

**REZEPTOREPITOP-ABHÄNGIGKEIT DER BINDUNG
MUSKARINISCHER ALLOSTERISCHER
MODULATOREN UNTER VERSCHIEDENEN
IONALEN BEDINGUNGEN**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Valérie Straßmann

aus

Rheinbach

Bonn 2007

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

1. Referent: Prof. Dr. med. Klaus Mohr

2. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Bönisch

Tag der mündlichen Prüfung: 23.08.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2003 bis September 2006 in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Institutes der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr angefertigt.

INHALTSVERZEICHNIS

I	Einleitung	1
I.1	Muskarinrezeptoren.....	1
I.2	Allosterische Modulation.....	2
I.3	Therapeutische Perspektiven der allosterischen Modulation.....	5
I.4	Epitopabhängigkeit allosterischer Modulatoren.....	6
I.5	Fragestellung.....	8
II	Material und Methoden	11
II.1	Molekularbiologische Arbeiten.....	11
II.1.1	Zielgerichtete Mutagenese.....	11
II.1.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	11
II.1.1.2	Transformation.....	14
II.1.1.2.1	Herstellung der ampicillinhaltigen Agarplatten.....	15
II.1.1.2.2	Transformation durch Hitzeschock.....	15
II.1.1.2.3	Ausplattieren der transformierten Bakterien.....	16
II.1.1.2.4	Selektion und Vermehrung der transformierten XL1-Blue-Bakterien	16
II.1.2	Plasmid-DNA-Gewinnung.....	17
II.1.2.1	Ansetzen der Übernachtskulturen.....	18
II.1.2.2	Präparation der Plasmid-DNA.....	18
II.1.2.3	DNA-Gehaltsbestimmung.....	19
II.1.2.4	Herstellung von Glycerol-Stocks.....	19
II.1.3	Sequenzierung der Plasmid-DNA.....	20
II.1.4	Untersuchte Rezeptormutanten	20
II.2	Zellbiologische Arbeiten.....	21
II.2.1	Ausfrieren von COS-7-Zellen.....	21
II.2.2	Kultivierung von COS-7-Zellen.....	22
II.2.3	Einfrieren von COS-7-Zellen	22
II.2.4	Transiente Transfektion von COS-7-Zellen.....	23
II.2.4.1	Zählen und Ausplattieren der COS-7-Zellen (Tag 1).....	23
II.2.4.2	Transfektion mit Polyfect® (Tag 2).....	24

II.2.5	Membranpräparation (Tag 4).....	24
II.3	Radioligandbindungsuntersuchungen.....	26
II.3.1	Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen	26
II.3.1.1	Die Vier-Parameter-logistische-Gleichung	29
II.3.1.2	Homologe Konkurrenz	30
II.3.1.3	Allosterische Interaktion.....	31
II.3.2	Kinetische Untersuchungen.....	34
II.3.2.1	Dissoziationsexperimente mit Zweipunkterfassung.....	35
II.3.3	Versuchsdurchführung	39
II.3.3.1	Inkubationsbedingungen	39
II.3.3.2	Filtrationsmethoden	40
II.3.3.3	Homologe Konkurrenz	41
II.3.3.4	Heterologe allosterische Interaktion	43
II.3.3.5	Dissoziationsverlauf	45
II.3.3.6	Zweipunkt-dissoziationsexperimente.....	47
II.3.3.7	Szintillationsmethoden.....	51
II.3.3.8	Berechnung der Konzentration des eingesetzten Radioliganden	52
II.3.3.9	Silanisierung von Probengefäßen	53
II.4	Proteinbestimmung nach Bradford	54
II.5	Statistische Methoden	55
II.6	Strukturformeln verwendeter Substanzen	58
II.6.1	Antagonisten an der orthosterischen Bindungsstelle	58
II.6.1.1	N-Methylscopolamin.....	58
II.6.1.2	Atropin	59
II.6.2	Allosterische Modulatoren	59
II.6.2.1	W84.....	59
II.6.2.2	Gallamin	60
II.6.2.3	Alcuronium	60
II.6.2.4	Diallylcaracurin (CARALL).....	61
II.6.2.5	CARBEM.....	61
II.6.2.6	Naphmethonium (MM3A)	62
II.7	Materialien	63
II.8	Geräte.....	64
II.9	Reagenzien.....	65

II.10	Herstellerverzeichnis	66
II.11	Puffer und Lösungen.....	68
II.12	Computerprogramme.....	71
III	Ergebnisse.....	72
III.1	Charakterisierung der eingesetzten Membransuspensionen.....	72
III.2	Dissoziationsverzögerungsexperimente	79
III.2.1	Bedeutung der Aminosäuren M ₂ ¹⁷⁷ -Tyrosin und M ₂ ⁴²³ -Threonin für die M ₂ /M ₅ -Subtypselektivität.....	79
III.2.1.1	W84.....	79
III.2.1.1.1	5 mM Na, K, P _i -Puffer bei 23°C	80
III.2.1.1.2	3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37 °C.....	81
III.2.1.1.3	10 mM Hepes-Puffer bei 30°C	82
III.2.1.2	Gallamin.....	84
III.2.1.2.1	5 mM Na, K, P _i -Puffer bei 23°C	84
III.2.1.2.2	3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37 °C.....	85
III.2.1.2.3	3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 23 °C – Einfluss von Temperaturänderungen auf die Epitopabhängigkeit	86
III.2.1.2.4	10 mM Hepes-Puffer mit GDP bei 30°C	89
III.2.1.3	Alcuronium.....	91
III.2.1.3.1	5 mM Na, K, P _i -Puffer bei 23°C	91
III.2.1.3.2	3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C.....	93
III.2.1.3.3	10 mM Hepes-Puffer bei 30°C	94
III.2.1.3.4	Bedeutung der Aminosäuren M ₂ ⁴²³ -Threonin und M ₂ ⁴²³ -Histidin, bzw. M ₅ ⁴⁷⁸ -Histidin im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C	96
III.2.1.4	Diallylcaracurin V	99
III.2.1.4.1	5 mM Na, K, P _i -Puffer bei 23°C	100
III.2.1.4.2	10 mM Hepes-Puffer bei 30°C	101
III.2.1.5	CARBEM.....	103
III.2.1.5.1	5 mM Na, K, P _i -Puffer bei 23°C	103
III.2.1.5.2	10 mM Hepes-Puffer bei 30°C	105
III.2.2	Bedeutung der Aminosäure M ₂ ¹⁷⁵ -Glutamat für die Affinität des Modulators W84	107

III.2.3	Bedeutung der Aminosäuren M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan für die Affinität allosterischer Modulatoren	110
III.2.3.1	W84 im 10 mM Hepes-Puffer	110
III.2.3.2	Gallamin im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C.....	112
III.2.3.3	Alcuronium im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C.....	115
III.2.3.4	Alcuronium im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C.....	117
III.2.4	Bedeutung der Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{422} Tryptophan für die Affinität von Naphmethonium (MM3A) im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C	119
III.2.5	Magnesium-Ionen als allosterische Modulatoren an NMS-besetzten Rezeptoren – Epitopabhängigkeit im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C	121
III.3	Gleichgewichtsbindungsexperimente	124
III.3.1	Bedeutung der Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin für die M_2/M_5 -Subtypselektivität allosterischer Modulatoren	125
III.3.1.1	W84	125
III.3.1.1.1	5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C	125
III.3.1.1.2	3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C	127
III.3.1.1.3	10 mM Hepes-Puffer bei 30°C.....	129
III.3.1.2	Gallamin.....	131
III.3.1.2.1	5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C	131
III.3.1.2.2	3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37 °C	133
III.3.1.2.3	10 mM Hepes-Puffer bei 30°C.....	134
III.3.1.3	Alcuronium.....	136
III.3.1.3.1	5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C	137
III.3.1.3.2	3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37 °C	140
III.3.1.3.3	10 mM Hepes-Puffer bei 30°C.....	142
III.3.1.3.4	Austausch der Aminosäuren M_2^{423} Threonin und M_5^{478} Histidin durch Alanin im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C	144
III.3.2	Bedeutung der Epitope M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan für die Affinität allosterischer Modulatoren	147
III.3.2.1	W84 im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C.....	147
III.3.2.2	Gallamin im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C.....	150
III.3.2.3	Alcuronium.....	154
III.3.2.3.1	5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C	154
III.3.2.3.2	10 mM Hepes-Puffer bei 30°C.....	157

IV Diskussion.....	159
IV.1 Bindungsverhalten von [³ H]N-Methylscopolamin unter verschiedenen Inkubationsbedingungen	159
IV.2 Einfluss der Temperatur auf die Epitopabhängigkeit	166
IV.3 Vergleich der Epitopabhängigkeit unter verschiedenen Inkubationsbedingungen	169
IV.3.1 W84.....	169
IV.3.1.1 Epitopabhängigkeit am besetzten Rezeptor	170
IV.3.1.2 Epitopabhängigkeit am unbesetzten Rezeptor.....	174
IV.3.2 Gallamin.....	177
IV.3.2.1 Epitopabhängigkeit am NMS-besetzten Rezeptor.....	178
IV.3.2.2 Epitopabhängigkeit am unbesetzten Rezeptor.....	181
IV.3.3 Alcuronium.....	184
IV.3.3.1 Epitopabhängigkeit am NMS-besetzten Rezeptor.....	185
IV.3.3.2 Epitopabhängigkeit am unbesetzten Rezeptor.....	189
IV.3.4 Diallylcaracurin V	192
IV.3.5 CARBEM.....	195
IV.4 Einfluss der Inkubationsbedingungen auf die Kooperativität allosterischer Modulatoren	197
IV.4.1 W84.....	199
IV.4.2 Gallamin.....	202
IV.4.3 Alcuronium.....	204
IV.5 Epitopabhängigkeit der positiven Kooperativität von Alcuronium.....	208
V Zusammenfassung.....	211
VI Anhang.....	214
VI.1 Einfluss der Inkubationszeit auf die Bindungseigenschaften der Membransuspension.....	214
VI.2 Vorversuche.....	216
VI.2.1 Einfluss von W84 auf die [³ H]NMS-Gleichgewichtsbindung an M ₂ -Rezeptoren im Mg-Tris-Puffer bei 37°C am Brandel-Harvester und am Tomtec Harvester.....	216

VI.2.2	Untersuchung des Einflusses der Silanisierung von Polypropylengefäßen auf die Wirksamkeit der Substanzen Alcuronium, CARBEM und CARALL in Dissoziationsverzögerungsversuchen	218
VI.3	Tabellarische Zusammenfassung der Bindungsparameter der untersuchten allosterischen Modulatoren	223
VI.3.1	W84	224
VI.3.2	Gallamin.....	226
VI.3.3	Alcuronium.....	228
VI.3.4	Diallylcaracurin V	230
VI.3.5	CARBEM	230
VI.3.6	Naphmethonium (MM3A).....	231
VI.4	Charakteristika der durchgeführten heterologen Interaktionsexperimente	232
VII	Literaturverzeichnis.....	234
VIII	Veröffentlichungen.....	240

I EINLEITUNG

I.1 MUSKARINREZEPTOREN

Im menschlichen Körper dienen membranständige Rezeptoren der Übertragung von extrazellulären Signalen in das Zellinnere. Neben Ionenkanälen und Tyrosinkinase-Rezeptoren gehören dazu insbesondere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bestehen typischerweise aus einem Proteinfaden, der sich mehrmals durch die Membran windet und dabei sieben transmembranäre hydrophobe Domänen bildet, die eine α -helikale Struktur aufweisen (Caulfield und Birdsall, 1998; Jensen und Spalding, 2004). Der Name dieser Rezeptoren leitet sich von ihrer Fähigkeit ab, mit heterotrimeren G-Proteinen zu assoziieren und dadurch auf die Bildung von intrazellulären Botenstoffen ("second messenger") oder die Funktion von Ionenkanälen Einfluss zu nehmen. Die größte Unterfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren stellt die Familie A dar, zu der auch der Photorezeptor Rhodopsin gehört. Muskarinrezeptoren werden dieser Familie A der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zugeordnet und werden durch den endogenen Agonisten Acetylcholin aktiviert. Acetylcholin übernimmt im menschlichen Körper wichtige Funktionen als Überträgerstoff im zentralen Nervensystem, im autonomen (vegetativen) Nervensystem und im Gehirn, es wird auch aus nichtneuronalen Quellen freigesetzt (Eglen, 2006). Es gibt Hinweise darauf, dass Acetylcholin auch extraneuronale Wirksamkeit haben könnte (Kawashima et al., 1998). Acetylcholin kann seine Wirkung sowohl über muskarinische Acetylcholinrezeptoren als auch über nicotinische Acetylcholinrezeptoren entfalten, letztere stellen Ionenkanäle dar.

Man unterscheidet zur Zeit fünf verschiedene Subtypen von Muskarinrezeptoren, die als M_1 - M_5 bezeichnet werden und durch fünf verschiedene intronlose Gene codiert werden (Kubo et al., 1986; Bonner et al., 1987, 1988; Peralta et al., 1988). Es wird angenommen, dass die Bindungsstelle für den endogenen Agonisten Acetylcholin durch die transmembranären Domänen gebildet wird. In Mutagenese-Studien konnten Aminosäuren identifiziert werden, die für die Bindung von Acetylcholin verantwortlich sind und in allen 5 Subtypen des Rezeptors konserviert vorliegen (Hulme et al., 1990; Wess, 1993). Die einzelnen Rezeptorproteine der Subtypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Verteilung im Gewebe, der G-Protein-Kopplung und somit der nachgeschalteten Signaltransduktionswege und der vermittelten Effekte (Caulfield und Birdsall, 1998; Krejčí et al., 2004). Die Subtypen M_1 , M_3 und M_5 koppeln bevorzugt an G-Proteine des Types $G_{q/11}$, was zu einer Aktivierung der Phospholipase C und somit zur Produktion der Botenstoffe Diacylglycerol und Inositoltriphosphat führt. Die geradzahlig nummerierten Subtypen M_2 und M_4 neigen zur Kopplung an G-Proteine des Types $G_{i/o}$, die

folgende Aktivierung des Enzymes Adenylatcyclase führt zu einer Verminderung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Der nach Aktivierung dieser G-Protein-Subtypen freigesetzte Komplex von β/γ -Untereinheiten ist in der Lage, die Funktion von Kalium- und Calciumkanälen zu beeinflussen. Während die Öffnung von Kalium-Kanälen vor allem am Herzen zu beobachten ist, wird die Hemmung von Calcium-Kanälen für eine Autoinhibition der Acetylcholinfreisetzung durch präsynaptische Muskarinrezeptoren verantwortlich gemacht (Molenaar und Polak, 1980). Die unterschiedliche Gewebeverteilung der einzelnen Muskarinrezeptorsubtypen wurde unter anderem durch Quantifizierung von mRNA und durch Immunoassays näher geklärt (Dörje et al., 1991; Krejčí und Tuček, 2002). Muskarinrezeptoren vom Subtyp M_1 werden vor allem in Regionen des Vorderhirns, darunter im zerebralen Cortex, im Hippocampus sowie im Striatum exprimiert (Eglen, 2005). M_2 -Rezeptoren finden sich sowohl im zentralen wie auch im peripheren Nervensystem, vor allem im Herzen aber auch in glatter Muskulatur. M_3 -Rezeptoren befinden sich in glatter Muskulatur, in sekretorischen Drüsen und im Gehirn (Caulfield und Birdsall, 1998). Muskarinrezeptoren des Subtypes M_4 sind vorwiegend im basalen Vorderhirn und im Striatum lokalisiert, während sich M_5 -Rezeptoren im Gehirn in der Substantia nigra und in peripheren Geweben finden (Eglen, 2005).

Jedoch ist anzumerken, dass in den meisten Gewebetypen mehrere Subtypen von Muskarinrezeptoren nebeneinander vorliegen und die physiologische Antwort eines Gewebes auf den Neurotransmitter Acetylcholin eine Summe der Effekte der einzelnen Rezeptoren darstellt (Eglen, 2005).

I.2 ALLOSTERISCHE MODULATION

Die Stelle eines Rezeptors, an die ein endogener Agonist bindet, wird als orthosterische Bindungsstelle (aus dem Griechischen abgeleitet von *orthós* = recht und *stereós* = räumlich) bezeichnet (Neubig et al., 2003; Christopoulos et al., 2004). Neben dieser orthosterischen Bindungsstelle kann ein Rezeptor weitere Bindungsstellen besitzen, die sich räumlich von der orthosterischen Bindungsstelle unterscheiden. Diese werden als allosterische Bindungsstelle(n) (*allos*, griechisch = anders, verschieden) bezeichnet. An einen Rezeptor können somit gleichzeitig orthosterische und allosterische Liganden binden. Über die Bindung von Liganden an die allosterische Bindungsstelle ist es möglich, die Konformation eines Rezeptors zu verändern. Bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kann dies dazu führen, dass die Bindungseigenschaften des orthosterischen Liganden verändert werden und/oder die Signalübertragung in Anwesenheit oder Abwesenheit des orthosterischen Liganden modifiziert wird (Christopoulos et al., 2004). Allosterische Modulatoren an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren können demnach unter drei Gesichtspunkten betrachtet werden (Langmead und Christopoulos, 2006). Zunächst ist es

möglich, dass ein allosterischer Ligand lediglich die Bindungsaffinität des orthosterischen Liganden beeinflusst. Zweitens kann er die intrinsische Aktivität eines orthosterischen Liganden modulieren. Zum dritten ist zu berücksichtigen, welchen Effekt der allosterische Modulator selbst auf die Rezeptoraktivität ausübt.

Das einfachste Modell der allosterischen Interaktion betrachtet lediglich den Effekt, den ein allosterischer Modulator auf die Bindung eines orthosterischen Liganden hat. Diese Art der Interaktion lässt sich besonders mit Radioligandbindungsstudien untersuchen und wird durch das Modell der ternären allosterischen Interaktion beschrieben (Ehlert, 1988). Der Begriff der Kooperativität beschreibt in diesem Modell Ausmaß und Richtung des Effektes, den die Bindung eines allosterischen Modulators auf die Affinität des orthosterischen Liganden ausübt. Die Beziehung zwischen allosterischem und orthosterischem Liganden ist dabei reziprok, das heißt, dass die Affinität des allosterischen Modulators durch Bindung eines orthosterischen Liganden genauso beeinflusst werden kann wie die Affinität des orthosterischen Liganden durch den allosterischen Modulator (Lazareno und Birdsall, 2005). Ist ein allosterischer Modulator in der Lage, die Bindung des orthosterischen Liganden zu erhöhen, wird dies als positive Kooperativität bezeichnet, erniedrigt ein allosterischer Modulator die Bindung des orthosterischen Liganden, so spricht man von negativer Kooperativität. Lässt der allosterische Modulator die Bindung des orthosterischen Liganden unbeeinflusst, handelt es sich um neutrale Kooperativität. Zur Detektion der Effekte eines allosterischen Modulators auf die Bindung eines orthosterischen Liganden können Radioligandbindungsstudien dienen. Ein klarer Indikator für das Vorhandensein einer allosterischen Interaktion ist dabei eine Veränderung der Dissoziationsgeschwindigkeit des orthosterischen Liganden vom Rezeptor durch den allosterischen Modulator in kinetischen Experimenten, denn dies ist Ausdruck der Bildung sogenannter ternärer Komplexe. Im ternären Komplex binden allosterischer und orthosterischer Ligand gleichzeitig an den Rezeptor.

Erste Hinweise auf eine allosterische Wirksamkeit von Hexamethonium-Derivaten und Gallamin (Strukturformeln siehe unter II.6) an Muskarinrezeptoren ergaben sich in Organbadstudien am Herzen und am Ileum (Lüllmann et al., 1969; Clark und Mitchelson, 1976), in denen durch die allosterischen Modulatoren eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven muskarinischer Agonisten beobachtet wurde, die jedoch sättigbar war. Somit war diese Beobachtung nicht mit dem Verhalten kompetitiver Antagonisten erklärbar, die in diesem Fall eine nicht sättigbare Kurvenverschiebung hervorgerufen hätten. Mittlerweile ist bekannt, dass alle fünf Subtypen des Muskarinrezeptors allosterisch modulierbar sind (Ellis et al., 1991; Lazareno und Birdsall, 2005). Im Bindungsareal des orthosterischen Liganden Acetylcholin besitzen alle Subtypen eine hohe Sequenzhomologie, was die Entwicklung subtypelektiver Liganden der

orthosterischen Bindungsstelle am Muskarinrezeptor erschwert (Hulme et al., 1990; Caulfield und Birdsall, 1998; Jensen und Spalding, 2004). Allosterische Liganden können ihre Wirksamkeit über weniger konservierte Bindungsstellen entfalten und bieten somit die Möglichkeit subtypselektiver Modulation. So weisen zum Beispiel die allosterischen Liganden Gallamin, das Hexamethonium-Derivat W84 oder Alcuronium eine im Vergleich zu den anderen Subtypen erhöhte Affinität am M_2 -Rezeptor auf. Neben der Affinität kann auch das kooperative Verhalten allosterischer Modulatoren abhängig vom jeweiligen Muskarinrezeptorsubtyp differieren. W84 und Gallamin verhalten sich an allen fünf Subtypen des Muskarinrezeptors negativ kooperativ mit dem Antagonisten N-Methylscopolamin (NMS), wohingegen Alcuronium die Gleichgewichtsbindung von NMS an Muskarinrezeptoren vom Subtyp M_2 und M_4 erhöht und sie an den Subtypen M_1 , M_3 und M_5 erniedrigt (Tuček et al., 1990; Jakubík et al., 1995). Das kooperative Verhalten eines allosterischen Modulators ist auch abhängig von der Natur des orthosterischen Liganden. Zeigt Alcuronium mit NMS an einigen Subtypen noch positive Kooperativität, so verhält es sich mit dem endogenen Agonisten Acetylcholin an den Subtypen M_1 - M_5 des Muskarinrezeptors negativ kooperativ (Jakubík et al., 1997; Mohr et al., 2003). Das Alkaloid Brucin hingegen ist in der Lage, an Muskarinrezeptoren vom Subtyp M_1 die Bindung von Acetylcholin zu erhöhen (Jakubík et al., 1997; Lazareno und Birdsall, 1998).

Das Konzept, absolute Subtypselektivität durch allosterische Modulation zu erreichen, geht davon aus, dass ein allosterischer Modulator an einem bestimmten Rezeptorsubtyp die Bindung oder Wirkung des orthosterischen Liganden beeinflusst, während er an den anderen Subtypen keinen Einfluss auf die Wirkung dieses Liganden zeigt, sich also dort neutral kooperativ verhält. Ein Beispiel für dieses Verhalten ist der allosterische Modulator Thiochrom, das in der Lage ist, die Bindung von Acetylcholin an Rezeptoren vom Subtyp M_4 zu erhöhen, während es sich an den an den Subtypen M_1 , M_2 und M_3 nahezu neutral kooperativ verhält (Lazareno et al., 2004).

Innerhalb der allosterischen Bindungsstelle scheinen verschiedene Modulatoren unterschiedliche Haftareale ausnutzen zu können (Tränkle et al., 2005). Für das Haftareal innerhalb der allosterischen Bindungsstelle, das von Liganden wie Alcuronium, Gallamin und W84 genutzt wird, findet sich auch der Begriff der „common allosteric site“. Während sich die orthosterische Bindungsstelle für Acetylcholin im Bereich der transmembranären Domänen befindet (Caulfield und Birdsall, 1998; Hulme et al., 2003), liegt der Bereich der „common allosteric site“ extrazellulär am Bereich des Eingangs der Bindungstasche für Acetylcholin (Ellis et al., 1993; Leppik et al., 1994; Matsui et al., 1995; Gnagey et al., 1999; Buller et al., 2002; Voigtländer et al., 2003; Prilla et al., 2006).

I.3 THERAPEUTISCHE PERSPEKTIVEN DER ALLOSTERISCHEN MODULATION

Aktuell befinden sich schon verschiedene Arzneistoffe in therapeutischer Anwendung, die ihre Hauptwirkung über die allosterische Modulation von Rezeptoren entfalten. Als bekanntestes Beispiel sind hier die Benzodiazepine zu erwähnen, die ihre Wirkung über die allosterische Beeinflussung des GABA_A-Rezeptors, einem Ligand-gesteuerten Ionenkanal, vermitteln. Ebenso vermitteln Barbiturate und andere Narkotika ihre Wirkung über allosterische Interaktion mit dem GABA_A-Rezeptor. Benzodiazepine erhöhen die Wirksamkeit des inhibitorischen Neurotransmitters GABA an diesem Rezeptor, wodurch die Aktivität inhibitorischer Neurone im ZNS verstärkt wird (Sieghart, 1992).

Als allosterischer Modulator eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors wurde im Jahr 2004 der Arzneistoff Cinacalcet in Deutschland zugelassen, der allosterisch die Wirksamkeit von Calcium-Ionen am Ca²⁺-sensitiven Rezeptor der Nebenschilddrüse verstärkt (Block et al., 2004; Peacock et al., 2005). Über diese sogenannte "calcimimetische" Wirkung vermindert Cinacalcet die Freisetzung von Parathormon, wodurch sich die therapeutischen Anwendungsgebiete bei verschiedenen Formen des Hyperparathyreoidismus ergeben.

Allosterische Modulatoren sind in der Lage, die Aktivität eines Rezeptors über Konformationsänderungen des Rezeptorproteins zu beeinflussen und besitzen gegenüber Wirkprinzipien, die auf dem Einsatz orthosterischer Liganden beruhen, mehrere Vorteile. Der Effekt eines allosterischen Modulators auf die Wirksamkeit eines orthosterischen Liganden ist typischerweise sättigbar, wodurch sich eine größere Sicherheit bei der therapeutischen Anwendung ergibt, da eine Überdosierung nicht zu einer erhöhten Rezeptorantwort führt. Die hohe therapeutische Breite der Benzodiazepine ist ein Beispiel für diesen Vorteil (Christopoulos, 2002). Des Weiteren entfalten allosterische Modulatoren, die die Wirksamkeit eines endogenen orthosterischen Liganden beeinflussen, ihren Effekt im Gegensatz zu orthosterischen Agonisten nur in Anwesenheit des natürlicherweise ausgeschütteten endogenen Neurotransmitters, wodurch eine physiologische Signalübertragung erhalten bleibt. Ein weiterer Vorteil ist, dass allosterische Modulatoren ein höheres Potential für Subtypselektivität beinhalten, da sie ihre Wirkung nicht über die Bindungsstelle des endogenen orthosterischen Liganden entfalten, die meist in allen Rezeptorsubtypen mit hohem Konservierungsgrad vorliegt. So ist es bisher nicht gelungen, einen deutlich subtypselektiven orthosterischen Liganden an Muskarinrezeptoren zu entwickeln. Die z.B. sich in Deutschland auf dem Markt befindenden Arzneistoffe Darifenacin und Solifenacin werden zwar also M₃-selektiv bezeichnet, jedoch handelt es sich dabei um eine konzentrationsabhängige, relativ schwach ausgeprägte Präferenz für

diesen Subtyp. Allosterische Modulatoren sind in der Lage, ebenfalls eine solche "relative" Subtypselektivität aufzuweisen, können aber auch, indem sie sich an nur einem Rezeptorsubtyp positiv oder negativ kooperativ verhalten und gleichzeitig an den anderen Rezeptorsubtypen neutrale Kooperativität aufweisen, zu einer sogenannten "absoluten" Subtypselektivität führen (Lazareno und Birdsall, 2005).

I.4 EPITOPABHÄNGIGKEIT ALLOSTERISCHER MODULATOREN

Um den Bereich des Muskarinrezeptors zu identifizieren, mit dem allosterische Liganden interagieren, können Mutagenese-Studien durchgeführt werden, in denen entweder innerhalb der Subtypen konservierte Aminosäuren ausgetauscht werden oder aber solche Aminosäuren ausgetauscht werden, die sich unter den verschiedenen Subtypen unterscheiden, um für die Subtypselektivität relevante Bindungsepitope zu entdecken (Lee et al., 1992; Matsui et al., 1995; Prilla et al., 2006). Viele allosterische Modulatoren weisen zum Subtyp M_2 die höchste Affinität und zum Subtyp M_5 die niedrigste Affinität auf (Ellis et al., 1991; Jakubík et al., 1995; Holzgrabe und Mohr, 1998; Ellis und Seidenberg, 2000). Um herauszufinden, welche Aminosäuren für die M_2/M_5 -Subtypselektivität verantwortlich sind, werden häufig chimäre Rezeptoren verwendet, in denen größere Teile des M_2 -Subtypes in den M_5 -Subtyp eingebracht wurden, um Bindungsbereiche abzugrenzen und dann nach Identifizierung bindungsrelevanter Bereiche durch gezielte Mutation einzelner Aminosäuren für die Bindung wichtige Epitope zu entdecken (Ellis et al., 1993; Leppik et al., 1994; Gnagey et al., 1999; Voigtländer et al., 2003). Mittlerweile ist es gelungen, Epitope zu bestimmen, die für die Subtypselektivität verschiedener allosterischer Modulatoren verantwortlich sind. Die beiden Epitope M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin besitzen unter anderem eine Bedeutung für die M_2/M_5 -Subtypselektivität der Modulatoren W84 und Gallamin an der „common allosteric site“ von Muskarinrezeptoren (Buller et al., 2002; Voigtländer et al., 2003). In Studien mit mutierten Rezeptorproteinen, in denen einzelne Aminosäuren des M_2 -Subtypes in die korrespondierenden Aminosäuren des M_5 -Subtypes mutiert wurden, konnten durch den Austausch der Aminosäure M_2^{423} Threonin zur korrespondierenden Aminosäure Histidin (Buller et al., 2002) sowie den Austausch der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin zur korrespondierenden Aminosäure Glutamin (Voigtländer et al., 2003) die Affinitäten der untersuchten allosterischen Modulatoren zu NMS-besetzten Rezeptoren im Vergleich zum M_2 -Wildtyp auf M_5 -Niveau gesenkt werden. Für die Substanzen W84 und Diallylcaracurin ließ sich eine vollständige Abhängigkeit der M_2/M_5 -Subtypselektivität am NMS-besetzten Rezeptor von diesen beiden Aminosäuren belegen, an der M_2/M_5 -Subtypselektivität des Modulators Gallamin scheinen hingegen noch weitere Epitope beteiligt zu sein (Voigtländer, Dissertationsschrift 2003). Weitere Befunde zur Relevanz dieser beiden Aminosäuren, die

während der Anfertigung dieser Arbeit erhoben wurden, zeigen, dass der für W84 beobachtete Affinitätsabfall an der Mutante M_2^{423} Threonin→Histidin im NMS-besetzten Zustand auf einen störenden Einfluss der eingeführten Aminosäure Histidin zurückzuführen ist (Prilla et al., 2006). Für Diallylcaracurin V hingegen konnte dieser störende Effekt des Histidins nicht beobachtet werden, hier scheint die Bindung des Modulators am NMS-besetzten Rezeptor auf eine direkte Interaktion mit der Aminosäure Threonin zurückzuführen zu sein (Prilla et al., 2006). Neben Epitopen, die für die M_2/M_5 -Subtypselektivität eine Rolle spielen, konnten weitere konservierte Aminosäuren identifiziert werden, die für die Bindung allosterischer Modulatoren bedeutsam sind. Konservierte Aminosäuren tragen im Allgemeinen nicht zur M_2/M_5 -Subtypselektivität der Modulatoren bei, sondern vermitteln "Basisaffinität" der Modulatoren zu Muskarinrezeptoren. Die Aminosäure M_2^{422} Tryptophan spielt an NMS-besetzten Rezeptoren eine wichtige Rolle für die Basisaffinität von W84 und Gallamin (Prilla et al., 2006). Die Aminosäure M_2^{427} Tryptophan leistet kaum einen Beitrag zur Affinität von W84 oder Gallamin, scheint hingegen jedoch für das kooperative Verhalten von W84 mit NMS bedeutsam zu sein (Prilla et al., 2006). Die Aminosäure M_2^{175} Glutamat gehört zu der von Leppik et al. (1994) erwähnten EDGE-Sequenz mehrerer saurer Aminosäuren innerhalb der zweiten extrazellulären Schleife, die als potentieller Bindungspartner für die Interaktion von Magnesium-Ionen mit dem M_2 -Rezeptor postuliert wurde (Burgmer et al., 1998). Raasch (Dissertationsschrift 2003) fand eine geringe Abhängigkeit der Wirksamkeit von W84 am NMS-besetzten M_2 -Rezeptor von der Aminosäure M_2^{175} Glutamat. Abbildung 1 zeigt die Lage der oben erwähnten Aminosäuren im M_2 -Rezeptor.

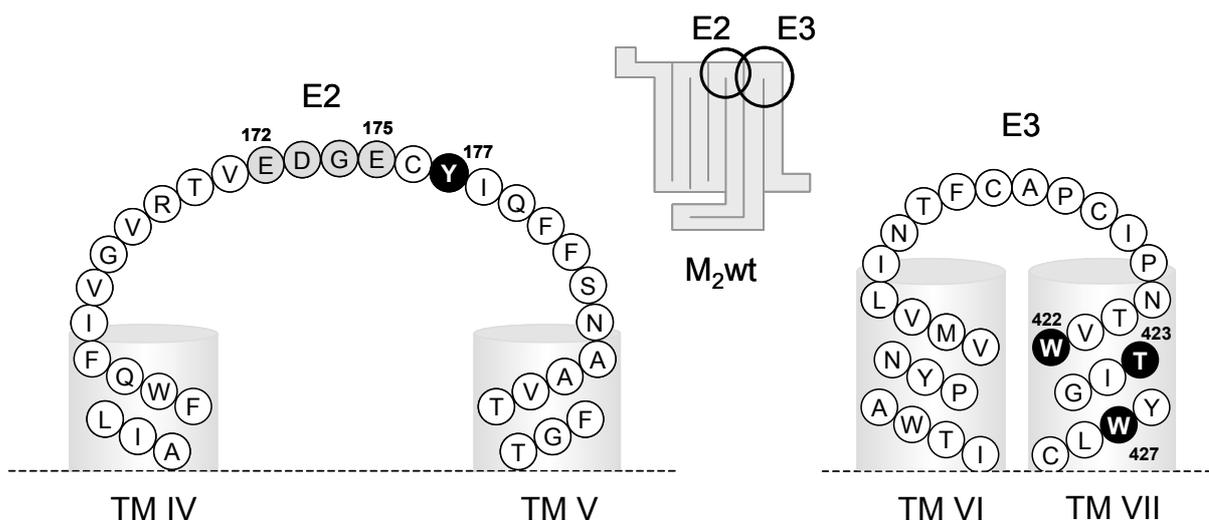


Abbildung 1: Schematische Darstellung der zweiten und dritten extrazellulären Schleife (E2, E3) des M_2 -Rezeptors mit den sich anschließenden α -helikalen Bereichen, die in dieser Abbildung als transmembranäre Domänen (TM IV – VII) bezeichnet werden, modifiziert nach Prilla et al. (2006). Einige für die Epitopabhängigkeit allosterischer Modulatoren relevante Aminosäuren sind dunkel hinterlegt.

Wichtige Erkenntnisse über die Struktur des Muskarinrezeptors ergaben sich durch die Aufklärung der Röntgenkristallstruktur des inaktiven bovinen Rhodopsins (Palczweski et al., 2000). Ausgehend von dieser Struktur konnte ein dreidimensionales Rezeptormodell entwickelt werden (Jöhren und Höltje, 2002), das mittlerweile auf Grund neuerer Daten zur Struktur des Rhodopsins überarbeitet wurde (Okada et al., 2004; Prilla et al., 2006). Nach diesem Modell wird davon ausgegangen, dass sich der Modulator W84 mit seiner Phthalimidgruppe zwischen den aromatischen Strukturen von M_2^{177} -Tyrosin und M_2^{422} -Tryptophan anlagert.

I.5 FRAGESTELLUNG

Die bisherigen Untersuchungen zur Epitopabhängigkeit allosterischer Modulatoren an Muskarinrezeptoren wurden in einem 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C durchgeführt. Unter diesen sehr artifiziellen Inkubationsbedingungen ist die Affinität allosterischer Modulatoren zu Muskarinrezeptoren maximal, so dass auch Fragestellungen nachgegangen werden kann, die Rezeptorsubtypen betreffen, zu denen die Modulatoren geringere Affinität haben, wie z.B. dem M_5 -Rezeptor. Eine Änderung der Inkubationsbedingungen bei Radioligandbindungsstudien führt zu Affinitätsverschiebungen allosterischer Modulatoren. Unter Pufferbedingungen, die dem physiologischen Milieu ähnlicher sind, ist die Affinität allosterischer Modulatoren geringer als im 5 mM Na, K, P_i -Puffer. Tränkle et al. (1996) konnten zeigen, dass allosterische Modulatoren unterschiedlicher Struktur beim Wechsel der Inkubationsbedingungen in verschiedenem Ausmaß von Wirksamkeitsverschiebungen betroffen sind. Beim Wechsel der Inkubationsbedingungen von einem 5 mM Na, K, P_i -Puffer zu einem 3/50 mM Mg-Tris-Puffer zeigt der Modulator Gallamin mit einem Affinitätsabfall um das 90-fache sehr starke Wirksamkeitsverschiebungen, der Modulator W84 mit 50-facher Wirksamkeitsabnahme mittelstarke Verschiebungen, während der Modulator Alcuronium mit 14-fachem Affinitätsabfall in seiner Wirksamkeit am M_2 -Rezeptor nur wenig von den eingesetzten Inkubationspuffern abhängt.

Durch Änderungen des Inkubationsmediums induzierte Wirksamkeitsverschiebungen allosterischer Modulatoren zeigen keine direkte Abhängigkeit von der Ionenstärke des verwendeten Puffermilieus (Burgmer et al., 1998). Hingegen ist ein ausgeprägter Einfluss von Magnesium auf die Wirksamkeit allosterischer Modulatoren feststellbar, der deutlich größer ist als durch den alleinigen Anstieg der Ionenstärke bei Magnesiumzusatz zum Inkubationspuffer zu erwarten gewesen wäre (Burgmer et al., 1998). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass Magnesium in der Lage ist, die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit allosterischer Modulatoren zu antagonisieren. Dies konnte unter anderem für den in dieser Arbeit untersuchten Modulator

W84 gezeigt werden (Burgmer et al., 1998). Es wurde daraufhin postuliert, dass sich Magnesium im Bereich der Bindungsstelle allosterischer Modulatoren anlagern könnte.

Inkubationsbedingungen können nach Befunden von Dong et al. (1995) auch einen Einfluss auf das kooperative Verhalten allosterischer Modulatoren in Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen haben, das positiv kooperative Verhalten von Alcuronium mit N-Methylscopolamin ist nach diesen Befunden von den dem Inkubationsmedium zugefügten Kationen abhängig. Die fördernde Wirksamkeit von Alcuronium auf die Bindung von NMS an M_2 -Rezeptoren ließ sich in von Dong et al. (1995) durchgeführten Experimenten nur in Anwesenheit von 100 mM NaCl oder 5 mM $CaCl_2$ beobachten, nicht jedoch im als Kontrolle dienenden 10 mM Hepes-Puffer.

Welche Auswirkungen ein Wechsel der Inkubationsbedingungen auf die Epitopabhängigkeit allosterischer Modulatoren hat, war bisher noch nicht bekannt, ebenso war unklar, ob die bisher unter artifiziellen Bedingungen identifizierten Epitope unter physiologischeren Bedingungen überhaupt noch bindungsrelevant sind. Dem starken Wirksamkeitsverlust allosterischer Modulatoren beim Wechsel der Inkubationsbedingungen könnte ebenfalls ein Wechsel der genutzten Epitope zu Grunde liegen. Da verschiedene Substanzen unterschiedlichen Wirksamkeitsverschiebungen unterliegen, ist es möglich, dass sich die Art der Interaktion der Modulatoren mit dem Rezeptor unter variierten Inkubationsbedingungen ebenfalls ändert.

Zur Interpretation der im 5 mM Na, K, P_i -Puffer ermittelten Ergebnisse zur Epitopabhängigkeit allosterischer Modulatoren war es wichtig, zu beurteilen, ob die bereits identifizierten Bindungsstellen unter veränderten „physiologischeren“ Inkubationsbedingungen überhaupt noch existent sind und welche Bedeutung sie dort haben. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Epitopabhängigkeit allosterischer Modulatoren unter weiteren Inkubationsbedingungen untersucht werden. Dafür wurden Inkubationspuffer ausgewählt, die höhere Ionenkonzentrationen enthalten und neben dem 5 mM Na, K, P_i -Puffer häufig für Radioligandbindungsversuche verwendet werden. Die Epitopabhängigkeit sollte unter den Bedingungen eines 3/50 mM Mg-Tris-Puffers bei 37°C und eines 10 mM Hepes-Puffers mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C überprüft werden. Diese beiden Inkubationspuffer zeichnen sich gegenüber dem 5 mM Na, K, P_i -Puffer unter anderem dadurch aus, dass die unter diesen Bedingungen in Radioligandbindungsstudien erhobenen Befunde Ergebnissen aus Organbadversuchen gleichen (Lazareno und Birdsall, 2005). Beide Inkubationspuffer enthalten das zweiwertige Kation Magnesium (im Mg-Tris-Puffer in 3 mM, im Hepes-Puffer in 10 mM Konzentration).

Die Hauptfragestellung dieser Arbeit lag darin, zu beurteilen, ob die bisher unter artifiziellen Inkubationsbedingungen identifizierten Aminosäuren unter physiologischeren Inkubationsbedingungen weiterhin bindungsrelevant sind.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung sollte die Epitopabhängigkeit von Modulatoren untersucht werden, die jeweils eine hohe (Gallamin), eine mittlere (W84) und eine niedrige (Alcuronium) Pufferabhängigkeit ihrer Wirksamkeit an M_2 -Rezeptoren zeigen. Die Epitopabhängigkeit dieser Modulatoren wurde sowohl am NMS-besetzten Rezeptor, als auch am unbesetzten Rezeptor untersucht. Zunächst wurden die Bedeutung der Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin für Affinität und Subtypselektivität der Modulatoren untersucht. Ebenso wurde der Einfluss der Inkubationsbedingungen auf die Kooperativität allosterischer Modulatoren überprüft.

Neben für die M_2/M_5 -Subtypselektivität relevanten Epitopen wurde die Bedeutung weiterer für die Basisaffinität allosterischer Modulatoren verantwortlicher Aminosäuren untersucht. Die Untersuchungen bezogen sich hierbei auf die Aminosäuren M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan.

II MATERIAL UND METHODEN

II.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Rezeptorproteine wurden durch die Expression von Plasmidvektoren, die die entsprechenden Rezeptorgene enthielten, in COS-7-Zellen (CV-1 origin SV40, siehe Kapitel II.2) gewonnen. Die dafür verwendeten pcD-Plasmide (Okayama und Berg, 1983) enthielten die entsprechende cDNA für die untersuchten Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren, ein Gen für Ampicillin-Resistenz und den Replikationsursprung des Affenvirus SV40. Das Einbringen der cDNA des humanen M₂- und M₅-Rezeptors (Hm2pCD, Hm5pCDp1) in die pcD-Plasmide wurde von Bonner et al. (1987, 1988) beschrieben. Die pcD-Plasmidvektoren, die die humanen M₂- und M₅-Rezeptoren enthielten, wurden dankenswerterweise von Prof. Dr. John Ellis, Penn State University, Hershey PA, USA zur Verfügung gestellt. Ausgehend von diesen Vektoren wurden durch zielgerichtete Mutagenese (siehe II.1.1) Plasmide gewonnen, die punktmutierte Muskarinrezeptorgene enthalten.

II.1.1 Zielgerichtete Mutagenese

Zum Einführen einer gezielten Mutation in das jeweilige Rezeptorgen der Plasmidvektoren wurde ein Verfahren gewählt, das auf dem Einsatz von Primern, die die gewünschte Mutation als veränderte Basensequenz enthalten, in einer Polymerasekettenreaktion (PCR: Polymerase chain reaction, siehe II.1.1.1) beruht. Die dadurch erhaltenen mutierten Plasmidvektoren wurden im Anschluß in kompetente Zellen transformiert (siehe II.1.1.2). PCR und Transformation wurden mit Hilfe des „QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene (M 32) gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Durch Plasmid-DNA-Gewinnung (siehe II.1.2) erfolgte die Amplifikation der mutierten DNA.

II.1.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur enzymatischen Vervielfältigung von DNA. Dabei wird doppelsträngig vorliegende DNA durch Erhitzen denaturiert, wobei sie sich in zwei Einzelstränge auf trennt. Nach Absenken der Temperatur auf die sogenannte „Hybridisierungstemperatur“ können an diese einzelnen Stränge der DNA-Matrize dazu komplementäre Oligonucleotide (Primer) binden. Der Vorgang der Anlagerung der Primer an die DNA wird auch „Annealing“ genannt. Die an die DNA angelagerten Primer dienen einer

thermostabilen DNA-Polymerase als Startpunkt für die Neusynthese eines zur DNA-Matrize komplementären DNA-Stranges durch den Einbau von Desoxynucleotiden (Elongation) von 5' in 3'-Richtung an das jeweilige 3'-Ende der Primer. Der Einbau erfolgt entlang des DNA-Stranges, der von 3' in 5'-Richtung repliziert wird. Die Elongation findet bei einer für die Aktivität der eingesetzten DNA-Polymerase optimalen Temperatur statt, die über der Hybridisierungstemperatur liegt. Das Aufeinanderfolgen von Denaturierung, Annealing und Elongation wird als ein Temperaturzyklus bezeichnet. Die unterschiedlichen temperaturabhängigen Schritte der PCR werden in bestimmten Zeitabständen mehrfach wiederholt, so dass nach dem Durchlaufen mehrerer Temperaturzyklen die DNA-Matrize vervielfältigt vorliegt.

Zum Einfügen einer Mutation wurden Primer verwendet, die nicht genau komplementär zur vorliegenden DNA-Matrize waren, sondern in denen eine veränderte Basensequenz mit der gewünschten Mutation enthalten war, so dass die bei der PCR entstehenden DNA-Stränge ebenfalls die veränderte Basenabfolge trugen. Die Basensequenz wurde so verändert, dass die entsprechenden mutierten Basentriplets für diejenigen Aminosäuren codierten, die durch Mutagenese an Stelle einer anderen Aminosäure eingebracht werden sollten. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

Das Design der verwendeten Oligonucleotid-Primer erfolgte unter Berücksichtigung folgender Gesichtspunkte:

- Die Länge der Primer sollte etwa 18-30, maximal 35 Basen betragen, wobei das 5'-Ende des Primers kein vollständiges Triplet enthalten muß.
- Am 3'-Ende des Primers, an dem die DNA-Polymerase ansetzt, sollte möglichst eine Guanodin- oder Cytosin-Base lokalisiert sein.
- Es sollten nicht mehr als 4 gleiche Basen aufeinander folgen.
- Keine Hybridisierung der Primer untereinander.
- Keine Bildung von internen Sekundärstrukturen wegen der dann geringeren Hybridisierung mit der DNA-Matrize.
- Der Schmelzpunkt der Primer sollte mindestens 4°C über der Temperatur der Elongationsphase der PCR (68°C) liegen.
- Die Mutation sollte eher in der Mitte des Primers oder aber zum 5'-Ende des Primers hin liegen.
- Es sollte ein Austausch von möglichst wenigen, idealerweise nur von einer einzigen Base erfolgen.
- Ein möglichst hoher Gehalt an Guanodin- und Cytosin-Basen (etwa 40 – 60%) ist wegen einer größeren Stabilität der Bindung durch von diesen Basen ausgebildeten dreifache Wasserstoffbrückenbindung vorteilhaft.
- Es wurden jeweils zwei Oligonucleotid-Primer benötigt (5' → 3' und 3' → 5'), eine vollständige Überlappung dieser beiden Primer ist jedoch nicht notwendig.

Neben den Reaktionsansätzen zur Einführung der gewünschten Punktmutationen in die entsprechenden pcD-Plasmide wurde in einer Kontrollreaktion (PCR-Kontrolle) als DNA-Matrize ein Plasmid (pWhitescript™) eingesetzt, das ein β-Galaktosidase-Gen enthält, bei

dem an Stelle des Codons für die Aminosäure Glutamin (TAA) ein Stopp-Codon (CAA) eingeführt worden ist. Die in der PCR eingesetzten Kontrollprimer fügten in dem Stoppcodon eine Punktmutation ein, durch die die Thymin-Base des Stoppcodons in eine Cytosin-Base mutiert wurde. Nach erfolgreicher PCR und Übertragung dieses Plasmids durch Transformation in *E.coli*-Zellen (II.1.1.2), exprimierten diese in Kultur das Enzym β -Galaktosidase, welches nach dem Ausplattieren der transformierten Bakterien bei einer Farbreaktion durch Umsetzung eines farblosen Substrates in einen blauen Farbstoff als Blau-Weiß-Marker diente und dadurch Indikator für einen erfolgreichen Ablauf der PCR bzw. der Mutagenese war (siehe Kapitel II.1.1.2 für die Erläuterung der Farbreaktion).

Zur Durchführung der PCR wurden die Primer und die DNA-Matrize für die Reaktionsansätze nach dem Auftauen durch Verdünnung mit steril filtriertem Wasser (L 25) auf eine Konzentration von 62,5 ng/ μ L bzw. 5 ng/ μ L eingestellt und zusammen mit den anderen im Kit enthaltenen Reagenzien gemäß folgender Tabelle (Tabelle 1) in autoklavierte 0,2 mL Reaktionsgefäße (M 21) einpipettiert.

Kontrolle	Reaktion
5 μ L 10x Reaction Buffer	5 μ L 10x Reaction Buffer
2 μ L pWhitescript control plasmid	2 μ L (10 ng) dsDNA template (DNA-Matrize)
1,25 μ L oligo control primer #1	2 μ L (125 ng) oligo primer #1
1,25 μ L oligo control primer #2	2 μ L (125 ng) oligo primer #2
1 μ L 10 mM dNTP mix	1 μ L 10 mM dNTP mix
39,5 μ L DDH ₂ O (L 25: ad 50 μ L Endvolumen)	38 μ L DDH ₂ O (L 25: ad 50 μ L Endvolumen)
1 μ L Pfu DNA Polymerase	1 μ L Pfu DNA Polymerase

Tabelle 1: Pipettierschema für die PCR im Rahmen der zielgerichteten Mutagenese mit dem QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit.

Die Reaktion wurde in einem programmierbaren Heizgerät (G 17: Thermocycler) durchgeführt, der gemäß nachfolgender Tabelle (Tabelle 2) programmiert war.

Segment	Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	30 s
2	12-18	95°C	30 s
		55°C	1 min
		68°C	12 min
3	1	4°C	1 h bis ∞

Tabelle 2: Abfolge der Temperaturzyklen bei der PCR.

Dabei kam es im ersten Schritt durch Erhitzen auf 95°C zur Denaturierung der beiden DNA-Stränge der Plasmide, die als Matrize eingesetzt wurden. Nach dem Absenken der Temperatur auf eine Hybridisierungstemperatur von 55°C lagerten sich die zugesetzten Oligonucleotid-Primer an die einzelsträngigen DNA-Matrizen an („Annealing“). Nach Temperaturerhöhung auf 68°C wurden durch das eingesetzte Enzym *PfuTurbo*® DNA Polymerase die Desoxyoligonucleotide an das 3'-Ende der Primer komplementär zur vorliegenden

DNA-Matrize eingebaut. Bei dem Enzym *PfuTurbo*[®] DNA Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*) handelte es sich um ein thermostabiles Enzym, welches neben der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität, die den Einbau der Desoxynucleotide katalysiert, auch eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität aufweist. Diese Exonuclease-Aktivität bedingt eine Korrekturaktivität, wodurch eventuelle Falschpaarungen durch Lesefehler der DNA-Polymerase korrigiert wurden. Die Elongationszeit von 12 Minuten ergab sich aus der Reaktionsgeschwindigkeit der *PfuTurbo*[®] DNA Polymerase, die 2 Minuten pro kb Plasmid betrug und der Länge der eingesetzten Plasmide, die bei 6 kb lag. Nach der Elongation erfolgte ein erneuter Zyklus, in dem es wieder zur Denaturierung, Anlagerung der Primer und zur Elongation kommt, die Anzahl der zu durchlaufenen Zyklen berechnete sich nach der Anzahl der ausgetauschten Basenpaare. Zum Austausch einer einzelnen Base sollten etwa 12 Zyklen durchlaufen werden, für jede weitere ausgetauschte Basen wurden zusätzlich 4 Zyklen benötigt. Nach dem Durchlaufen aller Reaktionszyklen wurde der Ansatz bei 4°C bis zur weiteren Bearbeitung im Thermocycler belassen. Anschließend erfolgte ein Zusatz von 1 µL des Restriktionsenzym Dpn I zu jedem der Reaktionsansätze, nach Mischen und kurzer Zentrifugation bei 3000 rpm (G 14) wurden diese für 1 Stunde bei 37°C im Thermocycler (G 17) inkubiert. Daraufhin wurden die Ansätze bis zur Durchführung der Transformation (siehe II.1.1.2) bei -20°C im Kühlschrank (G 11) aufbewahrt.

Die Reaktionsansätze enthielten nach Beendigung der PCR sowohl die eingesetzte DNA-Matrize, als auch die DNA-Stränge, in die die gewünschte Mutation eingefügt worden war. Da die DNA-Matrize aus E.coli-Stämmen isoliert worden war, die eine Methylierungsaktivität aufweisen, waren die Stränge der DNA-Matrize im Gegensatz zu den mutierten DNA-Strängen methyliert. Durch den Zusatz der Restriktionsendonuclease Dpn I, die methylierte und hemimethylierte DNA spaltet, wurde die DNA-Matrize abgebaut, während die mutierten Plasmidstränge erhalten blieben.

II.1.1.2 Transformation

Nach der PCR wurden die mutierten und noch nicht zirkulär vorliegenden Plasmidstränge durch Hitzeschock in Derivate des Stammes E.coli K12 (XL1-Blue superkompetente Zellen) transformiert, die durch Vorbehandlung eine hohe Kompetenz, also hohe Fähigkeit zur Aufnahme von DNA, aufwiesen. Beim Hitzeschock wird DNA passiv über die durch Vorbehandlung vorgeschädigte Membran der Bakterienzelle aufgenommen. Nach der Transformation werden die nach der PCR noch nicht zirkulär vorliegenden Plasmidstränge durch Aktivität der XL1-Blue-Zellen ligiert. Neben den Plasmiden, die die punktmultierten Rezeptorgene trugen, wurden das Plasmid, das zur Kontrolle der Mutagenese diente, sowie ein

weiteres Kontroll-Plasmid, das zur Kontrolle der Transformation diene, in die Bakterien eingebracht. Zur Kontrolle der Transformation diene ein pUC18-Kontrollplasmid, das ein Gen für Ampicillin-Resistenz und ein lacZ-Gen besitzt, welches für die aminoternale Proteinsequenz des Enzyms β -Galaktosidase kodiert. Die eingesetzten E.coli-Bakterien enthalten ein Gen für den carboxyterminalen Teil des lacZ-Gens. Somit verfügten nach erfolgreicher PCR und Transformation sowohl die Bakterien, die das Plasmid zur Mutagenese-Kontrolle enthielten (siehe II.1.1.1), als auch die Bakterien, in die das pUC18-Kontrollplasmid eingebracht worden war, über intakte Gene zur Expression der β -Galaktosidase. Das Enzym β -Galaktosidase katalysiert die Abspaltung von Galaktose und damit die Umsetzung von X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactosid: R 48) zu 5-Brom-4-chlor-indoxyl, welches wiederum mit Luftsauerstoff zum blaugefärbten Dimer 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo reagiert. Nach dem Ausplattieren auf ampicillinhaltigen Agarplatten, die mit X-Gal-Lösung (L 8) und einer Lösung (L 7) des Induktors IPTG (R 24: Isopropyl-D-1-thiogalactopyranosid) für das β -Galaktosidase-Gen beschickt worden waren, verfärbten sich die Kolonien der Kontrollreaktionen durch die Aktivität der β -Galaktosidase blau. Blau verfärbte Kolonien der Mutagenese-Kontrolle waren ein Indikator für eine erfolgreich verlaufene PCR und Transformation, während blaue Kolonien der pUC18-Kontrolle eine gelungene Transformation anzeigten.

