweite Ableitung von $B_A(x)$ nach x berechnet sich zu:

$$\begin{aligned} B''_A(x) &= -10^x(\alpha - 1)\alpha B_0 K_A K_L (K_L + L) \ln^2(10) \\ &\cdot \{(-2^{x+1}5^x + 10^x)L + \alpha [(K_A - 2^{x+1}5^x + 10^x)K_L + K_A L]\} \\ &\cdot \{10^x L + \alpha [(K_A + 10^x)K_L + K_A L]\}^{-3} \end{aligned}$$

Die Faktoren in Zeile 1 und 3 können nicht Null werden. Die Nullstelle der zweiten Ableitung ist daher durch die Gleichung

$$(-2^{x+1}5^x + 10^x)L + \alpha [(K_A - 2^{x+1}5^x + 10^x)K_L + K_A L] = 0$$

bestimmt. Durch die Auflösung nach x erhält man den gesuchten Wendepunkt.

$$x_W = \frac{\ln \left[\frac{\alpha K_A (K_L + L)}{\alpha K_L + L} \right]}{\ln 10}$$

Anhang C

Publikationsliste

Vollständig publizierte Arbeiten

Tränkle, C., Weyand, O., Voightländer, U., Mynett, A., Lazareno, S., Birdsall, N., and Mohr, K. (2003). Interactions of orthosteric and allosteric ligands with [3H]Dimethyl-W84 at the common allosteric site of muscarinic m2 receptors. *Mol Pharmacol*, 64:180–190.

Voightländer, U., Jöhren, K., Mohr, M., Raasch, A., Tränkle, C., Buller, S., Ellis, J., Hölteje, H., 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.

In Abstraktform publizierte Kongreßmitteilungen

Voightländer, 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*, 335:134.

Voightländer, U., Raasch, A., Buller, S., Ellis, J., and Mohr, K. (2003). 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.

Voightländer, 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*, 367:91.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. K. Mohr für die überlassene Thematik und für die intensive Betreuung und Unterstützung in allen Phasen der Arbeit. Die angenehme Atmosphäre der Zusammenarbeit, die ständige Ansprechmöglichkeit zur Klärung auftretender Fragen, sowie seine rasche Handlungsbereitschaft haben ganz entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. med. M. Göthert danke ich sehr herzlich für die Übernahme des Korreferates.

Allen Arbeitskollegen der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, ihre Diskussionsbereitschaft und Unterstützung. Die offene und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre hat mir sehr geholfen und zur Freude an der Arbeit beigetragen.