II.1.1.2.1 Herstellung der ampicillinhaltigen Agarplatten

Am Tag vor der Durchführung des Hitzeschocks wurden ampicillinhaltige Agarplatten hergestellt. Dabei wurden für 20 Platten mit 10 cm Durchmesser (M 34) 500 mL Agar benötigt (pro Platte 25 mL Agar). In einem Becherglas wurden 18,5 g Pulver für LB-Agar (R 27) in 500 mL Aqua destillata (L 30) gelöst und in der Mikrowelle (G 5) bis zum Entstehen einer klaren Lösung erhitzt und anschließend autoklaviert (G 46, Programm LS). Nach dem Abkühlen auf 55°C wurden 200 μ L Ampicillin-Lösung (L 5) mit einer sterilen Pipette (G 16, M 3) hinzupipettiert. Von dem so entstandenen flüssigen Agar wurden mit einer sterilen Pipette möglichst blasenfrei 25 mL in jede Platte ausgegossen und die Platten anschließend bis zum nächsten Tag im Kühlschrank (G 11) bei 2-8°C aufbewahrt.

II.1.1.2.2 Transformation durch Hitzeschock

Die benötigte Menge der am Vortag hergestellten Agarplatten (für jede durchgeführte Transformationsreaktion eine Platte, zusätzlich eine Platte für die Mutagenese-Kontrolle und eine Platte für die Kontrollreaktion der Transformation) wurde vor dem Hitzeschock aus dem Kühlschrank genommen und in einen auf 37°C temperierten Brutschrank (G 20) gelegt. Dabei

wurden die Schalen mit der offenen Seite nach unten gelegt, darüber wurden die Deckel schräg platziert, damit Kondenswasser verdunsten konnte. Die tiefgefrorenen XL1-Blue Bakterien, das pUC18-Plasmid und die mutierte Plasmid-DNA wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut, ebenso die benötigten Lösungen von Glucose 20% (L 6), IPTG (L 7) und X-Gal (L 8). 50 µL der XL1-Blue Bakterien wurden jeweils in ein Falcon (M 7) gegeben, dazu wurden 1 µL der mutierten Plasmid-DNA, bzw. der PCR-Kontrolle oder der pUC18-DNA (Transformations-Kontrolle) gegeben und die Ansätze 30 Minuten lang auf Eis gelagert. Währenddessen erfolgte die Herstellung frischer NZY⁺-Lösung (L 10: 10 mL NZY-Lösung (L 9) wurden mit 200 µL Glucose-Lösung 20% (L 6) versetzt). Die frisch hergestellte NZY⁺-Lösung (L 10) wurde in einem Wasserbad auf 42°C erwärmt. Zur Durchführung des Hitzeschocks wurde daraufhin jedes Falcon für genau 45 Sekunden in das 42°C warme Wasserbad gehalten und anschließend 2 Minuten lang auf Eis gelagert. In die Falcons wurden dann je 500 µL warme NZY⁺-Lösung (L 10) gegeben und diese wurden im Schüttelinkubator (G 42) für eine Stunde bei 37°C und 225-250 rpm inkubiert.

II.1.1.2.3 Ausplattieren der transformierten Bakterien

Zwei Agarplatten, die zur Anzucht der Kolonien mit den Kontroll-Reaktionen dienten, wurden vor dem Ausplattieren der Bakterien mit IPTG (L 7) und X-Gal (L 8) beladen. Dafür wurden je 100 µL IPTG-Lösung (L 7) mit einer vorher ausgebrannten Impföse auf dem Agar verstrichen. Nach dem Antrocknen dieser Lösung wurden anschließend ebenso je 100 µL X-Gal-Lösung (L 8) aufgebracht. Darauf folgte das Ausstreichen von 200 µL der inkubierten Bakterien der PCR-Kontrolle auf eine der beiden mit IPTG und X-Gal beschickten Agarplatten. Von der Bakteriensuspension der Transformations-Kontrolle (pUC18-Plasmid) wurden 5 µL mit 195 µL NZY⁺-Lösung (L 10) versetzt und dieses Gemisch auf die andere mit IPTG und X-Gal beschickte Agarplatte aufgebracht. Auf die nicht vorbehandelten Agarplatten wurden jeweils 150 µL der Bakterienlösungen ausgestrichen, die nach Transformation mutierte Plasmid-DNA enthielten. Alle Agarplatten wurden für etwa 16 – 18 Stunden im Brutschrank (G 20) bei 37°C inkubiert und anschließend in den Kühlschrank (G 11) gestellt.

II.1.1.2.4 Selektion und Vermehrung der transformierten XL1-Blue-Bakterien

Durch Sichtkontrolle erfolgte eine Beurteilung des Erfolges der PCR und der Transformation. Zeigten sich auf den Agarplatten der PCR-Kontrolle blaue Kolonien, so waren PCR, bzw. Mutation und Transformation des pWhitescriptTM-Kontrollplasmids gelungen, so dass die Bakterien β -Galaktosidase exprimierten. Blaue Kolonien der Transformationskontrolle mittels des pUC18-Plasmids wiesen auf eine erfolgreiche Transformation hin.

Die übrigen transformierten E.coli-Bakterien wuchsen in weißen Kolonien. Die Agarplatten der Kontrollen wurden verworfen und für jede Agarplatte mit Bakterienkolonien, welche die transformierte und mutierte Plasmid-DNA enthielten, zwei 50 mL-Falcons (M 28) mit je 12 mL autoklaviertem LB-Medium (L 2) und 12 µL Ampicillin-Lösung (L 5) beschickt. Von jeder Agarplatte wurde mit Hilfe einer Pipette mit einer sterilen Pipettenspitze (M 3, G 16) eine Kolonie „ausgestanzt“ und in ein 50mL-Falcon (M 28) gegeben, dieser Vorgang wurde mit einer weiteren Kolonie wiederholt. Die beschickten Falcons wurden mit lose aufgesetzten Deckel bei 37°C und 200 rpm für 8-9 Stunden in einem Schüttelinkubator (G 42) zur Vermehrung der Bakterien inkubiert. Anschließend wurde für jede hergestellte Mutante eines der beiden Falcons ausgewählt, in welchem eine sichtbare Trübung Hinweis auf die ausreichende Vermehrung der Bakterien während der Inkubationszeit gab. Dieses Falcon wurde zum Start der Übernachtskultur im Rahmen der Plasmid-DNA-Gewinnung zur Vermehrung der Plasmid-DNA (siehe II.1.2) verwendet.

II.1.2 Plasmid-DNA-Gewinnung

Die Vermehrung und Gewinnung der in XL1-Blue-Zellen vorliegenden Plasmide erfolgte durch Plasmid-DNA-Gewinnung. Die Plasmid-DNA-Gewinnung wurde mit Hilfe des Qiagen Plasmid Maxi Kits (M 31) gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Dieses Verfahren beruht auf einem modifizierten Verfahren der alkalischen Lyse. Dabei wurden die Bakterienzellen nach Vermehrung in Übernachtskultur in einer Lösung mit Natronlauge und dem Detergens Natriumlaurylsulfat (SDS) (M 31: Puffer P2) und RNase A (M 31: Puffer P1) lysiert. Das Enzym RNase A baut bakterielle RNA ab, SDS solubilisiert Phospholipid- und Proteinanteile der Zelle und durch Natronlauge werden Proteine, chromosomale DNA und Plasmid-DNA denaturiert. Das Lysat wurde im Anschluss durch Zugabe eines sauren Kaliumacetat-Puffers (M 31: Puffer P3) neutralisiert, woraufhin es zum Ausfallen von Kaliumlaurylsulfat (KDS) kam, dabei wurden denaturierte Proteine, chromosomale DNA und Zellfragmente in die ausfallenden Komplexe mit eingeschlossen, während die kleinere Plasmid-DNA renaturierte und in Lösung blieb. Nach Abtrennung der Präzipitate durch Zentrifugation wurde die Lösung auf eine Säule mit einem speziellen Anionen-Austauscher-Harz gegeben (M 31: QUIAGEN-tip 500). Dieses Harz enthielt positiv geladene Diethylaminoethanol-Gruppen, welche mit den negativen Phosphatgruppen der Plasmid-DNA interagieren, so dass diese auf den Austauschersäulen zurückgehalten wurde. Nach dem Waschen der Säulen mit einem Waschpuffer (M 31: QC-Puffer) erfolgte Elution der Plasmid-DNA durch einen Puffer mit hoher Salzkonzentration (M 31: QF-Puffer). Die im Eluat enthaltene Plasmid-DNA wurde

durch Isopropanol-Zugabe (R 4) gefällt, im Anschluss daran mit Ethanol (L 24) gewaschen und nach kurzer Lufttrocknung in TE-Puffer (L 4) aufgenommen.

II.1.2.1 Ansetzen der Übernachtskulturen

Die in Glycerol-Stocks (siehe II.1.2.4) gelagerten Bakterien oder die nach Mutagenese und Selektion in Falcons vermehrten Bakterienkolonien (siehe II.1.1.2.4) wurden in einer Übernachtskultur vermehrt. Dafür wurden mit autoklaviertem LB-Medium (L 2) beschickte Erlenmeyerkolben mit 500 μ L Ampicillin-Lösung (L 5) versetzt. In das ampicillinhaltige Nährmedium wurde nun entweder der Inhalt eines bewachsenen Falcons nach erfolgter Mutagenese (siehe II.1.1) gegeben oder aber es erfolgte ein Animpfen mit Bakterien aus Glycerol-Stocks (siehe II.1.2.4). Von dem entsprechenden Glycerol-Stock wurde mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze (M 25, G 2) ein kleiner Teil der Bakteriensuspension in das ampicillinhaltige Nährmedium gegeben. Die mit Bakterien beschickten Erlenmeyerkolben wurden in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 200 rpm etwa 17 Stunden lang inkubiert.

II.1.2.2 Präparation der Plasmid-DNA

Die im Kit (M 31) enthaltene Lösung von RNase A wurde bei Erstanbruch für 30 Sekunden bei 25000 rpm zentrifugiert (G 14) und mit einer sterilen Pipettenspitze in Puffer P1 (M 31) gegeben. Die Bakteriensuspensionen der Übernachtskultur wurden aus den Erlenmeyerkolben in große Zentrifugenbehältnisse (M 5) überführt, dabei wurde ein Rest der Suspension zur Herstellung von Glycerol-Stocks in den Erlenmeyerkolben belassen. Es erfolgte Zentrifugation der Suspension bei 4°C und 7000 rpm für 30 Minuten. Die nach dem Abschütten der überstehenden Lösung erhaltenen Bakterien-Pellets wurden mittels steriler Einmalpipetten (M 25, G 2) in 10 mL Puffer P1 (M 31) resuspendiert und in kleine Zentrifugengläser (M 23) gegeben. Nach Zugabe von 10 mL Puffer P2 (M 31) wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Zentrifugengläser wurden vorsichtig umgeschwenkt, dabei erfolgte die alkalische Lyse der Bakterienzellen. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde dem Gemisch 10 mL gekühlter acetatsaurer Puffer P3 (M 31) zugegeben und nochmals für 20 Minuten auf Eis inkubiert, in dieser Zeit erfolgte die Präzipitation. Die Präzipitate wurden im Anschluß durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 12000 rpm und 4°C (G 3) von der Lösung abgetrennt, der Überstand daraufhin sofort in eine zweite Serie kleiner Zentrifugengläser (M 23) abdekantiert und diese erneut für 15 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert (G 3). Währenddessen erfolgte die Äquilibration der Anionenaustauschersäulen (M 31: QUIAGEN-tip 500) mit 10 mL QBT-Puffer (M 31). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand möglichst ohne Proteinreste auf die Säulen gegeben. Dabei erfolgte die Absorption der Plasmid-DNA an

Anionenaustauschergruppen. Die Säulen wurden 3 mal mit jeweils 20 mL QC-Puffer (M 31) gewaschen, der Durchfluß verworfen und unter die Säulen daraufhin 50 mL-Falcons (M 28) gestellt. In diese Falcons erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mit 15 mL QF-Puffer (M 31). Die gelöste Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von je 10,5 mL Isopropanol (R 4) gefällt und bei 4°C für 60 Minuten bei 42000 rpm abzentrifugiert (G 3). Der Überstand wurde nach der Zentrifugation abgossen und auf jedes Pellet wurden zur Entfernung des Isopropanols 5 mL Ethanol 70% (L 24) gegeben, indem die Flüssigkeit vorsichtig am Rand des Falcons entlang hinzupipettiert wurde. Nach erneuter Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 42000 rpm (G 3) wurde der Überstand abgossen, die Falcons wurden umgedreht gelagert und die Pellets mit Plasmid-DNA bei Schräglage der Falcons für maximal 10 Minuten getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde mit 600 µL sterilem TE-Puffer (L 4) resuspendiert und in Kryovials (M 17) überführt. Die Plasmid-DNA wurde im Tiefkühlschrank bei -20°C (G 11) aufbewahrt.

II.1.2.3 DNA-Gehaltsbestimmung

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA erfolgte über eine photometrische Absorptionsmessung (G 44) bei den Wellenlängen 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}). Nucleinsäurelösungen zeigen bei einer Wellenlänge von 260 nm ein Absorptionsmaximum, eine Messung bei 280 nm erfaßt die Absorption durch Proteinverunreinigungen und dient so der Reinheitsbestimmung.

Von der in TE-Puffer (L 4) aufgenommenen Plasmid-DNA (siehe II.1.2.2) wurden 8 µL in ein mit 392 µL Aqua destillata (L 30) beschicktes Eppendorf-Cap (M 6) gegeben, und von der so verdünnten DNA-Lösung im Photometer (G 44) in Quarzküvetten (M 29) nach Nullabgleich die Absorption bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt. Die Nucleinsäurekonzentration wurde mit Hilfe des Verdünnungsfaktors (f) und dem Multiplikationsfaktor für doppelsträngige DNA (50 µg/mL bzw. 0,05 µg/µL) nach folgender Gleichung (Gleichung 1) berechnet:

$$c \text{ (}\mu\text{g}/\mu\text{L)} = A_{260} \times f_{\text{Verdünnung}} \times 0,05$$

Gleichung 1

mit: c: Konzentration der DNA
 A_{260} : Absorption bei 260 nm
f: Verdünnungsfaktor der Probe

Da die DNA im Verhältnis 1:50 verdünnt wurde, betrug der Verdünnungsfaktor 50. Der Quotient A_{260}/A_{280} ist ein Maß für die Reinheit der DNA-Probe.

II.1.2.4 Herstellung von Glycerol-Stocks

Zur längeren Aufbewahrung der transformierten XL1-Blue-Bakterien wurden diese unter Zusatz von Glycerol eingefroren. In ein Kryovial (M 17) wurden 300 µL einer 60%-igen Glycerol-

Lösung (L 3) gegeben und 900 µL der entsprechenden Bakteriensuspension aus der Übernachtskultur (siehe II.1.2.1) hinzugefügt, anschließend kurz vermischt und sofort bei -80°C (G 1) eingefroren.

II.1.3 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Die Basensequenz der hergestellten mutierten Plasmid-DNA wurde durch Sequenzierung überprüft. Diese wurde beim Institut für pharmazeutische Mikrobiologie der Universität Bonn in Auftrag gegeben und erfolgte dort nach der Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Von Oktober 2004 an wurde die Sequenzierung der DNA von der Firma Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Standard Hot Shot) durchgeführt.

II.1.4 Untersuchte Rezeptormutanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Rezeptorproteine verwendet, in denen eine oder mehrere Aminosäuren aus der M₂-Sequenz gegen die korrespondierenden Aminosäuren aus dem M₅-Rezeptor ausgetauscht worden waren. Außerdem wurde eine Rückmutante untersucht, in der eine Aminosäure aus dem M₅-Rezeptor durch die korrespondierende Aminosäure aus der M₂-Sequenz ersetzt worden war. Bei einigen Rezeptormutanten wurde an bestimmter Position die Aminosäure Alanin an Stelle der eigentlichen Aminosäure im Rezeptorprotein eingeführt. Die Aminosäure Alanin enthält keine funktionellen Gruppen, die für die Wechselwirkung eines Liganden mit dem Rezeptor verantwortlich gemacht werden können und stellt so eine „neutrale“ Aminosäure dar (Huang et al., 2005). In Abbildung 2 sind Ausschnitte aus der Aminosäuresequenz der 2. extrazellulären Schleife, in Abbildung 3 Teile der 7. transmembranären Domäne des M₂-Rezeptors mit der jeweils korrespondierenden M₅-Aminosäuresequenz dargestellt. Die Bezeichnung transmembranäre Domäne bezieht sich auf den α -helikalen Bereich, der die Membran durchzieht (Prilla et al., 2006). Die in dieser Arbeit untersuchten Rezeptormutanten sind hervorgehoben.

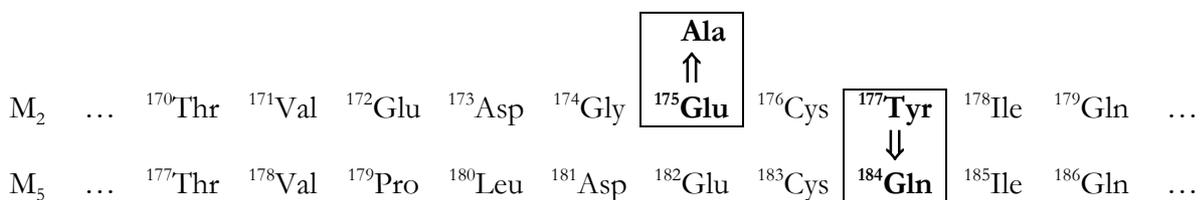


Abbildung 2: Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz der 2. extrazellulären Schleife des M₂-Rezeptors mit der korrespondierenden Aminosäuresequenz des M₅-Rezeptors. Siehe Abbildung 3 zur weiteren Erläuterung.

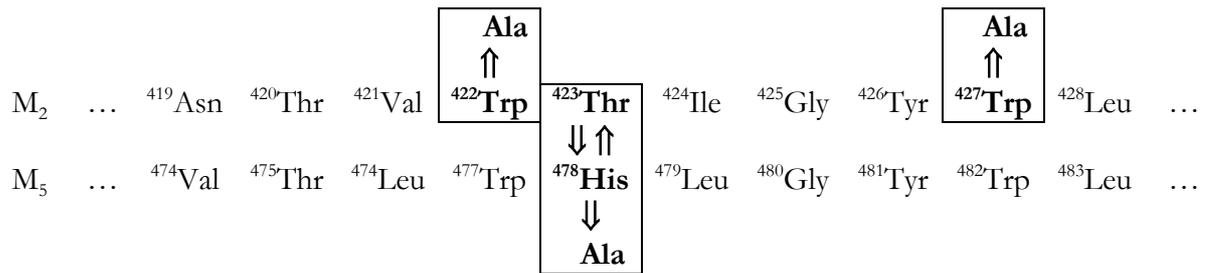


Abbildung 3: Ausschnitt aus dem α -helikalen Bereich des M_2 -Rezeptors, der als 7. transmembranäre Domäne die Membran durchzieht, dargestellt mit der korrespondierenden Aminosäuresequenz des M_5 -Rezeptors. Die untersuchten Rezeptormutanten sind durch Umrandung hervorgehoben, die Pfeile verweisen auf die ausgetauschte Aminosäure. Die Aminosäuren sind im Dreibuchstabencode aufgeführt.

II.2 ZELLBIOLOGISCHE ARBEITEN

Sämtliche zellbiologische Arbeiten wurden an einer COS-7-Zelllinie (CV-1 origin SV40) durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine einschichtig wachsende Nierenzelllinie der Afrikanischen Grünen Meerkatze (CV-1 Zelllinie), die mit einer Mutante des Affenvirus SV40 (Simian Virus 40) transfiziert ist (Gluzman, 1981). Die SV40-Mutante exprimiert das SV40-T-Antigen und weist eine Deletion im Replikationsursprung auf. An diesen bindet normalerweise das T-Antigen und führt so zur Replikation von viraler DNA, die diesen Replikationsursprung enthält. Werden in diese Zellen Plasmide eingebracht, die den Replikationsursprung von SV40 tragen, entsteht ein Wirts-Vektor-System, das zur Vermehrung der Plasmide in den Zellen führt. Die COS-7-Zellen wurden als Zellsuspension mit 10% DMSO-Zusatz (R 10) in flüssigem Stickstoff gelagert (G 39) und zur Durchführung der zellbiologischen Arbeiten ausgefroren und kultiviert. Die Kultivierung der COS-7-Zellen erfolgte in sterilen Kulturschalen (M 11, M 12) in einem Brutschrank (G 38) bei 37°C mit 5%-igem CO₂-Gehalt und bei 96% Luftfeuchtigkeit. Als Nährmedium diente Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM: R 12), das einen 10%-igen Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS: R 16) und einen 1%-igen Zusatz einer Penicillin-Streptomycin-Lösung (PenStrep: R 36) enthielt (DMEM + FKS + PenStrep: L 23). Die zellbiologischen Arbeiten erfolgten unter aseptischen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom (G 21), alle verwendeten Pipettenspitzen (M 42, M 3, M 40, M 13) wurden vor dem Einbringen in die Sicherheitswerkbank autoklaviert (G 46).

II.2.1 Ausfrieren von COS-7-Zellen

Um die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde ein Kryovial (M 17) mit Zellsuspension aus dem Stickstofftank (G 39) entnommen. Unmittelbar nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension aus dem Kryovial in ein mit 10 mL warmem Nährmedium (L 23) befülltes 50 mL Falcon (M 28) überführt und bei 900 rpm und 20°C für

4 Minuten zentrifugiert (G 3). Der DMSO-haltige Überstand wurde nach der Zentrifugation abgesaugt (G 45) und die Zellen nach Resuspendieren in warmem Nährmedium (L 23) auf eine kleine Kulturschale mit 10 cm Durchmesser (M 11) gegeben. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter II.2.2 beschrieben.

II.2.2 Kultivierung von COS-7-Zellen

Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:5 auf neue Zellkulturschalen aufgeteilt. Die hierfür benötigten Medien und Puffer (s.u.) wurden zuvor im Wasserbad (G 23) auf 37°C aufgewärmt, die Trypsin-EDTA-Lösung (R 47) wurde durch vorzeitiges Herausnehmen aus dem Kühlschrank auf Raumtemperatur erwärmt. Das alte Nährmedium in den Kulturschalen wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit warmem PBS-Puffer (L 1) gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturschalen wurden die Zellen anschließend mit Trypsin-EDTA-Lösung (R 47: 3 mL für kleine Kulturschalen (M 11) mit 10 cm Durchmesser, 5 mL für große Kulturschalen (M 12) mit 15 cm Durchmesser) für 5 Minuten bei 37°C im Brutschrank (G 38) inkubiert. Die sich ablösenden Zellen wurden zur Inaktivierung des Trypsins mit einer dem Volumen der zugesetzten Trypsin-Lösung (R 47) entsprechenden Menge Nährmedium versetzt und die resultierende Zellsuspension wurde auf neue mit warmem Nährmedium beschickte Kulturschalen (25 mL frisches Nährmedium für große Kulturschalen, 15 mL frisches Nährmedium für kleine Kulturschalen) verteilt.

II.2.3 Einfrieren von COS-7-Zellen

Zur längerfristigen Lagerung wurden COS-7-Zellen je nach Bedarf aus bestehender Kultur heraus eingefroren. Dafür wurde eine ausreichend mit Zellen bewachsene große 15 cm-Kulturschale (M 12) mit 15 mL warmem PBS-Puffer gewaschen, nach dem Absaugen des Puffers 5 mL Trypsin-EDTA-Lösung (R 47) zu den Zellen gegeben und diese für 5 Minuten bei 37°C im Brutschrank bis zur Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturschale inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit einer sterilen Pipette abgenommen, in ein 50 mL-Falcon (M 28) gegeben und zur Inaktivierung des Trypsins mit frischem Nährmedium (L 23) versetzt. Das Nährmedium wurde in der gleichen Menge wie die vorher zugesetzte Trypsin-Lösung hinzugegeben (Verhältnis 1:1). Nach Zentrifugation dieser Suspension für 4 Minuten bei 900 rpm und 20°C wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen wurden in 3 mL frischem Nährmedium resuspendiert. Jeweils 900 µL dieser Suspension wurden mit 100 µL Dimethylsulfoxid (R 10) in ein Kryovial (M 17) gegeben und nach kurzem Umschwenken bei einer Temperatur von -80°C eingefroren (G 1). Nach 24 Stunden erfolgte eine Überführung der tiefgefrorenen Zellsuspension in einen Stickstofftank (G 39) zur Lagerung bis zur erneuten Kultivierung der Zellen.

II.2.4 Transiente Transfektion von COS-7-Zellen

Die Überführung der Plasmidvektoren mit den entsprechenden Rezeptorgenen in COS-7-Zellen erfolgte mittels transienter Transfektion. Als Transfektionsreagenz diente Polyfect[®] der Firma Qiagen (R 39). Dieses Reagenz enthält sogenannte aktivierte Dendrimere, welche kationische verzweigte Polyamidoamin-Polymere mit sphärischer Struktur darstellen. Geladene Aminogruppen dieser Dendrimere können mit negativen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren interagieren und assemblieren so DNA. Diese Strukturen werden durch unspezifische Endocytose in die Zellen aufgenommen (Tang et al., 1996).

II.2.4.1 Zählen und Ausplattieren der COS-7-Zellen (Tag 1)

Einen Tag vor der Behandlung mit Polyfect[®]-Reagenz wurden die Zellen von dicht bewachsenen großen 15 cm-Kulturschalen (M 12) auf kleine 10 cm-Kulturschalen (M 11) ausplattiert. Dafür wurde von den großen Kulturschalen das Nährmedium abgesaugt und die Platten wurden mit warmem PBS-Puffer (L 1) gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS-Puffers erfolgte die Zugabe von je 5 mL Trypsin-Lösung (R 47) zu den Zellen, diese wurden dann 5 Minuten bei 37°C im Inkubator (G 38) bis zu Ablösung der Zellen inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden daraufhin 5 mL Nährmedium (L 23) pro eingesetzter Schale hinzugefügt, die Zellsuspension wurde in ein 50 mL-Falcon (M 28) gegeben und für 4 Minuten bei 20°C und 900 rpm zentrifugiert (G 3). Währenddessen wurden auf kleine 10-cm Kulturschalen (M 11) je 7 mL frisches warmes Nährmedium (L 23) gegeben. Für zwei dicht bewachsene große Kulturschalen wurden etwa 10 kleine Kulturschalen benötigt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in frischem Nährmedium (L 23) resuspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (G 31) erfolgte eine Bestimmung der Zelldichte in der Suspension. Auf die Zählkammer wurde nach Anfeuchten der seitlichen Glasstreifen ein Deckglas (M 15) so aufgebracht, dass es durch Adhäsion festgehalten wurde. Mit Hilfe einer sterilen Pipette wurden etwa 15 µL der Suspension so zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben, dass die Suspension durch Kapillarkräfte unter das Deckglas gezogen wurde. Unter dem Mikroskop wurde die Zellzahl von je 4 x 4 Kleinquadraten ausgezählt und anschließend der Mittelwert von 4 Zählungen ermittelt. Die Anzahl der Zellen in 16 Kleinquadraten multipliziert mit dem Faktor 10 000 gibt die Zelldichte der Suspension in Zellen/mL an. Aus dieser Zelldichte wurde nun das Volumen der Zellsuspension ermittelt, das benötigt wurde, damit auf jede kleine Kulturschale $1,6 \times 10^6$ Zellen ausplattiert werden konnten. Dieses berechnete Volumen der Suspension wurde auf die mit Nährmedium beschickten Kulturschalen gegeben und durch leichtes Schwenken in diesen verteilt. Bis zur Behandlung mit Polyfect[®]-Reagenz am darauf folgenden Tag wurden die Zellen in den kleinen 10 cm-Kulturschalen im Brutschrank vermehrt.

II.2.4.2 Transfektion mit Polyfect® (Tag 2)

Die auf kleine Kulturschalen ausplattierten Zellen sollten einen Tag nach dem Ausplattieren 40-80% konfluent sein. Für 10 zu transfizierende kleine Kulturschalen wurde in 10 sterilen Eppendorf-Caps (M 6) Nährmedium (R 12) ohne FKS und Antibiotika-Zusatz so vorgelegt, dass nach der Zugabe der erforderlichen Menge Plasmid-DNA ein Endvolumen von 300 µL vorlag (bei einer Menge von z.B. 5 µL zu transfizierender DNA wurden also 295 µL Nährmedium vorgelegt). Da die Anwesenheit von Antibiotika und FKS im Nährmedium die Interaktion der DNA mit dem Transfektionsreagenz beeinträchtigt, wurde Nährmedium ohne den entsprechenden Zusatz verwendet. In jedes Eppendorf-Cap wurde ein der Menge von 4 µg Plasmid-DNA entsprechendes Volumen der DNA-Lösung gegeben. DNA und Nährmedium wurden durch Vortexen (G 49) vermischt, anschließend erfolgte eine kurze Zentrifugation der Eppendorf Caps für 10 Sekunden (G 14). Darauf wurden zu jedem Eppendorf-Cap 25 µL Polyfect®-Reagenz (R 39) (das Reagenz wurde während der Transfektion auf Eis gelagert) hinzupipettiert und durch erneutes Vortexen für 10 Sekunden vermischt. Anschließend erfolgte eine 5-10-minütige Inkubation der Proben bei Raumtemperatur. Während dieser Zeit wurde von den zu transfizierenden Zellen in 10 kleinen Kulturschalen das alte Nährmedium abgesaugt, diese mit warmem PBS-Puffer (L 1) gewaschen, der PBS-Puffer abgesaugt und anschließend in jede Kulturschale 7 mL frisches warmes Nährmedium (L 23) mit FKS- und Antibiotika-Zusatz gegeben. Nach der Inkubation wurde in jedes Eppendorf-Cap 1 mL Nährmedium (L 23) mit FKS- und Antibiotika-Zusatz gegeben, durch auf- und abpipettieren mit dem Inhalt des Caps vermischt, das gesamte Gemisch auf eine der kleinen mit frischem Nährmedium beschickten Kulturschalen gegeben und durch Umschwenken der Schale verteilt. Die so behandelten Zellen wurden für 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, danach erfolgte die Membranpräparation.

II.2.5 Membranpräparation (Tag 4)

Um die nach Transfektion der entsprechenden Plasmide in COS-7-Zellen exprimierten Rezeptorproteine in Radioligandbindungsversuchen untersuchen zu können, wurden die Zellen von den Platten abgelöst, zerkleinert und als Suspension in Aliquoten schockgefroren.

Von jeweils 10 kleinen transfizierten 10 cm-Kulturschalen wurde das Nährmedium abgesaugt, die Zellen wurden mit warmem PBS-Puffer (L 1) unter unsterilen Bedingungen gewaschen und der PBS-Puffer abgesaugt. Auf die Kulturschalen wurde daraufhin 4 mL eisgekühltes Aqua destillata (L 30) gegeben. War das Homogenat zur Verwendung in nur einem Inkubationspuffer (siehe II.3.3.1) bestimmt, erfolgte in einigen Fällen eine Aufnahme in 5 mM Na, K, P_i-Puffer (L 26) oder Magnesium-Tris-Puffer 3/50 mM (L 27) anstatt in Aqua destillata. Mit Hilfe

eines Zellschabers (M 43) erfolgte das Loslösen der Zellen vom Plattenboden. Die Zellsuspension aus jeweils 5 kleinen Kulturschalen wurde in ein kleines Zentrifugenglas (M 23) überführt und auf Eis gelagert. In den Zentrifugengläsern wurde die Zellsuspension mit einem Polytron-Homogenisator (G 34, G 8) zerkleinert, indem die Suspension 3 mal auf Stufe 6 für jeweils 10 Sekunden homogenisiert wurde. Zwischen den einzelnen Homogenisationsschritten wurde die Suspension auf Eis gelagert. Anschließend erfolgte Zentrifugation der Suspension bei 4°C und 18 000 rpm für 30 Minuten (G 3). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgeschüttet und die Pellets mit 2 mL eisgekühltem Aqua destillata (L 30) mit Hilfe einer Pipette (G 16, M 40) resuspendiert. Die Suspension wurde in einen Potter aus Glas überführt und jedes Zentrifugenglas 2 mal mit je 2 mL eisgekühltem Aqua destillata (L 30) gespült. Diese Spülflüssigkeit wurde anschließend auch in den Potter überführt, um eine möglichst hohe Ausbeute an Rezeptorproteinen zu erhalten. Im Potter erfolgte eine weitere Homogenisierung der Suspension, diese wurde dann in ein 50 mL-Falcon (M 28) gegeben, der Potter nochmals zweimal mit 4,5 mL eisgekühltem Aqua destillata (L 30) gespült, das Spülwasser aus dem Potter mit der Suspension durch Vortexen (G 49) vermischt und anschließend in Aliquoten zu 0,5 mL oder 1,0 mL in Eppendorf-Caps (M 6) pipettiert und bei -80°C schockgefroren (G 1).

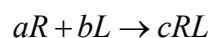
II.3 RADIOLIGANDBINDUNGSUNTERSUCHUNGEN

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen einem Liganden und einem Rezeptor eignet sich die Verwendung radioaktiv markierter Liganden. An die Rezeptoren gebundene radioaktiv markierte Liganden lassen sich quantitativ erfassen. Die Trennung von gebundenem und ungebundenem Radioliganden erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch Filtration über Glasfaserfilter, an denen Rezeptoren und mit ihnen die an sie gebundenen Radioliganden haften bleiben. Die nach Filtration am Filter haftende Menge der Radioaktivität wurde über Szintillationsmessung (siehe II.3.3.7) bestimmt. Radioaktiv markierte Liganden besitzen die Fähigkeit, neben der Bindung an spezifische Bindungsstellen am Rezeptor außerdem unspezifische Bindungsstellen an biologischen und nichtbiologischen Materialien zu besetzen. Spezifische und unspezifische Bindung bilden zusammen die Gesamtbindung, die durch Messung des radioaktiven Zerfalls bei der Szintillationsmessung erfasst wird. Die unspezifische Bindung kann durch Zusatz eines Überschusses einer unmarkierten Substanz mit hoher Affinität zur spezifischen Bindungsstelle zum Versuchsansatz zusammen mit dem Radioliganden und der Rezeptorsuspension bestimmt werden (Bennet und Yamamura, 1985).

II.3.1 Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen

Die reversible Interaktion eines Liganden mit einem Rezeptor lässt sich im Reaktionsgleichgewicht durch das Massenwirkungsgesetz beschreiben (Bennet und Yamamura, 1985).

Für die Assoziation des Liganden L an die spezifische Bindungsstelle des Rezeptors R unter Bildung eines Ligand-Rezeptorkomplexes RL gilt:



Gleichung 2

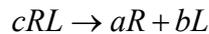
Dabei sind a,b und c die stöchiometrischen Faktoren der Reaktion. Für die Geschwindigkeit v_{hin} der Assoziationsreaktion gilt:

$$v_{hin} = k_{+1} \cdot [R]^a \cdot [L]^b$$

Gleichung 3

mit k_{+1} : Geschwindigkeitskonstante der Assoziationsreaktion
 [R]: Konzentration des freien Rezeptors
 [L]: Konzentration des Liganden
 a,b: stöchiometrische Faktoren der Assoziationsreaktion

Die Dissoziation des Liganden vom Ligand-Rezeptorkomplex lässt sich durch folgende Reaktionsgleichung beschreiben:



Gleichung 4

Für die Geschwindigkeit $v_{\text{rück}}$ der Dissoziationsreaktion des Liganden vom Ligand-Rezeptorkomplex gilt:

$$v_{\text{rück}} = k_{-1} \cdot [RL]^c$$

Gleichung 5

mit k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziationsreaktion
 $[RL]$: Konzentration der Ligand-Rezeptorkomplexe
 c : stöchiometrischer Faktor der Dissoziationsreaktion

Im Reaktionsgleichgewicht entspricht die Geschwindigkeit der Assoziationsreaktion der Geschwindigkeit der Dissoziationsreaktion, es gilt somit:

$$v_{\text{hin}} = v_{\text{rück}}$$

Gleichung 6

daraus folgt:

$$k_{+1} \cdot [R]^a \cdot [L]^b = k_{-1} \cdot [RL]^c$$

Gleichung 7

$$\Leftrightarrow \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R]^a \cdot [L]^b}{[RL]^c} = K_D = \frac{1}{K_A}$$

Gleichung 8

Dabei bildet der Quotient aus den Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten der Rück- und der Hinreaktion die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D , der Kehrwert der Gleichgewichtsdissoziationskonstante stellt die Gleichgewichtsassoziationskonstante K_A dar. Bei der Interaktion eines Liganden mit einem Rezeptor handelt es sich um eine sättigbare Wechselwirkung, da die Anzahl an Bindungsstellen und Rezeptoren begrenzt ist. Die maximale Anzahl verfügbarer spezifischer Bindungsstellen B_{max} ergibt sich aus der Summe der besetzten und der freien Rezeptoren:

$$B_{\text{max}} = [RL]^c + [R]^a$$

Gleichung 9

Durch Multiplikation mit dem Faktor $[L]^b$ ergibt sich daraus:

$$B_{\text{max}} \cdot [L]^b = [RL]^c \cdot [L]^b + [R]^a \cdot [L]^b \cdot \frac{[RL]^c}{[RL]^c}$$

Gleichung 10

Aus Gleichung 8 ergibt sich für den Fall, dass die stöchiometrischen Faktoren $a = c = 1$ sind:

$$[R] \cdot [L]^b = K_D [RL]$$

Gleichung 11

Durch Substitution in Gleichung 10 erhält man:

$$\begin{aligned} B_{\max} \cdot [L]^b &= [RL] \cdot [L]^b + [RL] \cdot K_D \\ \Leftrightarrow [RL] &= \frac{B_{\max} \cdot [L]^b}{[L]^b + K_D} \\ \Leftrightarrow \frac{[RL]}{B_{\max}} &= \frac{[L]^b}{[L]^b + K_D} \end{aligned}$$

Gleichung 12

Gleichung 12 entspricht der Gleichung nach Hill (Hill, 1910). Für den Fall, dass der stöchiometrische Faktor $b = 1$ ergibt, es sich also um die Interaktion eines einzigen Ligandmoleküles an einer einzigen Bindungsstelle des Rezeptors handelt, ergibt sich:

$$[RL] = \frac{B_{\max} \cdot [L]}{[L] + K_D}$$

Gleichung 13

Gleichung 13 entspricht als Hyperbel einer Sättigungsfunktion der Gleichung der Langmuirschen-Sättigungsisotherme (Barlow und Blake, 1989). Die Parameter B_{\max} und K_D , das heißt die maximale Anzahl an Rezeptorbindungsstellen und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante als inverses Maß für die Affinität eines bestimmten Liganden zu diesen Rezeptorbindungsstellen, stellen Charakteristika der Bindungseigenschaften einer Membransuspension dar. Diese können in Sättigungsexperimenten ermittelt werden, bei diesen Experimenten wird eine bestimmte Konzentration einer Membransuspension mit steigenden Konzentrationen eines radioaktiv markierten Liganden versetzt. Nachteil dieser Versuchsart ist der hohe Verbrauch des radioaktiv markierten Liganden. Eine weitere Möglichkeit zur Ermittlung dieser Charakteristika einer Membransuspension stellen homologe Konkurrenzexperimente dar (siehe II.3.1.2).

Die fraktionelle Rezeptorbesetzung B_f gibt den Anteil der vom Liganden besetzten Rezeptoren an:

$$B_f = \frac{[RL]}{B_{\max}} = \frac{[RL]}{[R] + [RL]} = \frac{[L]}{[L] + K_D}$$

Gleichung 14

Entspricht der Wert der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D der eingesetzten Konzentration des Liganden $[L]$, nimmt die fraktionelle Rezeptorbesetzung einen Wert von $\frac{1}{2}$

an, in diesem Fall entspricht der K_D -Wert der Ligandkonzentration, bei der die Hälfte der verfügbaren spezifischen Bindungsstellen besetzt ist.

II.3.1.1 Die Vier-Parameter-logistische-Gleichung

Nach der Hill-Gleichung (Gleichung 12) erhält man durch Umformungen folgenden Zusammenhang:

$$\begin{aligned} \frac{[RL]}{B_{\max}} &= \frac{[L]^n}{[L]^n + K_D} \\ \Leftrightarrow \frac{[RL]}{B_{\max}} &= \frac{[L]^n}{(1 + K_D \cdot [L]^{-n}) [L]^n} \\ \Leftrightarrow \frac{[RL]}{B_{\max}} &= \frac{1}{1 + K_D [L]^{-n}} \\ \Leftrightarrow \frac{[RL]}{B_{\max}} &= \frac{1}{1 + 10^{\lg(K_D [L]^{-n})}} \\ \Leftrightarrow \frac{[RL]}{B_{\max}} &= \frac{1}{1 + 10^{n(\lg K_D - \lg [L])}} \text{ s} \\ \Leftrightarrow [RL] &= \frac{B_{\max}}{1 + 10^{n(\lg K_D - \lg [L])}} \end{aligned}$$

Gleichung 15

Dieser Zusammenhang zeigt den Verlauf einer sättigbaren Reaktion, die dem Massenwirkungsgesetz folgt. Bei der Interaktion eines Liganden mit dem Rezeptor kann der Wert der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten als Wendepunkt der durch die Hill-Gleichung bei halblogarithmischer Auftragung beschriebenen Kurve bezeichnet werden, der Wendepunkt ($EC_{0.5}$) entspricht der Ligandkonzentration, bei der 50% aller Rezeptorbindungsstellen besetzt sind:

$$\begin{aligned} \frac{[RL]}{B_{\max}} &= \frac{1}{2} = \frac{EC_{0.5}}{EC_{0.5} + K_D} \\ \Leftrightarrow EC_{0.5} &= K_D \end{aligned}$$

Gleichung 16

In der Hill-Gleichung kann der Wert K_D also durch EC_{50} ersetzt werden. Der mathematische Zusammenhang der Hill-Gleichung lässt sich auch auf Konzentrations-Effekt-Kurven anwenden. Der Begriff B_{\max} entspricht in diesem Fall der Differenz aus dem unteren Plateauwert MIN und dem oberen Plateauwert MAX, die den sigmoidalen Verlauf einer Konzentrations-Effekt-Kurve bei halblogarithmischer Auftragung kennzeichnen. Beachtet man, dass MIN als unteres Plateau der Kurve den minimalen Effekt kennzeichnet, den man in Abwesenheit der untersuchten

Substanz ermittelt, so ist dieser Wert zu der Konzentrations-Effekt-Kurve hinzu zu addieren, damit ergibt sich die Vier-Parameter-logistische Gleichung:

$$[RL] = \frac{MAX - MIN}{1 + 10^{n(\lg EC_{0.5} - \lg [L])}} + MIN$$

Gleichung 17

Der Wert n dieser Gleichung gibt den sogenannten Hill-Koeffizienten wieder, der die Stöchiometrie der Interaktion des Liganden mit dem Rezeptor wiedergibt. Mit der Vier-Parameter-logistischen Gleichung lassen sich unter anderem homologe Konkurrenzexperimente (siehe II.3.1.2) und Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit allosterischer Modulatoren (siehe II.3.2.1) beschreiben und auswerten.

II.3.1.2 Homologe Konkurrenz

Die Bindungseigenschaften einer Membransuspension können auch mit Hilfe von homologen kompetitiven Inhibitionsexperimenten ermittelt werden. Dabei wird eine Membransuspension mit einer bestimmten Konzentration eines Radioliganden und steigenden Konzentrationen eines kompetitiven Inhibitors, der mit dem Radioliganden identisch ist, aber keine radioaktive Markierung aufweist, versetzt. Nach Einstellung des Gleichgewichtes lässt sich das Ausmaß der Radioligandbindung an die Rezeptoren ermitteln. Da es sich bei der homologen Konkurrenz um eine sättigbare Reaktion handelt, können die Bindungsdaten nach der Vier-Parameter-logistischen Gleichung ausgewertet werden, der ermittelte Wendepunkt der Konzentrations-Effekt-Kurve entspricht dann nicht dem Wert der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten, da unmarkierter Ligand und markierter Ligand um die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor konkurrieren. Handelt es sich dabei um die Interaktion eines Liganden mit einer einzigen Bindungsstelle, das heißt, nimmt der Hill-Koeffizient den Wert -1 an, kann die Affinität des eingesetzten Kompetitors zum Rezeptor (K_i) nach der Gleichung von Cheng und Prusoff ermittelt werden (Cheng und Prusoff, 1973):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}}$$

Gleichung 18

mit K_i : Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Kompetitorbindung
 K_D : Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Radioligandbindung
 $[L]$: Konzentration des Radioliganden
 IC_{50} : Wendepunkt der Inhibitionskurve in halblogarithmischer Auftragung

Bei der homologen Konkurrenz wird ein radioaktiv markierter Ligand mit steigenden Konzentrationen des gleichen unmarkierten Liganden versetzt. Ligand und Kompetitor haben in

diesem Fall gleiche Bindungseigenschaften am Rezeptor, es gilt also $K_i = K_D$. Damit vereinfacht sich die Gleichung nach Cheng und Prusoff (Gleichung 18) zu:

$$K_D = IC_{50} - [L]$$

Gleichung 19

Beträgt der gebundene Anteil des Radioliganden maximal 10% der Gesamtmenge des eingesetzten Radioliganden, so kann die Konzentration $[L]$ des freien Radioliganden näherungsweise der Gesamtkonzentration des eingesetzten Radioliganden gleichgesetzt werden.

Nach DeBlasi (DeBlasi et al., 1989) lässt sich nach dem Massenwirkungsgesetz (Gleichung 12) unter der Annahme des Vorhandenseins einer einzigen Bindungsstelle für den eingesetzten Liganden am Rezeptor folgende Gleichung formulieren:

$$\frac{[RL]}{B_{\max}} = \frac{[L]}{[L] + K_D}$$

Wird die Konzentration des gebundenen Radioliganden $[RL]$ in Abwesenheit des unmarkierten strukturidentischen Liganden als B_0 bezeichnet, ergibt sich:

$$\frac{B_{\max}}{B_0} = \frac{[L] + [K_D]}{[L]}$$

Gleichung 20

Durch Einsetzen von Gleichung 19 in Gleichung 20 ergibt sich:

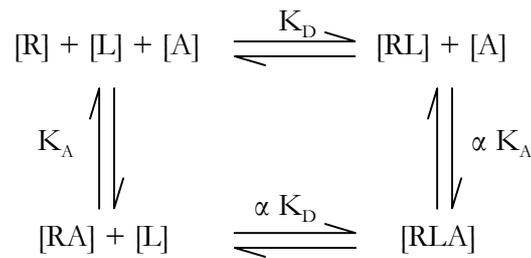
$$\begin{aligned} \frac{B_{\max}}{B_0} &= \frac{[L] + IC_{50} - [L]}{[L]} \\ \Leftrightarrow B_{\max} &= \frac{B_0 \cdot IC_{50}}{[L]} \end{aligned}$$

Gleichung 21

Somit lässt sich nach DeBlasi et al. (1989) die maximale Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen der Membransuspension bei Kenntnis des IC_{50} -Wertes, der spezifischen Radioligandbindung B_0 in Abwesenheit eines Inhibitors und der Konzentration des eingesetzten Radioliganden $[L]$ berechnen.

II.3.1.3 Allosterische Interaktion

Existiert an einem Rezeptor neben einer orthosterischen Bindungsstelle eine weitere allosterische Bindungsstelle, so können sich der orthosterisch gebundene Ligand und der allosterisch gebundene Ligand (Modulator) wechselseitig beeinflussen. Diese Interaktion wird durch das von Ehlert postulierte ternäre Modell der allosterischen Interaktion (Ehlert, 1988) beschrieben:



mit:

- [R]: Konzentration der Rezeptoren
- [L]: Konzentration des orthosterischen Liganden
- [A]: Konzentration des allosterischen Modulators
- [RL]: Konzentration des Komplexes aus orthosterischem Ligand und Rezeptor
- [RA]: Konzentration des Komplexes aus allosterischem Modulator und Rezeptor
- [RLA]: Konzentration des ternären Komplexes aus allosterischem Modulator, orthosterischem Liganden und Rezeptor
- K_D : Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des orthosterischen Liganden
- K_A : Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des allosterischen Modulators
- α : Kooperativitätsfaktor

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des allosterischen Modulators und des orthosterischen Liganden spiegeln deren Affinität zu den unbesetzten Rezeptoren wieder. Durch die Bindung eines allosterischen Modulators an den Rezeptor wird nach dem ternären Modell allosterischer Interaktionen die Bindung des orthosterischen Liganden an den Rezeptor beeinflusst, wobei die Bindung des allosterischen Modulators den gleichen Einfluss auf die Bindung des orthosterischen Liganden hat wie die Bindung eines orthosterischen Liganden auf die Bindung des allosterischen Modulators. Die gegenseitige Beeinflussung wird durch den Kooperativitätsfaktor α wiedergegeben. Stabilisiert der allosterische Modulator den Orthoster-freien Zustand des Rezeptor, so führt die Bindung des allosterischen Modulators zu einem verminderten Vorliegen von Ligand-Rezeptor-Komplexen im Reaktionsgleichgewicht. Für den Kooperativitätsfaktor gilt dann $\alpha > 1$, man spricht von negativer Kooperativität. In diesem Fall ist die Affinität des allosterischen Modulators zum freien unbesetzten Rezeptor größer als die zum orthoster-besetzten Rezeptorzustand. Fördert die Anwesenheit eines allosterischen Modulators die Bildung von ternären Komplexen aus orthosterischem Liganden, allosterischem Modulator und Rezeptor, stabilisiert der allosterische Modulator den orthoster-besetzten Zustand des Rezeptors. In diesem Fall gilt $\alpha < 1$, man spricht von positiver Kooperativität. Die Affinität des allosterischen Modulators zum orthoster-besetzten Rezeptor ist größer als die zum unbesetzten Rezeptor. Bleibt die Gleichgewichtsbindung eines orthosterischen Liganden an den Rezeptor trotz Bindung eines allosterischen Modulators unbeeinflusst, so gilt $\alpha = 1$, es handelt sich dabei um neutrale Kooperativität. Bei neutral kooperativem Verhalten ist die Affinität des

allosterischen Modulators zum besetzten Rezeptorzustand gleich groß wie die zum freien Rezeptor.

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Radioligandbindungsversuche wurde der Einfluss untersucht, den steigende Konzentrationen eines allosterischen Modulators auf die Bindung eines radioaktiv markierten orthosterischen Liganden am Rezeptor ausüben. In diesem Fall gilt:

$$B_{\text{spez.}} = B_0 \cdot \frac{[L] + K_D}{[L] + K_D \cdot \frac{K_A + [A]}{K_A + \frac{[A]}{\alpha}}}$$

Gleichung 22

mit:

- $B_{\text{spez.}}$: spezifische Bindung des radioaktiv markierten orthosterischen Liganden in Anwesenheit des allosterischen Modulators
- B_0 : spezifische Bindung des radioaktiv markierten orthosterischen Liganden in Abwesenheit des allosterischen Modulators
- K_A : Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des allosterischen Modulators
- K_D : Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des orthosterischen Liganden
- $[L]$: eingesetzte Konzentration des radioaktiv markierten orthosterischen Liganden
- $[A]$: Konzentration des allosterischen Modulators
- α : Kooperativitätsfaktor

Durch nichtlineare Regressionsanalyse der Bindungsdaten werden unter Verwendung der mittels homologer Kompetitionsexperimente ermittelten Gleichgewichtsdissoziationskonstante des radioaktiv markierten orthosterischen Liganden und seiner separat bestimmten eingesetzten Konzentration der Wert der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des allosterischen Modulators (K_A) und der Kooperativitätsfaktor α ermittelt. Diese Art der Analyse versagt oft beim Vorliegen von neutraler Kooperativität. In diesem Fall kann in einer modifizierten Gleichung die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators durch den Term $EC_{0.5,\text{diss.}}/\alpha$ ersetzt werden (Daiss et al., 2002; Raasch et al., 2002). Der $EC_{0.5,\text{diss.}}$ -Wert entspricht der Konzentration des allosterischen Modulators, bei der der Wendepunkt der Dissoziationsverzögerungskurve in Dissoziationsexperimenten (siehe II.3.2) beobachtet wurde, also eine halbmaximale Verzögerung der Dissoziation des Liganden vom Rezeptor erreicht wird. Ließen sich die Gleichgewichtsbindungsversuchen ermittelten Daten nicht mit der herkömmlichen Ehlert-Gleichung auswerten, so wurden die Daten mit Hilfe der modifizierten Gleichung analysiert.

Werden Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen in Gegenwart allosterischer Modulatoren durchgeführt, so muß berücksichtigt werden, dass ein allosterischer Modulator sowohl die Dissoziation eines orthosterischen Liganden vom Rezeptor als auch die Assoziation desselben an

den Rezeptor und somit die Gleichgewichtseinstellung der Reaktion verzögern kann. Nach Lazareno und Birdsall (Lazareno und Birdsall, 1995) lässt sich die Halbwertszeit der Dissoziation des Radioliganden in Anwesenheit eines dissoziationsverzögernden allosterischen Modulators nach folgender Gleichung ermitteln:

$$t_{0.5obs} = t_{0.5off} \cdot \left(1 + \frac{[A]}{EC_{0.5,diss}} \right)$$

Gleichung 23

mit:

$t_{0.5obs}$:	Halbwertszeit der Dissoziation des orthosterischen Liganden vom Rezeptor in Anwesenheit des allosterischen Modulators
$t_{0.5off}$:	Halbwertszeit der Dissoziation des orthosterischen Liganden vom Rezeptor in Abwesenheit des allosterischen Modulators
[A]:	Konzentration des allosterischen Modulators
$EC_{0.5,diss}$:	Konzentration des allosterischen Modulators, bei der eine halbmaximale Verzögerung der Dissoziation des orthosterischen Liganden vom Rezeptor beobachtet wird

Gleichung 23 gilt unter der Voraussetzung, dass die Dissoziation des allosterischen Modulators vom Rezeptor vernachlässigbar ist. Es wird angenommen, dass die Reaktion nach der fünffachen beobachteten Dissoziationshalbwertszeit des orthosterischen Liganden in Anwesenheit eines allosterischen Modulators ($t_{0.5obs}$) ein Reaktionsgleichgewicht erreicht hat. Damit ergibt sich für die Inkubationszeit:

$$t_{ink} = 5 \cdot t_{0.5obs}$$

Gleichung 24

II.3.2 Kinetische Untersuchungen

Die Interaktion eines Liganden mit einem Rezeptor lässt sich auch auf kinetische Gesichtspunkte hin untersuchen, dabei kann der Einfluss eines allosterischen Modulators auf die Assoziationsgeschwindigkeit oder die Dissoziationsgeschwindigkeit eines orthosterischen Liganden vom Rezeptor beobachtet werden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich kinetische Experimente durchgeführt, die die Dissoziation eines Liganden vom Ligand-Rezeptor-Komplex untersuchen. Nach dem Erreichen eines Gleichgewichtes der Reaktion des Radioliganden mit dem Rezeptor kann durch Zugabe eines kompetitiven Inhibitors im Überschuss eine sofortige Besetzung aller freien Bindungsstellen für den Radioliganden am Rezeptor erreicht werden, so dass nur noch die zu Zeitpunkt der Zugabe vorhandenen Radioligand-Rezeptor-Komplexe dissoziieren können, weil eine Reassoziierung des Radioliganden unterbunden wird. Dadurch kann der Zeitverlauf der Dissoziation des Radioliganden vom Rezeptor nachvollzogen werden. Man beobachtet für die Dissoziation bei Vorhandensein einer einzigen Bindungsstelle am Rezeptor

eine Reaktion erster Ordnung, das heißt, die Reaktionsgeschwindigkeit ist abhängig von der Konzentration der zerfallenden Rezeptor-Ligand-Komplexe [RL]:

$$\frac{d[RL]}{dt} = -k_{-1} \cdot [RL]$$

Gleichung 25

Durch Integration ergibt sich:

$$[RL]_t = [RL]_0 \cdot e^{-k_{-1}t}$$

Gleichung 26

mit:

- [RL]_t: Konzentration der Rezeptorligandkomplexe zum Zeitpunkt t
- [RL]₀: Konzentration der Rezeptorligandkomplexe bei Beginn der Dissoziationsreaktion
- k₋₁: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante des orthosterischen Liganden
- t: Zeit

Gleichung 26 gilt für den Zeitverlauf der beobachteten spezifischen Bindung. Der im Dissoziationsexperiment beobachtete Zeitverlauf der Gesamtbinding ergibt sich aus der Summe der sich vermindernenden spezifischen Bindung und des gleichbleibenden Wertes der unspezifischen Bindung (U):

$$[RL]_t = [RL]_0 \cdot e^{-k_{-1}t} + U$$

Gleichung 27

Für die Dissoziationshalbwertszeit gilt:

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

Gleichung 28

II.3.2.1 Dissoziationsexperimente mit Zweipunkterfassung

Ein allosterischer Modulator ist in der Lage, die Dissoziationsgeschwindigkeit eines Liganden vom Rezeptor zu beeinflussen. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde ausschließlich eine Dissoziationsverzögerung beobachtet. Handelt es sich bei der Dissoziation des Liganden vom Rezeptor in Anwesenheit und Abwesenheit des allosterischen Modulators um eine monophasische Reaktion, lässt sich die Geschwindigkeitskonstante k₋₁ der Dissoziationsreaktion durch die Ermittlung zweier Punkte, die den Verlauf der Dissoziationsreaktion beschreiben, berechnen (Kostenis und Mohr, 1996). Dabei werden die spezifische Bindung B₀ beim Start der Reaktion und die spezifische Bindung B_t nach einer bestimmten Zeit t bestimmt. Der Zeitpunkt t der Erfassung des zweiten Meßpunktes sollte dabei in einem Zeitintervall liegen, das die 1,5- bis 1,75-fache Zeit der Dissoziationshalbwertszeit des Liganden in Abwesenheit des allosterischen Modulators beträgt (t_{1/2 off}). Die beobachtete

Geschwindigkeitskonstante k_{obs} der Dissoziationsreaktion zum Zeitpunkt t berechnet sich nach folgendem Zusammenhang für eine monoexponentielle Reaktion:

$$k_{obs} = -\frac{\ln \frac{B_0}{B_t}}{t}$$

Gleichung 29

mit:

- k_{obs} : beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
- B_0 : spezifische Bindung zum Zeitpunkt 0, bzw. beim Start der Dissoziation
- B_t : spezifische Bindung zum Zeitpunkt t
- t : Zeit

Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} lässt sich in Abhängigkeit von der Konzentration eines allosterischen Modulators beschreiben. In Abbildung 4 ist der beispielhafte Verlauf von Dissoziationsverzögerungskurven in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen eines dissoziationsverzögernden allosterischen Modulators angegeben.

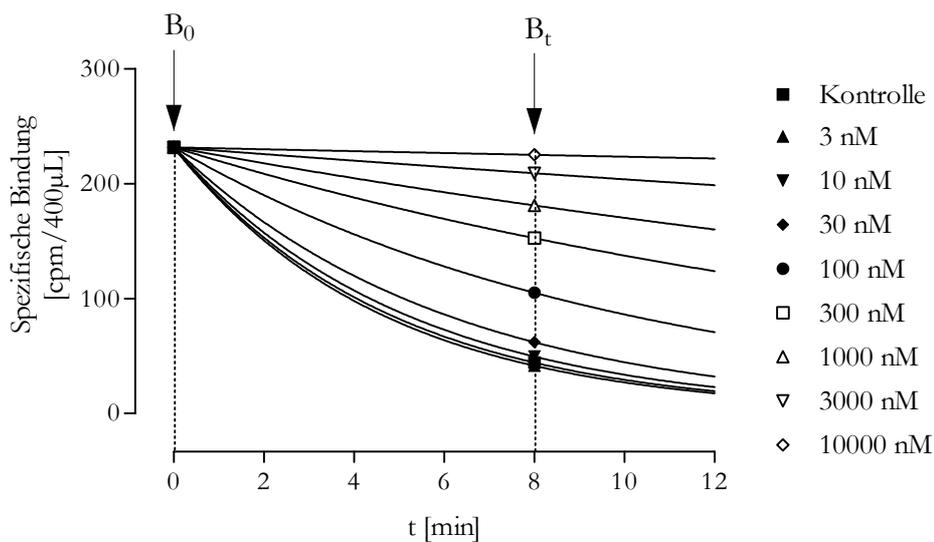


Abbildung 4: Beispielhafter Kurvenverlauf der Dissoziation eines Liganden vom Rezeptor in Anwesenheit steigender Konzentrationen eines dissoziationsverzögernden allosterischen Modulators. Im 2-Punkt-Dissoziationsexperiment wird die Bindung zum Zeitpunkt B_t und B_0 ermittelt, diese Punkte sind durch Pfeile in der Abbildung hervorgehoben. Die Dissoziationskurve einer monophasischen Reaktion lässt sich durch diese beiden Punkte beschreiben. Auf der Abszisse ist die Dissoziationszeit vom Start der „Dissoziationsreaktion“ an angegeben, auf der Ordinate ist die ermittelte spezifische Bindung aufgetragen.

Das Ausmaß der Dissoziationsverzögerung spiegelt den Grad der Besetzung des Ligand-Rezeptor-Komplexes durch den allosterischen Modulator wieder und beschreibt in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration des allosterischen Modulators eine hyperbolische Funktion, es handelt sich dabei um den Kurvenverlauf einer Sättigungsreaktion:

$$k_{obs} = \frac{k_0 \cdot [A]^n}{[A]^n + EC_{0.5,diss}}$$

Gleichung 30

mit:

k_{obs} :	beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
k_0 :	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators
$[A]$:	Konzentration des allosterischen Modulators
n :	stöchiometrischer Faktor der Reaktion, bzw. Hill-Koeffizient
$EC_{0.5,diss}$:	Konzentration des Modulators, bei der eine halbmaximale Dissoziationsverzögerung beobachtet wird

Diese kann nach der Vier-Parameter-logistischen Gleichung durch nichtlineare Regression analysiert werden (siehe auch II.3.1.1):

$$k_{obs} = \frac{MAX - MIN}{1 + 10^{n(\lg EC_{0.5,diss} - \lg[A])}} + MIN$$

Gleichung 31

Der durch nichtlineare Regression ermittelte Wendepunkt der Funktion der beobachteten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Abhängigkeit vom Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators ist ein Maß für die Affinität des allosterischen Modulators zum ligandbesetzten Rezeptor. Abbildung 5 gibt diesen Zusammenhang bildlich wieder.

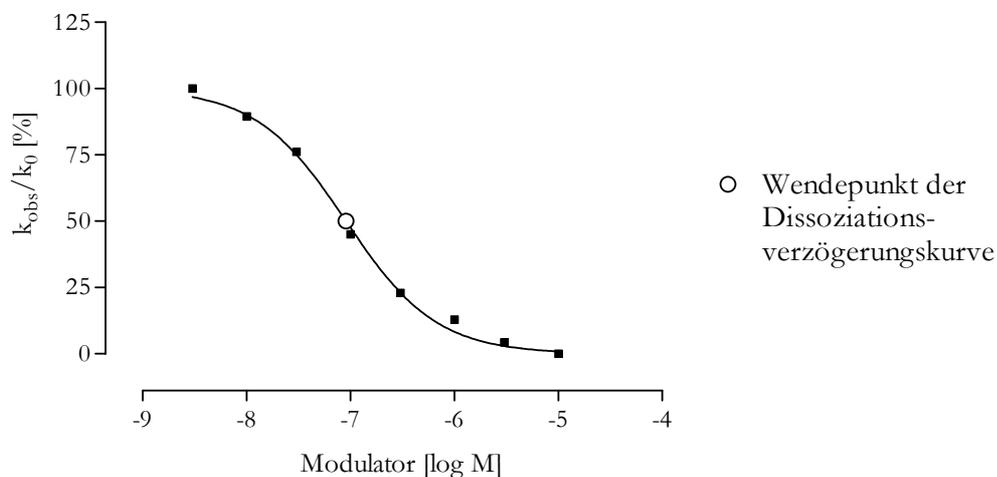


Abbildung 5: Beispielhafter Verlauf einer Konzentrations-Effekt-Kurve, welche die Abhängigkeit der beobachteten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten k_{obs} in Anwesenheit steigender Konzentrationen eines dissoziationsverzögernden allosterischen Modulators wiedergibt. Die Ordinate gibt den prozentualen Anteil von k_{obs} in Bezug auf den Ausgangswert k_0 in Abwesenheit des Modulators wieder. Auf der Abszisse wird die logarithmierte molare Konzentration des untersuchten Modulators aufgetragen. Der Wendepunkt der Kurve ist ein Maß für die Affinität des allosterischen Modulators zum Rezeptor.

Bei der Analyse der Bindungsdaten wurden die Kenngrößen $pEC_{0.5,diss}$, der Hill-Koeffizient n_H und das untere Plateau (MIN) der Konzentrations-Effekt-Kurven durch nichtlineare Regressionsanalyse nach Gleichung 31 ermittelt. Der Hill-Koeffizient n_H als Charakteristikum der Kurvensteilheit wurde, insofern er im F-Test nicht signifikant verschieden von -1 war, auf diesen

Wert festgesetzt. Das obere Plateau der Kurven wurde auf einen Wert von 100% festgesetzt, das untere Plateau wurde für den Fall, dass es sich im F-Test nicht signifikant vom Wert 0% unterschied, auf diesen Wert festgelegt.

In einigen Fällen ließ sich beim Einsatz hoher Konzentrationen eines allosterischen Modulators keine vollständige Verzögerung der Dissoziation des Liganden vom Rezeptor beobachten. In diesem Fall entsprach das untere Plateau der Vier-Parameter-logistischen Gleichung nicht der gemessenen unspezifischen Bindung. Der $EC_{0.5,diss}$ -Wert eines Modulators gibt an, bei welcher Konzentration des allosterischen Modulators eine halbmaximale Dissoziationsverzögerung erreicht wird. Wird die Dissoziation eines Liganden vom Rezeptor durch den allosterischen Modulator nicht vollständig verzögert, so schwingt die Konzentrations-Effekt-Kurve nicht auf den Wert $k_{obs}/k_0 = 0$ aus, sondern auf einen darüber liegenden Wert (Siehe Abbildung 6). Dieser Wert wird in Gleichung 31 als unteres Plateau durch MIN gekennzeichnet.

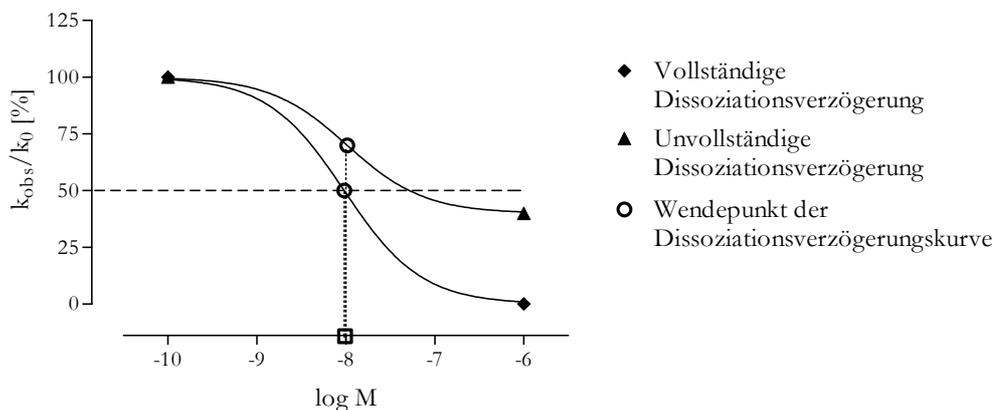


Abbildung 6: Beispielhafter Kurvenverlauf von Konzentrations-Effekt-Kurven allosterischer Modulatoren mit vollständiger und unvollständiger Dissoziationsverzögerung. Hervorgehoben sind die $EC_{0.5,diss}$ -Werte, die den Wendepunkten der dargestellten Kurvenverläufe entsprechen.

Der in Dissoziationsverzögerungsversuchen ermittelte $EC_{0.5,diss}$ -Wert für die Affinität des allosterischen Modulators zum mit dem orthosterischen Liganden besetzten Rezeptor entspricht nach dem Ehlert-Modell dem Wert αK_A (Daiss et al., 2002; Raasch et al., 2002). Über diesen Zusammenhang lassen sich unter Annahme der Gültigkeit des Ehlert-Modells Daten aus Gleichgewichtsbindungsversuchen mit den in kinetischen Versuchen ermittelten Parametern vergleichen. Es gilt:

$$EC_{0.5,diss} = \alpha \cdot K_A$$

Gleichung 32

II.3.3 Versuchsdurchführung

II.3.3.1 Inkubationsbedingungen

In dieser Arbeit wurden Radioligandbindungsuntersuchungen unter verschiedenen Inkubationsbedingungen durchgeführt. Eine Übersicht über die unterschiedlichen Inkubationsbedingungen gibt Tabelle 3.

Bezeichnung	Na, K, P _i -Puffer 5 mM (L 26)	Mg-Tris-Puffer 3/50 mM (L 27)	Hepes-Puffer 10 mM mit 10 μM GDP (L 19)
Chemische Zusammensetzung	4 mM Na ₂ HPO ₄ 1 mM KH ₂ PO ₄	3 mM MgHPO ₄ 50 mM Tris-HCl	10 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 10 mM Hepes 10 μM GDP
pH-Wert	pH 7,4	pH 7,4	pH 7,4
Temperatur	23°C	23°C/37°C	30°C
Ionenstärke	μ = 13 mM	μ = 34 mM	μ = 132 mM

Tabelle 3: Übersicht der unterschiedlichen Inkubationsbedingungen: Zusammensetzung der Inkubationspuffer, pH-Wert, jeweilige Inkubationstemperatur und Ionenstärke nach Lewis.

Die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen für die jeweiligen Inkubationspuffer richten sich nach den in der Literatur und in der internen Laborpraxis verwendeten Begriffen. Dabei wird der Na, K, P_i-Puffer in der additiven Zusammensetzung der molaren Konzentrationen als 5 mM bezeichnet, beim Mg-Tris-Puffer richtet sich die Konzentrationsbezeichnung nach den eingesetzten Magnesium- und Tris-Bestandteilen, während sich die Konzentrationsangaben des Hepes-Puffers nach der Konzentration der Hepes-Salze richten. Das Verhältnis der Konzentrationen der eingesetzten Salze blieb während dieser Arbeit konstant, das heißt, dass z.B. ein 20 mM Hepes-Puffer gleichzeitig auch 20 mM MgCl₂, 200 mM NaCl und 20 μM GDP enthält.

Die in Tabelle 3 angegebene Ionenstärke der Inkubationspuffer wurde nach der Gleichung nach Lewis (Gleichung 33) berechnet:

$$\mu = \frac{1}{2} (c_1 z_1^2 + c_2 z_2^2 + \dots) = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2$$

Gleichung 33

mit: c: Konzentration eines Ions
z: Ladung des entsprechenden Ions

Die Herstellungsvorschriften für die Pufferlösungen finden sich in Kapitel II.7. Es wurden konzentriertere Pufferlösungen hergestellt (L 15, L 20, L 19), die im jeweiligen Versuch mit den in Wasser aufgenommenen Membransuspensionen so verdünnt wurden, dass die entsprechende gewünschte Endkonzentration wie in Tabelle 3 angegeben resultierte. Nach dem Pipettieren der entsprechenden Lösungen in die Mikrotiterplatten oder Reagenzgläser wurden diese mit

Parafilm (M 24) abgedichtet und die Ansätze auf einem Kleinschüttler vermischt (G 30). Die Reaktionsansätze wurden im Wasserbad (G 36) unter Schütteln bei der entsprechenden Temperatur inkubiert.

II.3.3.2 Filtrationsmethoden

Zur Bestimmung der membrangebundenen Radioaktivität wurden die Reaktionsansätze über Glasfaserfilter filtriert. Durch die Filter wurden die membranständigen Rezeptormoleküle mit gebundenem radioaktiv markierten Liganden zurückgehalten und durch Szintillationsmethoden konnte anschließend die auf den Filtern zurückgebliebene Radioaktivität quantitativ bestimmt werden. In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Filtrationssysteme verwendet, die sich durch die Anzahl der gleichzeitig filtrierbaren Reaktionsansätze und in der Art der jeweils zur Verfügung stehenden Inkubationsgefäße für die Versuche unterschieden.

Das Filtrationssystem der Firma Brandel (Brandel-Harvester G 6, G 24) ermöglichte die gleichzeitige Filtration von 48 Reaktionsansätzen, die in Borosilikatgläsern (M 9) angesetzt wurden. Die Filtration erfolgte über Filtermatten der Firma Brandel, die zur Absenkung der unspezifischen Bindung eine halbe Stunde vor der Filtration in eiskalte 0,1%-ige Polyethylenimin-Lösung (L 29) eingelegt wurden. Nach der Filtration des Versuchsansatzes wurden Reaktionsansätze und Filter zwei mal zügig mit eisgekühltem 40 mM Na, K, PO₄-Puffer (L 13) gespült, um die unspezifische Bindung des Radioliganden zu reduzieren. Die durch die Filterbohrungen des Brandel-Harvesters vorgestanzten Filterstücke wurden mit einer Pinzette in Szintillationsgefäße überführt (M 37, M 36), mit 5 mL Szintillationsflüssigkeit (R 42: Ready-Protein) versetzt und in einem Szintillationsmeßgerät vermessen (G 40, G 41).

Mit dem Tomtec-Harvester (G 43, G 7) besteht die Möglichkeit, gleichzeitig 96 Reaktionsansätze zu filtrieren. Die Reaktionen wurden in Polypropylen-Blöcken mit 96 Bohrungen angesetzt (M 1), deren Fassungsvermögen mit 1,2 mL unter dem der Borosilikatgläser liegt. Die Filtration erfolgte über Filter der Firma Wallac (M 14), welche zur Absenkung der unspezifischen Bindung des Radioliganden an die Filter 45 Minuten vor der Filtration in eiskalte 0,1%-ige PEI-Lösung (L 29) eingelegt wurden. Nach Filtration des Versuchsansatzes wurde der Filter zusammen mit den Polypropylen-Blöcken zweimal mit eiskaltem Aqua destillata (L 30) gespült. Anschließend erfolgte eine Trocknung der Filter in einer Mikrowelle (G 27) für drei Minuten bei einer Leistung von 400 Watt. Die getrockneten Filter wurden auf ein Stück Alufolie (M 38) gelegt, auf die obere Seite der Filter das Szintillationswachs (M 18) aufgelegt und auf einem Heizblock (G 19) erfolgte anschließend das Aufschmelzen des Szintillationswachses (M 18) auf die Filter. Nach dem Abkühlen und Erhärten des aufgeschmolzenen Wachses wurde die mit dem Wachs

verschmolzene Filtermatte in eine Plastikschtzhülle (M 33) gegeben und im Szintillationsmeßgerät (G 50) vermessen.

II.3.3.3 Homologe Competition

Homologe Competitionsexperimente dienen der Charakterisierung der Bindungseigenschaften einer Membransuspension durch Bestimmung der Affinität des eingesetzten orthosterischen Liganden N-Methylscopolamin (NMS) zum untersuchten Rezeptor. Dabei wurde die Membransuspension im jeweiligen Reaktionspuffer mit einer fixen Konzentration des radioaktiv markierten Liganden [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS) und steigenden Konzentrationen des unmarkierten Liganden N-Methylscopolamin (NMS) versetzt. Die Endkonzentration von [³H]NMS im Versuchsansatz betrug 0,2 nmol/L. (siehe Inkubationsbedingungen: II.3.3.1). Dafür wurden am Tomtec-Harvester jeweils 50 µL der Kompetitorlösung in einem resultierenden Endvolumen von 300 µL, am Brandel-Harvester jeweils 100 µL der Kompetitorlösung in einem resultierenden Endvolumen von 1500 µL eingesetzt. Die unspezifische Bindung wurde durch den Zusatz von Atropin-Lösung mit einer resultierenden Endkonzentration von 3 µmol/L im Versuchsansatz bestimmt. Homologe Competitionversuche wurden immer parallel zu Untersuchungen der heterologen allosterischen Interaktion an derselben Membransuspension durchgeführt, deshalb richtete sich die Inkubationszeit der homologen Competitionsexperimente nach den durchgeführten Interaktionsexperimenten (siehe II.3.1.3), um möglichst vergleichbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten. Die in den Versuchen eingesetzten Reaktanden wurden gemäß Tabelle 4 und Tabelle 5 in die entsprechenden Reaktionsgefäße pipettiert. Die eingesetzte Membransuspension wurde mit Aqua destillata (L 30) so verdünnt, dass ein auswertbares Signal der membrangebundenen Radioaktivität resultierte und weniger als 10 % des gesamten eingesetzten Radioliganden an Rezeptoren gebunden wurden.

Volumen [µL]	Eingesetzte Lösung	Versuchsansatz	Eingesetzte Konzentration	Endkonzentration im Ansatz
100	[³ H]NMS	alle	3 nM	0,2 nM
50	Aqua pro analysi (L 31)	Gesamtbindung		
	oder Atropin	Unspezifische Bindung	90 µM	3 µM
	oder NMS	Kompetition	1,8 x 10 ^{-x} , bzw. 6 x 10 ^{-x}	3 x 10 ^{x+1} , bzw. 1 x 10 ^{-x}
1100	Magnesium-Tris-Puffer	alle	4,1/68,2 mM	3/50 mM
250	Membransuspension	alle	q.s.	
1500	Gesamtvolumen			

Tabelle 4: Pipettierschema zur Durchführung homologer Kompetitionsexperimente am Brandel-Harvester. Als Lösungsmittel wurde für alle eingesetzten Komponenten Aqua pro analysi (L 31) verwendet. Die verwendete Membransuspension wurde mit Aqua pro analysi (L 31) so verdünnt, dass ein auswertbares Signal der membrangebundenen Radioaktivität nach Filtration resultierte.

Volumen [µL]	Eingesetzte Lösung	Versuchsansatz	Eingesetzte Konzentration	Endkonzentration im Ansatz
50	[³ H]NMS	alle	1,2 nM	0,2 nM
50	Aqua pro analysi (L 31)	Gesamtbindung		
	oder Atropin	Unspezifische Bindung	18 µM	3 µM
	oder NMS	Kompetition	3 x 10 ^{-x} , bzw. 9 x 10 ^{-x}	1 x 10 ^{x+1} , bzw. 3 x 10 ^{x+1}
100	Membransuspension	alle	q.s.	
100	Na, K, PO ₄ -Puffer		15 mM	5 mM
	oder Mg-Tris-Puffer	alle	9/150 mM	3/50 mM
	oder Hepes-Puffer		30 mM	10 mM
300	Gesamtvolumen			

Tabelle 5: Pipettierschema zur Durchführung homologer Kompetitionsexperimente am Tomtec-Harvester. Als Lösungsmittel wurde für alle eingesetzten Komponenten Aqua pro analysi (L 31) verwendet. Die verwendete Membransuspension wurde mit Aqua pro analysi (L 31) so verdünnt, dass ein auswertbares Signal der membrangebundenen Radioaktivität nach Filtration resultierte.

Gesamtbindung und unspezifische Bindung wurden in jedem Experiment vierfach ermittelt, die Bindung mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors wurde jeweils zweifach bestimmt. Zur Beendigung der Reaktionen wurden die Versuchsansätze wie unter II.3.3.2 filtriert und die auf den Filtern verbliebene Radioaktivität wie unter II.3.3.7 beschrieben bestimmt. Die Auswertung erfolgte wie unter II.3.1.2 aufgeführt durch nichtlineare Regressionsanalyse gemäß der Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 31).

II.3.3.4 Heterologe allosterische Interaktion

Experimente zur Untersuchung der allosterischen Interaktion eines Modulators mit dem Radioliganden [³H]NMS wurden analog und jeweils als paralleler Versuchsansatz zu den unter II.3.3.3 beschriebenen homologen Konkurrenzexperimenten durchgeführt. An Stelle des Inhibitors NMS, der mit [³H]NMS um die orthosterische Bindungsstelle konkurriert, wurde hier ein allosterischer Modulator eingesetzt, der die Bindung von [³H]NMS an den Rezeptor beeinflusst. Dafür wurden am Tomtec-Harvester jeweils 50 µL der Kompetitorlösung in einem resultierenden Endvolumen von 300 µL, am Brandel-Harvester jeweils 100 µL der Kompetitorlösung in einem resultierenden Endvolumen von 1500 µL eingesetzt. Die Lösungen wurden gemäß Tabelle 6 und Tabelle 7 in die entsprechenden Reaktionsgefäße gegeben.

Volumen [µL]	Eingesetzte Lösung	Versuchsansatz	Eingesetzte Konzentration	Endkonzentration im Ansatz
100	[³ H]NMS	alle	3 nM	0,2 nM
50	Aqua pro analysi (L 31)	Gesamtbindung		
	oder Atropin	Unspezifische Bindung	90 µM	3 µM
	oder Allosterischer Modulator	Interaktion	1,8 x 10 ^{-x} , bzw. 6 x 10 ^{-x}	3 x 10 ^{x+1} , bzw. 1 x 10 ^{-x}
1100	Magnesium-Tris-Puffer	alle	4,1/68,2 mM	3/50 mM
250	Membransuspension	alle	q.s.	
1500	Gesamtvolumen			

Tabelle 6: Pipettierschema zur Durchführung heterologer Interaktionsexperimente am Brandel-Harvester. Als Lösungsmittel wurde für alle eingesetzten Komponenten Aqua pro analysi (L 31) verwendet. Die verwendete Membransuspension wurde mit Aqua pro analysi (L 31) so verdünnt, dass ein auswertbares Signal der membrangebundenen Radioaktivität nach Filtration resultierte.

Volumen [µL]	Eingesetzte Lösung	Versuchsansatz	Eingesetzte Konzentration	Endkonzentration im Ansatz
50	[³ H]NMS	alle	1,2 nM	0,2 nM
50	Aqua pro analysi (L 31)	Gesamtbindung		
	oder Atropin	Unspezifische Bindung	18 µM	3 µM
	oder Allosterischer Modulator	Inhibition	3 x 10 ^{-x} , bzw. 9 x 10 ^{-x}	1 x 10 ^{x+1} , bzw. 3 x 10 ^{x+1}
100	Membransuspension	alle	q.s.	
100	Na, K, PO ₄ -Puffer		15 mM	5 mM
	oder Mg-Tris-Puffer	alle	9/150 mM	3/50 mM
	oder Hepes-Puffer		30 mM	10 mM
300	Gesamtvolumen			

Tabelle 7: Pipettierschema zur Durchführung heterologer Interaktionsexperimente am Tomtec-Harvester. Als Lösungsmittel wurde für alle eingesetzten Komponenten Aqua pro analysi (L 31) verwendet. Die verwendete Membransuspension wurde mit Aqua pro analysi (L 31) so verdünnt, dass ein auswertbares Signal der membrangebundenen Radioaktivität nach Filtration resultierte.

Die benötigten Inkubationszeiten bis zur Einstellung des jeweiligen Reaktionsgleichgewichtes wurden gemäß Gleichung 23 berechnet. Gesamtbindung und unspezifische Bindung wurden jeweils vierfach bestimmt, die Bindung mit verschiedenen Konzentrationen des Modulators wurde jeweils zweifach bestimmt. Zur Beendigung der Reaktion erfolgte die Filtration der Versuchsansätze wie unter II.3.3.2 beschrieben. Die Auswertung wurde wie unter II.3.1.3 erläutert gemäß dem ternären Modell allosterischer Interaktion nach der Ehlert-Gleichung (Gleichung 22) mittels nichtlinearer Regressionsanalyse mit Hilfe des Computerprogrammes GraphPad Prism[®] durchgeführt. Der dafür erforderliche Wert K_D , der die Affinität des Liganden [³H]NMS zum Rezeptorprotein angibt, wurde in parallel durchgeführten homologen Konkurrenzexperimenten ermittelt. Die zur Berechnung ebenso erforderliche Konzentration des eingesetzten Radioliganden [³H]NMS wurde durch Szintillationsmessung ermittelt (G 41). Bei Vorliegen neutraler Kooperativität ist die nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-

Gleichung nicht möglich. Daher wurde in diesem Fall eine modifizierte Gleichung verwendet, bei der der Wert K_A der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des allosterischen Modulators in Gleichung 22 durch den Term $EC_{0.5,diss.}/\alpha$ ersetzt worden war (Vergleich II.3.2.1).

II.3.3.5 Dissoziationsverlauf

Bei Membranen, bei denen der Dissoziationsverlauf des Liganden [3 H]NMS vom Rezeptor unbekannt war, wurde vor der Durchführung von 2-Punkt-Dissoziationsexperimenten der gesamte Verlauf der Dissoziation des markierten Liganden vom Rezeptor in Abwesenheit eines allosterischen Modulators untersucht. Diese Experimente wurden ausschließlich am Tomtec-Harvester durchgeführt. Dafür wurden mehrere Bohrungen des Polypropylen-Blockes mit der zu untersuchenden Membransuspension, dem entsprechenden Inkubationspuffer und dem radioaktiv markierten Liganden [3 H]NMS in einer resultierenden Endkonzentration von 2 nmol/L beschickt. Das Reaktionsgemisch wurde bei der jeweiligen Inkubationstemperatur zur Anlagerung des Liganden [3 H]NMS an die Rezeptoren vorinkubiert. Die Vorinkubationszeit wurde dabei so gewählt, dass sie der fünffachen Halbwertszeit der Dissoziation von [3 H]NMS vom M_3 -Rezeptor unter den entsprechenden Inkubationsbedingungen entsprach, da diese Halbwertszeit jeweils der langsamsten beobachteten Dissoziationskinetik aller eingesetzten Rezeptormutanten entsprach und somit davon ausgegangen werden konnte, dass nach dieser Inkubationszeit die Reaktion des Liganden [3 H]NMS mit dem untersuchten Rezeptor ein Gleichgewicht erreicht hatte. Nach dieser Vorinkubation wurde zu bestimmten Zeitpunkten durch Zugabe einer vortemperierten Atropinlösung („Startlösung“, resultierende Endkonzentration im Versuchsansatz 3 μ mol/L) die Reassoziations von [3 H]NMS an die Rezeptoren unterbunden, so dass die Dissoziation von [3 H]NMS von den Rezeptoren erfasst werden konnte. Da die Versuchsansätze alle zum gleichen Zeitpunkt filtriert wurden, wurde zu den vorinkubierten Ansätzen zu verschiedenen Zeitpunkten Atropinlösung gegeben, so dass bei gleichzeitiger Filtration aller Bohrungen mit den Versuchsansätzen ein „Dissoziationsverlauf“ erfassbar war. Die Zeitpunkte wurden so gewählt, dass sie dazu geeignet waren, einen Verlauf der Dissoziation vom Rezeptor angemessen zu beschreiben. In Tabelle 8 sind die Volumina und Konzentrationen der eingesetzten Lösungen für den Versuchsansatz zur Vorinkubation aufgeführt. In den durchgeführten Dissoziationsexperimenten wurde die Membransuspension vor dem Pipettieren in die Bohrungen separat so mit Aqua destillata (L 30) und Puffer verdünnt, dass in der resultierenden verdünnten Suspension die jeweilige Endkonzentration des eingesetzten Inkubationspuffers erreicht wurde. Die im Versuch eingesetzten Lösungen von Atropin und [3 H]NMS wurden vor Zugabe der Membransuspension ebenfalls so mit dem

entsprechenden Inkubationspuffer verdünnt, dass auch hier die resultierende Endkonzentration der Pufferbedingungen vorlag.

Volumen [μL]		Eingesetzte Lösung	Versuchsansatz	Eingesetzte Konzentration	Endkonzentration im Ansatz
10		^3H]NMS	alle	40 nM	2 nM
10		Aqua pro analysi (L 31)	Gesamtbindung		
		oder Atropin	Unspezifische Bindung	60 μM	3 μM
		oder Aqua pro analysi (L 31)	Dissoziationsverlauf		
30		Na, K, PO_4 -Puffer		8,3 mM	5 mM
		oder Mg-Tris-Puffer	alle	5/83 mM	3/50 mM
		oder Hepes-Puffer		16,7 mM	10 mM
150	100	Membransuspension	alle	q.s.	
		Na, K, PO_4 -Puffer		15 mM	5 mM
	50	oder Mg-Tris-Puffer	alle	9/150 mM	3/50 mM
		oder Hepes-Puffer		30 mM	10 mM
200		Gesamtvolumen			

Tabelle 8: Pipettierschema für den Versuchsansatz zur Vorinkubation bei der Erfassung des Dissoziationsverlaufes. Die untersuchte Membransuspension wurde vor dem Einpipettieren mit dem entsprechenden Reaktionspuffer so verdünnt, dass die verdünnte Suspension bereits vor dem Pipettieren im Inkubationspuffer in der jeweiligen Endkonzentration des Puffers vorlag (Verdünnung im Verhältnis 2:1 mit dreifach konzentrierter Pufferlösung, pro Versuchsansatz wurden 150 μL der verdünnten Membransuspension in die Bohrungen gegeben). Als Lösungsmittel wurde für alle eingesetzten Komponenten Aqua pro analysi (L 31) verwendet. Die verwendete Membransuspension wurde mit Aqua pro analysi (L 31) so verdünnt, dass ein auswertbares Signal der membrangebundenen Radioaktivität nach Filtration resultierte.

Nach der Vorinkubation wurden in jede Bohrung 200 μL der Startlösung gegeben, die eine Atropinlösung im jeweiligen Inkubationspuffer enthielt und die auf die entsprechende Reaktionstemperatur gekühlt oder erwärmt worden war. In Tabelle 9 sind die eingesetzten Volumina und Konzentrationen zum Ansatz der Startlösung aufgeführt.

Volumen [μL]	Eingesetzte Lösung	Versuchsansatz	Eingesetzte Konzentration	Endkonzentration im Versuch nach Zugabe zum vorinkubierten Ansatz
100	Aqua pro analysi (L 31)	Dissoziation		
100	Atropin in		12 μM	3 μM
	Na, K, PO_4 -Puffer		10 mM	5 mM
	oder Mg-Tris-Puffer	Dissoziation	6/100 mM	3/50 mM
	oder Hepes-Puffer		20 mM	10 mM
200	Gesamtvolumen			

Tabelle 9: Pipettierschema zum Ansatz der Startlösung, von der zu definierten Zeitpunkten 200 μL zum vorinkubierten Reaktionsansatz gegeben wurden.

Die Gesamtbindung und die unspezifische Bindung wurden dreifach bestimmt, die Bindung zu den verschiedenen Zeitpunkten der Dissoziation wurde zweifach ermittelt. Zur Beendigung der Reaktion wurden die Versuchsansätze wie unter II.3.3.2 beschrieben unter Verwendung des

Tomtec-Harvesters filtriert, die Auswertung erfolgte durch nichtlineare Regressionsanalyse nach Gleichung 27 mit Hilfe des Computerprogrammes GraphPad Prism[®]. Die so ermittelten Werte für die Dissoziationshalbwertszeit des Liganden [³H]NMS vom untersuchten Rezeptor wurden zur Berechnung der Startzeiten für Dissoziationsexperimente mit Zweipunkterfassung (II.3.2.1, II.3.3.6) verwendet.

II.3.3.6 Zweipunktdissoziationsexperimente

In Experimenten mit Zweipunkterfassung wurden die spezifische Bindung B_0 beim Start der Dissoziation von [³H]NMS vom Rezeptor und die spezifische Bindung B_t nach einer bestimmten Dissoziationszeit $t_{1/2\text{ off}}$ (siehe II.3.2.1) in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des allosterischen Modulators und als Kontrolle in dessen Abwesenheit ermittelt. Als Bindung zum Zeitpunkt B_0 als „Reaktionsstart“ wurde die Menge des gebundenen Radioliganden bestimmt, die nach 30-minütiger Vorinkubation der untersuchten Membransuspension mit dem Radioliganden [³H]NMS in einer resultierenden Endkonzentration von 2 nmol/L im Versuchsansatz in Abwesenheit des allosterischen Modulators vorlag. Bei einigen der untersuchten Membranen hatte die Reaktion der Anlagerung von [³H]NMS an die Rezeptorproteine nach 30 Minuten noch nicht Reaktionsgleichgewichtsbedingungen erreicht. Dies war jedoch nicht nötig, weil die Zugabe gleichzeitig zu allen Versuchsansätzen erfolgte und die Dissoziationsreaktion somit auch gleichzeitig nach 30-minütiger Vorinkubation „gestartet“ wurde. Da alle Versuchsansätze gleichzeitig abfiltriert wurden, wurde 30 Minuten vor Filtration die Membransuspension in die Versuchsansätze zur Bestimmung der Gesamtbindung B_0 sowie der unspezifischen Bindung U gegeben. Zur Ermittlung der Bindung zum Zeitpunkt B_t wurde die Membransuspension im entsprechenden Reaktionspuffer separat mit [³H]NMS in einer Konzentration von 2 nmol/L im Versuchsansatz 30 Minuten in einem Szintillationsgefäß (M 37, M 36) vorinkubiert. Die vorinkubierte Membransuspension wurde dann zum entsprechenden Zeitpunkt zügig mittels eines Multistepers (G 15, M 8) in Bohrungen einpipettiert, in denen unterschiedliche Konzentrationen des allosterischen Modulators oder destilliertes Wasser (L 31) als Kontrolle jeweils mit einem Überschuss an Atropin (Endkonzentration 3 $\mu\text{mol/L}$ im Versuchsansatz) vorlagen. Hierdurch erfolgte der „Start“ der „Dissoziationsreaktion“ durch Hemmung der Assoziation des Liganden [³H]NMS an den Rezeptor durch Atropin. Der Zeitpunkt der Zugabe war dabei so ausgewählt, dass zum Zeitpunkt der Filtration die erforderliche „Dissoziationszeit“, bzw. $t_{1/2\text{ off}}$ -Zeit verstrichen war (siehe Tabelle 10).

Rezeptor	$t_{1/2 \text{ off}}$ -Zeit der [^3H]NMS-Dissoziation [Minuten]			
	Na, K, P _i -Puffer 23°C	Mg-Tris-Puffer 23°C	Mg-Tris-Puffer 37°C	Hepes-Puffer 30°C
M ₂ wt	9	45	8	4
M ₅ wt	150	360	60	60
M ₂ ¹⁷⁵ Glu→Ala	n.d.	n.d.	n.d.	4
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	13	72	9	7
M ₂ ⁴²³ Thr→His	26	75	14	8
M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	n.d.	n.d.	n.d.	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	50	124	24	12
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	25	n.d.	n.d.	5
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	60	n.d.	n.d.	15
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	95	n.d.	n.d.	35
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Thr	n.d.	n.d.	n.d.	24
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Ala	n.d.	n.d.	n.d.	35
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²² Trp→Ala	n.d.	n.d.	n.d.	3

Tabelle 10: Übersicht über die für Zweipunktdissoziationsexperimente genutzten $t_{1/2 \text{ off}}$ -Zeiten. Die $t_{1/2 \text{ off}}$ -Zeit bezeichnet dasjenige Zeitintervall in Minuten, nach welchem die [^3H]NMS-Dissoziationsreaktion beendet wurde, um die verbleibende [^3H]NMS-Bindung zu bestimmen. Bei den mit n.d. bezeichneten Tabellenfeldern wurden die entsprechenden Versuche nicht durchgeführt.

Die Membransuspension wurde so mit Puffer verdünnt, dass sie zum Zeitpunkt des Startes der Anlagerung des Liganden [^3H]NMS an den Rezeptor schon in der entsprechenden Endkonzentration der Inkubationspuffer vorlag (siehe II.3.3.1), die Lösung des Liganden [^3H]NMS wurde vor der Zugabe zur Membransuspension analog mit den entsprechenden Pufferlösungen versetzt. Die Versuchsansätze, die unterschiedliche Konzentrationen des allosterischen Modulators, destilliertes Wasser (L 31) und jeweils Atropin enthielten, wurden ebenfalls mit den entsprechenden Pufferlösungen auf die resultierenden Endkonzentrationen der Inkubationsbedingungen eingestellt. Bei jedem Zugabeschritt einer bestimmten Lösung oder Suspension zum Versuchsansatz während des Dissoziationsexperimentes erfolgte also keine Änderung der jeweiligen Pufferbedingungen, bzw. der Ionenkonzentration der Inkubationspuffer. Alle Lösungen wurden vor Beginn der Reaktion auf die entsprechende Reaktionstemperatur erwärmt oder abgekühlt und während der Versuche im Wasserbad weiterhin bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. In Abbildung 7 ist die Abfolge der einzelnen Pipettierschritte bei Zweipunktdissoziationsexperimenten schematisch festgehalten.

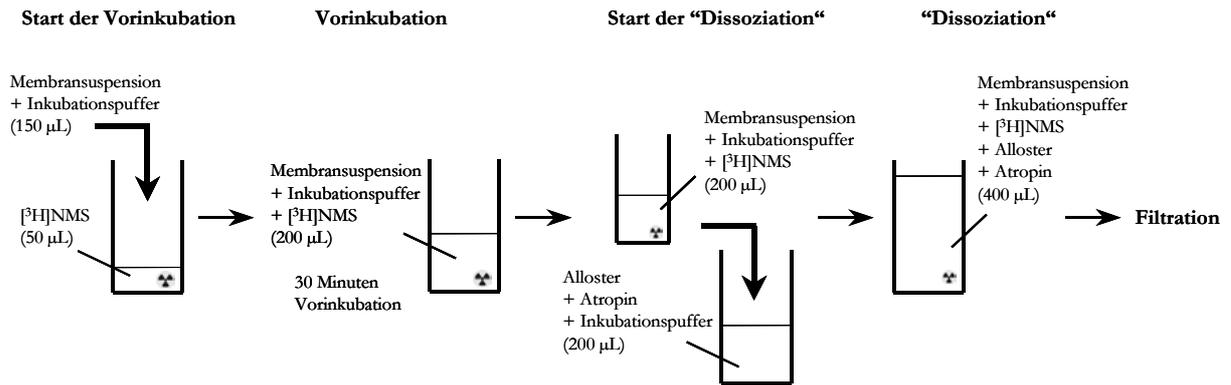


Abbildung 7: Schema der Abfolge der einzelnen Pipettierschritte bei der Durchführung von Zweipunkt-dissoziationsexperimenten. Die Membransuspension wird separat mit dem Radioliganden vorinkubiert und dann in 96-well-Mikrotiterplatten einpipettiert, in die in den einzelnen Bohrungen u.a. der allosterische Modulator in unterschiedlichen Konzentrationen, Atropin und Inkubationspuffer vorgelegt wurden.

Die Membransuspension wurde gemäß Tabelle 11, die die Zusammensetzung für jeweils einen einzelnen Versuchsansatz angibt, in ausreichender Menge für den gesamten Versuch verdünnt und mit dem entsprechenden Reaktionspuffer versetzt. Die Verdünnung der Membransuspension erfolgte mit jeweils dreifach konzentrierter Pufferlösung im Verhältnis 2:1.

Volumen [µL]	Eingesetzte Lösung	Versuchsansatz	Eingesetzte Konzentration	Endkonzentration im Ansatz
100	Membransuspension	alle	q.s.	
50	Na, K, PO ₄ -Puffer		15 mM	5 mM
	oder Mg-Tris-Puffer	alle	9/150 mM	3/50 mM
	oder Hepes-Puffer		30 mM	10 mM
150	Gesamtvolumen			

Tabelle 11: Zusammensetzung der verdünnten Membransuspension in Zweipunkt-dissoziationsexperimenten, die zum Ansatz zur 30-minütigen Vorinkubation vor dem Start der Dissoziation sowie zum Ansatz für die Bestimmung der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung 30 Minuten vor Filtration gegeben wurde. Als Lösungsmittel wurde für alle eingesetzten Komponenten Aqua pro analysi (L 31) verwendet. Die verwendete Membransuspension wurde mit Aqua pro analysi (L 31) so verdünnt, dass ein auswertbares Signal der membrangebundenen Radioaktivität nach Filtration resultierte

Die verdünnte Membransuspension wurde 30 Minuten vor der Filtration zu den Versuchsansätzen zur Bestimmung der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung gegeben. Tabelle 12 gibt die Konzentrationen und Volumina der Lösungen an, die in die Ansätze zur Ermittlung der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung vorgelegt wurden.

Volumen [μL]	Eingesetzte Lösung	Versuchsansatz	Eingesetzte Konzentration	Endkonzentration im Ansatz nach Zugabe der Membransuspension
10	[³ H]NMS	Gesamt + Unspezifisch	40 nM	2 nM
10	Aqua pro analysi (L 31)	Gesamtbindung		
	oder Atropin	Unspezifische Bindung	60 μM	3 μM
30	Na, K, PO ₄ -Puffer		8,3 mM	5 mM
	oder Mg-Tris-Puffer	Gesamt + Unspezifisch	5/83 mM	3/50 mM
	oder Hepes-Puffer		16,7 mM	10 mM
50	Gesamtvolumen			

Tabelle 12: Pipettierschema für die Versuchsansätze zur Bestimmung der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung in Zweipunktdissoziationsexperimenten, zu denen 30 Minuten vor Filtration 150 μL der verdünnten Membransuspension (Tabelle 11) gegeben wurden. Als Lösungsmittel wurde für alle eingesetzten Komponenten Aqua pro analysi (L 31) verwendet.

In die Versuchsansätze, die zur Bestimmung der spezifischen Bindung zum Zeitpunkt B_i in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen des allosterischen Modulators und destilliertem Wasser (L 31) als Kontrolle dienten, wurden die entsprechenden Lösungen wie in Tabelle 13 angegeben vorgelegt.

Volumen [μL]	Eingesetzte Lösung	Versuchsansatz	Eingesetzte Konzentration	Endkonzentration im Ansatz nach Zugabe der Membransuspension
100	Allosterischer Modulator	Dissoziation	$1,2 \times 10^{-x}$ M	$3 \times 10^{-x+1}$ M
			4×10^{-x} M	1×10^{-x} M
	oder Aqua pro analysi (L 31)	Kontrolle		
100	Atropin in		12 μM	3 μM
	Na, K, PO ₄ -Puffer	Kontrolle +	10 mM	5 mM
	oder Mg-Tris-Puffer	Dissoziation	6/100 mM	3/50 mM
	oder Hepes-Puffer		20 mM	10 mM
200	Gesamtvolumen			

Tabelle 13: Pipettierschema im Zweipunktissoziationsexperiment für die Versuchsansätze zur Bestimmung der spezifischen Bindung zum Zeitpunkt B_i in An- und Abwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen ($1,2 \times 10^{-x}$ M oder 4×10^{-x} M) des allosterischen Modulators. Zu den einzelnen Versuchsansätzen wurden jeweils 200 μL der mit dem Radioliganden vorinkubierten Membransuspension (siehe Tabelle 12) zum „Start“ der Dissoziationsreaktion gegeben. Als Lösungsmittel wurde für alle eingesetzten Komponenten Aqua pro analysi (L 31) verwendet.

Die verdünnte Membransuspension wurde vor dem „Start“ der Dissoziationsreaktion 30 Minuten mit [³H]NMS im entsprechenden Inkubationspuffer vorinkubiert. Dabei wurde die benötigte Menge an [³H]NMS und Pufferlösung nach Tabelle 14 berechnet, die die Konzentrationen und Volumina der benötigten Lösungen für einen einzelnen Versuchsansatz angibt. Nach der Berechnung der benötigten Mengen für den gesamten Versuch wurden die

entsprechenden Lösungen in einem Reaktionsgefäß (M 37) vorgelegt und zum Start der Anlagerung mit der verdünnten Membransuspension versetzt.

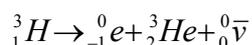
Volumen [μL]		Eingesetzte Lösung	Versuchsansatz	Eingesetzte Konzentration	Endkonzentration im Ansatz
10		$[^3\text{H}]\text{NMS}$	Kontrolle +	40 nM	2 nM
10		Aqua pro analysi (L 31)	Dissoziation		
30		Na, K, PO_4 -Puffer	Kontrolle +	8,3 mM	5 mM
		oder Mg-Tris-Puffer	Dissoziation	5/83 mM	3/50 mM
		oder Hepes-Puffer		16,7 mM	10 mM
150	100	Membransuspension		q.s.	
		Na, K, PO_4 -Puffer	Kontrolle +	15 mM	5 mM
	50	oder Mg-Tris-Puffer	Dissoziation	9/150 mM	3/50 mM
		oder Hepes-Puffer		30 mM	10 mM
200		Gesamtvolumen			

Tabelle 14: Versuchsansatz zur 30-minütigen Vorinkubation der Membransuspension: die für den Versuch benötigte Menge an $[^3\text{H}]\text{NMS}$, destilliertem Wasser (L 31) und Reaktionspuffer wurden in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und durch Zugabe der verdünnten Membransuspension wurde die Vorinkubation gestartet. Hier aufgeführt sind die Mengen für jede einzelne Bohrung, die für den Versuch benötigte Gesamtmenge wurde jedoch in einem einzigen Gefäß (M 36, M 37) vorinkubiert. Als Lösungsmittel wurde für alle eingesetzten Komponenten Aqua pro analysi (L 31) verwendet. Die verwendete Membransuspension wurde mit Aqua pro analysi (L 31) so verdünnt, dass ein auswertbares Signal der membrangebundenen Radioaktivität nach Filtration resultierte

Nach 30 Minuten Vorinkubation wurde die Lösung zu den Versuchsansätzen gegeben, in denen Atropin, allosterischer Modulator oder destilliertes Wasser (L 31) nach Tabelle 13 vorgelegt worden waren. Die Dissoziationsreaktion wurde durch Filtration zum entsprechenden Zeitpunkt mittels eines Tomtec-Harvesters wie unter II.3.3.2 beschrieben beendet. Die Auswertung der Bindungsdaten erfolgte wie unter II.3.2.1 beschrieben.

II.3.3.7 Szintillationsmethoden

Der in dieser Arbeit eingesetzte Ligand N-Methylscopolamin (Strukturformel unter II.6.1.1) war durch das Einbringen von Tritium ($[^3\text{H}]$) an Stelle eines üblichen Wasserstoffatoms in der N-ständigen Methylgruppe radioaktiv markiert. Der Atomkern des Elementes Tritium besteht aus einem Neutron und zwei Protonen und zerfällt unter β^- -Zerfall. Dabei wandelt sich eines der Neutronen unter Aussendung eines Elektrons, eines Elektron-Antineutrinos und unter Energiefreisetzung in ein Proton um, aus dem Element Tritium wird Helium. Die radioaktive Zerfallsgleichung für Tritium ist in Gleichung 34 wiedergegeben.



Gleichung 34

Das dabei emittierte Elektron kann durch Szintillation detektiert werden. Bei der Flüssigszintillation wird die kinetische Energie des ausgesendeten Elektrons auf Lösungsmittelmoleküle übertragen, diese gehen in einen angeregten Zustand über und übertragen

diese Energie wiederum auf Fluorophore, die vom energetisch angeregten Zustand unter Aussendung von Photonen in den Grundzustand zurückkehren. Das emittierte Licht kann durch einen Photomultiplier in elektrische Impulse umgewandelt werden und so detektiert werden. Bei der Feststoffsintillation erregt das ausgesendete Elektron direkt ein Molekül eines festen Szintillators, ohne vorher Lösungsmittelmoleküle zu erregen. Dieser kehrt wiederum unter Aussendung von Photonen in den Grundzustand zurück. In dieser Arbeit kamen sowohl die Flüssig- als auch die Feststoffsintillation zum Einsatz.

Die Flüssigsintillation wurde zur Messung der membrangebundenen Aktivität an ausgestanzten Filterstücken nach Filtration mit dem Brandel-Harvester (siehe II.3.3.2) und bei der direkten Vermessung radioaktiver Lösungen verwendet. Als Szintillator diente dabei Ready Protein Liquid Scintillation Cocktail (R 42), von dem jeweils 5 mL zu den Proben gegeben wurden. Die Messung der Proben fand in einem Zählgerät der Firma Beckman (G 40, G 41) statt.

Die nach Filtration mit dem Tomtec-Harvester (siehe II.3.3.2) auf Filtermatten zurückgebliebene Radioaktivität wurde mit Hilfe eines Feststoffsintillators (M 18) detektiert. Dieser Szintillator mit wachsartiger Konsistenz wurde durch Aufschmelzen auf einem Heizblock (G 19) auf die Filtermatten aufgebracht und anschließend in einem Zählgerät der Firma Wallac (G 50) vermessen. Die Effektivität der Feststoffsintillationszählung wurde von Voigtländer (Voigtländer, Dissertationsschrift 2003) untersucht. Diese beträgt 34%, das heißt, die bei dieser Meßmethode registrierten Zerfallsereignisse (angegeben als counts per minute: cpm) müssen mit dem Faktor 2,9 multipliziert werden, um die Zahl der tatsächlichen Zerfallsereignisse (decays per minute: dpm) zu erhalten.

II.3.3.8 Berechnung der Konzentration des eingesetzten Radioliganden

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der radioaktiv markierte orthosterische Ligand [³H]N-Methylscopolamin (Struktur siehe II.6.1.1) mit einer spezifischen Aktivität von 81-82 Ci/mmol eingesetzt. Die Aktivität eines Stoffes gibt die Anzahl der Kernzerfälle in einer bestimmten Zeitspanne an.

Es gilt:

$$1 \cdot Ci = 3,7 \cdot 10^{10} Bq$$

Gleichung 35

Die Aktivitätseinheit Curie (Ci) kann nach Gleichung 35 auch in Bequerel (Bq) umgerechnet werden. Dabei entspricht die Aktivität von 1 Bq einem Zerfall pro Sekunde. Dadurch ergibt sich für die Maßeinheit dpm (decays per minute):

$$1 \cdot Ci = 2,22 \cdot 10^{12} \text{ dpm}$$

Gleichung 36

Die Konzentration eines radioaktiv markierten Moleküls in einer Probe lässt sich bei Kenntnis der spezifischen Aktivität des eingesetzten Radioliganden nach Messung der Aktivität der Probe berechnen. Die molare Menge ergibt sich aus dem Quotienten aus der gemessenen Aktivität (Zerfallsereignisse) und der spezifischen Aktivität (Zerfallsereignisse/mol), damit folgt für die Konzentration einer Probe:

$$c[\text{nmol/L}] = \frac{\text{dpm}}{\text{Spez. Aktivität}[\text{Ci/mol}] \cdot 2220[\text{dpm/nCi}] \cdot V[\text{mL}]}$$

Gleichung 37

mit:

dpm: Anzahl der Zerfallsereignisse pro Minute
V: Volumen der Probe in mL

II.3.3.9 Silanisierung von Probengefäßen

Das Verfahren der Silanisierung dient der Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit von Versuchsgefäßen. Das dafür eingesetzte Reagenz Sigmacote® (R 45) besteht aus einer Lösung von chlorierten Organopolysiloxanen in Heptan. Das Reagenz reagiert mit Silanolgruppen und Wassermolekülen auf Glasoberflächen, auf denen dadurch ein dünner hydrophober Film entsteht. Die dabei ablaufende Reaktion ist schematisch in Abbildung 8 dargestellt.

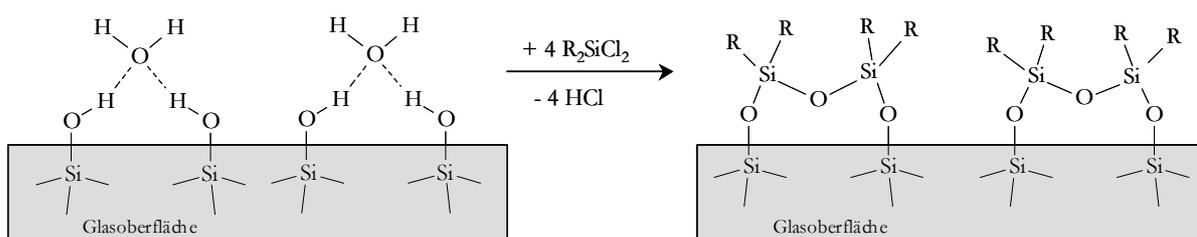


Abbildung 8: Schematischer Reaktionsablauf bei der Silanisierung von Glasoberflächen mit Organochlorsilanen. In Silanolgruppen oder in Wasserfilmen auf der Oberfläche vorhandene Hydroxylgruppen reagieren als Nucleophile mit den eingesetzten Silanen unter Abspaltung von Salzsäure.

Das eigentlich für Glasoberflächen entwickelte Verfahren wurde im Rahmen von Radioligandbindungsstudien auch zur Behandlung von Polypropylenoberflächen angewandt (Duda-Johner, Dissertationsschrift 2002; Raasch, Dissertationsschrift 2003; siehe auch VI.2.2). Die Lösung des verwendeten Reagenzes Sigmacote (R 45) wurde mit Hilfe einer Plastik-Pipette in die Bohrungen der Polypropylengefäße (M 1) gegeben, nach Benetzung der Oberfläche wurde der Überstand abgenommen und für weitere Bohrungen verwendet. Nach dem Trocknen an der

Luft wurden die Gefäße mit destilliertem Wasser (L 30) ausgewaschen. Dieses diente einerseits der Inaktivierung von überschüssigem Reagenz, andererseits der Entfernung der bei der Reaktion entstandenen Salzsäure. Anschließend wurden die Gefäße im Trockenschrank bei 60°C getrocknet.

II.4 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD

Die Bestimmung des Proteingehaltes der Membransuspensionen erfolgte mittels der Methode nach Bradford. Dieses colorimetrische Verfahren beruht auf der photometrischen Quantifizierung der Bindung eines blauen Säurefarbstoffes (Coomassie-Brilliant-Blau) an Proteine in saurer Lösung. Bradford-Reagenz enthält diesen Farbstoff in einer phosphorsäurehaltigen ethanolischen Lösung. Der Farbstoff bindet unspezifisch an kationische und unpolare Seitenketten der Proteine, dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum von einer Wellenlänge von 465 nm zu einer Wellenlänge von 595 nm. Durch colorimetrische Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm kann so die Menge der an den Farbstoff gebundenen Proteine ermittelt werden.

Für die Bestimmung wurde das im Kühlschrank gelagerte Bradford-Reagenz (R 8) einige Stunden vor der eigentlichen Proteinbestimmung aus dem Kühlschrank genommen, um eine Erwärmung des Reagenzes auf Raumtemperatur zu ermöglichen. Eine Eichgerade wurde mit einer wässrigen Lösung von humanem Serumalbumin (R 23) erstellt. Dafür wurden zur Herstellung einer Stammlösung 30 mg humanes Serumalbumin (R 23) in 15 mL Aqua pro analysi (L 31) gelöst und gemäß Tabelle 15 in Eppendorf-Caps zur Herstellung einer Eichreihe mit Lösungen unterschiedlicher Konzentration gegeben.

Menge der eingesetzten Standardlösung (c = 2 mg/L) [mL]	Menge des Zusatzes von destilliertem Wasser (L 31) [mL]	Resultierende Endkonzentration der Lösung [mg/mL]
0	1	0
0,125	0,875	0,25
0,25	0,75	0,5
0,375	0,625	0,75
0,5	0,5	1
0,75	0,25	1,5

Tabelle 15: Pipettierschema zur Herstellung der Lösungen zur Erstellung einer Eichgeraden zur Proteinbestimmung nach Bradford.

Da der Proteingehalt der untersuchten Membransuspensionen sehr gering war, wurden diese zur Bestimmung unverdünnt eingesetzt. Es wurden jeweils 2 x 100 µl der Lösungen zur Erstellung der Eichgeraden oder 2 x 100 µl der untersuchten Membransuspension in Borosilikat-Gläser (M 9) gegeben, mit 3 mL Bradford-Reagenz versetzt (siehe Tabelle 16) und nach kurzem Umschütteln 5 bis 45 Minuten lang inkubiert.

Volumen [μL]	Eingesetzte Lösung	Versuchsansatz
100	verdünnte Standardlösung	Eichgerade
	oder Membransuspension	Probe
3000	Bradford-Reagenz	alle
3100	Gesamtvolumen	

Tabelle 16: Pipettierschema zur Beschickung der Reagenzgläser bei der Proteinbestimmung nach Bradford zur Vermessung im Photometer bei 595 nm nach 5-45-minütiger Inkubationszeit.

Die Proben zur Erstellung der Eichgerade, sowie die Proben der Membransuspensionen wurden zügig bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer (G 4) vermessen. Mit Hilfe der Eichgerade wurden die Proteinkonzentrationen der untersuchten Membransuspensionen ermittelt.

II.5 STATISTISCHE METHODEN

Bei der Durchführung der Radioligandbindungsstudien wurde in den meisten Fällen die membrangebundene Radioaktivität als Variable in Abhängigkeit bestimmter Konzentrationen eines allosterischen und/oder orthosterischen Modulators untersucht. Die Verteilung der Daten ist dabei nicht symmetrisch. Bei Werten einer Sättigungsfunktion, die sich durch die Vier-Parameter-logistische-Gleichung (siehe Gleichung 17) beschreiben lassen, folgen die Parameter $EC_{0,5}$ und n einer asymmetrischen Häufigkeitsverteilung, ebenso gilt dies für die mit der Gleichung nach Ehlert (siehe Gleichung 22) ermittelten Parameter K_A und α (Christopoulos, 1998). Ein Häufigkeitsdiagramm der logarithmierten Werte ergibt eine symmetrische Verteilung entsprechend einer Gaußschen Normalverteilung. Zum Vergleich der Lageparameter der Meßwerte unterschiedlicher Datensätze statistische Verfahren genutzt, die auf der Annahme beruhen, dass die Häufigkeitsverteilung der betrachteten Grundgesamtheit einer Gaußschen Normalverteilung entspricht.

Der arithmetische Mittelwert wurde nach folgender Gleichung (Gleichung 38) berechnet:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Gleichung 38

Als Streuungsmaß, das die Abweichungen der Messwerte vom Mittelwert angibt, dient die Varianz, die die mittlere quadratische Abweichung der Messwerte vom Mittelwert angibt:

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

Gleichung 39

Die Varianz hat eine quadratische Dimension, deshalb wird die Wurzel der Varianz gezogen, um ein Streuungsmaß mit gleicher Dimension wie die Messwerte zu erhalten, dieses ist die Standardabweichung:

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

Gleichung 40

Der empirische Mittelwert wird aus Messwerten ermittelt, die zufällig in die untersuchte Stichprobe gelangen, das heißt, bei erneuter Messung einer weiteren Stichprobe würden die empirischen Mittelwerte voneinander abweichen. Die Variabilität dieser Mittelwerte wird durch den Standardfehler des Mittelwertes beschrieben. Der Standardfehler entspricht der erwarteten Streuung der empirischen Mittelwerte um den wahren Mittelwert, er lässt sich durch folgende Gleichung (Gleichung 41) aus einer Stichprobe schätzen:

$$s_x = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Gleichung 41

Der Standardfehler macht die gemessene Streuung (Standardabweichung) von zwei Datensätzen mit unterschiedlichem Stichprobenumfang vergleichbar, indem er die Standardabweichung normiert. Die Mittelwerte zweier Datensätze wurden mit Hilfe des ungepaarten t-Tests untersucht. Dieser parametrische Test geht davon aus, dass die Werte der Datensätze jeweils normalverteilt sind und die gleiche Standardabweichung besitzen. Der t-Test testet die Nullhypothese, dass zwei Meßreihen aus der gleichen Verteilung stammen, dabei werden die Mittelwerte zweier Messreihen im Verhältnis zur Standardabweichung verglichen.

Der t-Wert berechnet sich wie folgt:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{s^2}{n_1} + \frac{s^2}{n_2}}}$$

Gleichung 42

Dabei bezeichnet s^2 die gepoolte Varianz, die sich aus den empirischen Varianzen s_1^2 und s_2^2 der beiden Meßreihen ergibt:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Gleichung 43

Aus dem t-Wert lässt sich die Wahrscheinlichkeit, eine wahre Nullhypothese irrtümlich abzulehnen, der sogenannte p-Wert, mit Hilfe von Tabellenwerken oder Computerprogrammen ermitteln. Soweit nicht anders angegeben erfolgte der Vergleich unterschiedlicher Datensätze in

dieser Arbeit mittels eines t-Tests mit Hilfe des Computerprogrammes GraphPad InStat[®] mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ($p = 0,05$).

Zur Überprüfung der Variabilität zweier Meßreihen werden die Varianzen der Messreihen miteinander verglichen. Die F-Verteilung beschreibt den Quotienten der Varianzen zweier unabhängiger Stichproben:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Gleichung 44

Mit entsprechenden Tabellenwerken und Computerprogrammen lässt sich wiederum ein dem berechneten F-Wert zugehöriger p-Wert ermitteln, der angibt, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Nullhypothese, dass die beiden Messreihen sich bezüglich der Varianzen signifikant unterscheiden, irrtümlicherweise abgelehnt wird.

Bei der Datenanalyse im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels eines F-Testes mit Hilfe des Computerprogrammes Graphpad Prism[®] ermittelt, welches von zwei Modellen zur Kurvenanpassung besser die ermittelten Daten beschreiben konnte (Motulsky, 2003). Dabei ergibt sich die Anzahl der Freiheitsgrade (df) des jeweiligen Modells aus der Differenz der Anzahl der Messpunkte n und der Variablen v der entsprechenden Gleichung:

$$df = n - v$$

Gleichung 45

Für jedes Modell lässt sich berechnen, welche Differenz zwischen dem experimentell ermittelten Wert Y und dem durch die jeweilige Gleichung beschriebenen Wert R liegt und die Summe der Fehlerquadrate SS dieser Differenz berechnen. Die Fehlerquadrate und die unterschiedlichen Freiheitsgrade der Modelle a und b lassen sich zueinander in ein Verhältnis setzen:

$$F = \frac{(SS_a - SS_b)/SS_b}{(df_a - df_b)/df_b}$$

Gleichung 46

Ist das einfachere Modell a mit der höheren Anzahl an Freiheitsgraden korrekt, so ergibt sich ein F-Wert von 1. Für F-Werte, die größer als der Wert 1 sind, lässt sich die Wahrscheinlichkeit ermitteln, mit der das komplexere Modell b zutrifft. Auch diese Analyse wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% durchgeführt.

II.6 STRUKTURFORMELN VERWENDETER SUBSTANZEN

II.6.1 Antagonisten an der orthosterischen Bindungsstelle

II.6.1.1 N-Methylscopolamin

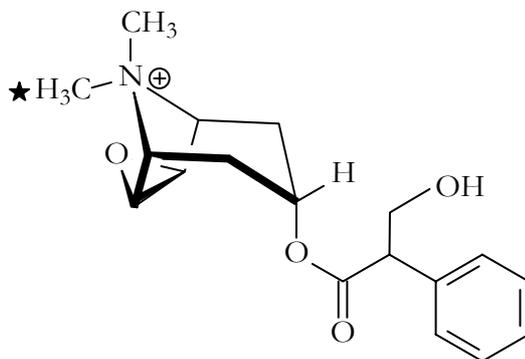


Abbildung 9: Strukturformel von N-Methylscopolamin.

(-)-N-Methylscopolaminbromid (R 1)

Als nicht markierter Ligand an der orthosterischen Bindungsstelle wurde (-)-N-Methylscopolaminbromid eingesetzt:

Summenformel:	$C_{18}H_{24}NO_4 \cdot Br$
Molekulargewicht:	398,3 g/mol
CAS-Nr.:	155-41-9
Lieferant:	Sigma (S8502)

[³H]N-Methylscopolaminchlorid (R 2)

Als radioaktiv markierter Ligand an der orthosterischen Bindungsstelle wurde [³H]N-Methylscopolaminchlorid eingesetzt, die Position der radioaktiven Markierung ist in der Abbildung der Strukturformel von N-Methylscopolamin (Abbildung 9) durch das Symbol ★ gekennzeichnet. Die spezifische Aktivität betrug 81–82 Ci/mmol. Die Substanz wurde in ethanolischer Lösung geliefert.

Summenformel:	$C_{18}H_{24}NO_4 \cdot Cl$
Molekulargewicht:	353,8 g/mol
CAS-Nr.:	10459-99-1
Lieferant:	PerkinElmer (NET636001MC)

II.6.1.2 Atropin

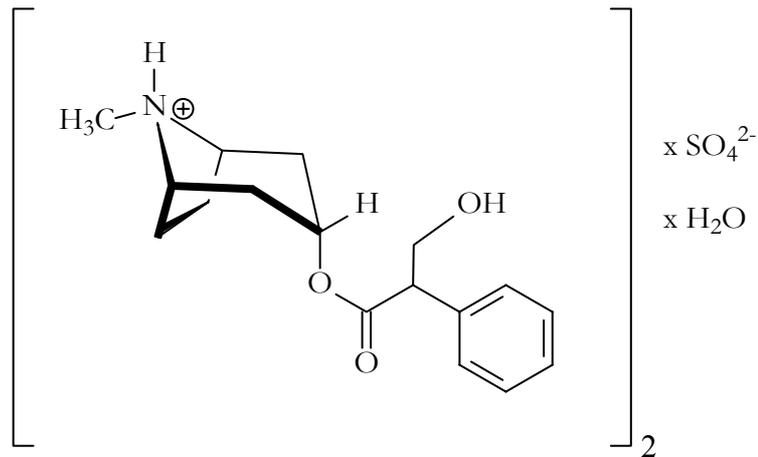


Abbildung 10: Strukturformel von Atropinsulfat (R 7).

Summenformel: $(C_{17}H_{23}NO_3)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot H_2O$
Molekulargewicht: 694,83 g/mol
CAS-Nr.: 5908-99-6
Lieferant: Sigma (A0257)

II.6.2 Allosterische Modulatoren

II.6.2.1 W84

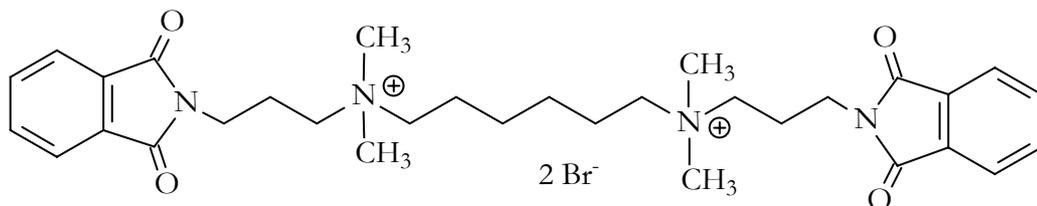


Abbildung 11: Strukturformel der Substanz W84-Bromid.

Summenformel: $C_{32}H_{44}N_4O_4 \cdot 2 Br$
Molekulargewicht: 708,5 g/mol
CAS-Nr.: 21093-51-6
Lieferant: Pharmakologisches Institut der Universität
 Kiel (Dr. Pfeffer)

II.6.2.2 Gallamin

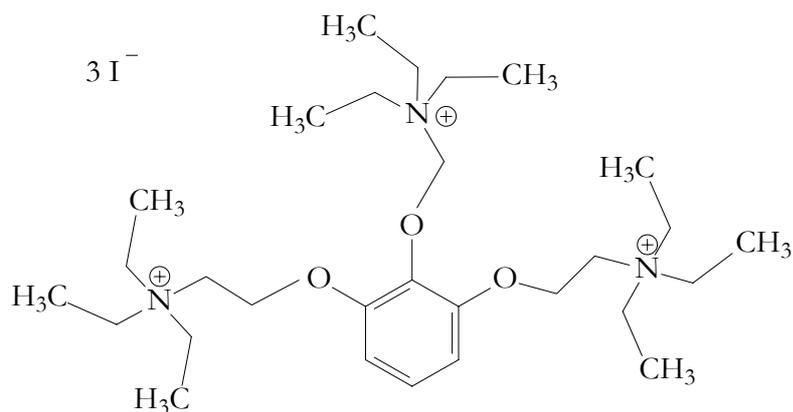


Abbildung 12: Strukturformel der Substanz Gallamintriiodid (R 17).

Summenformel:	$C_{30}H_{60}N_3O_3 \cdot 3 I$
Molekulargewicht:	891,5 g/mol
CAS-Nr.:	65-29-2
Lieferant:	Sigma-Aldrich (G-8134)

II.6.2.3 Alcuronium

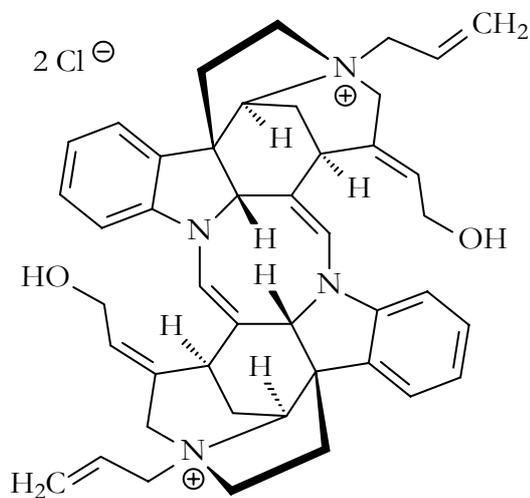


Abbildung 13: Strukturformel der Substanz Alcuroniumchlorid.

Summenformel:	$C_{44}H_{50}N_4O_2 \cdot 2 Cl$
Molekulargewicht:	737,79 g/mol
CAS-Nr.:	15180-03-7
Lieferant:	Hoffmann La Roche

II.6.2.4 Diallylcaracurin (CARALL)

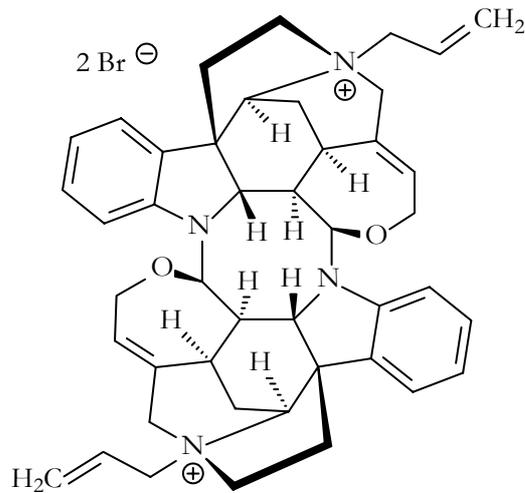


Abbildung 14: Strukturformel der Substanz Diallylcaracurin.

Summenformel:	$C_{44}H_{50}N_4O_2 \cdot 2 Br$
Molekulargewicht:	826,71 g/mol
CAS-Nr.:	326894-86-4
Lieferant:	Arbeitskreis Prof. Dr. Holzgrabe

II.6.2.5 CARBEM

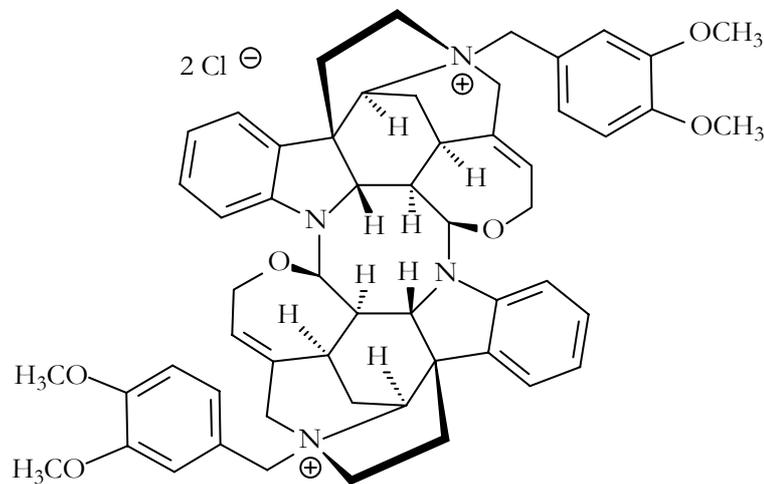


Abbildung 15: Strukturformel der Substanz CARBEM.

Summenformel:	$C_{56}H_{62}N_4O_6 \cdot 2 Cl$
Molekulargewicht:	958,04 g/mol
CAS-Nr.:	326894-93-3
Lieferant:	Arbeitskreis Prof. Dr. Holzgrabe

II.6.2.6 Naphmethonium (MM3A)

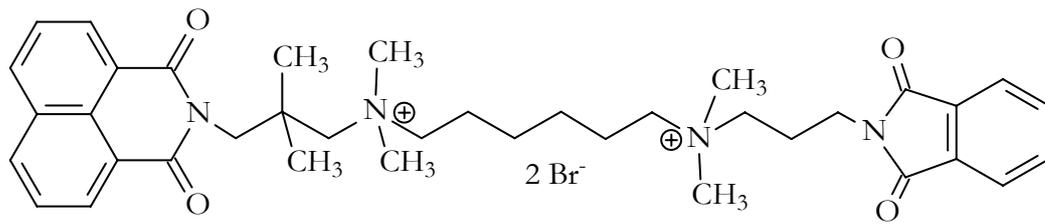


Abbildung 16: Strukturformel der Substanz Naphmethonium.

Summenformel: $C_{38}H_{50}N_4O_6 \cdot 2 Br$
Molekulargewicht: 786,65 g/mol
CAS-Nr.: 505059-23-4
Lieferant: Arbeitskreis Prof. Dr. Holzgrabe

II.7 MATERIALIEN

Material	Artikel-Nummer	Hersteller
M 1 1,2 mL 96-well storage plate	AB-0564	Abgene
M 2 Beckman Zentrifugengläser 500 mL	361691	Beckman Instruments
M 3 Blue Graduated Pipette Tips 101 – 1000 µL	S1111-2021	Starlab
M 4 Braun Injekt 20 mL Luer-lock	4606205V	Braun
M 5 Centrifuge Tubes 500 mL	361691	Beckman Instruments
M 6 Eppendorf-Caps: 1,5 mL-PP-Reaktionsgefäß	616201	Greiner
M 7 Falcon tubes 2059: Polypropylene Round-Bottom Tube 17 x 100 mm	352059	BD
M 8 Finntip Stepper: 0,5 mL; 1,25 mL; 2,5 mL; 5,0 mL; 12,5 mL		Thermo Labsystems
M 9 Fisherbrand Kulturröhrchen 16 x 100 mm, Borosilikatglas	FB 51330	Fisher
M 10 Flasche G16 klar	300140	CS
M 11 Gewebekulturschale 100/20 mm steril mit Nocken		Greiner
M 12 Gewebekulturschale steril mit Nocken 145/20 mm	6392160	Greiner
M 13 Glas-Pasteurpipetten ~150 mm	747715	Brand
M 14 Glass fibre filter 90 x 120 mm	1450-421	Wallac
M 15 Haemocytometer Deckgläser plangeschliffen 20 x 25 mm		Marienfeld
M 16 Kanülen gelb, Sterican 0,9 x 70 mm	4665791	Braun
M 17 Kryovials: Cryo.s		Greiner
M 18 MeltiLex™ A Melt-on Scintillator Sheets 73 x 109 mm, 4 g	1450-441	Wallac
M 19 Meßkolben, diverse Größen		Brand
M 20 Meßzylinder 100 mL, 500 mL, 1 L		Witeg
M 21 MicroAmp® 0,2 mL Reaction Tubes with caps	N801-0540	Applied Biosystems
M 22 Nalgene 50 mm Bottle Top Filter 150 mL 0,2 µM	290-4520	IDL
M 23 Nalgene® Zentrifugengläser 50 mL	3138-0050	Nalge
M 24 Parafilm	PM-996	Pechiney
M 25 Plastikpipette 10 mL	4488	Corning
M 26 Plastikpipette 25 mL	760180	Greiner
M 27 PP-Röhrchen, steril 15 mL, 17,0/120 mm	188271	Greiner
M 28 PP-test tube 50 mL	227261	Greiner
M 29 Präzisions-Küvetten aus Quarzglas Suprasil®, Schichtdicke 10,00 mm	100B-QS	Hellma
M 30 Qualilab® Spritzenvorsatzfilter 0,22 µM CM Membran	5122110	Merck
M 31 Quiagen Plasmid Maxi Kit, enthält QUIAGEN-tip 500, Puffer P1, P2, P3, QBT, QC, QF, RNase A (100 mg/mL)	12162	Quiagen
M 32 Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit	200519	Stratagene

Material	Artikel-Nummer	Hersteller
M 33 Sample Bag max. size 90x120 mm	1450-432	Perkin Elmer
M 34 Schale 94/16 steril	633161	Greiner
M 35 Schraubkappe G16-E	300332	CS
M 36 Schraubverschluß, weiß 27 mm		Greiner
M 37 Szintillationsflasche 27,0/60,0mm	619301	Greiner
M 38 Tip Alufolie 30 m		Tip
M 39 Vakuumpumpenöl		Vacuubrand
M 40 Weiße Pipettenspitzen 0,5 – 5 mL		Brand
M 41 Whatman-Filter GF/B	FBP 148L	Adi
M 42 Yellow Pipette Tips 1 – 100 µL	S1111-0006	Starlab
M 43 Zellschaber 25 cm	83.1830	Sarstedt

II.8 GERÄTE

Gerät	Artikel-Nummer	Hersteller
G 1 -86C ULT Freezer	984	Thermo Forma
G 2 Accu-Jet		Brand
G 3 Avanti J-20XP Zentrifuge	AV-J20XP	Beckman Coulter
G 4 Beckman Spectrophotometer	DU 640	Beckman Instruments
G 5 Bosch Mikrowelle 600 Watt		Bosch
G 6 Brandel Cell Harvester 48 well	MB-48L	Biomedical
G 7 Drehschieber Vakuumpumpe	RE 16	Vacuubrand
G 8 Drehzahlregler PCU 85/EU	SI 10AF	Kinematica
G 9 Electrolux MF 120	991.7940.10	Dometic
G 10 Electrolux ML 150	991.7841.10	Dometic
G 11 Electrolux ML 300C	991.7860.10	Dometic
G 12 Elix Millipore	ZLXS5005Y	Millipore
G 13 Elix Milli-Q Biocel	ZMQS50FT1	Millipore
G 14 Eppendorf Centrifuge 5417C		Eppendorf
G 15 Finnpipette Multistepper 1250 µL	4540500	Thermo LabSystems
G 16 Finntip Pipette Digital, diverse Größen		Thermo LabSystems
G 17 GeneAmp PCR System 2400	N8030002	Perkin Elmer
G 18 Heidolph MR1000 Magnetrührer		Heidolph
G 19 Heizblock: Driblock	DB-2A	Techne
G 20 Heraeus Kelvitron® t	B6060	Kendro
G 21 Herasafe Werkbank HS15 Klasse II A	50072440	Kendro
G 22 Julabo Cryo-Compact-Thermostat	F30-C	Julabo
G 23 Julabo TW 12		Julabo
G 24 Membran-Vakuumpumpe MZ2C		Vacuubrand
G 25 Mettler Toledo AG285, AG204, PB406-S, B2002-S, PB1502-S		Mettler
G 26 Mikroskop Zeiss Axiovert 25	667484	Zeiss
G 27 Mikrowelle (Tomtec)	R-611	Sharp
G 28 Millipore Biocel A10 (Iso)		Millipore
G 29 Millipore Elix (Iso)		Millipore
G 30 MS1 Minishaker		IKA
G 31 Neubauer-improved Zählkammer		Marienfeld
G 32 pH-Elektrode SenTix 41		WTW
G 33 pH-Meter pH523		WTW

Gerät	Artikel-Nummer	Hersteller
G 34 Polytron-Homogenisator PT 10/35	911006	Kinematica
G 35 PP-Röhrchen, steril 15 mL, 17,0/120 mm	188271	Greiner
G 36 Schüttelwasserbad	GFL 1083	GFL
G 37 Scotsman AF 100	AS-E 230/50/1	Frimont
G 38 Series II Water Jacketed CO ₂ Incubator	3221	Thermo Forma
G 39 Stickstoff-Tank	681-012-U2	Taylor-Wharton
G 40 Szintillationsmeßgerät LS-6000 SC		Beckman Coulter
G 41 Szintillationsmeßgerät LS-6500		Beckman Coulter
G 42 Thermo Forma Orbital Shaker		Thermo Forma
G 43 Tomtec Harvester 96 MACH 3		Tomtec
G 44 Ultrospec 3300 pro	80-2112-33	Biochrom
G 45 Vakuum-Pumpsystem	BVC 21	Vacuubrand
G 46 Varioklav Dampfsterilisator 135 S		H+P
G 47 VarioMag Electronicrührer	30102	H+P
G 48 VarioMag Electronicrührer Monotherm	60100	H+P
G 49 Vortex-Genie 2	G560E	Scientific
G 50 Wallac 1450 Microbeta Liquid Scintillation & Luminescence Counter		Perkin Elmer

II.9 REAGENZIEN

Reagenz	Artikel-Nummer	Hersteller
R 1 (-)-N-Methylscopolaminbromid, C ₁₈ H ₂₄ NO ₄ x Br ⁻ (Mr = 398,3 g/mol)	S8502	Sigma
R 2 [³ H]N-Methylscopolaminchlorid, C ₁₈ H ₂₄ NO ₄ x Cl ⁻ (Mr = 353,8 g/mol), 81–82 Ci/mmol	NET636001MC	Perkin Elmer
R 3 2-Propanol	UN 1219	ZVE
R 4 2-Propanol ultrarein, C ₃ H ₈ O (Mr = 60,1 g/mol)	59304	Fluka
R 5 Ampicillin-Na, C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ Sna (Mr = 371,4 g/mol)	A9518	Sigma
R 6 Aqua pro analysi, H ₂ O (Mr = 18,02 g/mol)	1.16754.5000	Merck
R 7 Atropinsulfat, (C ₁₇ H ₂₃ NO ₃) ₂ x H ₂ SO ₄ (Mr = 676,8 g/mol)	A0257	Sigma
R 8 Bradford Reagent	B6916	Sigma
R 9 D(+)-Glucose-Monohydrat, C ₆ H ₁₂ O ₆ x H ₂ O (Mr = 198,17 g/mol)	109346	Merck
R 10 Dimethylsulfoxid (DMSO), C ₂ H ₆ OS (Mr = 78,13 g/mol)	D5879	Sigma
R 11 Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (Mr = 177,99 g/mol)	1.06580.1000	Merck
R 12 Dulbecco's modified eagle's medium – high glucose (DMEM), enthält 4500 mg/L Glucose, L-Glutamin, Natriumbicarbonat	D5796	Sigma
R 13 Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS), Pulver zur Herstellung von 1 L Puffer	D5652	Sigma
R 14 Ethanol, C ₂ H ₆ O (Mr = 46,07 g/mol), Rotipuran [®] ≥ 99,8% p.a.	9065.2	Roth
R 15 Ethylendiamintetraaminessigsäure (EDTA), C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ (Mr = 292,24 g/mol)	E9834	Sigma
R 16 Fetal Bovine Serum, fetales Kälberserum (FKS)	F7524	Sigma
R 17 Gallamintriodid, C ₃₀ H ₆₀ I ₃ N ₃ O ₃ , (Mr = 891,5 g/mol)	G-8134	Sigma
R 18 Glycerol 99%, C ₃ H ₈ O ₃ (Mr = 92,09 g/mol)	G5516	Sigma

Reagenz	Artikel- Nummer	Hersteller
R 19 Guanosin-5'-diphosphat-Na-Salz (GDP), $C_{10}H_{15}N_5O_{11}P_2$ (M_r freie Säure = 443,2 g/mol)	G7127	Sigma
R 20 Guanosin-5'-Triphosphat-Na-Salz, $C_{10}H_{16}N_5O_{14}P_3$ (M_r = 523,2 für die freie Säure, Na: 3mol/mol)	G8877	Sigma
R 21 Hepes-Na-Salz, $C_8H_{17}N_2NaO_4S$ (M_r = 260,29 g/mol)	H7006	Sigma
R 22 Hepes-Säure, $C_8H_{18}N_2O_4S$ (M_r = 238,31 g/mol)	H3375	Sigma
R 23 Humanalbumin Fraktion V	A1653	Sigma
R 24 IPTG (Isopropyl-D-1-thiogalactopyranosid), $C_9H_{18}O_5S$ (M_r = 238,3 g/mol)	I6758	Sigma
R 25 Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 (M_r = 136,09 g/mol)	1.04873.1000	Merck
R 26 KCl-Lösung 3 mol/L	9823	Mettler
R 27 LB Agar, Miller (Luria-Bertani)	L3027	Sigma
R 28 Luria Broth (Miller's LB broth), Nährmedium	L3522	Sigma
R 29 Magnesiumchlorid-Hexahydrat, $MgCl_2 \times 6H_2O$ (M_r = 203,3 g/mol)	1.05833.0250	Merck
R 30 Magnesiumhydrogenphosphat-Trihydrat, $HMgPO_4 \times 3H_2O$ (M_r = 174,34 g/mol)	63080	Fluka
R 31 N,N-Dimethylformamid (DMF), $HCON(CH_3)_2$ (M_r = 73,09 g/mol)	40248	Fluka
R 32 Natriumchlorid, NaCl (M_r = 58,44 g/mol)	0278	Mallinckrodt
R 33 Natronlauge, NaOH 0,1 mol/L	35263	Sigma
R 34 Natronlauge, NaOH 1 mol/L	35256	Sigma
R 35 NZY Broth	13635-024	Gibco
R 36 Penicillin-Streptomycin Solution (Penicillin 10.000 U/mL + Streptomycin 10 mg/mL in 0,9% NaCl)	P0781	Sigma
R 37 Phosphorsäure, H_3PO_4 85%	124715	ZVE
R 38 Polyethylenimin-Lösung 50% (w/v) in Wasser (L 30)	P3143	Sigma
R 39 Polyfect Transfection Reagent	301107	Quiagen
R 40 Pufferlösung pH 6,865	A 1259	Appllichem
R 41 Pufferlösung pH 9,180	A 1261	Appllichem
R 42 Ready Protein [®] Liquid Scintillation Cocktail	P/N 586604	Beckman Coulter
R 43 Salzsäure HCl 0,1 mol/L	35335	Sigma
R 44 Salzsäure HCl 1 mol/L	23204	Grüssing
R 45 Sigmacote	SL2	Sigma
R 46 Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, $H_2NC(CH_2OH)_3$ (M_r = 121,14 g/mol)	1.08382.0500	Merck
R 47 Trypsin-EDTA Solution (1x) (0,5 g porcine trypsin und 0,2 g EDTA x 4Na/L HBS)	T7524	Sigma
R 48 X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactoside), $C_{14}H_{15}BrClNO_6$ (M_r = 408,63 g/mol)	B4252	Sigma

II.10 HERSTELLERVERZEICHNIS

Hersteller	Anschrift
Abgene	ABgene House, Epsom, Surrey, UK
Adi	Adi Hassel Ing. Büro, München, DE

Hersteller	Anschrift
Antiseptica	Antiseptica Produkte GmbH Pulheim/Brauweiler, DE
Applichem	Applichem GmbH Darmstadt DE
Applied Biosystems	Applied Biosystems, Foster City, USA
BD	Beckton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE
Beckman Coulter	Beckman Coulter GmbH, Fullerton, USA
Beckman Instruments	Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA
Biochrom	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
Biomedical	Biomedical Research & Development Laboratories, Inc., USA
Bode	Bode Chemie, Hamburg, DE
Bosch	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, DE
Brand	Brand GmbH, Wertheim, DE
Braun	Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Corning	Corning Inc., Corning, USA
CS	Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, DE
Dometic	Dometic S.à.r.l., Hosingen, Luxemburg
Eppendorf	Eppendorf AG; Hamburg; DE
Fisher	Fisher Scientific GmbH; Schwerte, DE
Fluka	Fluka Chemie AG, Buchs, CH
Frimont	Frimont S.P.A., Pogliano, IT
GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, DE
Gibco	Gibco BRL® Life Technologies, Maryland, USA
Greiner	Greiner Bio-one International AG, Kremsmuenster, AT
Grüssing	Grüssing GmbH, Filsum, DE
H+P	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, DE
Heidolph	Heidolph Instruments, DE
Hellma	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, DE
IDL	IDL Nidderau, DE
IKA	IKA Werke GmbH, Staufen, DE
Julabo	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, DE
Kendro	Kendro Laboratory Products, Hanau, DE
Kinematica	Kinematica AG Littau, Luzern, CH
Mallinckrodt	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer NL
Marienfeld	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, DE
Merck	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Mettler	Mettler Toledo GmbH, Giessen, DE
Millipore	Millipore GmbH, Schwalbach, DE
Nalge	Nalge Europe Limited, Hereford, UK
Pechiney	Pechiney Plastic Packaging Inc., Neenah, USA
Perkin Elmer	Perkin Elmer Life Sciences GmbH, Rodgau-Jügesheim, DE
Quiagen	Quiagen GmbH, Hilden, DE
Roth	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Sarstedt	Sarstedt AG, Nürnbergrecht, DE
Scientific	Scientific Industries, New York, USA
Sharp	Sharp Electronics GmbH, Hamburg, DE
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
Starlab	Starlab GmbH, Ahrensburg, DE
Stratagene	Stratagene Europe Amsterdam NL
Taylor-Wharton	Taylor-Wharton Harco GmbH, Husum, DE
Techne	Techne Duxford, Cambridge, UK
Thermo Forma	Thermo Forma, Ohio, USA
Thermo Labsystems	Thermo Labsystems Oy, Helsinki, FI

Hersteller	Anschrift
Tip	Tip Goldhand Vertriebs-GmbH, DE
Tomtec	Tomtec Inc., Hamden, USA
Vacuubrand	Vacuubrand GmbH, Wertheim DE
Wallac	Wallac Inc., Gaithersburg, USA (jetzt PerkinElmer)
Witeg	Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, DE
WTW	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten Wertheim, DE
Zeiss	Carl Zeiss AG, Göttingen, DE
ZVE	Zentrale Chemikalienversorgung, Universität Bonn, Abteilung 4.6, Bonn, DE

II.11 PUFFER UND LÖSUNGEN

L 1 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), steril

Eine Packung PBS-Pulver (R 13) wird in 1 L Aqua destillata (L 30) gelöst und unter Verwendung eines Spezialfilteraufsatzes (M 22) unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom (G 21) sterilfiltriert.

L 2 LB-Nährmedium

25 g Fertiggpulver für LB Medium (R 28) werden in 1 L Aqua destillata (L 30) gelöst. Zur Plasmid-DNA-Gewinnung werden jeweils 500 mL Nährmedium in einen großen Erlenmeyerkolben gegeben und darin autoklaviert (G 46, Programm ST).

L 3 Glycerol 60%

30,3 mL Glycerol 99% (R 18) werden mit 19,7 mL Aqua destillata (L 30) vermischt, unter Verwendung eines Membranfilters (M 30) und einer Spritze (M 4, M 16) unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom (G 21) sterilfiltriert und zu je 5 mL in Polypropylengefäße (M 27) aliquotiert. Die Aliquote werden bis zur Verwendung im Tiefkühlschrank (G 11) bei -30°C aufbewahrt.

L 4 TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer : EDTA 1 mM, Tris 10 mM, pH 8)

29,22 mg EDTA (R 15) und 121,14 mg Tris (R 46) werden in 100 mL Aqua destillata (L 30) gelöst, mit Salzsäure (R 43, R 44) unter Verwendung einer pH-Elektrode (G 32, G 33) auf pH 8 eingestellt, mittels eines Membranfilters (M 30) und einer Spritze (M 4, M 16) unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom (G 21) sterilfiltriert und zu je 5 mL in Polypropylengefäße (M 27) aliquotiert. Die Aliquote werden bis zur Verwendung im Tiefkühlschrank (G 11) bei -30°C aufbewahrt.

L 5 Ampicillin-Lösung (50 mg/mL)

750 mg Ampicillin-Natrium (R 5) werden in 15 mL Aqua destillata (L 30) gelöst, mittels eines Membranfilters (M 30) und einer Spritze (M 4, M 16) unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom (G 21) sterilfiltriert und je 550 µL in sterile Eppendorf-Caps (M 6) aliquotiert. Die Aliquote werden bis zur Verwendung im Tiefkühlschrank (G 11) bei -30°C aufbewahrt.

L 6 Glucose-Lösung 20%

4g Glucose (R 9) werden in 20 mL Aqua destillata (L 30) gelöst, mittels eines Membranfilters (M 30) und einer Spritze (M 4, M 16) unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom (G 21) in ein 50 mL-Falcon (M 28) sterilfiltriert und bis zur Verwendung im Tiefkühlschrank (G 11) bei -30°C aufbewahrt.

L 7 IPTG-Lösung (10 mM)

24 mg IPTG (R 24) werden in 10 mL Aqua destillata (L 30) gelöst, mittels eines Membranfilters (M 30) und einer Spritze (M 4, M 16) unter einer Sicherheitswerkbank mit

laminarem Luftstrom (G 21) in ein Polypropylen-Gefäß (M 27) sterilfiltriert und bis zur Verwendung im Tiefkühlschrank (G 11) bei -30°C aufbewahrt.

L 8 X-Gal-Lösung 2%

20 mg X-Gal (R 48) werden in 1 mL Dimethylformamid (R 31) gelöst und in einem Polypropylengefäß (M 27) bis zur Verwendung im Tiefkühlschrank (G 11) bei -30°C aufbewahrt.

L 9 NZY-Lösung (21 g/L, pH 7,5)

4,2 g NZY-Pulver (R 35) werden in 200 mL Aqua destillata (L 30) gelöst, mit 1N Natronlauge (R 34) unter Verwendung einer pH-Elektrode (G 32, G 33) auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert (G 46, Programm LS).

L 10 NZY⁺-Lösung

10 mL NZY-Lösung (L 9) werden mit 200 μL Glucose-Lösung 20% (L 6) versetzt.

L 11 Na₂HPO₄-Stammlösung 0,5 M

178 g Na₂HPO₄ x H₂O (R 11) werden mit 1,5 L Aqua destillata (L 30) versetzt, bis zur vollständigen Lösung erwärmt (G 48) und nach dem Abkühlen bis zu einem Volumen von 2 L mit Aqua destillata (L 30) aufgefüllt.

L 12 KH₂PO₄-Stammlösung 0,5 M

68 g KH₂PO₄ (R 25) werden in 1 L Aqua destillata (L 30) gelöst. Die Lagerung der Lösung erfolgte unter Lichtausschluß.

L 13 Na, K, PO₄-Puffer 40 mM pH 7,4

200 mL NaHPO₄-Stammlösung 0,5 M (L 11) und 40 mL KH₂PO₄-Stammlösung 0,5 M (L 12) werden mit Aqua destillata (L 30) zu einem Endvolumen von 3 L ergänzt. Der pH-Wert wird mit 1 N H₃PO₄ (L 14) unter Verwendung einer pH-Elektrode (G 32, G 33) auf 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgt im Kühlschrank (G 10) bei $2-8^{\circ}\text{C}$.

L 14 Phosphorsäure (H₃PO₄) 1 N

2,05 mL Phosphorsäure 85% (R 37) werden mit Aqua destillata (L 30) zu einem Endvolumen von 100 mL ergänzt.

L 15 Na, K, PO₄-Puffer 15 mM pH 7,4

150 mL Na, K, PO₄-Puffer 40 mM pH 7,4 werden mit Aqua destillata (L 30) zu einem Endvolumen von 400 mL ergänzt. Der pH-Wert wird mit einer pH-Elektrode (G 32, G 33) überprüft und gegebenenfalls mit 1 N H₃PO₄ (L 14) auf pH 7,4 eingestellt.

L 16 GDP-Lösung 30 mM

0,0279 g GDP (R 19) werden in 2 mL Aqua destillata (L 30) gelöst und je 50 μL der resultierenden Lösung in Eppendorf-Caps (M 6) aliquotiert und im Tiefkühlschrank (G 9) bei -30°C gelagert.

L 17 GDP-Stammlösung 0,3 mM

50 μL GDP-Lösung 30 mM (L 16) werden in 5 mL HEPES-Puffer 30 mM (L 18) gelöst. Die Stammlösung wird bei -30°C gelagert (G 9).

L 18 Hepes-Puffer 30 mM (300 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, 30 mM Hepes), pH 7,4

2,603 g Hepes-Na-Salz (R 21), 4,766 g Hepes-Säure (R 22), 6,099 g MgCl₂ x 6H₂O (R 29) und 17,532 g NaCl (R 32) werden in 1 L Aqua destillata (L 30) gelöst, unter Verwendung einer pH-Elektrode (G 32, G 33) wird der pH-Wert mit Natronlauge (R 33 R 34) oder Salzsäure (R 43, R 44) auf 7,4 eingestellt. Die Lagerung des Puffers erfolgt im Kühlschrank (G 10) bei $2-8^{\circ}\text{C}$.

L 19 Hepes-Puffer 30 mM mit GDP 10 μ M

Die jeweils für den Versuch benötigte Menge GDP-Stammlösung 0,3 mM (L 17) wird mit Hepes-Puffer 30 mM (L 18) im Verhältnis 1:10 verdünnt. Der Puffer mit GDP-Zusatz wird für jeden Versuchstag frisch angefertigt und sofort verwendet.

L 20 Magnesium-Tris-Puffer 9/150 mM (9 mM Mg, 150 mM Tris), pH 7,4

0,3923 g Magnesiumhydrogenphosphat-Trihydrat (R 30) werden unter Zusatz von Salzsäure (R 44) in etwa 200 mL Aqua destillata (L 30) gelöst. Nachdem die Lösung klar geworden ist, werden 4,5428 g Tris (R 46) hinzugefügt. Der pH-Wert der Lösung wird mit Salzsäure (R 43, R 44) unter Verwendung einer pH-Elektrode (G 32, G 33) auf pH 7,4 eingestellt. Die Lagerung der klaren Pufferlösung erfolgt im Kühlschrank (G 10) bei 2-8°C.

L 21 Atropinsulfat-Stammlösung 3 x 10⁻³M

0,0102 g Atropinsulfat (R 7) werden in 10 mL Aqua destillata (L 30) gelöst. Die Lagerung erfolgt im Kühlschrank (G 10) bei 2-8°C.

L 22 Atropinlösung 1,8 x 10⁻⁵M

120 μ L Atropinsulfat-Stammlösung 3 x 10⁻³M (L 21) werden mit 19,88 mL Aqua destillata (L 30) verdünnt. Die Lagerung erfolgt im Kühlschrank (G 10) bei 2-8°C.

L 23 Dulbecco's modified eagle's medium, mit FKS 10% und PenStrep 1% (DMEM + FKS + PenStrep)

500 mL Dulbecco's modified eagle's medium (R 12) werden unter aseptischen Bedingungen mit 50 mL fetalem Kälberserum (FKS: R 16) und 5 mL Penicillin-Streptomycin-Lösung (PenStrep: R 36) versetzt und vermischt. Die Lagerung erfolgt im Kühlschrank (G 11) bei 2-8°C.

L 24 Ethanol (70%)

70 mL Ethanol (R 14) werden mit 30 mL Aqua destillata (L 30) versetzt und geschüttelt.

L 25 Wasser zur PCR, steril filtriert

Etwa 50 mL analysenreines Wasser (R 6) werden unter aseptischen Bedingungen in eine 20 mL-Luer-Lock-Spritze (M 4) aufgezogen und nach Aufsatz eines Membranfilters (M 30) mit Hilfe einer Kanüle (M 16) in ein steriles 50 mL-Falcon (M 27) überführt.

L 26 Na, K, PO₄-Puffer 5 mM pH 7,4

Na, K, PO₄-Puffer 15 mM pH 7,4 (L 15) wird im Verhältnis 1:2 mit Aqua destillata (L 30) verdünnt.

L 27 Magnesium-Tris-Puffer 3/50 mM (3 mM Mg, 50 mM Tris), pH 7,4

Magnesium-Tris-Puffer 9/150 mM (L 20) wird im Verhältnis 1:2 mit Aqua destillata (L 30) verdünnt.

L 28 PEI-Stammlösung 1%

10 g Polyethylenimin-Lösung 50% (R 38) werden in 490 mL Aqua destillata (L 30) durch kräftiges Schütteln gelöst.

L 29 PEI-Lösung 0,1%

50 mL PEI-Stammlösung 1% (L 28) werden mit 450 mL Aqua destillata (L 30) versetzt, geschüttelt und bis zur Verwendung im Kühlschrank (G 10) bei 2-8°C gelagert.

L 30 Aqua destillata

Die Herstellung von Aqua destillata erfolgte mittels eines Wasseraufbereitungssystems der Firma Elix[®] (G 12). Das so hergestellte Reinwasser entspricht einer Wasserqualität vom Typ II (Laborwasser).

L 31 Aqua pro analysi

Die Herstellung von Aqua pro analysi erfolgte mittels des Wasseraufbereitungssystemes Milli-Q der Firma Elix[®] (G 13). Dieses System stellt ausgehend von Aqua destillata (L 30) Reinstwasser vom Typ I her.

Einstellung der pH-Werte der hergestellten Puffer und Lösungen

Die Einstellung der pH-Werte der verwendeten Lösungen erfolgte bei 25°C mit Hilfe einer pH-Elektrode (G 32, G 33), die vor jeder Messung mit Eichlösungen (R 40, R 41) kalibriert worden war. Die Lagerung der pH-Elektrode erfolgte in Kaliumchloridlösung (R 26).

Herstellung der Verdünnungsreihen der untersuchten Substanzen

Zur Herstellung der Verdünnungsreihen wurde aus den Reinsubstanzen der entsprechenden Stoffe zunächst eine konzentrierte Stammlösung erstellt. Die Lösung der Substanzen erfolgte dabei bis auf die Substanzen CARALL und CARBEM, die in DMSO (R 10) gelöst wurden, in Aqua pro analysi (L 31). Alle Stammlösungen wurden in Glasgefäßen (M 10, M 35) angesetzt. Die weiteren jeweils benötigten geringer konzentrierten Lösungen der Substanzen wurden durch Verdünnung der entsprechenden Stammlösungen mit Aqua pro analysi (L 31) in Szintillationsgefäßen (M 37, M 36) hergestellt.

II.12 COMPUTERPROGRAMME

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Computerprogramme verwendet:

GraphPad Prism[®], Version 3.02 und 4.03; GraphPad[®] Software, San Diego, USA

GraphPad InStat[®] Version 3.0; GraphPad[®] Software, San Diego, USA

ChemWindow[®], Version 6.0; BioRad Laboratories, Sadtler Division, Philadelphia, USA

Microsoft[®] Excel 2000, Microsoft Corporation, Redmond, USA

Microsoft[®] Word 2000, Microsoft Corporation, Redmond, USA

Reference Manager[®], Version 10, Thomson ResearchSoft[®], Stamford, USA

III ERGEBNISSE

III.1 CHARAKTERISIERUNG DER EINGESETZTEN MEMBRANSUSPENSIONEN

Die Dissoziationshalbwertszeit des Liganden N-Methylscopolamin vom Rezeptorprotein stellt ein Charakteristikum der untersuchten Rezeptoren dar. Die Dissoziationshalbwertszeiten in Abwesenheit allosterischer Modulatoren wurden im Rahmen von Zweipunktdissoziationsexperimenten nach Gleichung 28 nach 30-minütiger Vorinkubation mit [³H]N-Methylscopolamin in einer Endkonzentration von 2 nmol/L bestimmt und sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Rezeptor	Geschwindigkeitskonstanten k_{-1} [min^{-1}] und Halbwertszeiten $t_{1/2}$ [min] der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation							
	Na, K, P _i -Puffer 23°C		Mg-Tris-Puffer 23°C		Mg-Tris-Puffer 37°C		Hepes-Puffer 30°C	
	k_{-1}	$t_{1/2}$	k_{-1}	$t_{1/2}$	k_{-1}	$t_{1/2}$	k_{-1}	$t_{1/2}$
M ₂ wt	0,1711 ± 0,0054 (n = 24)	4,1	0,0368 ± 0,0046 (n = 4)	18,9	0,1855 ± 0,0069 (n = 13)	3,7	0,4070 ± 0,0173 (n = 19)	1,7
M ₅ wt	0,0063 ± 0,0003 (n = 25)	109,5	0,0030 ± 0,0003 (n = 3)	227,4	0,0291 ± 0,0029 (n = 11)	23,8	0,0236 ± 0,0007 (n = 15)	29,4
M ₂ ¹⁷⁵ Glu→Ala	n.b.	--	n.b.	--	n.b.	--	0,3763 ± 0,0284 (n = 4)	1,8
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	0,1231 ± 0,0061 (n = 20)	5,6	0,0282 ± 0,0008 (n = 3)	24,5	0,1456 ± 0,0053 (n = 10)	4,8	0,2756 ± 0,0293 (n = 23)	2,5
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	0,0871 ± 0,0026 (n = 3)	8,0	n.b.	--	n.b.	--	0,2263 ± 0,0071 (n = 13)	3,1
M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	n.b.	--	n.b.	--	n.b.	--	0,4491 ± 0,0129 (n = 3)	1,5
M ₂ ⁴²³ Thr→His	0,0474 ± 0,0013 (n = 21)	14,6	0,0181 ± 0,0014 (n = 3)	38,3	0,1024 ± 0,0045 (n = 10)	6,8	0,2061 ± 0,0052 (n = 18)	3,4
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	0,0331 ± 0,0011 (n = 3)	21,0	n.b.	--	n.b.	--	0,0896 ± 0,0020 (n = 11)	7,7
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²² Trp→Ala	0,1732 ± 0,0036 (n = 5)	4,0	n.b.	--	n.b.	--	0,3876 ± 0,0079 (n = 3)	1,8
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	0,0288 ± 0,0006 (n = 15)	24,1	0,0095 ± 0,0002 (n = 3)	72,9	0,0578 ± 0,0012 (n = 10)	12,0	0,1165 ± 0,0042 (n = 17)	5,9
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	0,0141 ± 0,0004 (n = 3)	49,1	n.b.	--	n.b.	--	0,0408 ± 0,0016 (n = 9)	17,0
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Ala	n.b.	--	n.b.	--	n.b.	--	0,0384 ± 0,0016 (n = 6)	18,1
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Thr	n.b.	--	n.b.	--	n.b.	--	0,0459 ± 0,0010 (n = 3)	15,1

Tabelle 17: Geschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten [min] der Dissoziation von [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS) von den aufgeführten Rezeptoren unter den jeweiligen Inkubationsbedingungen, angegeben als Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Versuchen. Die angegebenen Dissoziationshalbwertszeiten wurden im Rahmen von Dissoziationsexperimenten mit Zweipunktkinetik nach 30-minütiger Vorinkubation der jeweiligen Membransuspensionen mit [³H]NMS 2 nM ermittelt. Die Abkürzung „n.b.“ steht für „nicht bestimmt“.

Zur Ermittlung der Charakteristika B_{max} und K_D der in dieser Arbeit verwendeten Membransuspensionen dienten homologe Konkurrenzexperimente (II.3.3.3) mit [³H]NMS in einer Endkonzentration von 0,2 nmol/L unter verschiedenen Inkubationsbedingungen (siehe II.3.3.1). Die Inkubationszeit richtete sich dabei nach den parallel durchgeführten allosterischen

Interaktionsexperimenten, ebenso die Auswahl der Inkubationsbedingungen. Die Durchführung der homologen Konkurrenzexperimente wird unter II.3.3.3 beschrieben. Die in den Versuchen ermittelten Bindungsdaten wurden mit Hilfe der Vier-Parameter-Logistischen-Gleichung wie unter II.3.1.1 beschrieben durch nichtlineare Regression analysiert. Dabei wurde mittels eines F-Testes (siehe II.5) ermittelt, ob sich der Kurvenverlauf mit einem Modell, in dem der Hill-Koeffizient als ein Parameter der Vier-Parameter-logistischen Gleichung konstant auf den Wert $n_H = -1$ festgelegt wurde, ausreichend beschreiben ließ. In diesem Fall darf angenommen werden, dass der Ligand mit einer Population gleichartiger Bindungsstellen interagiert. In Abbildung 17 ist der Verlauf einer repräsentativen Inhibitionskurve eines homologen Konkurrenzexperimentes wiedergegeben.

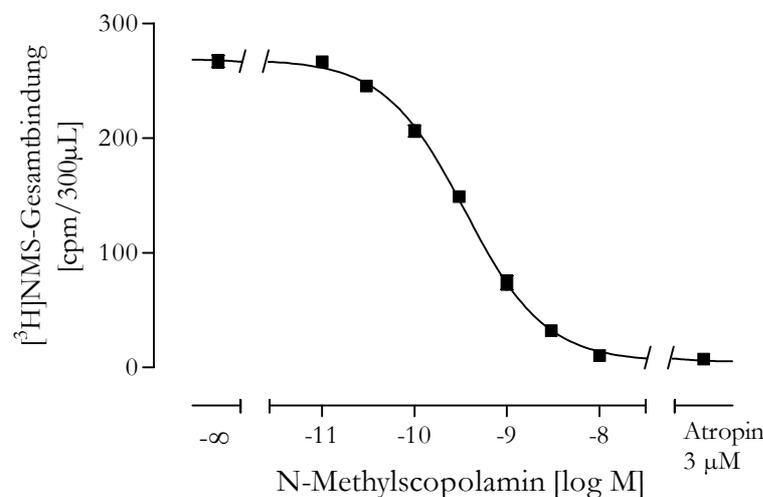


Abbildung 17: Konzentrations-Effekt-Kurve eines repräsentativen homologen Konkurrenzexperimentes mit steigenden Konzentrationen von N-Methylscopolamin an COS-7-Membransuspensionen der Rezeptormutante $M_2^{427Trp \rightarrow Ala}$ mit $[^3H]NMS$ 0,2 nM in 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP bei 30°C. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 3 μM Atropin bestimmt. Die dargestellten Einzelpunkte sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus Zweifachbestimmungen, die Linie gibt den durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Vier-Parameter-logistischen Gleichung errechneten Verlauf der Inhibitionskurve wieder. Der Kurvenverlauf wird mit einem konstanten Wert von $n_H = -1$ für den Hill-Koeffizient als Steigungsparameter ausreichend beschrieben (F-Test, $\alpha = 0,05$), daher wurde dieser Parameter bei der Kurvenanpassung auf diesen Wert festgelegt. Abszisse: Gesamtbindung [cpm/300 μL]. Ordinate: logarithmierter Wert der molaren Konzentration von NMS.

Die im Verlauf dieser Arbeit untersuchten Membransuspensionen zeigten in homologen Konkurrenzexperimenten alle Kurvenverläufe, in denen sich der Hill-Koeffizient nicht signifikant von dem Wert -1 unterschied. Daher konnte die Bestimmung des K_D -Wertes, der als Maß für die Affinität des Liganden NMS zu den untersuchten Rezeptoren diente, unter Anwendung von Gleichung 19 durchgeführt werden. Ebenso ließ sich die Anzahl der Bindungsstellen (B_{max}) nach der Gleichung von DeBlasi (Gleichung 21) ermitteln. Die für die unterschiedlichen Chargen der in dieser Arbeit untersuchten Membransuspensionen unter den jeweiligen Inkubationsbedingungen ermittelten pK_D - und B_{max} -Werte ($pK_D = -\log K_D$) sind in

Tabelle 18 für die am Tomtec-Harvester durchgeführten Experimente und in Tabelle 19 für die Versuche am Brandel-Harvester aufgeführt. Die bei verschiedenen Inkubationszeiten ermittelten pK_D - und B_{max} -Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander (siehe VI.1). Daher werden in dieser Tabelle für die pK_D - und B_{max} -Werte einer Membrancharge im entsprechenden Inkubationsmilieu Mittelwerte \pm Standardfehler der unter verschiedenen Inkubationszeiten ermittelten Einzelwerte angegeben.

Membranchege	Puffer	pK _D [log M]	Protein- gehalt [mg/mL]	B _{max} [fmol/mg Protein]
M ₂ wt (02.10.03)	Mg-Tris-Puffer 37°C	9,06 (9,22; 8,91)	0,1713	864 (528; 1199)
M ₂ wt (25.06.04)	Na, K, P _i -Puffer 23°C	9,75 ± 0,09 (n = 4)	0,0492	4650 ± 171 (n = 4)
M ₂ wt (19.08.04)	Na, K, P _i -Puffer 23°C	9,87 ± 0,11 (n = 7)	0,3651	462 ± 75 (n = 7)
M ₂ wt (19.08.04z)	Hepes-Puffer 30°C	9,64 ± 0,15 (n = 10)	0,1466	765 ± 94 (n = 10)
M ₂ wt (09.12.04)	Mg-Tris-Puffer 37°C	9,69 ± 0,14 (n = 3)	0,0763	2316 ± 350 (n = 3)
M ₂ wt (19.05.05)	Na, K, P _i -Puffer 23°C	9,94 ± 0,04 (n = 3)	0,3691	488 ± 33 (n = 3)
M ₃ wt (19.08.04z)	Na, K, P _i -Puffer 23°C	10,12 ± 0,17 (n = 6)	0,2741	479 ± 55 (n = 6)
M ₃ wt (25.06.04)	Na, K, P _i -Puffer 23°C	10,03 ± 0,28 (n = 4)	0,2235	957 ± 74 (n = 4)
M ₃ wt (20.10.04)	Hepes-Puffer 30°C	9,54 ± 0,10 (n = 8)	0,2816	540 ± 101 (n = 8)
M ₃ wt (09.12.04)	Mg-Tris-Puffer 37°C	9,58 ± 0,07 (n = 4)	0,1593	534 ± 46 (n = 4)
M ₃ wt (09.12.04)	Hepes-Puffer 30°C	9,67 (9,29; 10,05)	0,1593	757 (964; 549)
M ₃ wt (19.05.05)	Mg-Tris-Puffer 37°C	9,79 (9,68; 9,90)	0,3789	518 (585; 452)
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln (25.06.04)	Na, K, P _i -Puffer 23°C	9,71 ± 0,07 (n = 5)	0,0519	3043 ± 529 (n = 5)
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln (20.10.04)	Hepes-Puffer 30°C	9,39 ± 0,13 (n = 5)	0,2911	422 ± 80 (n = 5)
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln (09.12.04)	Mg-Tris-Puffer 37°C	9,67 ± 0,04 (n = 5)	0,1030	1155 ± 167 (n = 5)
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln (09.12.04)	Hepes-Puffer 30°C	9,32 (9,42; 9,22)	0,1030	1315 (987; 1643)
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln (16.12.04)	Na, K, P _i -Puffer, 23°C	9,92 (9,80; 10,05)	n.b.	n.b.
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln (19.05.05)	Na, K, P _i -Puffer 23°C	9,53 ± 0,00 (n = 3)	0,2222	1010 ± 46 (n = 3)
M ₂ ⁴²² Trp→Ala (13.07.05)	Hepes-Puffer 30°C	9,52 ± 0,10 (n = 4)	0,3117	348 ± 47 (n = 4)
M ₂ ⁴²² Trp→Ala (04.08.05)	Na, K, P _i -Puffer 23°C	10,85 ± 0,53 (n = 4)	0,2672	648 ± 108 (n = 4)
M ₂ ⁴²³ Thr→Ala (04.08.05)	Hepes-Puffer 30°C	9,44 ± 0,04 (n = 4)	0,4049	586 ± 40 (n = 4)
M ₂ ⁴²³ Thr→His (14.04.04)	Na, K, P _i -Puffer, 23°C	10,00 ± 0,17 (n = 4)	0,2333	1411 ± 117 (n = 4)
M ₂ ⁴²³ Thr→His (25.06.04)	Na, K, P _i -Puffer 23°C	10,03 ± 0,21 (n = 4)	0,0885	1281 ± 186 (n = 3)
M ₂ ⁴²³ Thr→His (25.06.04)	Hepes-Puffer 30°C	9,55 ± 0,20 (n = 3)	0,0885	801 ± 150 (n = 3)

Membrancharge	Puffer	pK _D [log M]	Protein- gehalt [mg/mL]	B _{max} [fmol/mg Protein]
M ₂ ⁴²³ Thr→His (20.10.04)	Na, K, P _i -Puffer 23°C	10,22 ± 0,10 (n = 3)	0,2044	620 ± 147 (n = 3)
M ₂ ⁴²³ Thr→His (20.10.04)	Mg-Tris-Puffer 37°C	9,74 (9,56; 9,93)	0,2044	535 (625; 445)
M ₂ ⁴²³ Thr→His (20.10.04)	Hepes-Puffer 30°C	9,65 ± 0,05 (n = 3)	0,2044	419 ± 83 (n = 3)
M ₂ ⁴²³ Thr→His (19.05.05)	Mg-Tris-Puffer 37°C	9,71 ± 0,04 (n = 3)	0,2966	316 ± 40 (n = 3)
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala (04.08.05)	Na, K, P _i -Puffer 23°C	10,75 (10,69; 10,81)	0,2178	569 (507; 631)
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala (04.08.05)	Hepes-Puffer 30°C	9,79 ± 0,05 (n = 3)	0,2178	436 ± 17 (n = 3)
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala (20.10.05)	Na, K, P _i -Puffer 23°C	10,10 (10,23; 9,97)	0,1765	680 (717; 643)
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His (25.06.04)	Na, K, P _i -Puffer 23°C	10,37 ± 0,21 (n = 3)	0,0782	2319 ± 256 (n = 3)
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His (20.10.04)	Hepes-Puffer 30°C	9,63 ± 0,16 (n = 7)	0,2346	430 ± 74 (n = 7)
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His (09.12.04)	Na, K, P _i -Puffer 23°C	10,12 (10,29; 9,96)	0,0888	1665 (1587; 1743)
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His (09.12.04)	Mg-Tris-Puffer 37°C	9,78 ± 0,08 (n = 5)	0,0888	1059 ± 200 (n = 5)
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His (19.05.05)	Mg-Tris-Puffer 37°C	9,73 (9,82; 9,64)	0,2889	503 (437; 569)
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala (13.07.05)	Hepes-Puffer 30°C	9,45 ± 0,06 (n = 3)	0,2571	292 ± 26 (n = 3)
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala (04.08.05)	Hepes-Puffer 30°C	9,66 ± 0,16 (n = 3)	0,2772	236 ± 51 (n = 3)
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala (01.09.05)	Na, K, P _i -Puffer 23°C	10,14 ± 0,14 (n = 3)	0,4339	364 ± 23 (n = 3)
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Ala (04.08.05)	Hepes-Puffer 30°C	9,51 ± 0,09 (n = 3)	0,3236	426 ± 86 (n = 3)
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Thr (13.07.05)	Hepes-Puffer 30°C	9,29 ± 0,04 (n = 3)	0,3329	586 ± 84 (n = 3)

Tabelle 18: Charakteristische Bindungsparameter der verwendeten Membransuspensionen, die mit Hilfe homologer Kompetitionsexperimente unter den jeweiligen Inkubationsbedingungen am Tomtec-Harvester ermittelt wurden. Die Inkubationszeit betrug dabei 2-24 Stunden. Angegeben sind jeweils die ermittelten Mittelwerte ± Standardfehler und die Anzahl der durchgeführten unabhängigen Experimente (n) mit Doppelbestimmung, bei denen aus dem Verlauf der Inhibitionskurve der Wendepunkt zur Berechnung des K_D-Wertes ermittelt wurde. Bei Durchführung von zwei unabhängigen Experimenten sind der Mittelwert der Experimente und die beiden jeweiligen Einzelwerte angegeben. Die Bestimmung des pK_D-Wertes (-logK_D-Wert) erfolgte durch Anwendung von Gleichung 19, da bei keinem der Experimente der ermittelte Hill-Koeffizient signifikant verschieden von -1 war (F-Test, α = 0,05). Der angegebene Proteingehalt wurde in Doppelbestimmung nach der Methode nach Bradford bestimmt. Die B_{max}-Werte wurden nach der Gleichung von DeBlasi ermittelt und sind zusätzlich bezogen auf den jeweiligen Proteingehalt des Homogenates aufgeführt. Das in Klammern angegebene Datum der Membrancharge bezeichnet das Herstellungsdatum der Membransuspension, evtl. mit zusätzlicher Chargenbezeichnung. Die Abkürzung „n.b.“ steht für „nicht bestimmt“.

Membrancharge	pK_D [log M]	B_{max} [fmol/mL]	B_{max} [fmol/mg Protein]
M ₂ wt (02.10.03)	9,43 (9,37; 9,50)	271 (287; 255)	1583 (1678; 1490)

Tabelle 19: Charakteristische Bindungsparameter einer Membransuspension, die mit Hilfe homologer Konkurrenzexperimente am Brandel-Harvester im Mg-Tris-Puffer bei 37°C bestimmt wurden. Die Inkubationszeit betrug 2 Stunden. Angegeben sind der Mittelwert von zwei Experimenten und die beiden jeweiligen Einzelwerte. Die Bestimmung des pK_D -Wertes ($-\log K_D$ -Wert) erfolgte durch Anwendung von Gleichung 19, da bei keinem der Experimente der ermittelte Hill-Koeffizient signifikant verschieden von -1 war (F-Test, $\alpha = 0,05$). Der angegebene Proteingehalt wurde in Doppelbestimmung nach der Methode nach Bradford bestimmt. Die B_{max} -Werte wurden nach der Gleichung von DeBlasi ermittelt und sind zusätzlich bezogen auf den jeweiligen Proteingehalt des Homogenates aufgeführt. Das in Klammern angegebene Datum der Membrancharge bezeichnet das Herstellungsdatum der Membransuspension. Die Abkürzung „n.b.“ steht für „nicht bestimmt“.

III.2 DISSOZIATIONSVERZÖGERUNGSEXPERIMENTE

Epitopabhängigkeit unterschiedlicher allosterischer Modulatoren an [³H]NMS-besetzten Rezeptoren unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

III.2.1 Bedeutung der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin für die M₂/M₅-Subtypselektivität

III.2.1.1 W84

Die M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators W84 an NMS-besetzten Rezeptoren wird im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C vollständig durch die beiden Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin erklärt. Bei Austausch dieser beiden Aminosäuren im M₂-Rezeptor in die korrespondierenden Aminosäuren des M₅-Rezeptors fällt die Affinität des Modulators W84 auf das Niveau des M₅-Rezeptors ab (Buller et al., 2002; Voigtländer et al., 2003).

Beim Wechsel der Inkubationsbedingungen von einem 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C zu einem 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C änderte sich die Affinität von W84 zu NMS-besetzten M₂-Rezeptoren um den Faktor 54 (Tränkle et al., 1996). Dass die beobachteten Wirksamkeitsverschiebungen beim Wechsel der Inkubationsbedingungen nicht auf Temperaturänderungen zurückzuführen sind, konnte Staschen in seiner Habilitationsschrift nachweisen (Staschen, 1991).

Um die Bedeutung der Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin für die M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators W84 unter verschiedenen Inkubationsbedingungen zu untersuchen, wurden die entsprechenden in COS-7-Zellen exprimierte Rezeptorproteine in 2-Punkt-Kinetik-Dissoziationsverzögerungsexperimenten an NMS-besetzten Rezeptoren untersucht.

III.2.1.1.1 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C

Die die im Na, K, P_i-Puffer an den entsprechenden Rezeptorproteinen ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung 18 dargestellt

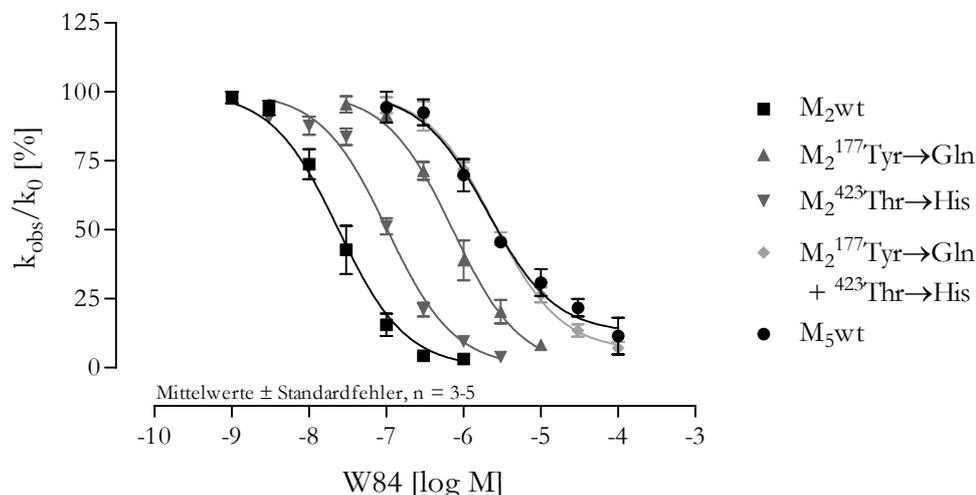


Abbildung 18: Konzentrations-Effekt-Kurven von W84 im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators als prozentualer Wert der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Die aus den in Abbildung 18 abgebildeten Konzentrations-Effekt-Kurven ermittelten Kenngrößen sind in Tabelle 20 angegeben.

Rezeptor	pEC _{0,5,diss} [log M]	Δ pEC _{0,5,diss} (M ₂ -M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	7,62 ± 0,05	0	-1,21 ± 0,12	-2,7 ± 3,3	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	6,14 ± 0,04	1,48	-1,04 ± 0,09	1,1 ± 3,9	3
M ₂ ⁴²³ Thr→His	6,99 ± 0,04	0,63	-1,06 ± 0,08	-0,9 ± 2,7	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	5,62 ± 0,04	2,00	-0,97 ± 0,09	6,1 ^s ± 2,2	3
M ₅ wt	5,67 ± 0,09	1,95	-0,95 ± 0,18	12,5 ^s ± 3,5	3-5

Tabelle 20: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von W84 im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterschieden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0,5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0,5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0,5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Durch die in diesen Versuchen erhobenen Daten werden die von Buller und Voigtländer (Buller et al., 2002; Voigtländer et al., 2003) erhobenen Befunde zur Epitopabhängigkeit von W84 bestätigt. Durch Austausch der beiden Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin in die korrespondierenden Aminosäuren des M₅-Rezeptors sinkt die Affinität des Modulators W84 zu diesen Rezeptoren auf das Niveau des M₅-Wildtyps. Die Affinität des Modulators W84 zum NMS-besetzten Rezeptorprotein, in dem gleichzeitig die Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin in die korrespondierenden Aminosäuren des M₅-Rezeptors überführt wurden, unterscheidet sich im t-Test nicht signifikant von der Affinität zum M₅-Wildtyp-Rezeptor. Für die

M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators W84 scheinen somit die beiden Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin vollständig verantwortlich zu sein.

III.2.1.1.2 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37 °C

Die im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung 19 dargestellt.

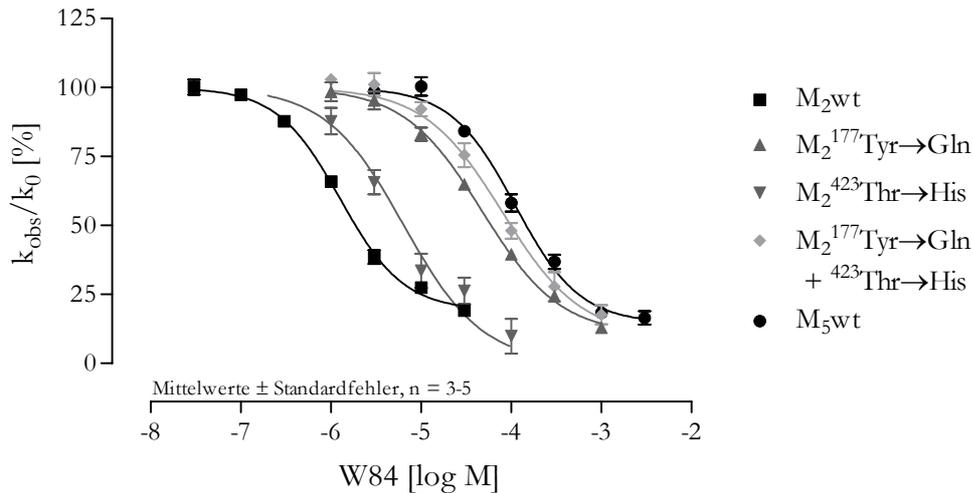


Abbildung 19: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von W84 an den angegebenen Rezeptorproteinen im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Tabelle 21 gibt die zu Abbildung 19 gehörigen Kenndaten wieder.

Rezeptor	pEC _{0,5,diss} [log M]	Δ pEC _{0,5,diss} (M ₂ -M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	5,90 ± 0,03	0	-1,24 ^s ± 0,10	19,2 ^s ± 1,9	4
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	4,32 ± 0,04	1,58	-0,94 ± 0,08	10,4 ^s ± 2,0	4
M ₂ ⁴²³ Thr→His	5,19 ± 0,06	0,71	-0,86 ± 0,11	8,8 ± 5,3	3-5
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	4,10 ± 0,07	1,80	-1,21 ± 0,07	9,8 ^s ± 4,0	4
M ₅ wt	3,96 ± 0,05	1,94	-1,22 ^s ± 0,12	14,6 ^s ± 2,8	3-4

Tabelle 21: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von W84 im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterscheiden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0,5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0,5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0,5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Der einzelne Austausch der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin in die jeweils korrespondierende Aminosäure des M₅-Rezeptors führte zu einem signifikanten Affinitätsverlust von W84 (Vergleich mit M₂wt im t-Test: M₂¹⁷⁷Tyr→Gln: p < 0,0001; M₂⁴²³Thr→His p < 0,0001). Die Affinität von W84 zur Doppelmutante unterscheidet sich nicht signifikant von der Affinität

zum M_5 -Wildtyp-Rezeptor (t-Test: $p = 0,1917$). Die beiden Aminosäuren scheinen die M_2/M_5 -Subtypselektivität von W84 unter diesen Inkubationsbedingungen vollständig zu erklären.

III.2.1.1.3 10 mM HEPES-Puffer bei 30°C

Die im HEPES-Puffer an den entsprechenden Rezeptorproteinen ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von W84 sind in Abbildung 20 dargestellt.

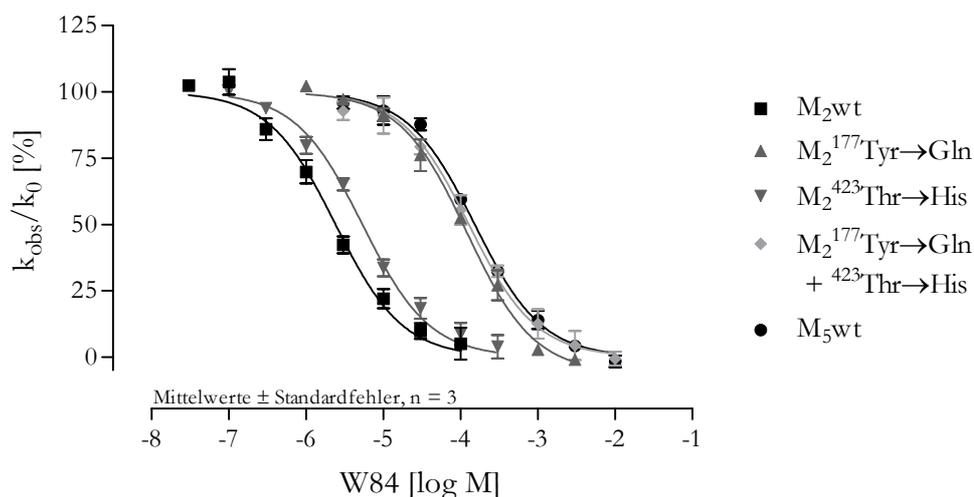


Abbildung 20: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von W84 an den angegebenen Rezeptorproteinen im 10 mM HEPES-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Die Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Tabelle 22 zusammengestellt.

Rezeptor	$pEC_{0,5,diss}$ [log M]	$\Delta pEC_{0,5,diss}$ (M_2 - M_x)	n_H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M_2 wt	$5,62 \pm 0,05$	0	$-0,96 \pm 0,09$	$3,4 \pm 3,0$	3
$M_2^{177Tyr \rightarrow Gln}$	$3,92 \pm 0,04$	1,70	$-0,94 \pm 0,09$	$-5,9^s \pm 2,6$	3
$M_2^{423Thr \rightarrow His}$	$5,27 \pm 0,04$	0,35	$-0,90 \pm 0,06$	$3,8 \pm 2,1$	3
$M_2^{177Tyr \rightarrow Gln + 423Thr \rightarrow His}$	$3,89 \pm 0,05$	1,73	$-0,91 \pm 0,08$	$0,2 \pm 2,8$	3
M_5 wt	$3,82 \pm 0,03$	1,80	$-1,05 \pm 0,07$	$-1,8 \pm 1,9$	3

Tabelle 22: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von W84 im 10 mM HEPES-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1 , so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterscheiden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der $pEC_{0,5,diss}$ -Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M_2 -Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes $\Delta pEC_{0,5,diss}$ errechnet sich aus der Differenz der $pEC_{0,5,diss}$ -Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M_2 -Wildtyp-Rezeptor.

Durch den alleinigen Austausch der Aminosäure M_2^{177Tyr} Tyrosin im M_2 -Rezeptor sinkt die Affinität von W84 auf einen Wert, der sich nicht signifikant vom Affinitätswert für den M_5 -Rezeptor unterscheidet. Die Affinität von W84 für die Doppelmutante $M_2^{177Tyr \rightarrow Gln + 423Thr \rightarrow His}$ unterscheidet sich weder von der Affinität zur Einzelmutante

M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin, noch von der Affinität zum M₅-Rezeptor signifikant. Die M₂/M₅-Subtypselektivität von W84 wäre also im Hepes-Puffer allein durch die Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin erklärbar. Der alleinige Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin führt jedoch auch zu einem Affinitätsverlust von W84, der im Vergleich mit dem M₂-Wildtyp-Rezeptor signifikant aber relativ gering ist.

Das untere Plateau des Kurvenverlaufes der Mutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin unterscheidet sich signifikant von 0% und liegt im negativen Bereich. Dies bedeutet, dass es dabei rein theoretisch zu einer Bindungssteigerung bei hohen Konzentrationen von W84 kommt, dies ist jedoch auf Grund der im Überschuß zugefügten Menge von Atropin nicht plausibel. Die in Zweipunkt-dissoziationsexperimenten ermittelten Daten für die Gesamtbindung in Abwesenheit des Modulators beruhen auf einer Vierfachbestimmung, das ermittelte untere Plateau wird durch nichtlineare Regressionsanalyse des gesamten Datensatzes aller eingesetzten Modulatorkonzentrationen ermittelt. Daher ist eher anzunehmen, dass es sich bei dem Phänomen des negativen unteren Plateaus um ein Artefakt handelt, das darauf beruht, dass der Kontrollwert, also die Gesamtbindung, mit einem etwas zu geringen Wert bestimmt wurde. In einem solchen Fall wurde davon ausgegangen, dass der ermittelte Kurvenverlauf mit dem von 0% verschiedenen Plateauwert korrekter beschrieben wird als mit einem festgesetzten Wert von 0%.

III.2.1.2 Gallamin

Der Modulator Gallamin zeigt eine starke Puffer-Abhängigkeit seiner dissoziationsverzögernden Wirksamkeit an M_2 -Rezeptoren (Tränkle et al., 1996). Prilla (Prilla, Dissertationsschrift 2006) und Huang et al. (2005) konnten nachweisen, dass den Epitopen M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C eine Bedeutung für die M_2/M_5 -Subtypselektivität dieses Modulators am NMS-besetzten Rezeptor zukommt.

Untersuchungen zum Einfluss der Inkubationsbedingungen auf die Bedeutung dieser Epitope für Gallamin sind im Folgenden dargestellt.

III.2.1.2.1 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C

Die Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Gallamin unter diesen Pufferbedingungen sind in Abbildung 21 dargestellt. Die daraus abgeleiteten Maßzahlen finden sich in Tabelle 23.

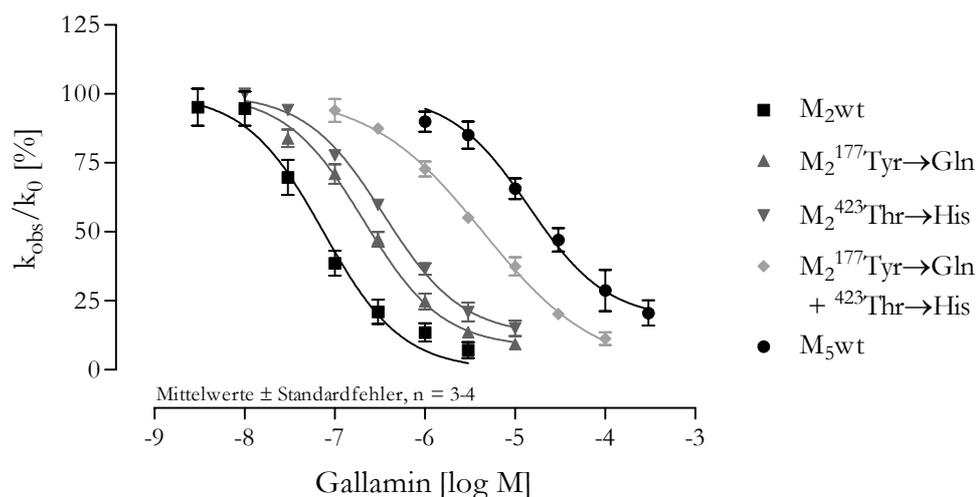


Abbildung 21: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Gallamin an den angegebenen Rezeptorproteinen im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Rezeptor	pEC _{0.5,diss} [log M]	Δ pEC _{0.5,diss} (M ₂ -M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	7,13 ± 0,06	0	-0,97 ± 0,11	5,4 ± 3,6	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	6,68 ± 0,04	0,45	-0,88 ± 0,07	8,1 ^s ± 1,8	3
M ₂ ⁴²³ Thr→His	6,46 ± 0,04	0,67	-0,97 ± 0,08	12,4 ^s ± 1,8	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	5,36 ± 0,03	1,77	-0,69 ^s ± 0,03	2,2 ± 4,7	3
M ₅ wt	4,85 ± 0,09	2,28	-0,81 ± 0,17	18,3 ^s ± 4,3	4

Tabelle 23: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Gallamin im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterscheiden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0.5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0.5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0.5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Durch den einzelnen Austausch der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin in die korrespondierenden Aminosäuren des M₅-Rezeptors kommt es in Bezug auf den M₂-Rezeptor zu einem signifikanten Affinitätsverlust von Gallamin. Beide Epitope haben somit eine Bedeutung für die M₂/M₅-Subtypselektivität von Gallamin an NMS-besetzten Rezeptoren. Die Affinität von Gallamin sinkt an der Doppelmutante jedoch nicht auf das Niveau des M₅-Rezeptors ab. An der M₂/M₅-Subtypselektivität von Gallamin sind also offenbar noch weitere Epitope beteiligt.

III.2.1.2.2 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37 °C

In Abbildung 22 sind die Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Gallamin dargestellt.

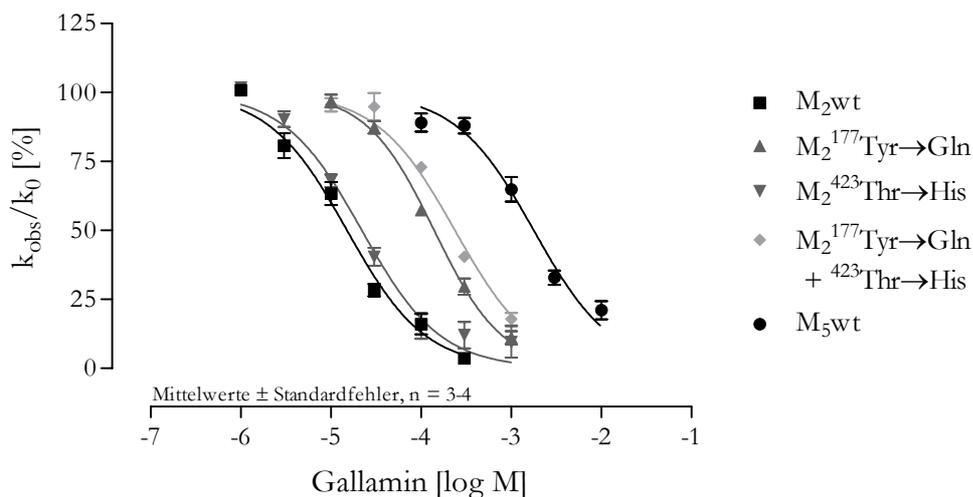


Abbildung 22: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Gallamin an den angegebenen Rezeptorproteinen im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Die Kenndaten der in Abbildung 22 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven finden in Tabelle 24.

Rezeptor	pEC _{0,5,diss} [log M]	Δ pEC _{0,5,diss} (M ₂ -M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	4,82 ± 0,04	0	-1,07 ± 0,04	-0,3 ± 3,8	3-4
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	3,85 ± 0,02	0,97	-1,15 ^s ± 0,07	5,8 ± 3,8	3
M ₂ ⁴²³ Thr→His	4,66 ^{n.s.} ± 0,05	0,16	-1,03 ± 0,10	5,1 ± 2,9	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3,62 ± 0,04	1,20	-1,17 ± 0,09	-6,7 ± 6,9	3
M ₅ wt	2,75 ± 0,04	2,07	-0,93 ± 0,09	6,9 ± 5,5	4

Tabelle 24: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Gallamin im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterschieden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0,5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0,5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0,5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Die Affinität von Gallamin zu allen untersuchten Rezeptorproteinen ist im Mg-Tris-Puffer bei 37°C erheblich niedriger als im Na, K, P_i-Puffer. Durch den Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin kommt es zu einem deutlichen Abfall der Affinität des Modulators Gallamin im Vergleich zum M₂-Wildtyp-Rezeptor. Eine Substitution der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin führt hingegen zu einem geringen Affinitätsverlust, der aber statistisch nicht signifikant ist (t-Test: p = 0,07). Der Austausch beider Aminosäuren in die jeweiligen Aminosäuren des M₅-Rezeptors führt zu einem großen Affinitätsverlust des Modulators Gallamin. Beide Aminosäuren können die M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators Gallamin jedoch nicht vollständig erklären, daran scheinen noch weitere Epitope beteiligt zu sein.

III.2.1.2.3 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 23 °C – Einfluss von Temperaturänderungen auf die Epitopabhängigkeit

Die Affinität des Modulators Gallamin zu den untersuchten Rezeptorproteinen wurde durch den Wechsel der Inkubationsbedingungen vom 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C zum 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C sehr stark beeinflusst. Die Wirksamkeit des Modulators Gallamin in Gleichgewichtsbindungsversuchen wird im wesentlichen durch die ionale Zusammensetzung des Puffers bestimmt, während sich Temperaturänderungen nur mit geringen Wirksamkeitsverschiebungen auswirken (Pedder et al., 1991). Es sollte daher überprüft werden, ob die in dieser Arbeit beobachteten Änderungen der Wirksamkeit an NMS-besetzten Rezeptoren in kinetischen Versuchen allein durch den Wechsel der ionalen Zusammensetzung des Inkubationspuffers oder aber auch durch die Inkubationstemperatur hervorgerufen werden. Dafür wurde die Bedeutung der Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin zusätzlich im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 23°C untersucht. So konnte ein direkter Vergleich der Wirksamkeiten im

3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 23°C und bei 37°C erfolgen. Die dabei ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung 23 dargestellt, die zugehörigen Kenndaten in Tabelle 25.

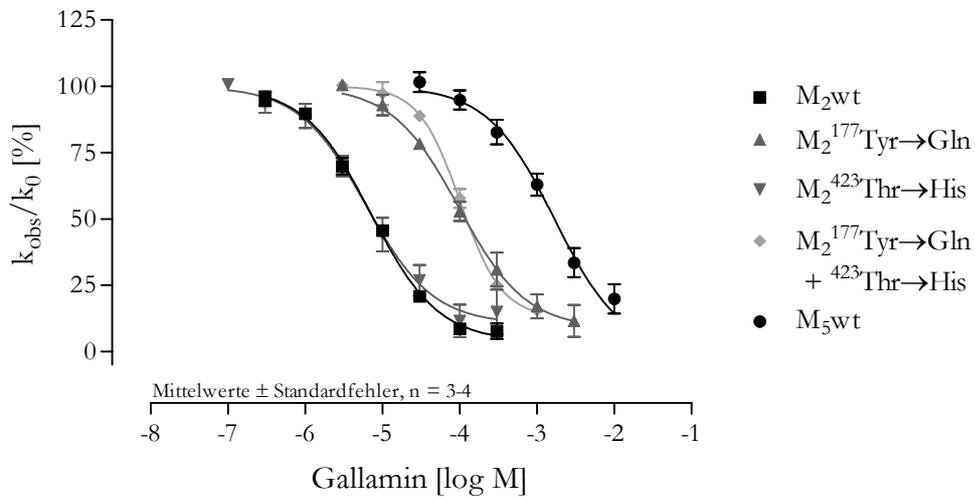


Abbildung 23: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Gallamin an den angegebenen Rezeptorproteinen im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 23°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Rezeptor	pEC _{0.5,diss} [log M]	Δ pEC _{0.5,diss} (M ₂ -Mx)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	5,15 ± 0,03	0	-1,02 ± 0,07	3,7 ^s ± 1,5	3-4
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	4,01 ± 0,06	1,14	-1,07 ± 0,15	8,7 ^s ± 3,1	3
M ₂ ⁴²³ Thr→His	5,21 ^{n.s.} ± 0,08	-0,06	-1,03 ± 0,17	10,4 ^s ± 3,6	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3,99 ± 0,04	1,16	-1,61 ^s ± 0,18	12,9 ^s ± 3,0	3
M ₅ wt	2,77 ± 0,05	2,38	-0,94 ± 0,10	7,1 ± 6,1	3

Tabelle 25: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Gallamin im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 23°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterschieden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0.5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0.5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0.5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (Mx) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Die bei dieser Inkubationstemperatur beobachtete Epitopabhängigkeit zeigt sich beinahe identisch mit der bei 37°C ermittelten. Es zeigt sich eine große Bedeutung der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin, die Aminosäure M₂⁴²³Threonin scheint keinen Beitrag zur M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators zu leisten, die Affinität von Gallamin zur entsprechenden Rezeptormutante unterscheidet sich nicht signifikant von der zum M₂-Rezeptor (t-Test: p = 0,5212), ebenso unterscheidet sich die Bindungsneigung von Gallamin zu der Rezeptormutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin nicht signifikant von der zur Doppelmutante (t-Test: p = 0,7953). Die M₂/M₅-Subtypselektivität wird lediglich durch die Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin vermittelt, diese

vermag das Ausmaß der M_2/M_5 -Subtypselektivität des Modulators Gallamin jedoch nicht vollständig zu erklären.

Obwohl der Wechsel der Inkubationstemperatur erheblichen Einfluss auf die Geschwindigkeit der [3 H]NMS-Dissoziation zeigt (siehe III.1), ändert sich die Wirksamkeit von Gallamin beim Wechsel der Inkubationstemperatur bei gleichbleibendem Inkubationsmedium nur leicht. Eine Gegenüberstellung der Affinitätsparameter von Gallamin bei den verschiedenen Inkubationstemperaturen findet sich in Tabelle 26. Es zeigt sich, dass das Gesamtbild der Epitopabhängigkeit beim Wechsel der Inkubationstemperatur überwiegend erhalten bleibt und die Affinitätsveränderungen bei Temperaturänderung im Vergleich mit den starken Effekten beim Wechsel vom Na, K, P_i -Puffer zum Mg-Tris-Puffer eher gering sind.

Rezeptor	$pEC_{0.5,diss}$ 23°C	$pEC_{0.5,diss}$ 37°C	$\Delta pEC_{0.5,diss}$ ($pEC_{0.5,diss}$ 23°C - $pEC_{0.5,diss}$ 37°C)	p-Wert (t-Test)	$\Delta_{rel.M_2/M_5}$ [%] 23°C	$\Delta_{rel.M_2/M_5}$ [%] 37°C
M_{2wt}	$5,15 \pm 0,03$ (n = 3-4)	$4,82 \pm 0,04$ (n = 3-4)	0,33	0,0027	0	0
$M_{2^{177}Tyr \rightarrow Gln}$	$4,01 \pm 0,06$ (n = 3)	$3,85 \pm 0,02$ (n = 3)	0,16	0,0647	48	47
$M_{2^{423}Thr \rightarrow His}$	$5,21 \pm 0,08$ (n = 3)	$4,66 \pm 0,05$ (n = 3)	0,55	0,0029	-3	8
$M_{2^{177}Tyr \rightarrow Gln}$ + $^{423}Thr \rightarrow His$	$3,99 \pm 0,04$ (n = 3)	$3,63 \pm 0,04$ (n = 3)	0,36	0,0031	49	58
M_{5wt}	$2,77 \pm 0,05$ (n = 3)	$2,75 \pm 0,04$ (n = 4)	0,02	0,7704	100	100

Tabelle 26: Gegenüberstellung der $pEC_{0.5,diss}$ -Werte und der relativen Bedeutung der Epitope für die M_2/M_5 -Subtypselektivität von Gallamin an [3 H]NMS-besetzten Rezeptoren im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 23°C und 37°C. Angegeben ist jeweils als $\Delta pEC_{0.5,diss}$ -Wert die Absolutdifferenz zwischen der Affinität des Modulators Gallamin zum Rezeptor bei 23°C und bei 37°C, der jeweilige p-Wert eines t-Testes für die bei verschiedenen Temperaturen ermittelten Affinitätsparameter, sowie die relative Bedeutung der Epitope für die Subtypselektivität $\Delta_{rel.M_2/M_5}$ [%].

Da die Effekte beim Wechsel der ionalen Zusammensetzung weitaus größer sind und überwiegen, wurde im Folgenden auf eine weitere Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Epitopabhängigkeit allosterischer Modulatoren verzichtet. Zur Untersuchung der Wirksamkeit allosterischer Modulatoren im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer wurde eine Inkubationstemperatur von 37°C der von 23°C vorgezogen, da die Dissoziation von [3 H]N-NMS bei 23°C nur sehr langsam erfolgt und an M_5 -artigen Rezeptoren zu wenig praktikablen Inkubationszeiten führt (siehe III.1, $t_{1/2} = 227$ Minuten, zum Erreichen der Gleichgewichtsbedingungen im Gleichgewichtsbindungsversuch wäre nach Gleichung 23 für eine Gallamin-Konzentration von $10^{-2,52}$ eine Inkubationszeit von mindestens 52 Stunden nötig).

III.2.1.2.4 10 mM HEPES-Puffer mit GDP bei 30°C

Die mit Gallamin im HEPES-Puffer ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung 24 dargestellt, die zugehörigen Kenndaten finden sich in Tabelle 27.

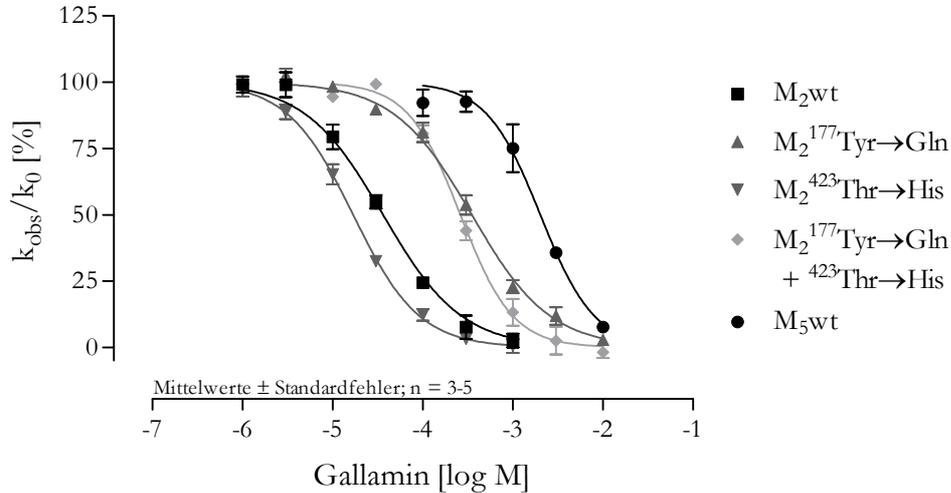


Abbildung 24: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Gallamin an den angegebenen Rezeptorproteinen im 10 mM HEPES-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Rezeptor	pEC _{0,5,diss} [log M]	Δ pEC _{0,5,diss} (M ₂ -M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	4,44 ± 0,04	0	-1,16 ± 0,09	-3,2 ± 3,1	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	3,46 ± 0,03	0,98	-1,05 ± 0,07	-0,6 ± 2,5	3-5
M ₂ ⁴²³ Thr→His	4,77 ± 0,02	-0,33	-1,18 ^s ± 0,07	0,3 ± 1,8	3-5
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3,58 ± 0,03	0,86	-1,49 ^s ± 0,15	-1,1 ± 2,8	3-4
M ₅ wt	2,69 ± 0,05	1,75	-1,45 ^s ± 0,20	-5,9 ± 13,4	3

Tabelle 27: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Gallamin im 10 mM HEPES-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterscheiden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0,5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0,5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0,5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Das Affinitätsniveau von Gallamin ändert sich beim Wechsel vom Mg-Tris-Puffer zum HEPES-Puffer nur geringfügig. Der Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin führt zu einem signifikanten Abfall der Affinität von Gallamin (t-Test, p<0,0001). Hingegen zeigt Gallamin zu der Rezeptormutante M₂⁴²³Threonin→Histidin eine leicht höhere Affinität als zum M₂-Rezeptor (t-Test: p = 0,0018). Diese Beobachtung lässt sich beim Vergleich der Affinitäten von Gallamin zur Einfachmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin und zur Doppelmutante bestätigen, an der Doppelmutante ist die Affinität von Gallamin etwas höher als zur Einfachmutante (t-Test:

$p = 0,0398$). Das Epitop M_2^{423} Threonin scheint im Hepes-Puffer keine Rolle für die M_2/M_5 -Subtypselektivität von Gallamin zu spielen, sondern eher störenden Einfluss auf dessen Affinität zu haben. Die Aminosäure M_2^{177} Tyrosin hingegen besitzt Relevanz für die M_2/M_5 -Subtypselektivität, für diese sind jedoch noch weitere Epitope verantwortlich.

III.2.1.3 Alcuronium

Die Bedeutung der beiden Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin wurde für Alcuronium, das in seiner Wirksamkeit durch wechselnde Inkubationsbedingungen wenig beeinflussbar ist, untersucht.

III.2.1.3.1 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C

Die im Na, K, P_i-Puffer bei 23°C ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung 25 dargestellt.

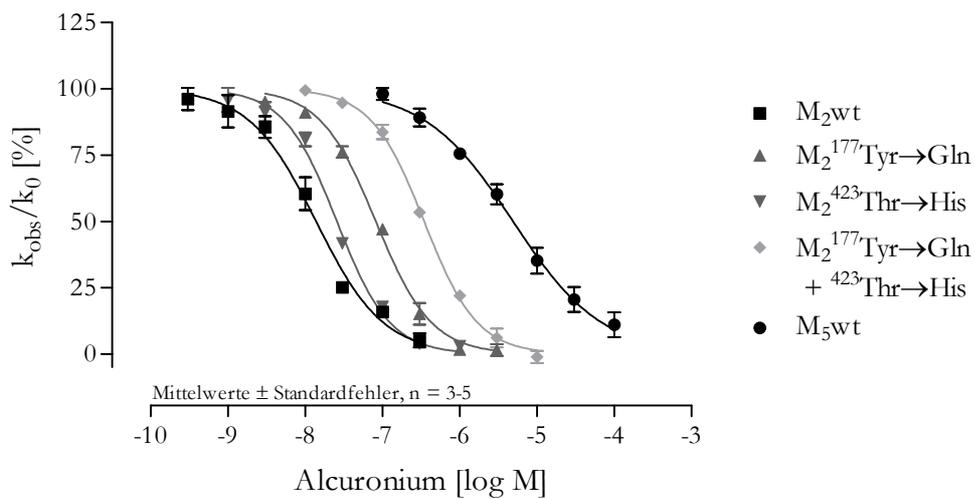


Abbildung 25: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Alcuronium an den angegebenen Rezeptorproteinen im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Die Kenngrößen der in Abbildung 25 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Tabelle 28 aufgeführt.

Rezeptor	pEC _{0.5,diss} [log M]	Δ pEC _{0.5,diss} (M ₂ -M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	7,86 ± 0,05	0	-1,05 ± 0,10	0,9 ± 3,7	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	7,09 ± 0,02	0,77	-1,21 ^s ± 0,07	-2,5 ± 2,1	3
M ₂ ⁴²³ Thr→His	7,59 ± 0,03	0,27	-1,27 ^s ± 0,10	2,0 ± 2,4	3-4
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	6,46 ± 0,02	1,40	-1,26 ^s ± 0,06	-2,1 ± 2,1	3
M ₅ wt	5,31 ± 0,05	2,55	-0,76 ^s ± 0,06	4,3 ± 6,1	5

Tabelle 28: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Alcuronium im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterscheiden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0.5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0.5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0.5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Die einzelne Substitution der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin und M₂⁴²³Threonin→Histidin führt im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor zu einem signifikanten Affinitätsverlust des Modulators Alcuronium am NMS-besetzten Rezeptor. Die Bedeutung des Epitopes M₂⁴²³Threonin für die M₂/M₅-Subtypselektivität ist gering. Beide Epitope können die M₂/M₅-Subtypselektivität von Alcuronium nicht vollständig erklären, daran sind wahrscheinlich weitere noch nicht identifizierte Epitope beteiligt.

III.2.1.3.2 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C

Die Konzentrations-Effekt-Kurven von Alcuronium im Mg-Tris-Puffer finden sich in Abbildung 26.

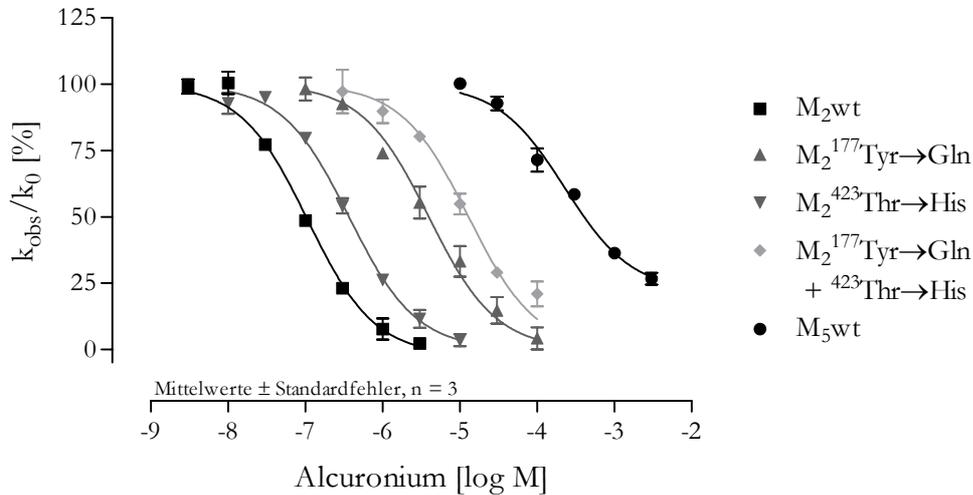


Abbildung 26: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Alcuronium an den angegebenen Rezeptorproteinen im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Die Kenndaten der in Abbildung 26 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Tabelle 29 angegeben.

Rezeptor	pEC _{0,5,diss} [log M]	Δ pEC _{0,5,diss} (M ₂ -Mx)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	7,00 \pm 0,03	0	-1,16 ^s \pm 0,09	2,1 \pm 2,9	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	5,40 \pm 0,05	1,60	-0,86 \pm 0,08	3,9 \pm 3,6	3
M ₂ ⁴²³ Thr→His	6,44 \pm 0,03	0,56	-1,01 \pm 0,06	0,1 \pm 2,2	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	4,89 \pm 0,05	2,11	-0,85 \pm 0,09	11,5 \pm 5,0	3
M ₅ wt	3,64 \pm 0,06	3,36	-0,98 \pm 0,14	21,8 ^s \pm 2,9	3

Tabelle 29: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Alcuronium im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterschieden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0,5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0,5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0,5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (Mx) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Die Affinität von Alcuronium zum M₂-Wildtyp-Rezeptor sinkt beim Wechsel der Inkubationsbedingungen vom Na, K, P_i-Puffer zum Mg-Tris-Puffer nur geringfügig und bestätigt somit die Befunde von Tränkle et al. (1996). Dies lässt sich jedoch nicht an allen untersuchten Rezeptorproteinen beobachten, die Affinität zum M₅-Wildtyp sinkt stärker ab als an M₂ und führt somit zu einer erhöhten M₂/M₅-Subtypselektivität von Alcuronium im Mg-Tris-Puffer.

Durch den einzelnen Austausch der Aminosäuren $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ und $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ kommt es im Vergleich zum M_2 -Rezeptor jeweils zu einem signifikanten Abfall der Affinität des Modulators Alcuronium, der bei Austausch der Aminosäure $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ größer ist als beim Austausch $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$. Durch den gleichzeitigen Austausch beider Aminosäuren in der Doppelmutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ fällt die Affinität von Alcuronium stärker ab als an den beiden Einzelmutanten, der Wert der Affinität zum M_5 -Rezeptor wird jedoch nicht erreicht. Beide Epitope können wie im Na, K, P_i -Puffer die M_2/M_5 Subtypselektivität nicht vollständig erklären.

III.2.1.3.3 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C

Die im Hepes-Puffer beobachteten Konzentrations-Effekt-Kurven von Alcuronium sind in Abbildung 27 dargestellt, die entsprechenden Maßzahlen finden sich in Tabelle 30.

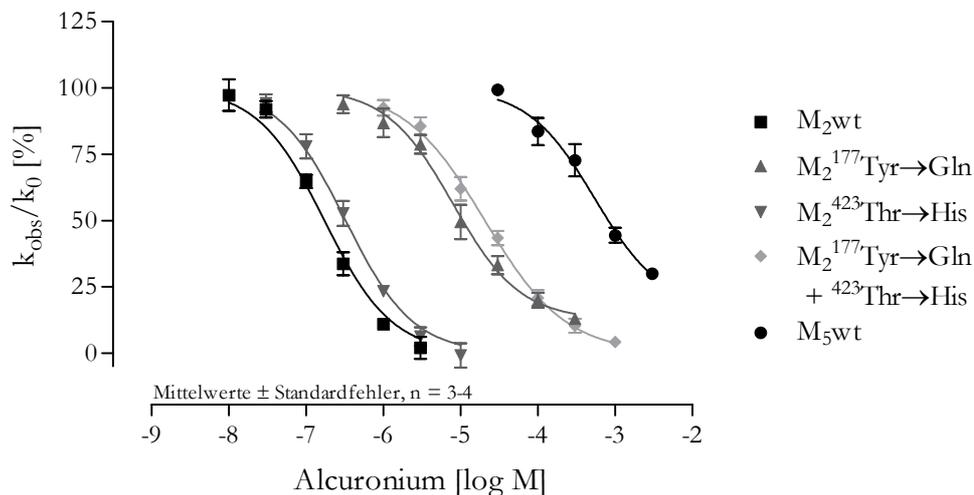


Abbildung 27: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Alcuronium an den angegebenen Rezeptorproteinen im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Rezeptor	pEC _{0.5,diss} [log M]	Δ pEC _{0.5,diss} (M ₂ -Mx)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	6,76 ± 0,04	0	-1,25 ± 0,11	0,1 ± 4,2	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	5,10 ± 0,07	1,66	-0,89 ± 0,13	12,6 ^s ± 3,0	3
M ₂ ⁴²³ Thr→His	6,49 ± 0,04	0,27	-1,13 ± 0,10	5,1 ± 3,0	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	4,68 ± 0,03	2,08	-0,83 ^s ± 0,05	1,1 ± 0,1	3
M ₅ wt	3,26 ± 0,09	3,50	-1,05 ± 0,23	16,8 ^s ± 5,5	3-4

Tabelle 30: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Alcuronium im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterscheiden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0.5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0.5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0.5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (Mx) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Sowohl durch Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin als auch durch Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin kommt es im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor zu einem signifikanten Abfall der Affinität von Alcuronium (t-Test, M₂¹⁷⁷Tyr→Gln: p < 0,0001; M₂⁴²³Thr→His: p = 0,0088). Beide Epitope scheinen somit für die M₂/M₅-Subtypselektivität von Alcuronium im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C verantwortlich zu sein. Die Bedeutung des Epitopes M₂¹⁷⁷Tyrosin ist deutlich größer als die des Epitopes M₂⁴²³Threonin. Der an der Doppelmutante beobachtete Affinitätsverlust liegt nicht auf dem für den M₅-Rezeptor beobachteten Affinitätsniveau, für die M₂/M₅-Subtypselektivität von Alcuronium müssen also noch weitere Epitope eine Rolle spielen. Durch den Wechsel vom Mg-Tris-Puffer zum Hepes-Puffer sinkt die Affinität an allen untersuchten Rezeptorproteinen leicht ab, das Gesamtbild der Epitopabhängigkeit bleibt jedoch erhalten.

III.2.1.3.4 Bedeutung der Aminosäuren M₂⁴²³Threonin und M₂⁴²³Histidin, bzw.

M₅⁴⁷⁸Histidin im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C

Im Verlauf der Anfertigung dieser Arbeit wurde die Rolle des Epitopes M₂⁴²³Threonin im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C für einige allosterische Modulatoren näher erklärt (Prilla et al., 2006). Es konnte gezeigt werden, dass der beim Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin beobachtete Affinitätsabfall im Vergleich zum M₂-Rezeptor für W84 allein auf einem störenden Einfluss durch die Einführung der Aminosäure Histidin in das Rezeptorprotein beruht. An der Rezeptormutante M₂⁴²³Threonin→Alanin konnte kein Abfall der Affinität von W84 beobachtet werden, und der Austausch der Aminosäure Histidin im M₅-Rezeptor (M₅⁴⁷⁸Histidin→Alanin) führte zu einer Affinitätszunahme von W84 im Vergleich zum M₅-Rezeptor.

Auf Grund dieser Erkenntnisse und Fragestellungen zur Epitopabhängigkeit der Kooperativität, die sich aus den Untersuchungen der Interaktion von Alcuronium mit freien Rezeptoren im 10 mM Hepes-Puffer ergaben, wurde die Bedeutung des Epitopes M₂⁴²³Threonin für den Modulator Alcuronium an NMS-besetzten Rezeptoren unter den Inkubationsbedingungen des 10 mM Hepes-Puffers näher untersucht. Dabei sollten Beobachtungen an der Rezeptormutante M₂⁴²³Threonin→Alanin Aufschluß darüber geben, ob der für Alcuronium beobachtete Affinitätsverlust im Vergleich zum M₂-Rezeptor auf eine Störwirkung der in der Mutante M₂⁴²³Threonin→Histidin eingefügten Aminosäure Histidin zurückzuführen ist. Weiteren Aufschluß zur Bedeutung der Aminosäure Histidin für das Bindungsverhalten am M₅-Rezeptor sollten Untersuchungen an den Rezeptormutanten M₅⁴⁷⁸Histidin→Alanin, sowie M₅⁴⁷⁸Histidin→Threonin geben.

Die im Hepes-Puffer mit Alcuronium ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung 28 dargestellt, die entsprechenden Kenndaten sind in Tabelle 31 angegeben.

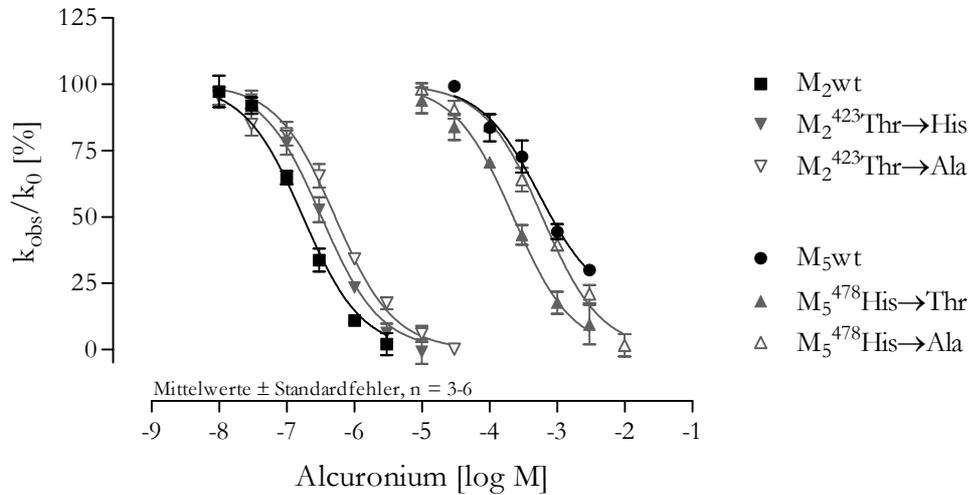


Abbildung 28: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Alcuronium an den angegebenen Rezeptorproteinen im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Rezeptor	pEC _{0.5,diss} [log M]	Δ pEC _{0.5,diss} (Wildtyp – Mutante)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	6,76 ± 0,04	--	-1,25 ± 0,11	0,1 ± 4,2	3
M ₂ ⁴²³ Thr→His	6,49 ± 0,04	0,27	-1,13 ± 0,10	5,1 ± 3,0	3
M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	6,28 ± 0,04	0,48	-0,87 ± 0,07	0,8 ± 2,6	3
M ₅ wt	3,26 ± 0,09	--	-1,05 ± 0,23	16,8 ^s ± 5,5	3-4
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Thr	3,65 ± 0,05	-0,39	-0,93 ± 0,09	2,3 ± 4,6	3
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Ala	3,22 ^{n.s.} ± 0,03	0,04	-0,89 ± 0,06	1,8 ± 3,5	3-6

Tabelle 31: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Alcuronium im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterscheiden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Δ pEC_{0.5,diss} gibt die jeweilige absolute Differenz der Mittelwerte der pEC_{0.5,diss}-Werte zwischen dem Rezeptorwildtyp und der zugehörigen Rezeptormutante an. Unterschied sich der pEC_{0.5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂- bzw. M₅-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet.

Der Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Alanin führt im Vergleich mit der Affinität von Alcuronium zum M₂-Rezeptor zu einem signifikanten Affinitätsverlust. Der pEC_{0.5,diss}-Wert von Alcuronium an der Rezeptormutante M₂⁴²³Threonin→Alanin unterscheidet sich signifikant vom pEC_{0.5,diss}-Wert an der Mutante M₂⁴²³Threonin→Histidin. Das Einbringen der Aminosäure Alanin an Stelle von Histidin führt im M₂-Rezeptor zu einem zusätzlichen Affinitätsverlust. Durch die Mutation M₅⁴⁷⁸Histidin→Alanin kommt es im Vergleich zum M₅-Rezeptor zu keiner signifikanten Änderung der Affinität von Alcuronium zu der entsprechenden Rezeptormutante. Das Einführen der Mutation M₅⁴⁷⁸Histidin→Threonin hingegen führt zu einer Affinitätszunahme

im Vergleich zum M₅-Rezeptor. Die Aminosäure Histidin hat also keine störende Wirkung für die Interaktion von Alcuronium mit dem M₂-Rezeptor oder dem M₅-Rezeptor. Die Interaktion von Alcuronium mit dem Epitop Threonin scheint also ein direkter affinitätsgebender Einfluss dieser Aminosäure zu sein.

III.2.1.4 Diallylcaracurin V

In den Untersuchungen der Epitopabhängigkeit der M₂/M₅-Subtypselektivität von Alcuronium, W84 und Gallamin an NMS-besetzten Rezeptoren unter drei verschiedenen Inkubationsbedingungen zeigte sich, dass bei den stark pufferabhängigen Modulatoren Gallamin und W84 im 5 mM Na, K, P_i-Puffer ein größerer Affinitätsabfall bei Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin im Vergleich zum M₂-Rezeptor erfolgte als bei der nicht pufferabhängigen Substanz Alcuronium. Um zu überprüfen, ob es sich dabei um einen substanzspezifischen Befund oder um einen generellen Effekt der Pufferabhängigkeit handelt, wurden zwei weitere Modulatoren auf ihre Epitopabhängigkeit unter verschiedenen Inkubationsbedingungen untersucht. Da sich bei den vorangegangenen Untersuchungen die größten Affinitätsänderungen jeweils beim Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i-Puffer zum 10 mM Hepes-Puffer ergeben hatten, wurde auf Untersuchungen im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C verzichtet. Als Modulatoren wurden die Caracurinderivate Diallylcaracurin V und CARBEM ausgewählt, wobei Diallylcaracurin V eine hohe und CARBEM eine niedrige Affinitätsänderung im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C beim Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin zeigt (Buller, Dissertationsschrift 2002; Voigtländer et al., 2003). Erkenntnisse zur Pufferabhängigkeit der Wirksamkeit dieser Modulatoren lagen bisher noch nicht vor.

Für die M₂/M₅-Subtypselektivität von Diallylcaracurin V scheinen alleine die beiden Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin verantwortlich zu sein (Voigtländer et al., 2003). Untersuchungen zur dissoziationsverzögernden Wirksamkeit dieses Modulators im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C sollten Aufschluß über den Einfluss unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf die Wirksamkeit dieser Substanz geben und weitere Daten zur Relevanz der Rezeptormutante M₂⁴²³Threonin→Histidin für die Pufferabhängigkeit liefern.

III.2.1.4.1 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C

Die im Na, K, P_i-Puffer ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Diallylcaracurin V sind in Abbildung 29 dargestellt.

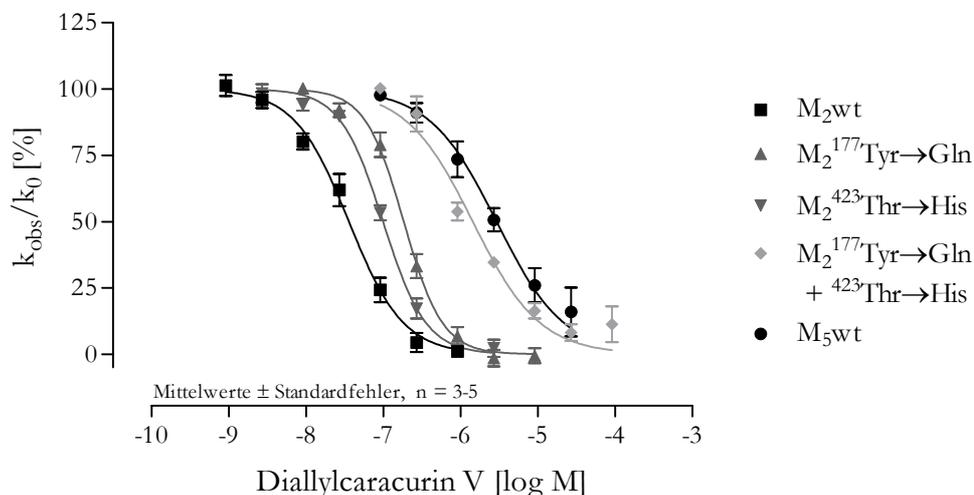


Abbildung 29: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Diallylcaracurin V an den angegebenen Rezeptorproteinen im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Die Kenndaten der in Abbildung 29 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Tabelle 32 aufgeführt.

Rezeptor	pEC _{0,5,diss} [log M]	Δ pEC _{0,5,diss} (M ₂ -M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	7,44 ± 0,04	0	-1,23 ^s ± 0,12	-3,2 ± 4,4	4
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	6,73 ± 0,03	0,71	-1,74 ^s ± 0,17	-1,3 ± 2,3	3
M ₂ ⁴²³ Thr→His	7,00 ± 0,02	0,44	-1,57 ^s ± 0,12	0,4 ± 2,2	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	5,84 ± 0,06	1,60	-1,00 ± 0,12	6,4 ± 3,2	3
M ₅ wt	5,53 ± 0,06	1,91	-0,88 ± 0,11	8,3 ± 6,2	5

Tabelle 32: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Diallylcaracurin V im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterschieden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0,5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0,5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0,5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Durch den Einzelaustausch der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin und M₂⁴²³Threonin→Histidin kommt es im Vergleich zum M₂-Rezeptor jeweils zu einer signifikanten Abnahme der Affinität des Modulators Diallylcaracurin V (t-Test, M₂¹⁷⁷Tyr→Gln: p < 0,0001; M₂⁴²³Thr→His: p = 0,0003). Die Affinität dieses Modulators zur Doppelmutante fällt im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmutanten stark ab, unterscheidet sich jedoch noch signifikant von der Affinität zum M₅-Rezeptor (t-Test: p = 0,0145). Beim Austausch beider Epitope wird an

der Doppelmutante ein größerer Affinitätsabfall beobachtet, als er sich rechnerisch aus der Summe der Affinitätsdifferenzen der Einzelmutanten ergibt. Die beiden Epitope scheinen in ihrer Wechselwirkung mit Diallylcaracurin V also nicht unabhängig voneinander zu sein. Die M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators wird durch die beiden Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin fast vollständig erklärt.

III.2.1.4.2 10 mM HEPES-Puffer bei 30°C

Die im HEPES-Puffer ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung 30 dargestellt.

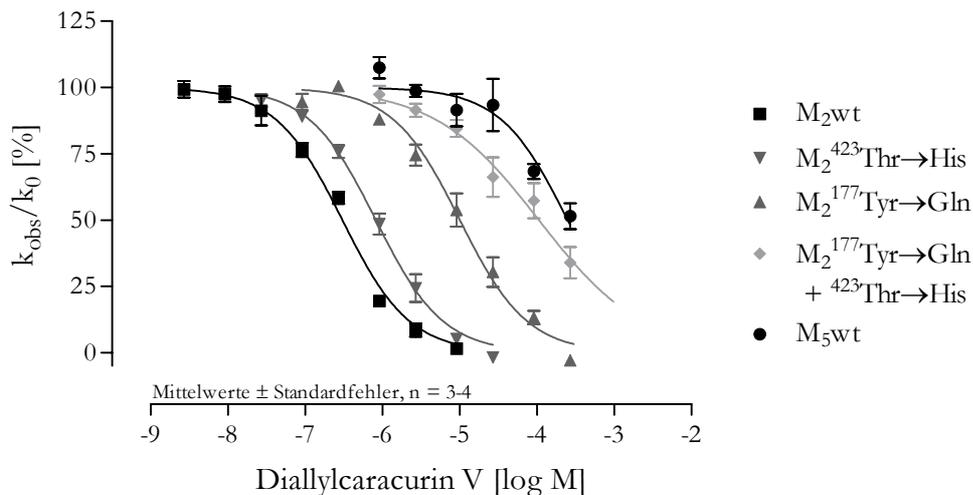


Abbildung 30: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit Diallylcaracurin V an den angegebenen Rezeptorproteinen im 10 mM HEPES-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Die zu Abbildung 30 gehörigen Kenndaten werden in Tabelle 33 angegeben.

Rezeptor	pEC _{0.5,diss} [log M]	Δ pEC _{0.5,diss} (M ₂ -Mx)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	6,52 ± 0,03	0	-1,10 ± 0,08	-3,4 ± 2,6	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	5,00 ± 0,04	1,52	-0,92 ± 0,08	-2,4 ± 3,2	3-4
M ₂ ⁴²³ Thr→His	6,08 ± 0,03	0,44	-1,03 ± 0,07	-4,4 ± 2,2	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3,98 ± 0,09	2,54	-0,64 ^s ± 0,08	0,8 ± 49,9	3-4
M ₅ wt	3,61 ± 0,07	2,91	-0,89 ± 0,19	23,4 ± 23,4	3

Tabelle 33: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Diallylcaracurin V im 10 mM HEPES-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterscheiden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0.5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0.5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0.5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (Mx) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Sowohl durch den Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin als auch durch Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin sinkt die Affinität von Diallylcaracurin V zu diesen

mutierten Rezeptoren signifikant im Vergleich zum M₂-Rezeptor (t-Test, M₂¹⁷⁷Tyr→Gln: $p < 0,0001$; M₂⁴²³Thr→His: $p = 0,0005$). Der an der Doppelmutante beobachtete pEC_{0,5,diss}-Wert unterscheidet sich signifikant vom pEC_{0,5,diss}-Wert des M₅-Rezeptors (t-Test, $p = 0,0318$). Die Erstellung der Konzentrations-Effekt-Kurven an diesen beiden Rezeptorproteinen wurde jedoch durch die mangelnde Verfügbarkeit an Reinsubstanz zur Herstellung höher konzentrierter Lösungen des Modulators limitiert. Daher beinhaltet der für den M₅-Rezeptor ermittelte Wert des unteren Plateaus einen hohen Standardfehler. Die für die jeweiligen Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit ermittelten Werte des unteren Plateaus unterschieden sich im F-Test nicht signifikant vom Wert 0%. Die Bedeutung des Epitopes M₂¹⁷⁷Tyrosin für die M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators Diallylcaracurin V ist größer als die des Epitopes M₂⁴²³Threonin. Der Austausch beider Aminosäuren führt an der Doppelmutante zu einem Affinitätsabfall, der größer ist als die Summe der Affinitätsabfälle an den jeweiligen Einzelmutanten. Beide Epitope sind somit wie im Na, K, P_i-Puffer nicht unabhängig voneinander an der Interaktion von Diallylcaracurin V mit dem NMS-besetzten M₂-Rezeptor beteiligt. Die beiden Epitope scheinen die M₂/M₅-Subtypselektivität fast vollständig zu erklären.

Im Vergleich mit der Affinität von Diallylcaracurin V zum M₂-Rezeptor im Na, K, P_i-Puffer zeigt sich eine deutliche Pufferabhängigkeit der Wirkung beim Wechsel zum Hepes-Puffer, diese nimmt jedoch nicht die gleichen Ausmaße an wie bei W84. Die Bedeutung der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin für die M₂/M₅-Subtypselektivität von Diallylcaracurin V steigt beim Wechsel vom Na, K, P_i-Puffer zum Hepes-Puffer stark an, dies geht einher mit einer Zunahme des absoluten Ausmaßes der M₂/M₅-Subtypselektivität. Das Ausmaß der beobachteten Wirksamkeitsverschiebung von Diallylcaracurin V beim Pufferwechsel liegt etwa auf dem Niveau der bei Alcuronium beobachteten Wirksamkeitsverschiebung und nimmt nicht die gleichen Ausmaße wie bei W84 an, obwohl beide Modulatoren ihre M₂/M₅-Subtypselektivität vollständig von den beiden Epitopen M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin beziehen.

III.2.1.5 CARBEM

Der Modulator CARBEM stellt ein Caracurinderivat dar, das in Dissoziationsverzögerungsversuchen im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C beim Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin keinen signifikanten Affinitätsabfall im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor zeigte (Buller, Dissertationsschrift 2002). Daher wurde diese Substanz ausgewählt, um das Ausmaß ihrer Pufferabhängigkeit zu untersuchen und um beurteilen zu können, inwiefern eine Abhängigkeit der M₂/M₅-Subtypselektivität vom Epitop M₂⁴²³Threonin mit der Pufferabhängigkeit einer Substanz korreliert. Dafür wurde die Rolle der Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin für die M₂/M₅-Subtypselektivität dieses Modulators unter den Bedingungen des 5 mM Na, K, P_i-Puffers bei 23°C und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C überprüft.

III.2.1.5.1 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C

Die Konzentrations-Effekt-Kurven von CARBEM im 5 mM Na, K, P_i-Puffer sind in Abbildung 31 dargestellt.

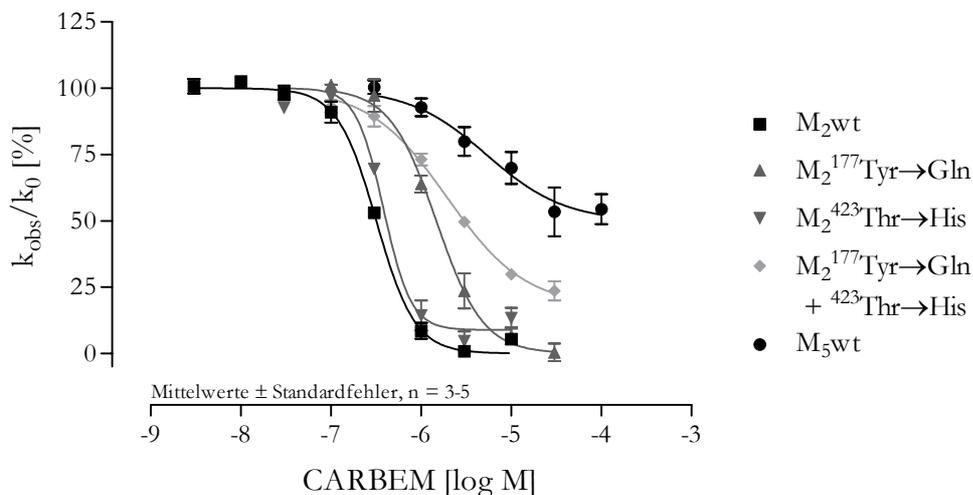


Abbildung 31: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von CARBEM an den angegebenen Rezeptorproteinen im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Die Kenngrößen der in Abbildung 31 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Tabelle 34 angegeben.

Rezeptor	pEC _{0,5,diss} [log M]	Δ pEC _{0,5,diss} (M ₂ -M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	6,50 ± 0,02	0	-2,03 ^s ± 0,18	2,1 ± 1,8	4
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	5,83 ± 0,04	0,67	-1,68 ^s ± 0,20	1,9 ± 3,5	3
M ₂ ⁴²³ Thr→His	6,42 ^{n.s.} ± 0,04	0,08	-2,84 ^s ± 0,75	8,8 ^s ± 3,0	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	5,71 ± 0,05	0,79	-1,01 ± 0,12	17,7 ^s ± 2,8	3
M ₅ wt	5,27 ± 0,18	1,23	-1,11 ± 0,45	49,7 ^s ± 5,4	5

Tabelle 34: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von CARBEM im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterschieden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0,5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0,5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0,5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven von CARBEM am M₂-Rezeptor und an den Rezeptormutanten M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin und M₂⁴²³Threonin→Histidin zeichnen sich durch sehr steile Kurvenverläufe aus, der Hill-Koeffizient dieser Kurven unterscheidet sich deutlich und signifikant vom Wert -1. Dies bestätigt die von Buller (Dissertationsschrift, 2002) erhobenen Befunde der Wirksamkeit von CARBEM, die von ihm ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven zeichnen sich ebenfalls durch steile Kurvenverläufe aus. Durch den Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin kommt es im Vergleich zum M₂-Rezeptor zu keinem signifikanten Affinitätsverlust des Modulators CARBEM, wie auf Grund der von Buller (Dissertationsschrift, 2002) erhobenen Befunde zu erwarten war. Ebenso unterscheiden sich die pEC_{0,5,diss}-Werte an den Rezeptormutanten M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin und M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²³Threonin→Histidin nicht signifikant voneinander. Das Epitop M₂⁴²³Threonin→Histidin scheint somit keinen Beitrag zur M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators CARBEM zu leisten. Durch den Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin kommt es im Vergleich zum M₂-Rezeptor zu einem starken und signifikanten Abfall der Affinität des Modulators CARBEM. Die Affinität des Modulators CARBEM zur Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²³Threonin→Histidin unterscheidet sich nicht signifikant von der Affinität zum M₅-Rezeptor. Der ermittelte dem pEC_{0,5,diss}-Wert an der Einzelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin unterscheidet sich ebenfalls nicht signifikant von dem am M₅-Rezeptors beobachteten Wert (t-Test, p = 0,0598). Auf Grund der experimentellen Streuung lässt sich jedoch keine Aussage darüber treffen, ob die M₂/M₅-Subtypselektivität von CARBEM alleinig durch das Epitop M₂¹⁷⁷Tyrosin vermittelt wird.

Im Vergleich mit Diallylcaracurin V zeigt CARBEM im 5 mM Na, K, P_i-Puffer eine geringere Affinität zum M₂-Rezeptor, eine kleinere M₂/M₅-Subtypselektivität und eine sehr hohe Steilheit der Konzentrations-Effekt-Kurven.

III.2.1.5.2 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C

Die im 10 mM Hepes-Puffer ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung 32 dargestellt, die zugehörigen Maßzahlen finden sich in Tabelle 35.

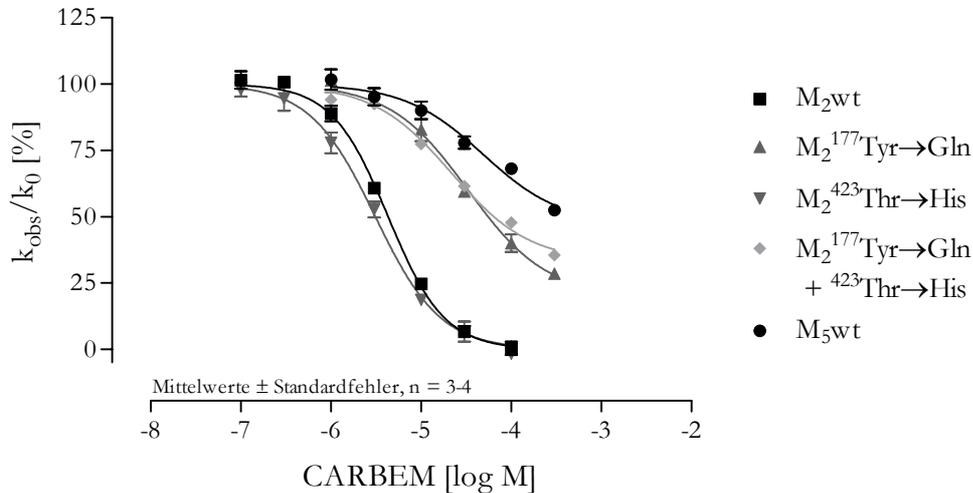


Abbildung 32: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von CARBEM an den angegebenen Rezeptorproteinen im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Rezeptor	pEC _{0.5,diss} [log M]	Δ pEC _{0.5,diss} (M ₂ -M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	5,37 ± 0,02	0	-1,39 ^s ± 0,08	-0,1 ± 2,3	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	4,48 ± 0,06	0,89	-1,26 ± 0,16	20,1 ^s ± 3,3	3
M ₂ ⁴²³ Thr→His	5,51 ± 0,03	-0,14	-1,20 ^s ± 0,09	-3,0 ± 3,2	3-4
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	4,66 ± 0,05	0,71	-0,82 ± 0,09	33,2 ^s ± 2,2	3
M ₅ wt	4,31 ± 0,11	1,06	-0,79 ± 0,20	47,1 ^s ± 4,3	3

Tabelle 35: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von CARBEM im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterscheiden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0.5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0.5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0.5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Der Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin führt zu einer leichten statistisch signifikanten Affinitätszunahme von CARBEM im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor. Der pEC_{0.5,diss}-Wert von CARBEM an der Einzelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin unterscheidet sich nicht signifikant vom an der Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²³Threonin→Histidin ermittelten Wert. Die Aminosäure M₂⁴²³Threonin leistet also keinen Beitrag zur M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators. An der Rezeptormutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin zeigt sich eine im Vergleich zum M₂-Rezeptor verminderte Affinität von CARBEM. Der an der

Rezeptormutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin beobachtete pEC_{0.5,diss}-Wert unterscheidet sich nicht signifikant von dem am M₅-Rezeptor ermittelten Wert. Die Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin scheint alleine für die M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators unter den beobachteten Inkubationsbedingungen verantwortlich zu sein.

Der Vergleich der Wirksamkeitsverschiebungen von CARBEM und Diallylcaracurin V beim Wechsel der Inkubationspuffer zeigt, dass beide Substanzen in ähnlich starkem Ausmaß durch wechselnde Inkubationsbedingungen beeinflussbar sind, obwohl beide eine unterschiedliche Abhängigkeit ihrer Wirksamkeit von der Aminosäure M₂⁴²³Threonin zeigen. Die „Threonin-Abhängigkeit“ eines allosterischen Modulators korreliert nach diesen Befunden nicht mit dem Ausmaß der Pufferabhängigkeit einer Substanz.

III.2.2 Bedeutung der Aminosäure M₂¹⁷⁵Glutamat für die Affinität des Modulators W84

Da die vorangehenden Versuche gezeigt hatten, dass die M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators W84 unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen im Wesentlichen erhalten bleibt, scheint der beobachtete Affinitätsverlust beim Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i-Puffer zu physiologischeren Pufferbedingungen wie einem 3/50 mM Mg-Tris-Puffer oder 10 mM Hepes-Puffer auf eine veränderte Basisaffinität des Modulators W84 an Muskarinrezeptoren hinzudeuten. Die Aminosäure M₂¹⁷⁵Glutamat stellt eine der drei negativen Aminosäuren der sogenannten EDGE-Sequenz in Position M₂¹⁷²⁻¹⁷⁵ der zweiten extrazellulären Schleife dar (Leppik et al., 1994). Es ist postuliert worden, dass zweiwertige Kationen durch Interaktion mit dieser EDGE-Sequenz zu einer verminderten Affinität von allosterischen Modulatoren zum M₂-Rezeptor führen (Burgmer et al., 1998). Durch den Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁵Glutamin→Alanin sollte die Bedeutung dieser Aminosäure für die Basisaffinität des Modulators W84 unter Pufferbedingungen in Anwesenheit von zweiwertigen Magnesiumkationen untersucht werden. Da in vorangehenden Untersuchungen die größten Wirksamkeitsverschiebungen von W84 beim Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i-Puffer zum 10 mM Hepes-Puffer zu beobachten waren, wurden die folgenden Versuche im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C durchgeführt. Da diese Versuche lediglich die Relevanz dieses Epitopes im 10 mM Hepes-Puffer untersuchen sollten, wurde auf eine Wiederholung der Untersuchungen von Raasch (Raasch, Dissertationschrift 2003) an der Rezeptormutante M₂¹⁷⁵Glutamat→Alanin im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C am Tomtec-Harvester verzichtet. Die Konzentrations-Effekt-Kurve von W84 an der Rezeptormutante M₂¹⁷⁵Glutamat→Alanin ist zur Übersicht gemeinsam mit den am M₂-Rezeptor ermittelten Daten in Abbildung 34 dargestellt.

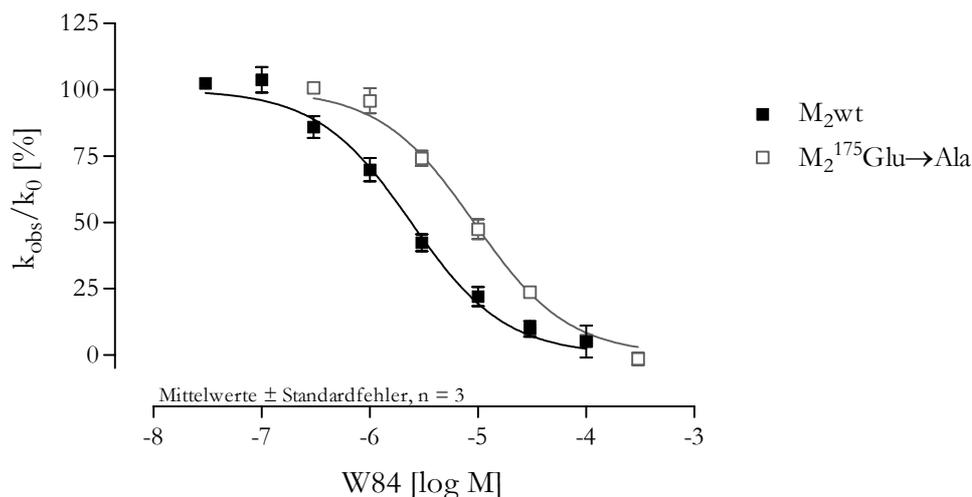


Abbildung 33: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von W84 an den angegebenen Rezeptor im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Die Kenndaten der in Abbildung 34 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Tabelle 36 angegeben.

Rezeptor	$pEC_{0,5,diss}$ [log M]	n_H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M_2^{wt}	$5,62 \pm 0,05$	$-0,96 \pm 0,09$	$3,4 \pm 3,0$	3
$M_2^{175}Glu \rightarrow Ala$	$5,04 \pm 0,04$	$-1,11 \pm 0,08$	$-4,5 \pm 2,5$	3

Tabelle 36: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von W84 im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant vom Wert -1 , so ist dieser Wert mit dem Zeichen * gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterscheiden, sind mit dem Zeichen * gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der $pEC_{0,5,diss}$ -Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M_2 -Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet.

Durch den Austausch der Aminosäure M_2^{175} Glutamat \rightarrow Alanin kommt es zu einem statistisch signifikanten Abfall der Affinität des Modulators W84 im Vergleich zum NMS-besetzten M_2 -Rezeptor. Die Aminosäure M_2^{175} Glutamat besitzt unter den beobachteten Inkubationsbedingungen eine Bedeutung für die Basisaffinität von W84. In Tabelle 37 sind die in dieser Arbeit im 10 mM Hepes-Puffer mit GDP bei 30°C ermittelten $pEC_{0,5,diss}$ -Werte des Modulators W84 den Kenndaten gegenübergestellt, die Raasch (Raasch, Dissertationsschrift 2003) im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C beobachten konnte.

Rezeptor	10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C, Tomtec-Harvester		5 mM Na, K, P _i -Puffer bei 23°C, Brandel-Harvester (Raasch)	
	pEC _{0.5,diss} [log M]	Δ pEC _{0.5,diss} (M ₂ -M _x)	pEC _{0.5,diss} [log M]	Δ pEC _{0.5,diss} (M ₂ -M _x)
M ₂ wt	5,62	0	7,43	0
M ₂ ¹⁷⁵ Glu→Ala	5,04	0,58	6,96	0,47

Tabelle 37: Dissoziationsverzögernde Wirksamkeit des Modulators W84 an den angegebenen NMS-besetzten Rezeptortypen, angegeben als pEC_{0.5,diss}-Werte, die im Rahmen von Dissoziationsverzögerungsversuchen mit 2-Punkt-Kinetik ermittelt wurden. Den in dieser Arbeit im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C ermittelten Kenndaten sind die von Raasch (Raasch, Dissertationsschrift 2003) im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C am Brandel-Harvester erhobenen Befunde gegenübergestellt. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0.5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0.5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Der Vergleich der in Tabelle 37 angegebenen Kenndaten zeigt, dass die Bedeutung des Epitopes M₂¹⁷⁵Glutamat für die Affinität des Modulators W84 unter beiden Inkubationsbedingungen ähnlich ist. Da die affinitätsgebende Rolle des Epitopes M₂¹⁷⁵Glutamat beim Wechsel der Inkubationsbedingungen unbeeinflusst bleibt, scheinen unterschiedliche Pufferbedingungen dieses Epitop nicht in seiner Interaktion mit dem Modulator W84 zu beeinträchtigen. Der absolute Beitrag von M₂¹⁷⁵Glutamat zur Affinität von W84 ist im Mg²⁺-haltigen Hepes-Puffer genauso hoch wie im Mg²⁺-freien Na, K, P_i-Puffer. Die Gegenwart von Mg²⁺-Ionen „neutralisiert“ somit nicht M₂¹⁷⁵Glutamat. Die beobachteten Wirksamkeitsverschiebungen beim Wechsel der Inkubationsbedingungen lassen sich also nicht auf eine veränderte Affinität des Modulators W84 zur der Aminosäure M₂¹⁷⁵Glutamat zurückführen.

III.2.3 Bedeutung der Aminosäuren M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan für die Affinität allosterischer Modulatoren

Wie in den vorangehenden Abschnitten geschildert, hatten Versuche zur M_2/M_5 -Subtypselektivität allosterischer Modulatoren ergeben, dass die beim Wechsel der Inkubationsbedingungen beobachteten Wirksamkeitsverschiebungen im Wesentlichen nicht auf eine veränderte Bedeutung der Epitope M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin zurückgehen. Stattdessen könnten Epitope, die für die Basisaffinität allosterischer Modulatoren verantwortlich sind, stärker durch einen Wechsel der Inkubationspuffer beeinflusst werden. Die Aminosäure M_2^{422} Tryptophan spielt im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C eine wichtige Rolle für die Basisaffinität allosterischer Modulatoren an NMS-besetzten Muskarinrezeptoren, während die Bedeutung des Epitopes M_2^{427} Tryptophan eher gering ist (Prilla et al., 2006). Die Bedeutung dieser Epitope unter verschiedenen Inkubationsbedingungen war jedoch unklar, daher sollte ihre Rolle bezüglich der Pufferabhängigkeit näher untersucht werden.

Bei diesen Aminosäuren handelt es sich um im M_2 - und M_5 -Rezeptor konservierte Aminosäuren, daher wurden jeweils Rezeptormutanten untersucht, in denen die entsprechende Aminosäure gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht worden war. Da die vorangegangenen Versuche gezeigt hatten, dass die größte Affinitätsdifferenz im Vergleich zu den Experimenten im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C bei Durchführung der Versuche im 10 mM HEPES-Puffer bei 30°C auftrat und außerdem die Wirksamkeitsverschiebungen beim Wechsel vom 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C zum 10 mM HEPES-Puffer bei 30°C eher gering ausfallen, wurden hier lediglich Versuche im HEPES-Puffer durchgeführt und es wurde auf weitere Experimente im Mg-Tris-Puffer verzichtet. Die Untersuchungen von Prilla et al. (2006) hatten die beiden Epitope M_5^{477} Tryptophan und M_5^{482} Tryptophan einbezogen, um deren Bedeutung für die Affinität allosterischer Modulatoren zum M_5 -Rezeptor im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C zu bestimmen. Da in dieser Arbeit die Betrachtung der pufferinduzierten Wirksamkeitsverschiebungen am M_2 -Rezeptor im Vordergrund stand, wurde von einer Untersuchung der entsprechenden M_5 -Rezeptormutanten abgesehen.

III.2.3.1 W84 im 10 mM HEPES-Puffer

W84 hatte in Untersuchungen im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C eine deutliche Abhängigkeit von der Aminosäure M_2^{422} Tryptophan gezeigt, während ein Austausch der Aminosäure M_2^{427} Tryptophan keinen Effekt auf die Bindungsneigung dieses Modulators an NMS-besetzten Rezeptoren hatte (Prilla et al., 2006).

Die Konzentrations-Effekt-Kurven von W84 an den entsprechenden Tryptophan-

Rezeptormutanten sind in Abbildung 34 dargestellt, die zugehörigen Kenndaten finden sich in Tabelle 38.

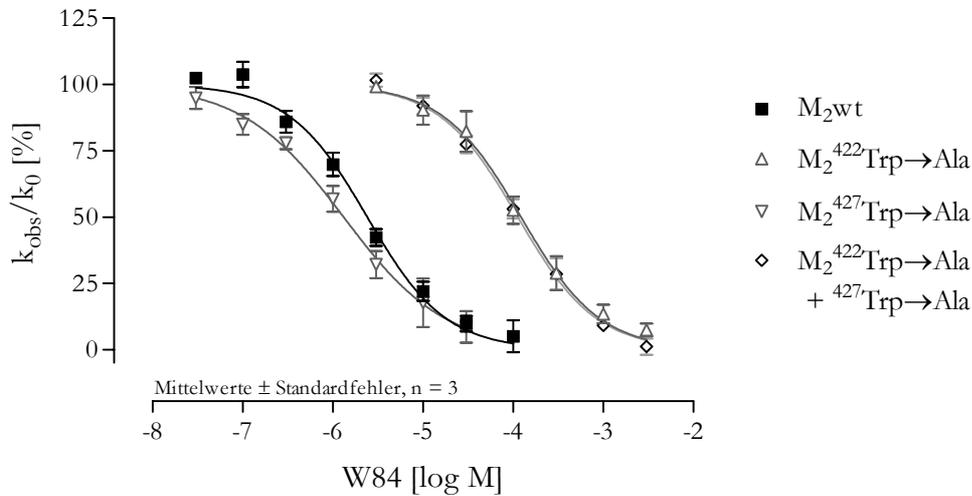


Abbildung 34: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von W84 an den angegebenen Rezeptorproteinen im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Rezeptor	pEC _{0,5,diss} [log M]	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	5,62 ± 0,05	-0,96 ± 0,09	3,4 ± 3,0	3
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	3,91 ± 0,05	-0,95 ± 0,10	3,8 ± 3,8	3
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	5,88 ± 0,06	-0,78 ^s ± 0,08	0,3 ± 8,7	3
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	3,95 ± 0,04	-1,02 ± 0,08	-1,8 ± 2,8	3

Tabelle 38: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von W84 im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterscheiden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0,5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet.

Der Austausch der Aminosäure M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin führt zu einem leichten signifikanten Anstieg der Affinität von W84 im Vergleich zum M₂-Wildtyp (t-Test: p = 0,0291). Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse von Prilla et al. (2006), die in analogen Experimenten ebenfalls einen leichten signifikanten Anstieg der Affinität beobachteten. Durch den Austausch der Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan→Alanin kommt es zu einem starken Affinitätsverlust im Vergleich zum M₂-Rezeptor. Der Modulator W84 weist zu der Doppelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin+⁴²⁷Tryptophan→Alanin die gleiche Affinität auf wie zu der einfachen Mutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin (t-Test: p = 0,5660). Somit besitzt das Epitop M₂⁴²²Tryptophan im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C eine große Bedeutung für die Affinität von W84 am M₂-Rezeptor, während das Epitop M₂⁴²⁷Tryptophan keine Relevanz aufweist. In Tabelle 39 sind die in dieser Arbeit im 10 mM Hepes-Puffer 30°C ermittelten pEC_{0,5,diss}-Werte

von W84 den Kenndaten gegenüberstellt, die Prilla (Prilla et al., 2006) im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C ermittelt hat.

Rezeptor	10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C, Tomtec-Harvester		5 mM Na, K, P _i -Puffer bei 23°C, Brandel-Harvester (<i>S. Prilla</i>)	
	pEC _{0,5,diss} [log M]	Δ pEC _{0,5,diss} (M ₂ -M _x)	pEC _{0,5,diss} [log M]	Δ pEC _{0,5,diss} (M ₂ -M _x)
M ₂ wt	5,62	0	7,40	0
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	3,91	1,71	5,89	1,51
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	5,88	-0,26	7,48	-0,08
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²² Trp→Ala	3,95	1,67	5,92	1,48

Tabelle 39: Dissoziationsverzögernde Wirksamkeit von W84 an den angegebenen NMS-besetzten Rezeptortypen, angegeben als pEC_{0,5,diss}-Werte, die im Rahmen von Dissoziationsverzögerungsversuchen ermittelt wurden. Den in dieser Arbeit im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C ermittelten Kenndaten sind die von Prilla (Prilla et al., 2006) im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C erhobenen Befunde gegenübergestellt. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0,5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0,5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Der Vergleich der in Tabelle 39 angegebenen Kenndaten zeigt, dass die Bedeutung der Epitope M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan für die Basisaffinität von W84 unter den beiden untersuchten Inkubationsbedingungen nahezu gleich ist.

III.2.3.2 Gallamin im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C

Für den Modulator Gallamin war die Bedeutung der Epitope M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan für die Basisaffinität zum M₂-Rezeptor in vorangehenden Experimenten im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C untersucht worden (Prilla et al., 2006). Beim Austausch der Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan zu der Aminosäure Alanin ließ sich in diesen Untersuchungen ein Affinitätsverlust von Gallamin feststellen, während das Epitop M₂⁴²⁷Tryptophan kaum Bedeutung für die Affinität von Gallamin zu NMS-besetzten M₂-Rezeptoren hatte. Die im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C an den entsprechenden Rezeptoren ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven von Gallamin sind in Abbildung 35 dargestellt, die zugehörigen Maßzahlen finden sich in Tabelle 40.

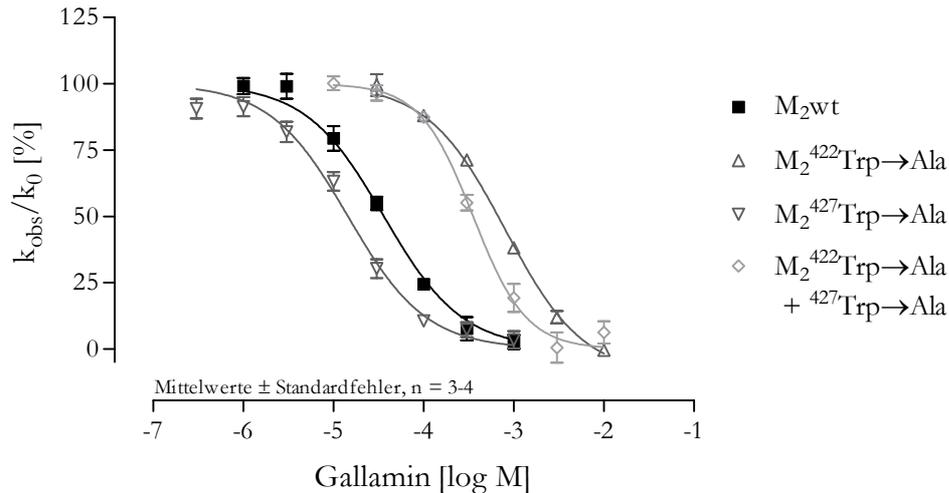


Abbildung 35: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Gallamin an den angegebenen Rezeptorproteinen im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Rezeptor	pEC _{0,5,diss} [log M]	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	4,44 ± 0,04	-1,16 ± 0,09	-3,2 ± 3,1	3
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	3,09 ± 0,04	-1,11 ± 0,08	-9,9 ^s ± 2,5	3
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	4,83 ± 0,04	-0,99 ± 0,08	0,8 ± 2,6	3-4
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	3,45 ± 0,04	-1,47 ± 0,15	2,2 ± 3,2	3

Tabelle 40: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Gallamin im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterscheiden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0,5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet.

Durch den Austausch der Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan→Alanin kommt es zu einem signifikanten Abfall der Affinität des Modulators Gallamin im Vergleich zum M₂-Rezeptor. Ein Austausch der Aminosäure M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin führt hingegen zu einer statistisch signifikanten Affinitätszunahme (t-Test: p = 0,0023). Diese Effekte scheinen sich additiv zu verhalten, an der Doppelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin + ⁴²⁷Tryptophan→Alanin wird eine signifikant höhere Affinität als an der Einzelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin beobachtet (t-Test: p = 0,0031). Die Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan hat somit eine große Bedeutung für die Affinität von Gallamin, wohingegen die Aminosäure M₂⁴²⁷Tryptophan eher eine störende Wirkung für die Bindung des Modulators an den NMS-besetzten M₂-Rezeptor hat. In Tabelle 41 sind die im 10 mM Hepes-Puffer mit GDP bei 30°C erhaltenen Kenndaten den von Prilla (Prilla et al., 2006) im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C ermittelten Daten gegenübergestellt.

Rezeptor	10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C, Tomtec-Harvester		5 mM Na, K, P _i -Puffer, 23°C, Brandel-Harvester (Prilla)	
	pEC _{0.5,diss} [log M]	Δ pEC _{0.5,diss} (M ₂ -Mx)	pEC _{0.5,diss} [log M]	Δ pEC _{0.5,diss} (M ₂ -Mx)
M ₂ wt	4,44	0	6,96	0
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	3,09	1,35	5,93	1,03
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	4,83	-0,39	6,86	0,1
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	3,45	0,99	5,79	1,17

Tabelle 41: Dissoziationsverzögernde Wirksamkeit von Gallamin an den angegebenen NMS-besetzten Rezeptortypen, angegeben als pEC_{0.5,diss}-Werte, die im Rahmen von Dissoziationsverzögerungsversuchen ermittelt wurden. Den in dieser Arbeit im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C ermittelten Kenndaten sind die von Prilla (Prilla et al., 2006) im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C erhobenen Befunde gegenübergestellt. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0.5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0.5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (Mx) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Der Vergleich der in dieser Arbeit erhobenen Daten mit den Befunden von Prilla et al. (2006) zeigt, dass die Bedeutung des Epitopes M₂⁴²²Tryptophan für die Basisaffinität des Modulators Gallamin beim Wechsel zu physiologischeren Inkubationsbedingungen erhalten bleibt. Das Epitop M₂⁴²⁷Tryptophan scheint im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C keine Bedeutung für die Affinität von Gallamin zu NMS-besetzten M₂-Rezeptoren zu haben, im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C beobachtet man beim Austausch dieser Aminosäure eine erhöhte Affinität des Modulators Gallamin zur Rezeptormutante M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin, die Aminosäure Tryptophan besitzt unter diesen Inkubationsbedingungen also eher eine störende Wirkung für die Affinität des Modulators Gallamin. Unter beiden untersuchten Inkubationsbedingungen besitzt das Epitop M₂⁴²⁷Tryptophan keine affinitätsgebenden Eigenschaften für Gallamin.

III.2.3.3 Alcuronium im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C

Die Bedeutung der Epitope M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan für die Basisaffinität von Alcuronium an NMS-besetzten Rezeptoren wurde von Prilla im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C untersucht (Prilla, Dissertationsschrift 2006). Dabei konnte nur ein geringer Beitrag dieser beiden Epitope zur Affinität des Modulators beobachtet werden. Da die von Buller (2002) und Prilla (Prilla, Dissertationsschrift 2006) ermittelten Wirksamkeiten von Alcuronium sich von den in dieser Arbeit beobachteten Werten unterschieden (siehe VI.2.2), wurde die Relevanz dieser Epitope zur besseren Vergleichbarkeit der Daten untereinander nochmals im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C untersucht. Die dabei ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung 36 dargestellt.

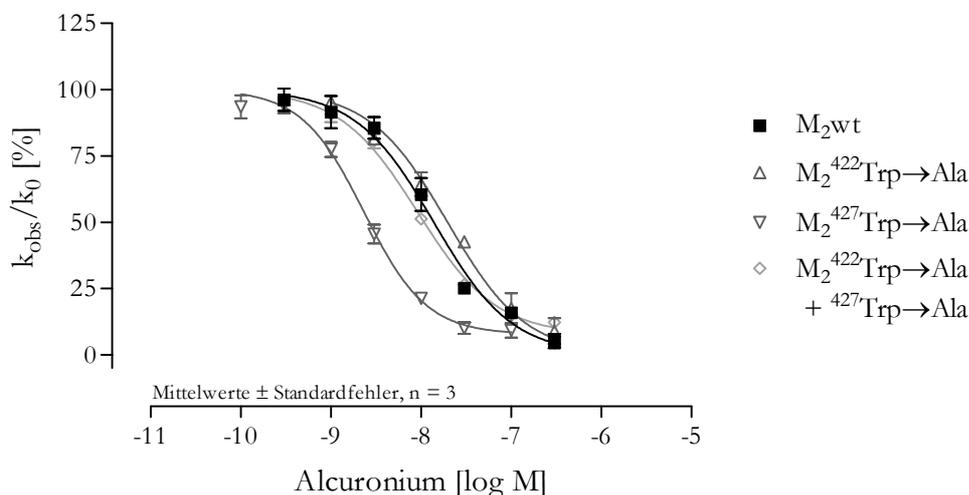


Abbildung 36: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Alcuronium an den angegebenen Rezeptorproteinen im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Die ermittelten Kenngrößen der in Abbildung 36 dargestellten Konzentration-Effekt-Kurven werden in Tabelle 40 angegeben.

Rezeptor	pEC _{0.5,diss} [log M]	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	7,86 ± 0,05	-1,05 ± 0,10	0,9 ± 3,7	3
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	7,71 ^{n.s.} ± 0,04	-0,88 ± 0,07	4,3 ± 3,5	3
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	8,63 ± 0,13	-1,26 ^s ± 0,04	7,7 ^s ± 2,5	3
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	8,04 ± 0,03	-1,14 ± 0,08	7,6 ^s ± 1,6	3

Tabelle 42: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Alcuronium im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterscheiden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0.5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet.

Der Austausch der Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan zu Alanin führt zu keinem signifikanten Abfall der Affinität von Alcuronium an NMS-besetzten Rezeptoren. Durch die Mutation M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin wird die Affinität des Modulators im Vergleich zum M₂-Rezeptor signifikant erhöht. Beide Effekte finden sich anscheinend in der Affinität von Alcuronium zur Doppelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin + ⁴²⁷Tryptophan→Alanin wieder, die zwischen den Affinitäten zu den Einzelmutanten und etwas höher als zum M₂-Rezeptor liegt und sich signifikant von der Affinität zum M₂-Rezeptor unterscheidet. Die Basisaffinität von Alcuronium zu M₂-Rezeptoren zeigt somit keine Abhängigkeit vom Epitop M₂⁴²²Tryptophan, das Epitop M₂⁴²⁷Tryptophan scheint eher störenden Einfluss auf die Interaktion des Modulators Alcuronium mit dem Rezeptor zu haben. Diese Ergebnisse bestätigen die von Prilla (Prilla, Dissertationsschrift 2006) erhobenen Befunde zur Tryptophanabhängigkeit von Alcuronium.

III.2.3.4 Alcuronium im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C

Die im 10 mM Hepes-Puffer ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung 37 angegeben, die zugehörigen Kenndaten finden sich in Tabelle 43.

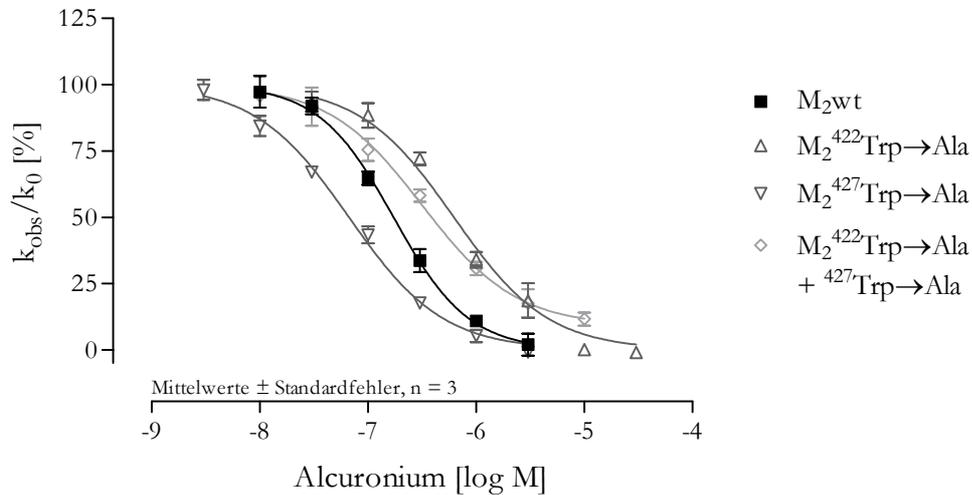


Abbildung 37: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Alcuronium an den angegebenen Rezeptorproteinen im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Rezeptor	pEC _{0,5,diss} [log M]	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	6,76 ± 0,04	-1,25 ± 0,11	0,1 ± 4,2	3
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	6,21 ± 0,04	-1,14 ± 0,11	-1,9 ± 2,0	3
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	7,18 ± 0,03	-0,98 ± 0,03	-1,9 ± 2,0	3
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	6,50 ± 0,06	-0,93 ± 0,12	9,1 ^s ± 3,0	3

Tabelle 43: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Alcuronium im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterschieden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0,5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet.

Die in Tabelle 43 aufgeführten pEC_{0,5,diss}-Werte unterscheiden sich alle signifikant voneinander. Durch den Austausch der Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan in die Aminosäure Alanin kommt es zu einem leichten Affinitätsverlust von Alcuronium, an der Rezeptormutante M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin findet man einen leichten Affinitätsgewinn im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor. Die Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan scheint somit einen Beitrag zur Basisaffinität von Alcuronium zu leisten, während die Aminosäure M₂⁴²⁷Tryptophan eher einen störenden Einfluss auf die Bindung von Alcuronium an den Rezeptor hat. An der Doppelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin + ⁴²⁷Tryptophan→Alanin finden sich die Effekte der Einzelmutanten als offenbar additive Beiträge zur Affinität wieder. Beide Effekte scheinen sich additiv und somit unabhängig voneinander zu verhalten.

Die Bedeutung der beiden Epitope M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan für die Affinität von Alcuronium ist unter den beiden betrachteten Inkubationsbedingungen gleich.

III.2.4 Bedeutung der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²²Tryptophan für die Affinität von Naphmethonium (MM3A) im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C

Der Modulator Naphmethonium wurde hinsichtlich seiner Epitopabhängigkeit von Prilla (Prilla, Dissertationsschrift 2006) im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass die beiden Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin die M₂/M₅-Subtypselektivität dieses Modulators vollständig erklären können. Die Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan konnte als wichtiges Epitop für die Basisaffinität dieses Modulators identifiziert werden. Da die vorangegangenen Untersuchungen gezeigt hatten, dass die Epitopabhängigkeit allosterischer Modulatoren beim Wechsel der Inkubationsbedingungen weitgehend erhalten bleibt, sollte in dieser Arbeit lediglich untersucht werden, welche Auswirkungen ein Austausch der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin, M₂⁴²²Tryptophan→Alanin und der Austausch dieser beiden Aminosäuren in der Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²²Tryptophan→Alanin für die Affinität des Modulators Naphmethonium im 10 mM Hepes-Puffer im Vergleich zum M₂-Rezeptor hat.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven von Naphmethonium an den entsprechenden Rezeptormutanten im Hepes-Puffer werden in Abbildung 38 dargestellt.

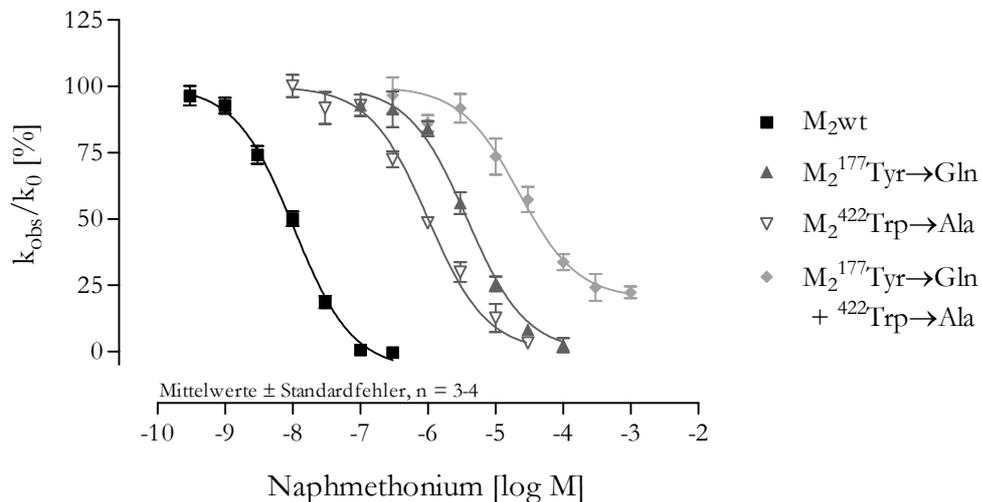


Abbildung 38: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Naphmethonium an den angegebenen Rezeptorproteinen im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Die Kenndaten der in Abbildung 38 dargestellten Konzentrations-Wirkungs-Kurven sind in Tabelle 44 aufgeführt.

Rezeptor	pEC _{0,5,diss} [log M]	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	7,99 ± 0,04	-1,06 ± 0,09	-6,7 ^s ± 2,2	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	5,42 ± 0,04	-1,10 ± 0,10	-3,4 ± 3,9	3-4
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	6,00 ± 0,04	-0,87 ± 0,07	4,2 ± 3,3	3-4
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²² Trp→Ala	4,65 ± 0,09	-0,82 ± 0,15	20,0 ^s ± 3,7	3

Tabelle 44: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Naphmethonium im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant vom Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterschieden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0,5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet.

Sowohl durch den Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin als auch durch den der Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan→Alanin kommt es zu einem starkem Abfall der Affinität von Naphmethonium im Vergleich zum M₂-Rezeptor. In Tabelle 45 sind die in dieser Arbeit unter den Bedingungen des 10 mM Hepes-Puffers bei 30°C erhobenen Befunde den Daten von Prilla (Prilla, Dissertationsschrift 2006), die im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C bestimmt wurden, gegenübergestellt.

Rezeptor	10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C, Tomtec-Harvester		5 mM Na, K, P _i -Puffer bei 23°C, Brandel-Harvester (Prilla)	
	pEC _{0,5,diss} [log M]	Δ pEC _{0,5,diss} (M ₂ -M _x)	pEC _{0,5,diss} [log M]	Δ pEC _{0,5,diss} (M ₂ -M _x)
M ₂ wt	7,99	0	9,04	0
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	5,42	2,59	7,73	1,31
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	6,00	1,99	7,71	1,33
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²² Trp→Ala	4,65	3,34	n.b.	n.b.

Tabelle 45: Dissoziationsverzögernde Wirksamkeit von Naphmethonium an den angegebenen NMS-besetzten Rezeptortypen, angegeben als pEC_{0,5,diss}-Werte, die im Rahmen von Dissoziationsverzögerungsversuchen ermittelt wurden. Den in dieser Arbeit im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C ermittelten Kenndaten sind die von Prilla (Prilla, Dissertationsschrift 2006) im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C erhobenen Befunde gegenübergestellt. Die Abkürzung „n.b.“ steht für „nicht bestimmt“. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pEC_{0,5,diss} errechnet sich aus der Differenz der pEC_{0,5,diss}-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Die Bedeutung der Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²²Tryptophan bleibt beim Wechsel der Inkubationsbedingungen erhalten.

III.2.5 Magnesium-Ionen als allosterische Modulatoren an NMS-besetzten Rezeptoren – Epitopabhängigkeit im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C

Magnesium-Ionen sind in der Lage, die Dissoziation von [³H]N-Methylscopolamin von Muskarinrezeptoren zu verzögern. Ebenso ist die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit des allosterischen Modulators W84 durch Mg²⁺ kompetitiv hemmbar (Burgmer et al., 1998). Die Mutation von Bindungsstellen des Modulators W84 im M₂-Rezeptor könnte somit auch Auswirkungen auf die Wirksamkeit von Magnesium-Ionen in Dissoziationsverzögerungsversuchen haben, wenn diese über die gleichen Epitope vermittelt würde wie bei W84. Ob die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit von Magnesium-Ionen durch Mutation von Aminosäuren, die für die Bindung allosterischer Modulatoren relevant sind, verändert wird, sollte durch Untersuchungen an ausgewählten Rezeptormutanten ermittelt werden. Die Wirksamkeit von Magnesium-Ionen in Dissoziationsverzögerungsversuchen wurde im magnesiumfreien 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C überprüft. Die dabei ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung 39 dargestellt.

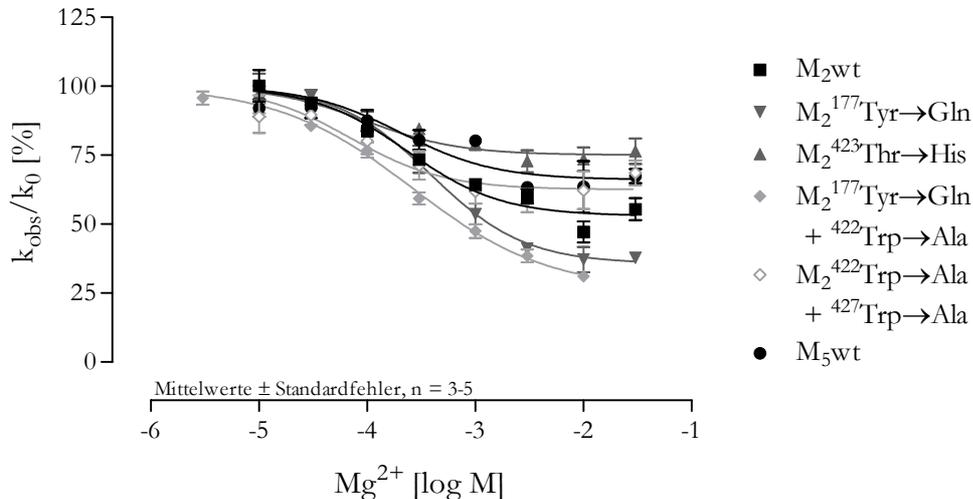


Abbildung 39: Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Magnesium-Ionen an den angegebenen mutierten Rezeptorproteinen im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators in Prozent der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

Die Kenngrößen der in Abbildung 39 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Tabelle 46 angegeben.

Rezeptor	pEC _{0,5,diss} [log M]	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	3,63 ± 0,10	-0,86 ± 0,17	53,0 ^s ± 2,0	3-4
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	3,41 ^{n.s.} ± 0,06	-1,05 ± 0,14	35,7 ^s ± 1,8	3-5
M ₂ ⁴²³ Thr→His	4,02 ^{n.s.} ± 0,17	-0,69 ± 0,24	75,1 ^s ± 1,7	4
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²² Trp→Ala	3,58 ^{n.s.} ± 0,09	-0,69 ^s ± 0,07	26,1 ^s ± 3,6	3-5
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	4,16 ^{n.s.} ± 0,17	-0,85 ± 0,32	62,5 ^s ± 2,6	3
M ₅ wt	3,69 ^{n.s.} ± 0,18	-0,57 ± 0,22	66,1 ^s ± 2,5	3-5

Tabelle 46: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven von Magnesium-Ionen im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Unterschied sich der Hill-Koeffizient (n_H) im F-Test signifikant von dem Wert -1, so ist dieser Wert mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterschieden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Unterschied sich der pEC_{0,5,diss}-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von Magnesium-Ionen an den untersuchten Rezeptoren scheinen flache Kurvenverläufe aufzuweisen, jedoch unterscheidet sich lediglich der Hill-Koeffizient der Dissoziationsverzögerungskurve an der Rezeptormutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²²Tryptophan→Alanin im F-Test signifikant vom Wert -1. An keinem der untersuchten Rezeptoren konnte durch Mg²⁺ als dissoziationsverzögerndes Agens eine vollständige Dissoziationsverzögerung beobachtet werden. Zwischen dem pEC_{0,5,diss}-Wert am M₂-Wildtyprezeptor und den an den Rezeptormutanten ermittelten Werten bestand in keinem Fall ein signifikanter Unterschied. Ebenso unterscheiden sich die pEC_{0,5,diss}-Werte am M₂- und am M₅-Wildtyprezeptor nicht signifikant voneinander, es scheint also hier keinen subtypabhängigen Unterschied in der Interaktion von Magnesium-Ionen mit Muskarinrezeptoren zu geben. Ein statistisch signifikanter aber geringer Unterschied lässt sich beim Vergleich der pEC_{0,5,diss}-Werte der M₂¹⁷⁷Tyr→Gln-Rezeptormutante und der M₂⁴²²Trp→Ala + ⁴²⁷Trp→Ala-Rezeptormutante, sowie beim Vergleich zwischen M₂¹⁷⁷Tyr→Gln + ⁴²²Trp→Ala und M₂⁴²²Trp→Ala + ⁴²⁷Trp→Ala finden. Ob dies an einer unterschiedlichen Art der Interaktion des Modulators Magnesium auf Grund der Mutation einer Aminosäure liegen könnte, lässt sich mit dem vorliegenden Datenmaterial jedoch nur schwer beurteilen. Bei der Analyse der Bindungsdaten werden an den untersuchten Rezeptormutanten unterschiedliche Werte für das untere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven ermittelt. In Tabelle 47 sind die im t-Test ermittelten p-Werte für den Vergleich der unteren Plateau-Werte der untersuchten Rezeptorproteinen angegeben.

Rezeptor	M ₂ wt	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	M ₂ ⁴²³ Thr→His	M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²² Trp→Ala	M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala
M ₂ wt	--	--	--	--	--
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	0,0030	--	--	--	--
M ₂ ⁴²³ Thr→His	0,0004	<0,0001	--	--	--
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²² Trp→Ala	0,0028	0,0756	<0,0001	--	--
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	0,0443	0,0011	0,0081	0,0012	--
M ₅ wt	0,0150	0,0006	0,0268	0,0008	0,3747

Tabelle 47: Im t-Test beim Vergleich der unteren Plateaus der Dissoziationsverzögerungs-Kurven von Magnesium-Ionen an den einzelnen Rezeptormutanten ermittelte p-Werte.

Der Vergleich der unteren Plateau-Werte der Konzentrations-Effekt-Kurven zeigt, dass sich an allen Rezeptormutanten das durch Magnesium-Ionen hervorgerufene Ausmaß der Dissoziationsverzögerung signifikant vom M₂-Rezeptor unterscheidet.

Die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit von Magnesium-Ionen wird durch Mutationen im Bereich der allosterischen Bindungsstelle nicht beeinflusst. Dies deutet darauf hin, dass Magnesium-Ionen nicht in direkter Weise mit den untersuchten Epitopen interagiert. Die unterschiedlichen Plateau-Werte einzelner Rezeptormutanten weisen darauf hin, dass durch Mutation von Epitopen in der allosterischen Bindungsstelle die Dissoziation von [³H]NMS und das Ausmaß der Dissoziationsverzögerung durch Magnesium-Ionen beeinflusst werden kann.

III.3 GLEICHGEWICHTSBINDUNGSEXPERIMENTE

Untersuchung des Effektes allosterischer Modulatoren auf die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung an Muskarinrezeptoren unter verschiedenen Inkubationsbedingungen – Epitopabhängigkeit am freien Rezeptor

Nachdem in kinetischen Experimenten der Einfluss unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf die Epitopabhängigkeit an NMS-besetzten Rezeptoren untersucht worden war, sollten Gleichgewichtsbindungsexperimente Aufschluß darüber geben, inwiefern der Effekt der Modulatoren auf die [³H]NMS-Bindung unter Gleichgewichtsbedingungen durch die Inkubationsbedingungen beeinflusst wird. Gleichgewichtsbindungsexperimente erlauben außerdem Rückschlüsse auf die Interaktion der Modulatoren mit dem freien Rezeptorprotein. Inwieweit dieses Verhalten von verschiedenen Pufferbedingungen abhängt und welche Rolle die schon am besetzten Rezeptorprotein untersuchten Epitope für die Alloster-Bindung am freien Rezeptor spielen, wurde in den nachfolgend dargestellten Experimenten untersucht. In diesen Versuchen wurde der Einfluss der Substanzen W84, Alcuronium und Gallamin auf die [³H]NMS-Bindung unter den Bedingungen des Na, K, P_i-Puffers, des Mg-Tris-Puffers sowie im Hepes-Puffer ermittelt. Die Durchführung der Experimente erfolgte wie unter II.3.3 dargestellt, die dabei gewonnenen Daten wurden unter Anwendung des ternären Modells der allosterischen Interaktion nach Gleichung 22 mit dem Computerprogramm GraphPad Prism[®] 3.02 analysiert. Die bei den einzelnen Versuchen angewandten Inkubationszeiten finden sich im Anhang dieser Arbeit in Tabelle 93. Die Analyse der in Gleichgewichtsbindungsexperimenten erhaltenen Kurvenverläufe erlaubt die Berechnung der Affinität des jeweiligen eingesetzten allosterischen Modulators zu freien Rezeptoren (K_A) unter Anwendung des Ehlert-Modells (Ehlert, 1988). Durch Experimente mit Rezeptormutanten sollte ermittelt werden, welchen Einfluss der Austausch bestimmter Aminosäuren auf das kooperative Verhalten eines Modulators mit dem orthosterischen Liganden N-Methylscopolamin ausübt und welche Bedeutung die entsprechende Aminosäure für das Bindungsverhalten des Modulators an freien Rezeptoren hat. Die Bedeutung der Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin für die M₂/M₅-Subtypselektivität allosterischer Modulatoren an freien Rezeptoren sollte unter verschiedenen Inkubationsbedingungen überprüft werden. Weiterhin sollte der Beitrag der Aminosäuren M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan zur

Basisaffinität allosterischer Modulatoren an freien M_2 -Rezeptoren bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen geklärt werden.

III.3.1 Bedeutung der Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin für die M_2/M_5 -Subtypselektivität allosterischer Modulatoren

III.3.1.1 W84

W84 zeigt in Gleichgewichtsbindungsversuchen im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C und im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C an M_2 -Rezeptoren negativ kooperatives Verhalten mit N-Methylscopolamin. W84 senkt also mit steigenden Konzentrationen die Gleichgewichtsbindung dieses orthosterischen Liganden. Die Affinität des Modulators zu unbesetzten Rezeptoren wird ebenso wie seine Affinität zu NMS-besetzten Rezeptoren durch den Wechsel der Inkubationsbedingungen vom Na, K, P_i -Puffer zum Mg-Tris-Puffer beeinflusst (Duda-Johner, Dissertationsschrift 2002). Eine größere negative Kooperativität im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C deutet auf einen unterschiedlichen Einfluss des Wechsels der Inkubationsmedien auf die Affinität von W84 zum freien und zum NMS-besetzten Rezeptor hin. Die Epitopabhängigkeit von W84 wurde von Voigtländer et al. (2003) bereits im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C untersucht. Die Epitope M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin haben unter diesen Bedingungen eine Bedeutung für die M_2/M_5 -Subtypselektivität von W84 an freien Muskarinrezeptoren (Voigtländer et al., 2003; Voigtländer, Dissertationsschrift 2003). Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf die Affinität von W84 zu freien Muskarinrezeptoren und die Epitopabhängigkeit der M_2/M_5 -Subtypselektivität in Gleichgewichtsbindungsexperimenten werden im Folgenden dargestellt. Ebenso wie schon bei Untersuchung der Epitopabhängigkeit am NMS-besetzten Rezeptor wurden die Experimente zur Interaktion mit unbesetzten Rezeptoren unter den Bedingungen eines Na, K, P_i -Puffers, eines Mg-Tris-Puffers und im Hepes-Puffer durchgeführt.

III.3.1.1.1 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C

Der Einfluss von W84 auf die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden [3 H]N-Methylscopolamin wurde in heterologen Interaktionsexperimenten überprüft, die dabei ermittelten Interaktionskurven sind in Abbildung 40 dargestellt, die zugehörigen Maßzahlen finden sich in Tabelle 48.

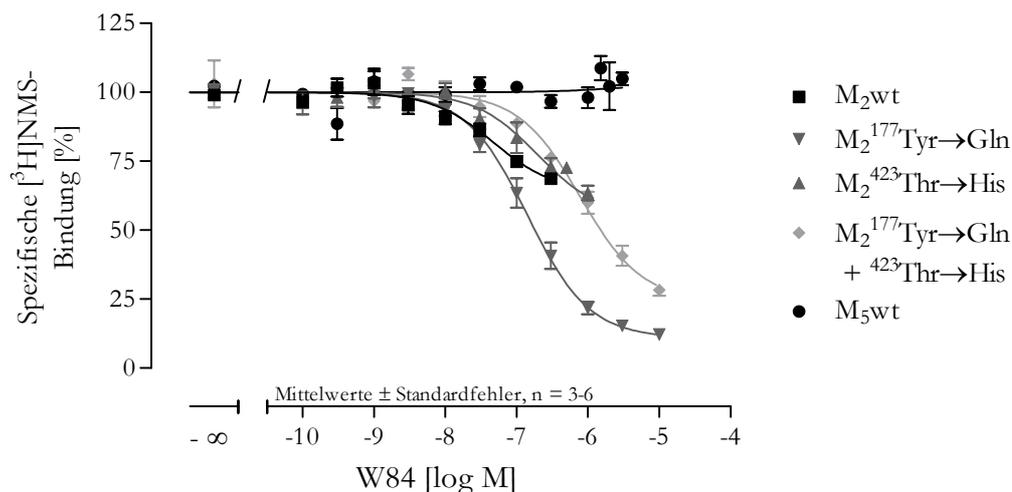


Abbildung 40: Einfluss von W84 auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]$ NMS 0,2 nM im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C an den angegebenen Rezeptoren. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von $[^3\text{H}]$ NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Rezeptor	pK_A [log M]	ΔpK_A (M_2 -Mx)	$\text{p}\alpha$	Zahl der Versuche	$\text{pK}_A + \text{p}\alpha$	$\text{pEC}_{0,5,\text{diss}}$ [log M]
M_2 wt	$7,47 \pm 0,09$	0	$-0,34 \pm 0,02$	5	7,13	7,62
$M_2^{177\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}}$	$7,13 \pm 0,11$	0,34	$-1,24 \pm 0,02$	4	5,89	6,14
$M_2^{423\text{Thr}\rightarrow\text{His}}$	$6,99 \pm 0,14$	0,48	$-0,55 \pm 0,01$	4	6,44	6,99
$M_2^{177\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}} + ^{423\text{Thr}\rightarrow\text{His}}$	$6,76 \pm 0,07$	0,71	$-1,27 \pm 0,03$	3	5,49	5,62
M_5 wt*	$5,65^* \pm 0,12$	1,82	$0,04^* \pm 0,12$	6	5,69*	5,67

Tabelle 48: Kenndaten des Einflusses von W84 auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]$ NMS 0,2 nM im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt und sind in Tabelle 93 angegeben. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden unter Anwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten $\text{EC}_{0,5,\text{diss}}/\alpha$ ersetzt wurde. Der $\text{EC}_{0,5,\text{diss}}$ -Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt (siehe III.2.1.1.1), der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche erhaltenen Einzelwerte. Unterschied sich der pK_A -Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M_2 -Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes ΔpK_A errechnet sich aus der Differenz der pK_A -Werte am jeweils betrachteten (Mx) und am M_2 -Wildtyp-Rezeptor.

Sowohl beim Austausch der Aminosäure $M_2^{177\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}}$ als auch beim Austausch $M_2^{423\text{Thr}\rightarrow\text{His}}$ lässt sich ein signifikanter Abfall der Affinität von W84 zu den entsprechenden unbesetzten Rezeptormutanten im Vergleich zum M_2 -Rezeptor beobachten. Beide Aminosäuren scheinen eine Bedeutung für die M_2/M_5 -Subtypselektivität am unbesetzten Rezeptor zu besitzen, jedoch sind noch weitere Epitope involviert, da das Affinitätsniveau des M_5 -Rezeptors durch den Austausch der beiden Aminosäuren $M_2^{177\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}}$ und $M_2^{423\text{Thr}\rightarrow\text{His}}$ nicht erreicht wird. An allen untersuchten Rezeptormutanten sowie am M_2 -Rezeptor zeigt der Modulator W84 ein negativ kooperatives Verhalten mit dem orthosterischen Liganden NMS, am

M₅-Rezeptor hingegen verhält sich W84 neutral kooperativ mit NMS. Der Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin führt zu einer deutlichen Zunahme der negativen Kooperativität von W84 im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor. Die Summe aus den ermittelten pK_A- und pα-Werten sollte nach dem ternären Modell allosterischer Interaktionen mit dem am NMS-besetzten Rezeptor ermittelten pEC_{0,5,diss}-Wert übereinstimmen, hier zeigen sich je nach untersuchter Rezeptormutante leichte Abweichungen zwischen dem aus den in Gleichgewichtsbindungsdaten errechneten und dem experimentell in Dissoziationsverzögerungsversuchen ermittelten Wert.

III.3.1.1.2 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C

Der Einfluss von W84 auf die Bindung des orthosterischen Liganden [³H]NMS im Mg-Tris-Puffer wird in Abbildung 41 dargestellt.

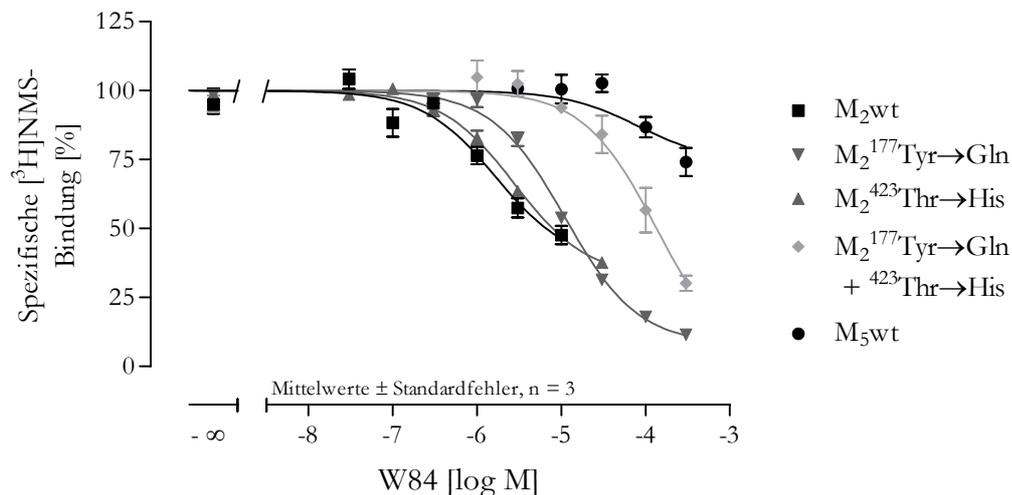


Abbildung 41: Einfluss von W84 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C an den angegebenen Rezeptoren. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Die Kenndaten der in Abbildung 41 dargestellten Interaktionskurven werden in Tabelle 49 aufgeführt.

Rezeptor	pK _A [log M]	Δ pK _A (M ₂ -M _x)	pα	Zahl der Versuche	pK _A + pα	pEC _{0,5,diss} [log M]
M ₂ wt	5,98 ± 0,03	0	-0,63 ± 0,05	3	5,35	5,90
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	5,22 ± 0,02	0,76	-1,36 ± 0,00	3	3,86	4,32
M ₂ ⁴²³ Thr→His	5,78 ± 0,04	0,20	-0,72 ± 0,02	3	5,06	5,19
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	4,20 ± 0,11	1,78	-4,36 ± 0,49	3	-0,16	4,10
M ₅ wt*	4,16* ± 0,05*	1,82	-0,21* ± 0,05	3	3,96*	3,96

Tabelle 49: Kenndaten des Einflusses des Modulators W84 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt und sind in Tabelle 93 angegeben. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden unter Anwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten EC_{0,5,diss}/α ersetzt wurde. Der EC_{0,5,diss}-Wert wurde in Dissoziationsverzögerungs-experimenten ermittelt (siehe III.2.1.1.2), der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche erhaltenen Einzelwerte. Unterschied sich der pK_A-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pK_A errechnet sich aus der Differenz der pK_A-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Durch den Austausch der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin in die korrespondierenden Aminosäuren des M₅-Rezeptors kommt es zu einem signifikanten Abfall der Affinität von W84 an den entsprechenden unbesetzten Rezeptoren im Vergleich zum M₂-Rezeptor. Dieser Effekt ist beim Austausch von M₂¹⁷⁷Tyrosin größer als beim Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin. Die an der Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²³Threonin→Histidin beobachtete Affinität von W84 unterscheidet sich nicht signifikant von der Affinität zu freien M₅-Rezeptoren. Die Interpretation der ermittelten Affinitätsdaten von W84 zur Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²³Threonin→Histidin gestaltet sich jedoch dadurch schwierig, dass in den Versuchen keine höheren Konzentrationen des Modulators einsetzbar waren, da sonst die Inkubationszeit zu lang gewesen wäre. Dadurch lässt sich der Wendepunkt des Kurvenverlaufes nur sehr schwer ermitteln. Dieses erschwert die Beurteilung, ob die beiden untersuchten Epitope alleine für die M₂/M₅-Subtypselektivität verantwortlich sind. Der aus der Summe des pK_A- und pα-Wertes rechnerisch ermittelte pEC_{0,5,diss}-Wert stimmt ebenso nicht mit dem in Dissoziationsverzögerungsversuchen ermittelten Wert überein. Auffallend ist auch, dass sowohl im Na, K, P_i-Puffer als auch im Hepes-Puffer die Affinität von W84 an der Doppelmutante nicht auf das Affinitätsniveau des M₅-Rezeptors abfällt (siehe III.3.1.1.1 und III.3.1.1.3). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die Affinität von W84 zu der Doppelmutante in den hier vorliegenden Versuchen, evtl. auf Grund nicht erreichter Gleichgewichtsbedingungen unterschätzt worden sein könnte.

Der Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin führt zu einer Zunahme des negativ kooperativen Verhaltens des Modulators W84 mit [³H]NMS, noch stärker negativ kooperativ verhält sich W84 an der Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²³Threonin→Histidin.

III.3.1.1.3 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C

Der Einfluss von W84 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS an den entsprechenden Rezeptorproteinen wird in Abbildung 42 dargestellt.

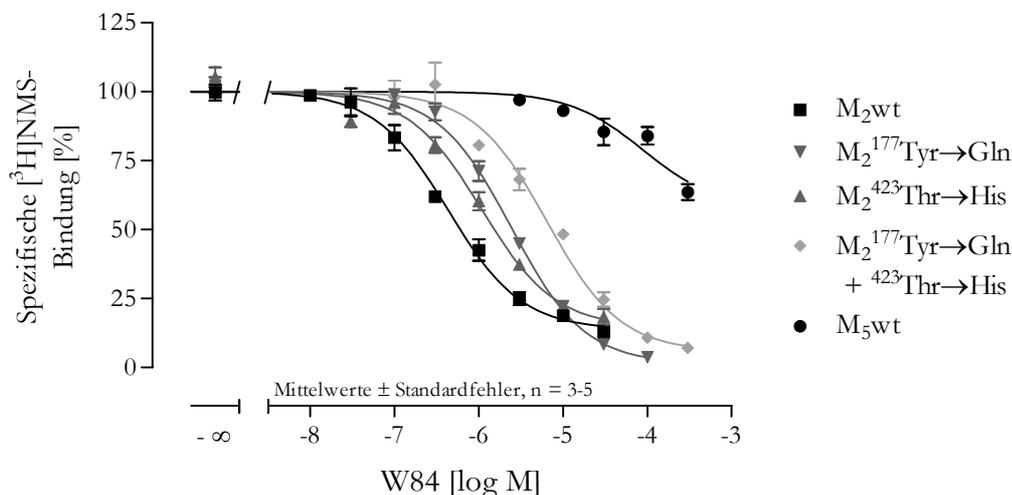


Abbildung 42: Einfluss von W84 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C an den angegebenen Rezeptoren. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Tabelle 50 gibt die Kenngrößen der in Abbildung 42 dargestellten Interaktionskurven wieder.

Rezeptor	pK _A [log M]	Δ pK _A (M ₂ -M _x)	p α	Zahl der Versuche	pK _A + p α	pEC _{0,5,diss} [log M]
M ₂ wt	6,60 \pm 0,03	0	-1,10 \pm 0,05	3	5,50	5,62
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	5,78 \pm 0,02	0,82	-2,07 \pm 0,12	4	3,71	3,92
M ₂ ⁴²³ Thr→His	6,18 \pm 0,04	0,42	-1,06 \pm 0,07	4	5,12	5,27
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	5,44 \pm 0,06	1,16	-1,49 \pm 0,13	4	3,95	3,89
M ₅ wt*	4,17* \pm 0,04	2,43	-0,35* \pm 0,04	5	3,82	3,82

Tabelle 50: Kenndaten des Einflusses von W84 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt und sind in Tabelle 93 angegeben. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden unter Anwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten EC_{0,5,diss}/ α ersetzt wurde. Der EC_{0,5,diss}-Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt (siehe III.2.1.1.3), der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche erhaltenen Einzelwerte. Unterschied sich der pK_A-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pK_A errechnet sich aus der Differenz der pK_A-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Der einzelne Austausch der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin und M₂⁴²³Threonin→Histidin führt im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor zu einem signifikanten Verlust der Affinität von W84 zu freien Rezeptoren. Beide Aminosäuren scheinen somit an der M₂/M₅-Subtypselektivität des

Modulators am freien Rezeptor beteiligt zu sein. Die Bedeutung der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin ist hierbei größer als die der Aminosäure M_2^{423} Threonin. Die Affinität von W84 an der Doppelmutante erreicht nicht das Niveau der Affinität zu freien M_5 -Rezeptoren, für die M_2/M_5 -Subtypselektivität sind unter den beobachteten Inkubationsbedingungen wahrscheinlich noch weitere Epitope verantwortlich.

Der Austausch der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin→Glutamin führt zu einer deutlichen Zunahme der negativen Kooperativität von W84 mit N-Methylscopolamin, während der Austausch der Aminosäure M_2^{423} Threonin→Histidin keinen Einfluss auf das kooperative Verhalten des Modulators zu haben scheint. Am M_2 -Rezeptor wird ein stärker negativ kooperatives Verhalten von W84 als am M_5 -Rezeptor beobachtet.

Die im Hepes-Puffer beobachtete Epitopabhängigkeit findet sich auch im Na, K, P_i -Puffer, jedoch nicht im Mg-Tris-Puffer. Dies bezieht sich in erster Linie auf die an den Doppelmutanten ermittelten Affinitätswerte. Im Mg-Tris-Puffer hätte eine präzisere Beschreibung des Kurvenverlaufes der [3 H]NMS-Gleichgewichtsbindung an der Doppelmutante beim Einsatz höherer Modulatorkonzentrationen eine nicht praktikabel lange Inkubationszeit erfordert. Von daher sollte der in diesen Versuchen ermittelte pK_A -Wert nicht bei der näheren Betrachtung der Epitopabhängigkeit mit einbezogen werden. Es ist anzunehmen, dass die Epitopabhängigkeit im Mg-Tris-Puffer sich wie unter den anderen untersuchten Inkubationsbedingungen verhält und die beiden untersuchten Epitope M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin auch hier die M_2/M_5 -Subtypselektivität von W84 nicht vollständig zu erklären vermögen.

III.3.1.2 Gallamin

Die Interaktion des Modulators Gallamin zeigt sowohl an freien als auch an NMS-besetzten Rezeptoren eine starke Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen. Ein Wechsel vom Na, K, P_i-Puffer zum Mg-Tris-Puffer zeigte in vorangehenden Untersuchungen einen größeren Effekt auf die Affinität zu freien Rezeptoren als zu NMS-besetzten Rezeptoren (Schröter et al., 2000). Die Epitopabhängigkeit von Gallamin an freien Muskarinrezeptoren wurde unter den Bedingungen eines 5 mM Na, K, P_i-Puffers bei 23°C untersucht (Prilla et al., 2006; Prilla, Dissertationsschrift 2006). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin eine Bedeutung für die M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators Gallamin an freien Muskarinrezeptoren haben.

III.3.1.2.1 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C

Der Einfluss von Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS an den entsprechenden Muskarinrezeptoren wird in Abbildung 43 dargestellt, die zugehörigen Kenndaten finden sich in Tabelle 51.

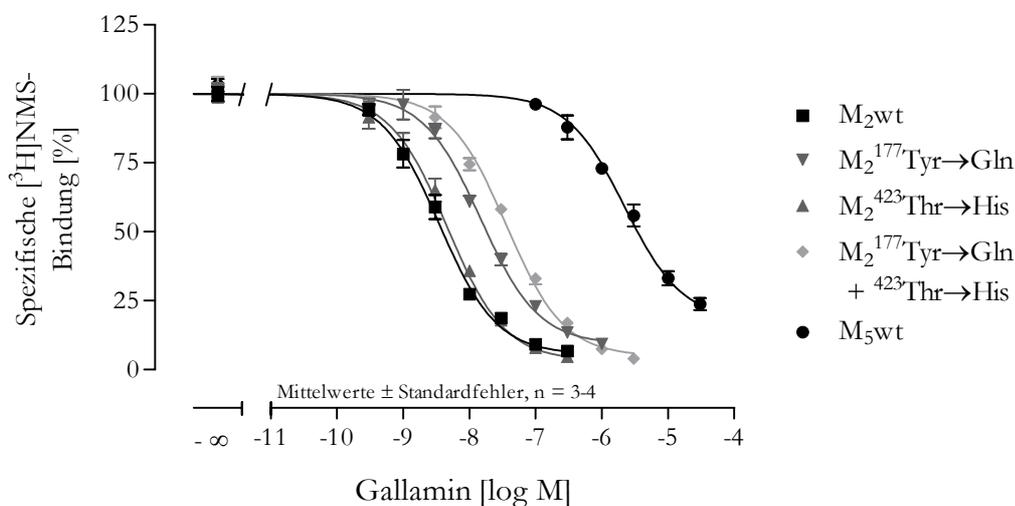


Abbildung 43: Einfluss von Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C an den angegebenen Rezeptoren. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Rezeptor	pK_A [log M]	ΔpK_A (M_2 - M_x)	$p\alpha$	Zahl der Versuche	$pK_A + p\alpha$	$pEC_{0,5,diss}$ [log M]
M_2 wt	$8,83 \pm 0,09$	0	$-1,63 \pm 0,13$	3	7,20	7,13
M_2^{177} Tyr→Gln	$8,11 \pm 0,06$	0,72	$-1,32 \pm 0,02$	3	6,79	6,68
M_2^{423} Thr→His	$8,95^{n.s.} \pm 0,10$	-0,12	$-2,11 \pm 0,23$	3	6,84	6,46
M_2^{177} Tyr→Gln + 423 Thr→His	$8,17 \pm 0,04$	0,66	$-2,04 \pm 0,05$	3	6,13	5,36
M_5 wt*	$6,16 \pm 0,07$	2,67	$-1,25 \pm 0,07$	4	4,91	4,85

Tabelle 51: Kenndaten des Einflusses von Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3H]NMS$ 0,2 nM in 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt und sind in Tabelle 93 angegeben. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden unter Anwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten $EC_{0,5,diss}/\alpha$ ersetzt wurde. Der $EC_{0,5,diss}$ -Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt (siehe III.2.1.2.1), der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche erhaltenen Einzelwerte. Unterschied sich der pK_A -Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M_2 -Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes ΔpK_A errechnet sich aus der Differenz der pK_A -Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M_2 -Wildtyp-Rezeptor.

Beim Austausch der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin→Glutamin ergibt sich im Vergleich zum M_2 -Rezeptor ein signifikanter Abfall der Affinität von Gallamin zum unbesetzten Rezeptor, wohingegen der Austausch der Aminosäure M_2^{423} Threonin→Histidin keinen Einfluss auf die Affinität von Gallamin hat (t-Test: $p = 0,4228$). Ebenso unterscheidet sich Gallamins pK_A -Wert an der Rezeptormutante M_2^{177} Tyrosin→Glutamin nicht signifikant von dem an der Doppelmutante M_2^{177} Tyrosin→Glutamin + 423 Threonin→Histidin ermittelten Wert ($p = 0,4522$). Diese beiden Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Aminosäure M_2^{423} Threonin unter den betrachteten Inkubationsbedingungen keine Bedeutung für die M_2/M_5 -Subtypselektivität des Modulators Gallamin am unbesetzten Rezeptorprotein hat. Neben der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin sind scheinbar noch weitere Epitope für die M_2/M_5 -Subtypselektivität verantwortlich, der am M_5 -Rezeptor ermittelte pK_A -Wert findet sich bei einer deutlich höheren Konzentration als der an der M_2^{177} Tyrosin→Glutamin beobachtete Wert.

III.3.1.2.2 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37 °C

Der unter den Inkubationsbedingungen des Mg-Tris-Puffers ermittelte Einfluss von Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS wird in den Interaktionskurven in Abbildung 44 dargestellt.

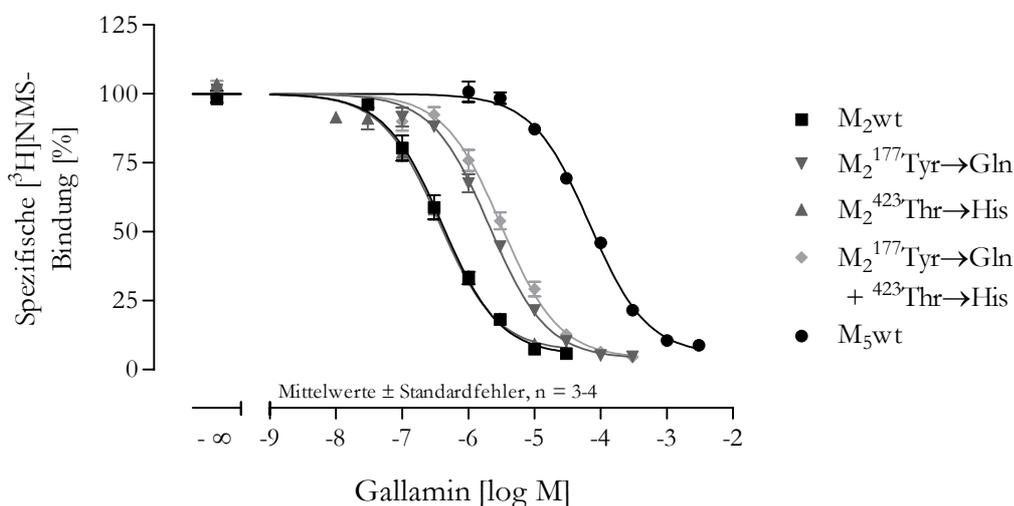


Abbildung 44: Einfluss des Modulators Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C an den angegebenen Rezeptoren. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Die Kenndaten der in Abbildung 44 dargestellten Interaktionskurven finden sich in Tabelle 52.

Rezeptor	pK _A [log M]	Δ pK _A (M ₂ -M _x)	p α	Zahl der Versuche	pK _A + p α	pEC _{0,5,diss} [log M]
M ₂ wt	6,67 \pm 0,08	0	-1,56 \pm 0,05	4	5,11	4,82
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	5,95 \pm 0,02	0,72	-1,67 \pm 0,11	4	4,28	3,85
M ₂ ⁴²³ Thr→His	6,73 ^{n.s.} \pm 0,03	-0,06	-1,46 \pm 0,08	4	5,27	4,66
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	5,82 \pm 0,07	0,85	-1,70 \pm 0,08	3	4,12	3,62
M ₅ wt*	4,39 \pm 0,03	2,28	-1,49 \pm 0,05	3	2,90	2,75

Tabelle 52: Kenndaten des Einflusses von Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM in 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt und sind in Tabelle 93 angegeben. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden unter Anwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten EC_{0,5,diss}/ α ersetzt wurde. Der EC_{0,5,diss}-Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt (siehe III.2.1.2.2), der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche erhaltenen Einzelwerte. Unterschied sich der pK_A-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pK_A errechnet sich aus der Differenz der pK_A-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Gallamin zeigt an allen untersuchten Rezeptoren ein ausgeprägt negativ kooperatives Verhalten mit NMS, das auch durch den Austausch einzelner Aminosäuren nicht beeinflusst wird. Die

Epitopabhängigkeit verhält sich wie im Na, K, P_i-Puffer, lediglich sinkt die Affinität von Gallamin zu allen untersuchten Rezeptormutanten im Mg-Tris-Puffer erheblich. Durch den Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin kommt es im Vergleich mit dem unbesetzten M₂-Rezeptor es zu einem signifikanten Affinitätsverlust des Modulators. Der Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin führt zu keinem signifikanten Abfall der Affinität (t-Test: p = 0,5088). Ebenso unterscheidet sich der an der Rezeptormutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin ermittelte pK_A-Wert nicht von dem an der Doppelmutante beobachteten Wert (p = 0,0947). Die Aminosäure M₂⁴²³Threonin hat somit unter den betrachteten Inkubationsbedingungen keine Bedeutung für die M₂/M₅-Subtypselektivität von Gallamin an freien Muskarinrezeptoren. Durch den Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin wird das Affinitätsniveau des unbesetzten M₅-Rezeptors nicht erreicht. Für die M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators Gallamin an freien Muskarinrezeptoren im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C sind demnach neben dem Epitop M₂¹⁷⁷Tyrosin noch weitere Epitope von Bedeutung.

III.3.1.2.3 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C

Der Einfluss von Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS im Hepes-Puffer wird in den Interaktionskurven in Abbildung 45 dargestellt.

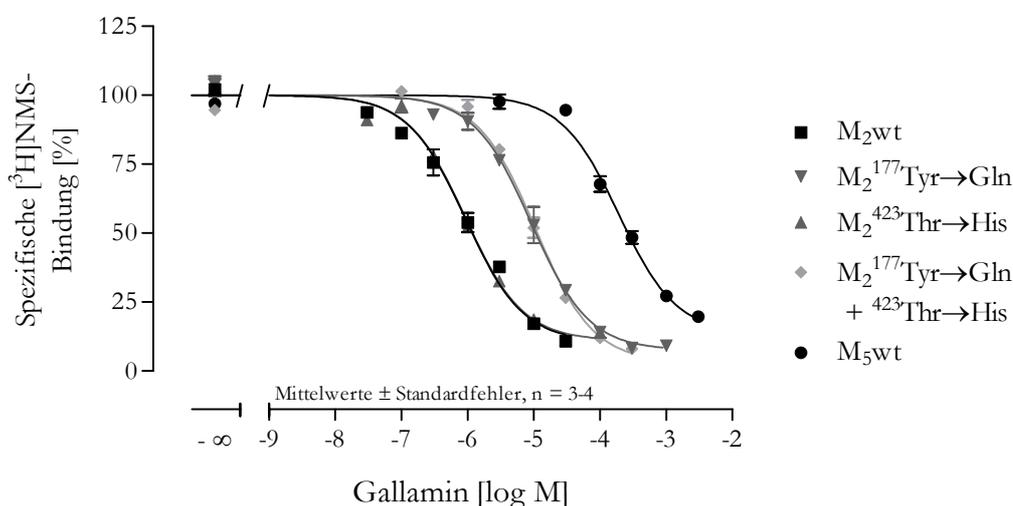


Abbildung 45: Einfluss von Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C an den angegebenen Rezeptoren. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Die Kenngrößen der in Abbildung 45 dargestellten Interaktionskurven werden in Tabelle 53 angegeben.

Rezeptor	pK _A [log M]	Δ pK _A (M ₂ -Mx)	pα	Zahl der Versuche	pK _A + pα	pEC _{0,5,diss} [log M]
M ₂ wt	6,28 ± 0,10	0	-1,22 ± 0,05	4	5,06	4,44
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	5,20 ± 0,07	1,08	-1,28 ± 0,05	4	3,92	3,46
M ₂ ⁴²³ Thr→His	6,25 ^{n.s.} ± 0,02	0,03	-1,18 ± 0,03	4	5,07	4,77
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + M ₂ ⁴²³ Thr→His	5,23 ± 0,02	1,05	-1,75 ± 0,15	4	3,48	3,58
M ₅ wt*	3,93 ± 0,06	2,35	-1,08 ± 0,06	4	2,85	2,69

Tabelle 53: Kenndaten des Einflusses von Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM in 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C am Tomtec-Harvester. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt und sind in Tabelle 93 angegeben. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden unter Anwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten EC_{0,5,diss}/α ersetzt wurde. Der EC_{0,5,diss}-Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt (siehe III.2.1.2.4), der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche erhaltenen Einzelwerte. Unterschied sich der pK_A-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pK_A errechnet sich aus der Differenz der pK_A-Werte am jeweils betrachteten (Mx) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Der Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin führt zu einem signifikanten Abfall der Affinität von Gallamin im Vergleich mit dem unbesetzten M₂-Rezeptor. Der Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin hingegen führt zu keinem signifikanten Abfall des an dieser Rezeptormutante ermittelten pK_A-Wertes, ebenso unterscheidet sich der pK_A-Wert der Rezeptormutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin nicht signifikant vom pK_A-Wert an der Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + M₂⁴²³Threonin→Histidin. Die M₂/M₅-Subtypselektivität von Gallamin an freien Muskarinrezeptoren wird also zum Teil durch das Epitop M₂¹⁷⁷Tyrosin bestimmt, wohingegen das Epitop M₂⁴²³Threonin hierfür keine Bedeutung hat. An der M₂/M₅-Subtypselektivität von Gallamin am freien Rezeptor scheinen neben der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin noch weitere Epitope beteiligt zu sein. Beim den Wechsel vom Mg-Tris- zum Hepes-Puffer sinkt die Affinität von Gallamin an allen untersuchten Rezeptorproteinen leicht ab, das Gesamtbild der Epitopabhängigkeit ändert sich jedoch nicht.

III.3.1.3 Alcuronium

Der Modulator Alcuronium weist an M_2 -Rezeptoren eine geringe Pufferabhängigkeit seiner Wirksamkeit an freien und besetzten Rezeptoren auf (Schröter et al., 2000) und zeigt mit [3 H]NMS positiv kooperatives Verhalten an Muskarinrezeptoren vom Subtyp M_2 und negative Kooperativität an M_5 -Rezeptoren (Jakubík et al., 1995). Das Ausmaß der positiven Kooperativität dieses Modulators scheint durch die Inkubationsbedingungen beeinflussbar zu sein (Birdsall und Lazareno, 2005).

Der Effekt unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf den Einfluss von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von [3 H]NMS unter verschiedenen Inkubationsbedingungen wird im Folgenden dargestellt. Dafür wurde die Epitopabhängigkeit der M_2/M_5 -Subtypselektivität an freien Muskarinrezeptoren in verschiedenen Inkubationsmedien untersucht.

III.3.1.3.1 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C

In einer ersten Versuchsreihe zeigte Alcuronium am M₂-Wildtyp und an der Rezeptormutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin Wirkungen auf die [³H]NMS-Bindung, die in Abbildung 46 dargestellt sind, die in diesen Versuchen ermittelten Kenndaten sind in Tabelle 54 aufgeführt.

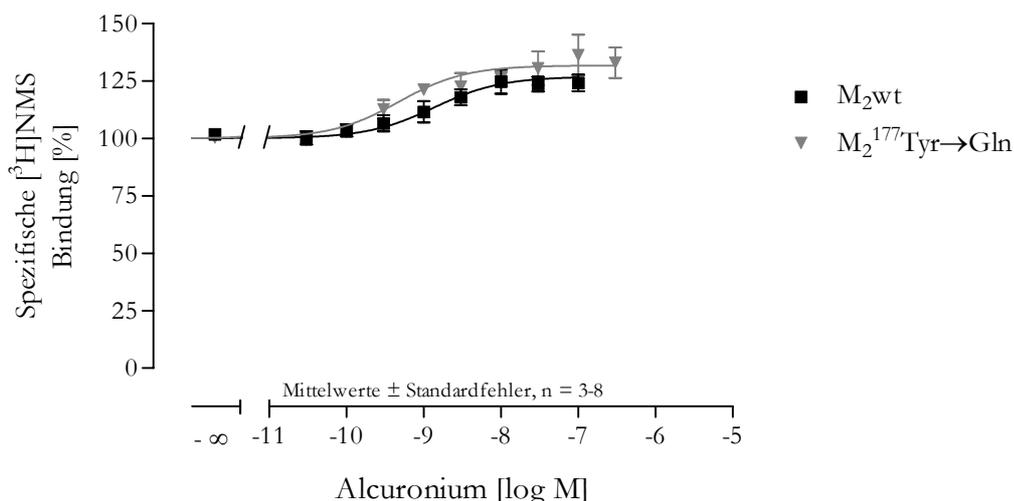


Abbildung 46: Erste Versuchsreihe: Einfluss von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C an den angegebenen Rezeptoren. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Rezeptor	pK _A [log M]	pα	Zahl der Versuche	pK _A + pα	pEC _{0,5,diss} [log M]
M ₂ wt	8,68 ± 0,25	0,29 ± 0,02	8	8,97	7,86
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	9,15 ^{n.s.} ± 0,25	0,30 ± 0,06	4	9,45	7,09

Tabelle 54: Erste Versuchsreihe: Kenndaten des Einflusses von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM in 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt und sind in Tabelle 93 angegeben. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden unter Anwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten EC_{0,5,diss}/α ersetzt wurde. Der EC_{0,5,diss}-Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt (siehe III.2.1.3.1), der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche erhaltenen Einzelwerte. Unterschied sich der pK_A-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet.

In diesen Experimenten zeigte sich bei schwacher positiver Kooperativität an beiden untersuchten Rezeptorproteinen eine sehr hohe Affinität zum freien Rezeptor, die nicht mit den in Dissoziationsexperimenten ermittelten pEC_{0,5,diss}-Werten zu vereinbaren waren. Auf Grund der in dieser ersten Versuchsreihe festgestellten positiven Kooperativität hätte die Affinität von Alcuronium zu den besetzten Rezeptoren weit höher liegen müssen als in den entsprechenden

Experimenten beobachtet. In einer erneuten Versuchsreihe zu einem späteren Zeitpunkt wurden an diesen Rezeptoren andere Werte ermittelt, die gemeinsam mit den Daten der übrigen Rezeptormutanten in in Abbildung 47 dargestellt sind.

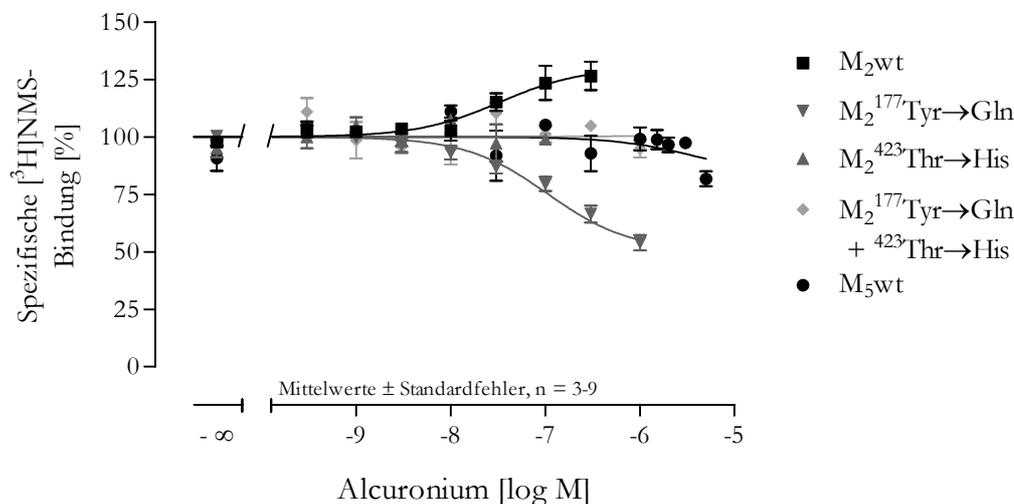


Abbildung 47: Einfluss von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 0,2 nM in 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C an den angegebenen Rezeptoren. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Die Kenngrößen der in Abbildung 47 dargestellten Interaktionskurven werden in Tabelle 55 angegeben.

Rezeptor	pK_A [log M]	ΔpK_A (M_2 - M_x)	$\text{p}\alpha$	Zahl der Versuche	$\text{pK}_A + \text{p}\alpha$	$\text{pEC}_{0,5,\text{diss}}$ [log M]
$M_2\text{wt}$	$7,18 \pm 0,13$	0	$0,42 \pm 0,14$	5	7,60	7,86
$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$	$7,13^{\text{n.s.}} \pm 0,13$	0,05	$-0,46 \pm 0,04$	9	6,67	7,09
$M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$	$7,59^* \pm 0,07$	-0,41	$0,002^* \pm 0,07$	4	$7,59^*$	7,59
$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ + $^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$	$6,45^* \pm 0,06$	0,73	$0,01^* \pm 0,06$	3	$6,46^*$	6,46
$M_5\text{wt}^*$	$5,49^* \pm 0,03$	1,69	$-0,18^* \pm 0,03$	4	$5,31^*$	5,31

Tabelle 55: Kenndaten des Einflusses von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 0,2 nM in 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt und sind in Tabelle 93 angegeben. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden unter Anwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten $\text{EC}_{0,5,\text{diss}}/\alpha$ ersetzt wurde. Der $\text{EC}_{0,5,\text{diss}}$ -Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt (siehe III.2.1.3.1), der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche erhaltenen Einzelwerte. Unterschied sich der pK_A -Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M_2 -Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes ΔpK_A errechnet sich aus der Differenz der pK_A -Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M_2 -Wildtyp-Rezeptor.

Die in der zweiten Versuchsreihe ermittelten Daten am M_2 -Rezeptor und an der Rezeptormutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ sind eher mit den in unabhängigen

Dissoziationsexperimenten ermittelten pEC_{0,5,diss}-Werten vereinbar und wurden daher zur weiteren Analyse herangezogen. Auffallend ist jedoch, dass in der ersten Versuchsreihe an der Rezeptormutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin positive Kooperativität und in der zweiten Versuchsreihe hingegen negative Kooperativität beobachtet wurde. Der Vergleich mit anderen Inkubationsbedingungen zeigt, dass Alcuronium sich an dieser Rezeptormutante im Mg-Tris- und im Hepes-Puffer positiv kooperativ verhält. Auf Grund der obigen erwähnten experimentellen Schwierigkeiten, sollte jedoch von einer Interpretation dahingehend, dass sich durch die Änderung der Inkubationsbedingungen eine Änderung des kooperativen Verhalten ergeben kann, abgesehen werden.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe führt der Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin, wie auch in der ersten Versuchsreihe beobachtet, nicht zu einem signifikanten Abfall der Affinität von Alcuronium an der entsprechenden unbesetzten Rezeptormutante im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor (t-Test: p = 0,8075). Durch den Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin wird eine leichte Zunahme der Affinität im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor erreicht, die mit einem p-Wert von 0,0372 im t-Test noch statistisch signifikant ist. Hingegen verringert sich durch Einführung der Doppelmutation M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²³Threonin→Histidin in das Rezeptorprotein die Affinität von Alcuronium zum unbesetzten Rezeptor signifikant. Aufgrund der Befunde an der Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²³Threonin→Histidin kann eine Bedeutung der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin für die Affinität des Modulators Alcuronium zu freien Rezeptoren aber nicht ausgeschlossen werden. Durch den Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin kommt es zu einer Änderung des kooperativen Verhaltens von Alcuronium mit [³H]NMS an der entsprechenden Rezeptormutante. Die am M₂-Rezeptor beobachtete positive Kooperativität lässt sich nicht mehr beobachten, statt dessen zeigt sich neutrale Kooperativität, die sich ebenso bei der Interaktion von Alcuronium mit NMS an der Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²³Threonin→Histidin findet. Während der Austausch von M₂⁴²³Threonin→Histidin am NMS-besetzten Rezeptor zu einem leichten Abfall der Affinität von Alcuronium im Vergleich zum M₂-Rezeptor führt, kommt es am unbesetzten Rezeptor zu einem Anstieg der Affinität von Alcuronium. Das Verhältnis zwischen dem Hemmeffekt von Alcuronium auf die NMS-Dissoziation und die NMS-Assoziation wird zugunsten des letzteren verschoben, so dass der fördernde Einfluss von Alcuronium auf die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung sinkt. Ist am M₂-Rezeptor die Affinität von Alcuronium zum besetzten Rezeptor noch höher als zum unbesetzten Rezeptor, nähern sich diese Affinitäten beim Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin einander an und es lässt sich neutral kooperatives Verhalten an dieser Rezeptormutante beobachten.

III.3.1.3.2 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37 °C

Der Einfluss von Alcuronium auf die [^3H]NMS-Gleichgewichtsbindung an den entsprechenden Rezeptorproteinen im Mg-Tris-Puffer ist in Abbildung 48 dargestellt.

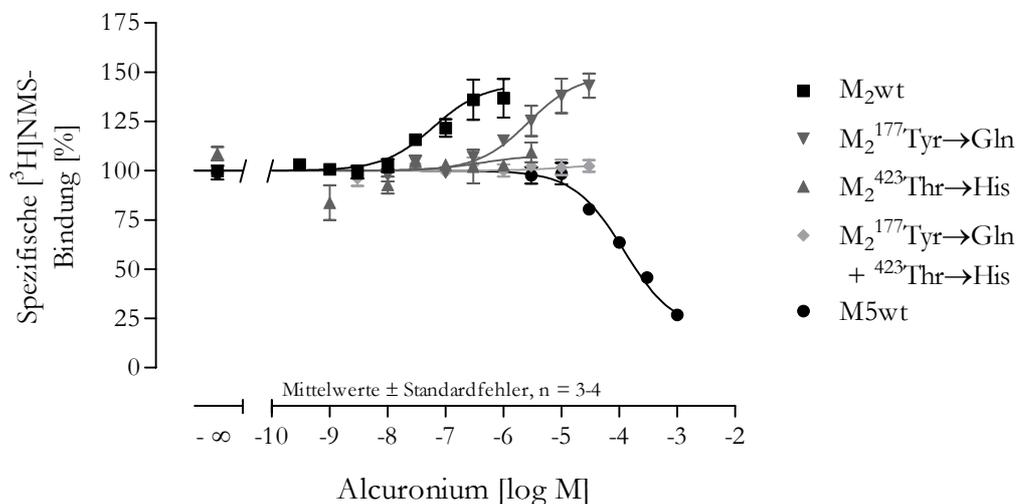


Abbildung 48: Einfluss von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von [^3H]NMS 0,2 nM im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C an den angegebenen Rezeptoren. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von [^3H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Die Kenngrößen der in Abbildung 48 dargestellten Interaktionskurven werden in Tabelle 56 angegeben.

Rezeptor	pK_A [log M]	ΔpK_A (M_2 -Mx)	$\text{p}\alpha$	Zahl der Versuche	$\text{pK}_A + \text{p}\alpha$	$\text{pEC}_{0,5,\text{diss}}$ [log M]
M_2 wt	$6,97 \pm 0,26$	0	$0,40 \pm 0,14$	4	7,37	7,00
$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$	$5,31 \pm 0,16$	1,66	$0,44 \pm 0,08$	4	5,75	5,40
$M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$	$6,36^{*n.s.} \pm 0,03$	0,61	$0,07^* \pm 0,03$	3	6,43*	6,44
$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ + $^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$	$4,86^* \pm 0,03$	2,11	$0,03^* \pm 0,03$	3	4,89*	4,89
M_5 wt*	$4,18 \pm 0,10$	2,79	$-0,99 \pm 0,05$	3	3,19	3,64

Tabelle 56: Kenndaten des Einflusses von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von [^3H]NMS 0,2 nM im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt und sind in Tabelle 93 angegeben. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden unter Anwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten $\text{EC}_{0,5,\text{diss}}/\alpha$ ersetzt wurde. Der $\text{EC}_{0,5,\text{diss}}$ -Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt (siehe III.2.1.3.2), der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche erhaltenen Einzelwerte. Unterschied sich der pK_A -Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M_2 -Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes ΔpK_A errechnet sich aus der Differenz der pK_A -Werte am jeweils betrachteten (Mx) und am M_2 -Wildtyp-Rezeptor.

Der Austausch der Aminosäure $M_2^{177}\text{Tyrosin}\rightarrow\text{Glutamin}$ führt zu einem signifikanten Abfall der Affinität von Alcuronium im Vergleich mit dem M_2 -Rezeptor. Durch Mutation der Aminosäure

M₂⁴²³Threonin→Histidin wird die Affinität von Alcuronium hingegen nicht beeinflusst, der pK_A-Wert an dieser Rezeptormutante unterscheidet sich nicht signifikant von dem am M₂-Rezeptor beobachteten Wert (t-Test: p = 0,1051). Auch bei Betrachtung der pK_A-Werte an der Einzelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin und an der Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²³Threonin→Histidin findet sich kein relevanter Einfluss dieses Epitopes für die Interaktion mit dem unbesetzten M₂-Rezeptor. Diese beiden Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (t-Test: p = 0,0650). Die Affinität von Alcuronium zur Rezeptormutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin erreicht nicht das Niveau des unbesetzten M₅-Rezeptors, für die M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators Alcuronium scheinen also noch weitere Epitope von Bedeutung zu sein.

Beim Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin kommt es am besetzten Rezeptor (siehe pEC_{0.5,diss}-Werte in Tabelle 56) zu einem signifikanten Abfall der Affinität, am unbesetzten Rezeptor ist der beobachtete Affinitätsabfall nicht signifikant. Durch den Austausch dieser Aminosäure ändert sich das kooperative Verhalten von Alcuronium mit [³H]NMS von positiver Kooperativität zu neutraler Kooperativität. Dies bedeutet, dass beim Austausch dieses Epitopes die Affinität am besetzten Rezeptor stärker abfällt als am unbesetzten Rezeptor, was in der Summe dazu führt, dass sich an der Mutante die Affinitäten von Alcuronium an NMS-besetztem und unbesetzten Rezeptor einander annähern und als Konsequenz neutrale Kooperativität resultiert.

III.3.1.3.3 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C

Der Einfluss von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von [^3H]NMS an den entsprechenden Rezeptoren wird in Abbildung 49 dargestellt.

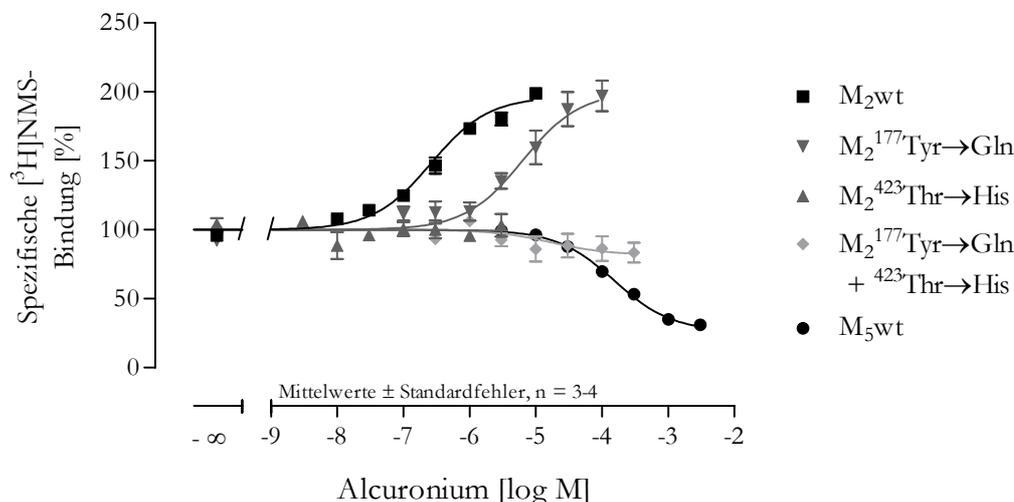


Abbildung 49: Einfluss von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von [^3H]NMS 0,2 nM im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C an den angegebenen Rezeptoren. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von [^3H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Die Kenngrößen der in Abbildung 49 dargestellten Interaktionskurven werden in Tabelle 57 angegeben.

Rezeptor	pK_A [log M]	ΔpK_A (M_2 - M_x)	$\text{p}\alpha$	Zahl der Versuche	$\text{pK}_A + \text{p}\alpha$	$\text{pEC}_{0,5,\text{diss}}$ [log M]
M_2 wt	$5,83 \pm 0,18$	0	$1,03 \pm 0,12$	5	6,86	6,76
$M_2^{177\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}}$	$4,95 \pm 0,03$	0,88	$0,56 \pm 0,05$	3	5,51	5,10
$M_2^{423\text{Thr}\rightarrow\text{His}}$	$6,50^* \pm 0,05$	-0,67	$-0,01^* \pm 0,05$	4	6,49	6,49
$M_2^{177\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}}$ + $^{423\text{Thr}\rightarrow\text{His}}$	$4,83^* \pm 0,09$	1,00	$-0,15^* \pm 0,09$	4	4,68	4,68
M_5 wt*	$3,99 \pm 0,04$	1,84	$-0,76 \pm 0,03$	4	3,23	3,26

Tabelle 57: Kenndaten des Einflusses von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von [^3H]NMS 0,2 nM im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt und sind in Tabelle 93 angegeben. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden unter Anwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten $\text{EC}_{0,5,\text{diss}}/\alpha$ ersetzt wurde. Der $\text{EC}_{0,5,\text{diss}}$ -Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt (III.2.1.3.3), der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche erhaltenen Einzelwerte. Unterschied sich der pK_A -Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M_2 -Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes ΔpK_A errechnet sich aus der Differenz der pK_A -Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M_2 -Wildtyp-Rezeptor.

Der Austausch der Aminosäure $M_2^{177\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}}$ führt im Vergleich zum unbesetzten M_2 -Rezeptor zu einem signifikanten Abfall der Affinität von Alcuronium an dieser

Rezeptormutante. Das kooperative Verhalten von Alcuronium mit NMS bleibt bei Austausch dieses Epitopes, wie schon am M₂-Rezeptor beobachtet, weiterhin positiv. Der Austausch des Epitopes führt sowohl am besetzten wie auch am unbesetzten Rezeptor zu einem Abfall der Affinität von Alcuronium im Vergleich mit der Affinität zum M₂-Rezeptor, so dass es zu keiner Änderung dieses positiv kooperativen Verhaltens kommt. Durch den Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin erhöht sich im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor die Affinität von Alcuronium zu dieser Rezeptormutante signifikant. Die Aminosäure M₂⁴²³Threonin scheint also die Interaktion von Alcuronium mit dem unbesetzten Rezeptor zu stören, bei Austausch dieser Aminosäure kommt es daher zu einer Affinitätszunahme. An der Mutante M₂⁴²³Threonin→Histidin verhält sich Alcuronium neutral kooperativ mit NMS. Der Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin hat am besetzten und am unbesetzten Rezeptor unterschiedlichen Einfluss auf die Affinität des Modulators Alcuronium. Im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor kommt es durch diese Mutation am besetzten Rezeptor zu einem leichten Affinitätsabfall, am unbesetzten Rezeptor zu einer leichten Affinitätszunahme. Diese beiden Effekte bedingen, dass der Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin zu einem Wechsel des kooperativen Verhaltens von Alcuronium mit NMS führt.

Der pK_A-Wert von Alcuronium an der Einzelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin unterscheidet sich nicht signifikant von dem an der Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²³Threonin→Histidin beobachteten Wert (t-Test: p = 0,3227). Die Erhöhung der Affinität von Alcuronium zu unbesetzten Rezeptoren, die durch Mutation der einzelnen Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin hervorgerufen wurde, lässt sich nicht als additiver Effekt an der Doppelmutante beobachten. Der Einfluss der beiden Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin auf die Interaktion von Alcuronium mit dem Rezeptorprotein ist also nicht unabhängig voneinander. Der Verlust des Epitopes M₂¹⁷⁷Tyrosin scheint dazu zu führen, dass die störende Wirkung des Epitopes M₂⁴²³Threonin nicht mehr vorhanden ist. Durch den Austausch des Epitopes M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin sinkt die Affinität des Modulators Alcuronium am unbesetzten Rezeptor nicht auf das Niveau des M₅-Rezeptors ab. Die M₂/M₅-Subtypselektivität von Alcuronium an unbesetzten Muskarinrezeptoren scheint also noch durch weitere Epitope beeinflusst zu werden.

III.3.1.3.4 Austausch der Aminosäuren M_2^{423} Threonin und M_5^{478} Histidin durch Alanin im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C

Die Einführung der Aminosäure Histidin an Stelle von M_2^{423} Threonin hatte am freien Rezeptor eine Affinitätszunahme für den Modulator Alcuronium im Vergleich mit dem M_2 -Wildtyp-Rezeptor gezeigt (siehe III.3.1.3.3). Dieser Effekt kann entweder auf eine Interaktion von Alcuronium mit der eingeführten Aminosäure Histidin oder aber auf einen störenden Effekt der Aminosäure Threonin für die Bindung von Alcuronium an den M_2 -Rezeptor zurückgeführt werden. Diese Fragestellung sollte durch Experimente an den Rezeptormutanten M_2^{423} Threonin→Alanin, M_5^{478} Histidin→Threonin und M_5^{478} Histidin→Alanin geklärt werden. In heterologen Interaktionsexperimenten wurde an den oben genannten Rezeptormutanten der Einfluss des Modulators Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden NMS überprüft. Die dabei ermittelten Interaktionskurven sind zur Übersicht gemeinsam mit den Ergebnissen vorheriger Experimente am M_2 - und M_5 -Rezeptor und an der Rezeptormutante M_2^{423} Threonin→Histidin in Abbildung 50 dargestellt.

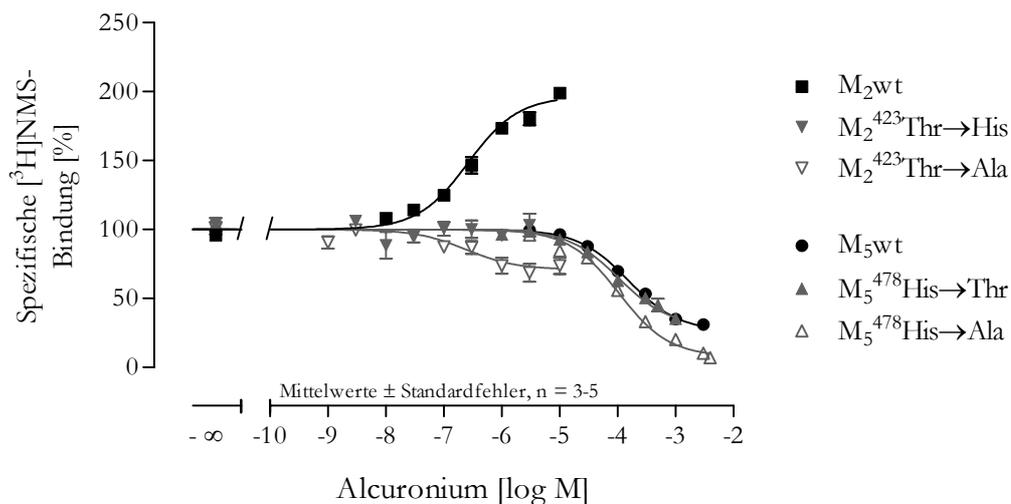


Abbildung 50: Einfluss des Modulators Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]$ NMS 0,2 nM im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C an den angegebenen Rezeptoren. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von $[^3\text{H}]$ NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Die Kenndaten der in Abbildung 50 dargestellten Interaktionskurven sind in Tabelle 58 aufgeführt.

Rezeptor	pK _A [log M]	Δ pK _A (Wildtyp – Mutante)	pα	Zahl der Versuche	pK _A + pα	pEC _{0,5,diss} [log M]
M ₂ wt	5,83 ± 0,18	0	1,03 ± 0,12	5	6,86	6,76
M ₂ ⁴²³ Thr→His*	6,50* ± 0,05	-0,67	-0,01* ± 0,05	4	6,49*	6,49
M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	6,69 ± 0,14	-0,76	-0,22 ± 0,04	5	6,47	6,28
M ₅ wt	3,99 ± 0,04	0	-0,76 ± 0,03	4	3,23	3,26
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Thr	4,10 ^{n.s.} ± 0,03	-0,11	-0,65 ± 0,05	4	3,45	3,65
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Ala	4,21 ± 0,04	-0,22	-1,34 ± 0,03	4	2,87	3,22

Tabelle 58: Kenndaten des Einflusses des Modulators Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt und sind in Tabelle 93 angegeben. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden unter Anwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten EC_{0,5,diss}/α ersetzt wurde. Der EC_{0,5,diss}-Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt (siehe III.3.1.3.4), der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche erhaltenen Einzelwerte. Unterschied sich der pK_A-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-, bzw. des M₅-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet.

Sowohl der Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin gegen Histidin als auch gegen Alanin führt zu einer signifikanten Zunahme der Affinität von Alcuronium. Die pK_A-Werte der beiden Rezeptormutanten M₂⁴²³Threonin→Histidin und M₂⁴²³Threonin→Alanin unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (t-Test: p = 0,2865). Dies spricht dafür, dass M₂⁴²³Threonin die Interaktion von Alcuronium mit dem Rezeptorprotein stört, bzw. dass Histidin an dieser Stelle keine affinitätsgebende Funktion besitzt. Am M₅-Rezeptor wird an der Mutante M₅⁴⁷⁸Histidin→Threonin eine leichte, aber nicht signifikante (t-Test: p = 0,07) Affinitätszunahme beobachtet. Die am M₂-Rezeptor beobachtete Störwirkung dieser Aminosäure findet sich also nicht am M₅-Rezeptor. Die Mutation M₅⁴⁷⁸Histidin→Alanin führt im Vergleich zum M₅-Wildtyp zu einer etwas größeren und signifikanten Affinitätszunahme. Die pK_A-Werte der Rezeptormutanten M₅⁴⁷⁸Histidin→Threonin und M₅⁴⁷⁸Histidin→Alanin unterscheiden sich im t-Test allerdings (p = 0,07) nicht signifikant voneinander. Die Aminosäure Histidin hat also am unbesetzten M₅-Rezeptor für die Interaktion des Modulators Alcuronium allenfalls eine geringe Bedeutung und zwar im Sinne eines leichten störenden Einflusses auf die Bindung von Alcuronium.

Sowohl an der Rezeptormutante M₂⁴²³Threonin→Histidin als auch an der Mutante M₂⁴²³Threonin→Alanin geht das am M₂-Wildtyp beobachtete positiv kooperative Verhalten von Alcuronium mit NMS verloren: an der Rezeptormutante M₂⁴²³Threonin→Histidin verhält sich Alcuronium neutral kooperativ mit NMS, an der Mutante M₂⁴²³Threonin→Alanin leicht negativ kooperativ. Die pEC_{0,5,diss}-Werte zeigen für beide Mutanten im NMS-besetzten Zustand eine leichte Abnahme der Affinität von Alcuronium (siehe III.2.1.3.4), während sich am unbesetzten Rezeptor wie oben dargelegt eine deutliche Affinitätszunahme beobachten lässt. Dies erklärt den

Verlust an positiver Kooperativität. Sowohl am M_5 -Rezeptor als auch an der Rezeptormutante $M_5^{478}\text{Histidin}\rightarrow\text{Threonin}$ zeigt Alcuronium negativ kooperatives Verhalten mit NMS. Die Mutation der Aminosäure $M_5^{478}\text{Histidin}\rightarrow\text{Threonin}$ führt am NMS-besetzten und am unbesetzten Rezeptor zu einer leichten Zunahme der Affinität von Alcuronium im Vergleich mit dem M_5 -Rezeptor, das kooperative Verhalten ändert sich nicht. Bei Austausch der Aminosäure $M_5^{478}\text{Histidin}\rightarrow\text{Alanin}$ bleibt die Affinität von Alcuronium zum besetzten Rezeptor gleich, während sich die Bindungsneigung an freie Rezeptoren erhöht. Dies führt zu einer stärkeren negativen Kooperativität von Alcuronium an dieser Rezeptormutante als am M_5 -Rezeptor.

III.3.2 Bedeutung der Epitope M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan für die Affinität allosterischer Modulatoren

Die Epitope M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan haben für die allosterischen Modulatoren W84 und Gallamin eine Bedeutung für die Basisaffinität zu Muskarinrezeptoren. Dies konnte durch Experimente im Na, K, P_i-Puffer gezeigt werden (Prilla et al., 2006). Da wie zuvor gezeigt die starken Wirksamkeitsverschiebungen dieser beiden allosterischen Modulatoren beim Wechsel der Inkubationsbedingungen nur mit geringen Änderungen der Epitopabhängigkeit der M₂/M₅-Subtypselektivität einhergehen, müssten für die Veränderungen des Affinitätsniveaus vor allem Epitope verantwortlich sein, die für die Basisaffinität der allosterischen Modulatoren relevant sind. Daher sollte die Bedeutung der Epitope M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan für die Affinität der allosterischen Modulatoren W84, Gallamin und Alcuronium an unbesetzten Rezeptoren unter Inkubationsbedingungen mit höherer Ionenstärke und in Anwesenheit zweiwertiger Kationen überprüft werden. Da die vorangehenden Untersuchungen gezeigt haben, dass beim Wechsel vom Mg-Tris-Puffer zum Hepes-Puffer nur geringe Wirksamkeitsverschiebungen zu beobachten sind, wurde auf Untersuchungen im Mg-Tris-Puffer verzichtet. Bei den Epitopen M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan handelt es sich um konservierte Aminosäuren, die sowohl im M₂- als auch im M₅-Rezeptor enthalten sind, deshalb wurden diese beiden Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht.

III.3.2.1 W84 im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C

In Experimenten im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C hatte sich gezeigt, dass besonders das Epitop M₂⁴²²Tryptophan eine Bedeutung für die Affinität von W84 zu freien Muskarinrezeptoren besitzt (Prilla et al., 2006). Der Austausch der Aminosäure M₂⁴²⁷Tryptophan gegen Alanin hatte einen nur geringeren Affinitätsabfall zur Folge, änderte aber die W84/NMS-Kooperativität von leicht negativ zu neutral kooperativ. Der Einfluss von W84 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS unter Hepes-Pufferbedingungen wurde hier an den Rezeptorproteinen M₂⁴²²Tryptophan→Alanin, M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin und an der Doppelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin + ⁴²⁷Tryptophan→Alanin untersucht. Die dabei ermittelten Interaktionskurven sind zur Übersicht gemeinsam mit den am M₂-Rezeptor erhobenen Daten in Abbildung 51 dargestellt.

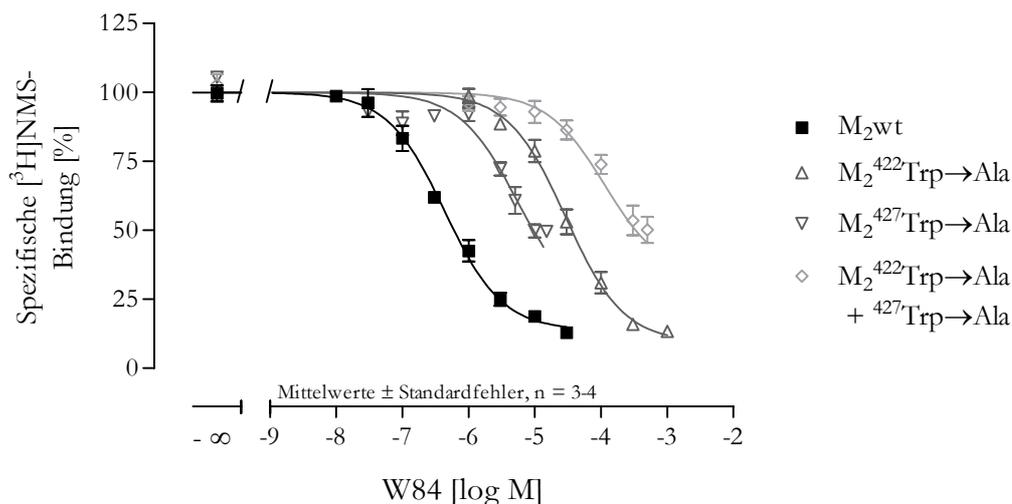


Abbildung 51: Einfluss des Modulators W84 auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 0,2 nM im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C an den angegebenen Rezeptoren. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Die Kenndaten der in Abbildung 51 dargestellten Interaktionskurven sind in Tabelle 59 aufgeführt.

Rezeptor	pK_A [log M]	$\text{p}\alpha$	Zahl der Versuche	$\text{pK}_A + \text{p}\alpha$	$\text{pEC}_{0,5,\text{diss}}$ [log M]
M_2wt	$6,60 \pm 0,03$	$-1,10 \pm 0,05$	3	5,50	5,62
$\text{M}_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	$4,76 \pm 0,09$	$-1,25 \pm 0,04$	3	3,51	3,91
$\text{M}_2^{427}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	$5,62 \pm 0,08$	$-1,02 \pm 0,09$	5	4,60	5,88
$\text{M}_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala} + ^{427}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	$4,16 \pm 0,06$	$-0,69 \pm 0,10$	4	3,47	3,95

Tabelle 59: Kenndaten des Einflusses von W84 auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ 0,2 nM im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt und sind in Tabelle 93 angegeben. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden unter Anwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten $\text{EC}_{0,5,\text{diss}}/\alpha$ ersetzt wurde. Der $\text{EC}_{0,5,\text{diss}}$ -Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt (siehe III.2.3.1), der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche erhaltenen Einzelwerte. Unterschied sich der pK_A -Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M_2 -Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet.

An den Einzelmutanten $\text{M}_2^{422}\text{Tryptophan}\rightarrow\text{Alanin}$ und $\text{M}_2^{427}\text{Tryptophan}\rightarrow\text{Alanin}$ ergab sich ein Abfall der Affinität von W84 zum freien Rezeptor im Vergleich mit dem M_2 -Rezeptor. An allen untersuchten Rezeptormutanten verhält sich W84 ebenso wie am M_2 -Rezeptor stark negativ kooperativ mit NMS. Auffallend ist die starke Abweichung des durch die Gleichgewichtsbindungsdaten als Summe aus pK_A und $\text{p}\alpha$ errechneten $\text{pEC}_{0,5,\text{diss}}$ -Wertes für die Rezeptormutante $\text{M}_2^{427}\text{Tryptophan}\rightarrow\text{Alanin}$ vom praktisch ermittelten Wert. Der in Dissoziationsverzögerungsversuchen ermittelte empirische $\text{pEC}_{0,5,\text{diss}}$ -Wert liegt bei niedrigeren Konzentrationen als der in Gleichgewichtsbindungsstudien ermittelte pK_A -Wert, in diesem Fall

sollte W84 eine höhere Affinität zum NMS-besetzten Muskarinrezeptor besitzen und sich in Gleichgewichtsbindungsexperimenten positiv kooperativ verhalten. Die in Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen beobachtete Interaktionskurve zeigt aber eindeutig ein negativ kooperatives Verhalten. Die Ermittlung dieser Interaktionskurve wurde durch die erforderlichen langen Inkubationszeiten von bis zu 9 Stunden erschwert, so dass der Einsatz des Modulators W84 in höheren Konzentrationen, die eine genauere Beschreibung des Kurvenverlaufes an der Rezeptormutante M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin zugelassen hätten, nicht mehr praktikabel war. Es wäre möglich, dass die Affinität von W84 aus diesen Gründen am freien Rezeptor bei der Auswertung der Bindungsdaten unterschätzt wurde. Die an der unbesetzten Doppelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin + ⁴²⁷Tryptophan→Alanin beobachtete Affinität von W84 zeigt, dass der Austausch der Aminosäure M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin zusätzlich zur Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan→Alanin zu einem weiteren Affinitätsverlust im Vergleich zur Einzelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin führt. Beide Epitope spielen somit eine Rolle für die Basisaffinität des Modulators W84 zu freien Muskarinrezeptoren. In Tabelle 60 sind die in dieser Arbeit ermittelten Daten gemeinsam mit den von Prilla (Prilla et al., 2006) erhobenen Befunden im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C vergleichend dargestellt.

Rezeptor	10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C, Tomtec-Harvester				5 mM Na, K, P _i -Puffer bei 23°C, Brandel-Harvester (Prilla)			
	pK _A [log M]	Δ pK _A (M ₂ -M _x)	pα	pEC _{0,5,diss} [log M]	pK _A [log M]	Δ pK _A (M ₂ -M _x)	pα	pEC _{0,5,diss} [log M]
M ₂ wt	6,60	0	-1,10	5,62	7,82	0	-0,50	7,40
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	4,76	1,84	-1,25	3,91	6,27	1,55	-0,38	5,89
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	5,62	0,98	-1,02	5,88	7,46	0,36	0,02	7,48
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	4,16	2,44	-0,69	3,95	5,92	1,90	0,01	5,92

Tabelle 60: Affinität von W84 an den angegebenen unbesetzten Rezeptortypen, aufgeführt als pK_A-Werte, die im Rahmen von Gleichgewichtsbindungsversuchen ermittelt wurden. Das kooperative Verhalten von W84 mit [³H]NMS wird durch den Kooperativitätsfaktor pα beschrieben. Den in dieser Arbeit im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C ermittelten Kenndaten sind die von Prilla (Prilla et al., 2006) im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C erhobenen Befunde gegenübergestellt. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pK_A errechnet sich aus der Differenz der pK_A-Werte am jeweils betrachteten (M_x) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Die Bedeutung der beiden Epitope M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan für die Affinität von W84 bleibt beim Wechsel der Inkubationsbedingungen weitestgehend erhalten, jedoch zeigt sich an der Rezeptormutante M₂⁴²⁷Tryptophan und an der Tryptophan-Doppelmutante im Hepes-Puffer ein unterschiedlich kooperatives Verhalten von W84 mit NMS, insgesamt ist die negative Kooperativität an allen untersuchten Rezeptorproteinen im Hepes-Puffer höher als im Na, K, P_i-Puffer. Diese Kooperativitätsunterschiede sind überwiegend darauf zurückzuführen, dass im Hepes-Puffer der Affinitätsabfall im Vergleich zum Na, K, P_i-Puffer am freien Rezeptor jeweils größer ausfällt als am besetzten Rezeptor. Die beiden untersuchten Epitope haben unter den Bedingungen des Hepes-Puffers eine größere Bedeutung für die Affinität von W84 als unter

den Bedingungen Na, K, P_i-Puffers. Affinitätsunterschiede unter den beiden Inkubationsbedingungen sind nicht auf eine verminderte Bedeutung dieser beiden Epitope für die Bindung von W84 zurückzuführen.

III.3.2.2 Gallamin im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C

Bei Untersuchungen im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C am Brandel-Harvester hatte gezeigt werden können, dass die Aminosäuren M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan eine Bedeutung für die Basisaffinität des Modulators Gallamin zu freien Muskarinrezeptoren haben (Prilla et al., 2006). Der Austausch der entsprechenden Epitope zur Aminosäure Alanin führte jeweils zu einem signifikanten Affinitätsabfall, der Effekt der einzelnen Epitope verhielt sich nicht additiv, wie Untersuchungen an der entsprechenden Doppelmutante zeigten. An den entsprechenden Rezeptormutanten M₂⁴²²Tryptophan→Alanin und M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin wurden sehr steile Interaktionskurven mit hoher negativer Kooperativität der Interaktion zwischen Gallamin und NMS beobachtet. Da die Affinität von Gallamin zu freien Rezeptoren stark durch die jeweiligen Inkubationsbedingungen beeinflusst wird (Schröter et al., 2000) sollte im stärker physiologischen Inkubationsmedium des 10 mM Hepes-Puffers überprüft werden, ob die Bedeutung der Epitope M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan durch den Wechsel des Inkubationspuffers beeinflusst wird. Unter diesen Inkubationsbedingungen wurde in heterologen Interaktionsexperimenten der Einfluss des Modulators Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS an den entsprechenden Rezeptorproteinen untersucht.

Die dabei ermittelten Interaktionskurven zeigt Abbildung 52.

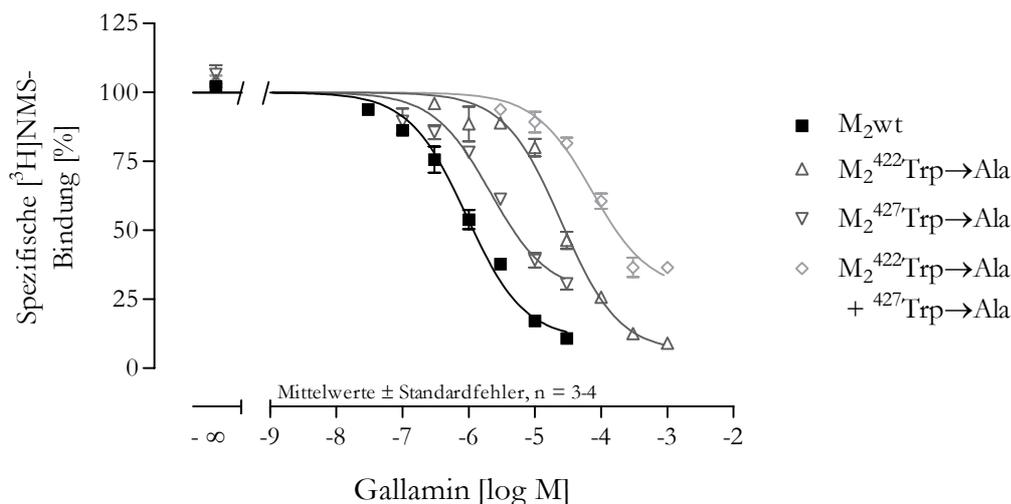


Abbildung 52: Einfluss von Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C an den angegebenen Rezeptoren. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Die errechneten Kenndaten der in Abbildung 52 dargestellten Interaktionskurven finden sich in Tabelle 61.

Rezeptor	pK _A [log M]	pα	Zahl der Versuche	pK _A + pα	pEC _{0,5,diss} [log M]
M ₂ wt	6,28 ± 0,10	-1,22 ± 0,05	4	5,06	4,44
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	4,83 ± 0,02	-1,46 ± 0,01	3	3,37	3,09
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	5,86 ± 0,03	-0,76 ± 0,06	3	5,10	4,83
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	4,30 ± 0,05	-0,72 ± 0,03	3	3,58	3,45

Tabelle 61: Kenndaten des Einflusses von Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM in 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt und sind in Tabelle 93 angegeben. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden unter Anwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten EC_{0,5,diss}/α ersetzt wurde. Der EC_{0,5,diss}-Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt (siehe III.3.2.2), der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche erhaltenen Einzelwerte. Unterschied sich der pK_A-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet.

Sowohl durch den Austausch der Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan→Alanin als auch durch Austausch der Aminosäure M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin kommt es im Vergleich zum M₂-Rezeptor zu einem signifikanten Abfall der Affinität von Gallamin an den entsprechenden freien Rezeptoren. Die Affinität von Gallamin zu der Doppelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin + ⁴²⁷Tryptophan→Alanin unterscheidet sich signifikant von der zu den jeweiligen Einzelmutanten. Beide Epitope spielen somit eine Rolle für die Basisaffinität des Modulators Gallamin zu unbesetzten M₂-Rezeptoren. An allen untersuchten Rezeptorproteinen zeigte sich eine starke negative Kooperativität der Interaktion von Gallamin mit NMS, jedoch nahm die

negative Kooperativität nicht das von Prilla beobachtete Ausmaß an. Auch zeigten sich bei den ermittelten Interaktionskurven nicht außergewöhnlich steile Kurvenverläufe. Die in dieser Arbeit ermittelten Daten sind in Tabelle 62 den von Prilla (Prilla et al., 2006) im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C am Brandel-Harvester erhobenen Befunden gegenübergestellt.

Rezeptor	10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C, Tomtec-Harvester				5 mM Na, K, P _i -Puffer bei 23°C, Brandel-Harvester (Prilla)			
	pK _A [log M]	Δ pK _A (M ₂ -Mx)	pα	pEC _{0.5,diss} [log M]	pK _A [log M]	Δ pK _A (M ₂ -Mx)	pα	pEC _{0.5,diss} [log M]
M ₂ wt	6,28	0	-1,22	4,44	7,70	0	<-2	6,96
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	4,83	1,45	-1,46	3,09	6,04	1,66	-1,01	5,93
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	5,86	0,42	-0,76	4,83	6,39	1,31	-0,80	6,86
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	4,30	1,98	-0,72	3,45	6,05	1,65	-0,89	5,79

Tabelle 62: Affinität von Gallamin an den angegebenen unbesetzten Rezeptortypen, aufgeführt als pK_A-Werte, die im Rahmen Gleichgewichtsbindungsversuchen ermittelt wurden. Das kooperative Verhalten von Gallamin mit [³H]N-Methylscopolamin wird durch den Kooperativitätsfaktor pα beschrieben. Den in dieser Arbeit im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C ermittelten Kenndaten sind die von Prilla (Prilla et al., 2006) im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C erhobenen Befunde gegenübergestellt. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes Δ pK_A errechnet sich aus der Differenz der pK_A-Werte am jeweils betrachteten (Mx) und am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

Die beiden Epitope M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan haben unter beiden untersuchten Inkubationsbedingungen eine Bedeutung für die Affinität von Gallamin zu freien Rezeptoren. Es zeigt sich jedoch, dass die Bedeutung des Epitopes M₂⁴²⁷Tryptophan unter den Bedingungen des Hepes-Puffers geringer ist als im Na, K, P_i-Puffer. Dessen affinitätsgebende Eigenschaften werden durch die Inkubationsbedingungen des Hepes-Puffers leicht abgeschwächt oder Gallamin nutzt den Raum der allosterischen etwas Bindungsstelle anders aus.

Wie schon bei W84 beobachtet, finden sich für die Rezeptormutante M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin Affinitätswerte am freien Rezeptor, die als Summe von pK_A- und pα-Werten einen rechnerischen pEC_{0.5,diss}-Wert ergeben, der nicht mit dem in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelten Wert übereinstimmt. Im Gegensatz zu den Untersuchungen bei W84 lässt bei Gallamin der an dieser Mutante ermittelte Kurvenverlauf nicht darauf schließen, dass im Versuch keine Gleichgewichtsbedingungen erreicht waren, da sich bei den höheren eingesetzten Modulatorkonzentrationen ein unteres Plateau des Kurvenverlaufes ermitteln lässt. Neben methodischen Gründen könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass in diesem Fall das Ehlert-Modell nicht gültig ist. Dies würde dann der Fall sein, wenn die Modulatoren an unbesetzten Rezeptoren weitere Bindungsstellen nutzen, die ihnen am besetzten Rezeptor nicht zur Verfügung stehen. Da dieses Phänomen nur bei der Rezeptormutante M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin beobachtbar ist, könnten durch Mutation des Tryptophans am freien Rezeptor zusätzliche Haftareale verfügbar werden, die vom flexiblen Gallamin oder langgestreckten W84 genutzt werden könnten und so zu einer höheren Affinität am freien Rezeptor führen würden: In diesem

Fall wäre diese nicht mehr rechnerisch auf die an NMS-besetzten Rezeptoren ermittelten pEC_{0.5,diss}-Werte zurückzuführen, da diese Epitope am besetzten Rezeptor nicht als Haftareal zur Verfügung stehen.

III.3.2.3 Alcuronium

Da die Relevanz der Epitope M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan für die Basisaffinität des Modulators Alcuronium zum freien M_2 -Rezeptor noch unbekannt war, sollte festgestellt werden, welche Bedeutung diese beiden Aminosäuren für die Bindung von Alcuronium an freien Muskarinrezeptoren im 5 mM Na, K, P_i -Puffer und im 10 mM Hepes-Puffer haben.

III.3.2.3.1 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C

Der Einfluss von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3H]NMS$ im Na, K, P_i -Puffer an den entsprechenden Rezeptorproteinen wird in den Interaktionskurven in Abbildung 53 dargestellt, die Kenngrößen werden in Tabelle 63 angegeben.

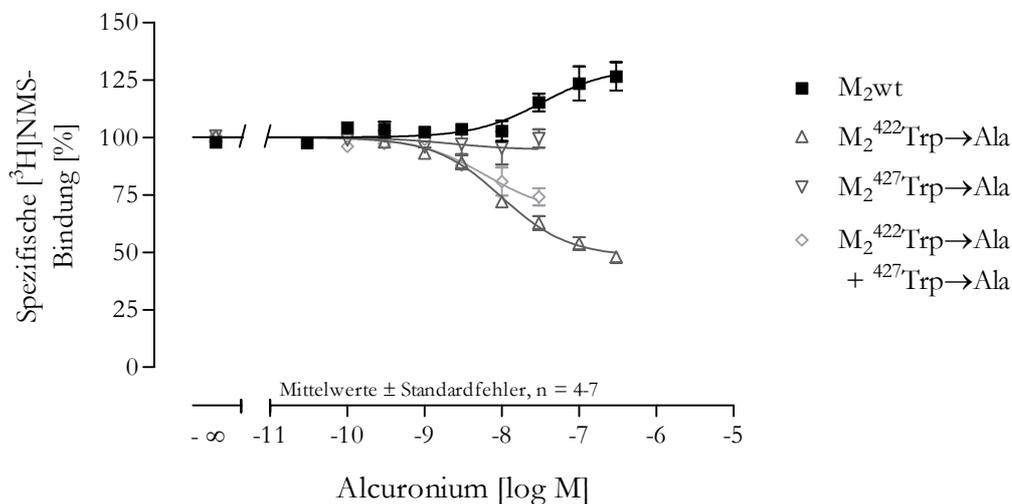


Abbildung 53: Einfluss von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3H]NMS$ 0,2 nM im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C an den angegebenen Rezeptoren. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von $[^3H]NMS$ bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Rezeptor	pK _A [log M]	pα	Zahl der Versuche	pK _A + pα	pEC _{0,5,diss} [log M]
M ₂ wt	7,18 ± 0,13	0,42 ± 0,14	5	7,60	7,86
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	8,88 ± 0,09	-1,20 ± 0,03	5	7,68	7,71
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	8,76* ± 0,14	-0,13* ± 0,14	7	8,63	8,63
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	8,52* ± 0,07	-0,48* ± 0,07	4	8,04	8,04

Tabelle 63: Kenndaten des Einflusses von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt und sind in Tabelle 93 angegeben. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden unter Anwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten EC_{0,5,diss}/α ersetzt wurde. Der EC_{0,5,diss}-Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt (siehe III.3.2.3.1), der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche erhaltenen Einzelwerte. Unterschied sich der pK_A-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet.

Durch den Austausch der Aminosäuren M₂⁴²²Tryptophan→Alanin und M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin kommt es jeweils zu einem signifikanten Anstieg der Affinität von Alcuronium zu den entsprechenden unbesetzten Rezeptormutanten im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor. Der Affinitätsgewinn an den Einzelmutanten scheint sich an der Doppelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin + ⁴²⁷Tryptophan→Alanin nicht additiv wiederzufinden. Ihr pK_A-Wert unterscheidet sich statistisch nicht signifikant vom pK_A-Wert der Einzelmutante M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin (t-Test: p = 0,2523), der Unterschied zur Einzelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin ist gering, allerdings statistisch signifikant (p = 0,0193). Jedoch ist die an der Doppelmutante ermittelte Affinität etwas geringer als die an den jeweiligen Einzelmutanten ermittelte. An der Einzelmutante M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin verhält sich Alcuronium mit NMS neutral kooperativ, während an der Einzelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin und an der Doppelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin + ⁴²⁷Tryptophan→Alanin negative Kooperativität zu beobachten ist.

Die beiden Epitope M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan haben somit einen störenden Einfluss auf die Interaktion von Alcuronium mit freien Rezeptoren. Das Epitop M₂⁴²²Tryptophan besitzt keine Relevanz für die Interaktion von Alcuronium mit NMS-besetzten Rezeptoren (siehe pEC_{0,5,diss}-Werte in Tabelle 63). Fällt durch Mutation dieses Epitopes der störende Einfluss für die Affinität von Alcuronium zu freien Rezeptoren weg, erhöht sich die Bindungsneigung zu freien Rezeptoren, während sie an besetzten Rezeptoren unbeeinflusst bleibt. Dies spiegelt sich in dem Wechsel des kooperativen Verhaltens des Modulators wieder, an der Rezeptormutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin verhält sich Alcuronium mit NMS nicht mehr positiv, sondern stark negativ kooperativ. Die Aminosäure M₂⁴²⁷Tryptophan hat sowohl am besetzten wie auch am unbesetzten Rezeptorprotein störenden Einfluss auf die Bindung von Alcuronium. Das Ausmaß dieses störenden Einflusses verhält sich am besetzten und am unbesetzten Rezeptor gleich, der Austausch der Aminosäure M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin führt zu neutral kooperativem Verhalten

von Alcuronium mit NMS. An der Doppelmutante M_2^{422} Tryptophan→Alanin + 427 Tryptophan→Alanin überwiegt der Effekt der Aufhebung der Störwirkung der Epitope am freien Rezeptor, die Affinität von Alcuronium ist am unbesetzten Rezeptor höher als am besetzten und es lässt sich negativ kooperatives Verhalten mit NMS beobachten. Die beiden Epitope M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan sind also für die Bindung von Alcuronium stark affinitätsbestimmend und haben durch ihre unterschiedliche Störwirkung am besetzten und am freien Rezeptorprotein massiven Einfluss auf das kooperative Verhalten des Modulators mit dem orthosterischen Liganden NMS.

III.3.2.3.2 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C

Der Einfluss des Modulators Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS im Hepes-Puffer an den angegebenen Rezeptorproteinen wird in den Interaktionskurven in Abbildung 54 dargestellt.

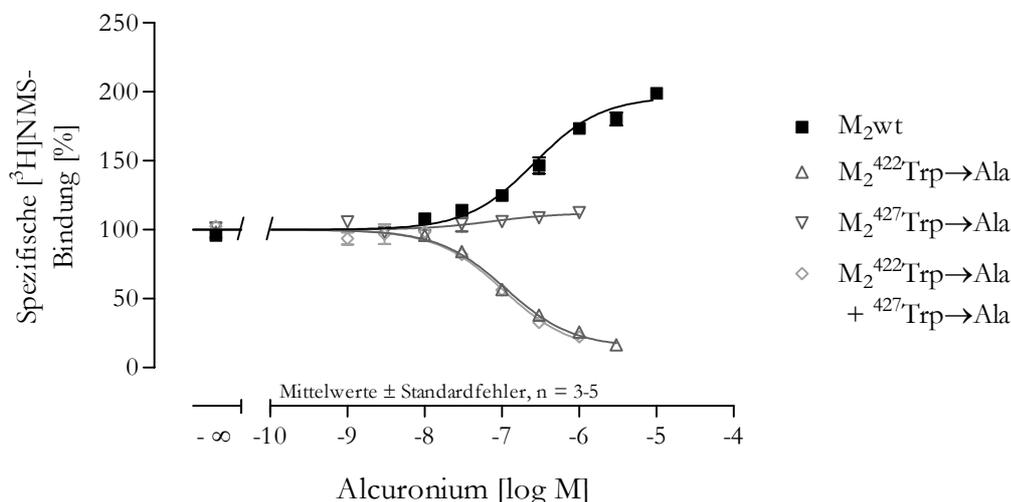


Abbildung 54: Einfluss von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C an den angegebenen Rezeptoren. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Die rechnerisch ermittelten Kenngrößen der in Abbildung 54 dargestellten Interaktionskurven sind in Tabelle 64 aufgeführt.

Rezeptor	pK _A [log M]	p α	Zahl der Versuche	pK _A + p α	pEC _{0,5,diss} [log M]
M ₂ wt	5,83 \pm 0,18	1,03 \pm 0,12	5	6,86	6,76
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	7,17 \pm 0,03	-1,05 \pm 0,06	3	6,12	6,21
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	7,02* \pm 0,04	0,16* \pm 0,04	4	7,18	7,18
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	7,27 \pm 0,01	-1,20 \pm 0,10	3	6,07	6,50

Tabelle 64: Kenndaten des Einflusses von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM in 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt und sind in Tabelle 93 angegeben. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden unter Anwendung der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten EC_{0,5,diss}/ α ersetzt wurde. Der EC_{0,5,diss}-Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt (siehe III.2.3.4), der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche erhaltenen Einzelwerte. Unterschied sich der pK_A-Wert einer Rezeptormutante im t-Test nicht signifikant vom Wert des M₂-Wildtyps, ist dieser Wert mit n.s. gekennzeichnet.

Sowohl der Austausch der Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan→Alanin als auch derjenige der Aminosäure M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin führt im Vergleich zum unbesetzten M₂-Rezeptor zu einer signifikanten Affinitätszunahme von Alcuronium an den entsprechenden Rezeptormutanten. Der

pK_A-Wert von Alcuronium an der Doppelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin + ⁴²⁷Tryptophan→Alanin unterscheidet sich trotz der geringen beobachteten Affinitätsunterschiede signifikant von den jeweiligen pK_A-Werten der entsprechenden Einzelmутanten. Auch die Affinitätswerte der Einzelmутanten unterscheiden sich untereinander signifikant. Der Affinitätsverlust, der sich durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure, sei dies M₂⁴²²Tryptophan oder M₂⁴²⁷Tryptophan, ergibt, findet sich jedoch nicht additiv in den Affinitätswerten von Alcuronium an der Doppelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin + ⁴²⁷Tryptophan→Alanin wieder. Die Aminosäuren M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan haben somit einen störenden Einfluss für die Affinität des Modulators Alcuronium zu unbesetzten M₂-Rezeptoren, sie sind in ihrer Störwirkung jedoch nicht unabhängig voneinander.

Der Austausch der Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan→Alanin führt an der entsprechenden Rezeptormutante zu negativer Kooperativität des Modulators Alcuronium mit NMS. Während dieses Epitop am besetzten Rezeptor beim Austausch zu Alanin zu einer Verminderung der Affinität von Alcuronium im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor führt, lässt sich am unbesetzten Rezeptor ein Affinitätsgewinn beobachten. Diese Aminosäure scheint also am NMS-besetzten Rezeptor relevant für die Bindung von Alcuronium zu sein, am unbesetzten Rezeptor wirkt sie sich jedoch störend auf die Interaktion von Alcuronium mit dem Rezeptorprotein aus. Durch den Austausch M₂⁴²²Tryptophan→Alanin wird die Affinität von Alcuronium zum unbesetzten Rezeptor größer als die zum NMS-besetzten Rezeptor und es resultiert ein negativ kooperatives Verhalten mit NMS an der entsprechenden Rezeptormutante. Analoge Beobachtungen gelten auch für die Affinitätsdifferenzen von Alcuronium an der Doppelmutante M₂⁴²²Tryptophan→Alanin + ⁴²⁷Tryptophan→Alanin, an dieser Rezeptormutante verhält sich Alcuronium ebenfalls negativ kooperativ mit NMS. Die Aminosäure M₂⁴²⁷Tryptophan scheint am besetzten Rezeptor eine geringere Störwirkung für die Bindung von Alcuronium als am unbesetzten Rezeptor zu besitzen. Durch den Austausch dieser Aminosäure fällt die Affinität zum freien Rezeptor im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor in größerem Maße ab als die zum NMS-besetzten Rezeptor, dies führt zum beobachteten nahezu neutral bis leicht positiv kooperativen Verhalten.

IV DISKUSSION

IV.1 BINDUNGSVERHALTEN VON [³H]N-METHYLSCOPOLAMIN UNTER VERSCHIEDENEN INKUBATIONSBEDINGUNGEN

Im folgenden Abschnitt soll betrachtet werden, ob die Änderung des Inkubationsmediums oder der Inkubationstemperatur einen Einfluss auf die Affinität von [³H]N-Methylscopolamin zu Muskarinrezeptoren hat. Dafür werden die unter den verschiedenen Bedingungen ermittelten Werte für die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D miteinander verglichen. Durch die ermittelten Daten kann überprüft werden, welchen Einfluss der Austausch einer Aminosäure auf die Affinität von [³H]N-Methylscopolamin an sich hat und ob unter verschiedenen Inkubationsbedingungen ein Austausch unterschiedliche Auswirkungen auf die Affinität hat, die Aminosäuren also unter verschiedenen Bedingungen unterschiedliche Relevanz für die Bindung von NMS haben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Affinität von [³H]NMS nicht durch den Austausch der hier untersuchten Aminosäuren beeinflusst wird. Höhere Ionenkonzentrationen führen zu einer etwas erniedrigten Affinität von [³H]NMS zu den eingesetzten Rezeptorproteinen, biologisch ist dies jedoch auf Grund der geringen Unterschiede nicht von Relevanz. Die Dissoziationsgeschwindigkeit von [³H]NMS vom Rezeptor wird sowohl durch den Austausch von Aminosäuren beeinflusst, als auch durch die eingesetzten Inkubationsbedingungen.

Allgemeine Beobachtungen zum Einfluss der Inkubationsbedingungen auf die Bindungseigenschaften von [³H]NMS

Staschen (1994) beobachtete, dass sich bei Erniedrigung der Inkubationstemperatur von 37°C auf 23°C und 0°C in einem 3/50 mM Mg-Tris-Puffer der pK_D -Wert (negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten in mol/L) nicht signifikant ändert. Die Inkubationstemperatur kann somit bei den betrachteten Reaktionstemperaturen von 23°C, 30°C und 37°C nicht für Änderungen der Affinität von NMS verantwortlich sein. Das zweiwertige Kation Magnesium führt in hohen Konzentrationen ab 10 mM zu einer Senkung der Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS, während diese in niedrigeren Konzentrationen unbeeinflusst bleibt (Burgmer et al., 1998). Monovalente Kationen wie Natrium, Kalium oder Lithium sind in der Lage, mit zunehmender Konzentration die Affinität von [³H]NMS zum M_2 -Rezeptor in Gleichgewichtsbindungsstudien zu erniedrigen. Hou et al. (1996) fanden beim Zusatz von 100 mM NaCl, LiCl oder KCl zu einem Kontrollpuffer eine jeweils signifikante Abnahme des pK_D -Wertes von $9,90 \pm 0,10$ auf jeweils $9,15 \pm 0,08$, bzw. $9,10 \pm 0,02$ (LiCl) und

9,26 ± 0,05 (KCl). Insgesamt bewegen sich die beobachteten Affinitätsunterschiede von NMS im biologisch nicht relevanten Bereich.

Der Austausch von Aminosäuren im Rezeptorprotein kann ebenso Einfluss auf die Affinität von [³H]N-Methylscopolamin zu Muskarinrezeptoren nehmen und wurde im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C beobachtet (Prilla et al., 2006; Prilla Dissertationsschrift, 2006).

Eigene Beobachtungen

Eine Zusammenfassung der unter verschiedenen Inkubationsbedingungen in dieser Arbeit beobachteten K_D-Werte der NMS-Bindung an M₂- und M₅-Wildtyprezeptoren und an Rezeptormutanten wird in Tabelle 65 gegeben.

Rezeptor	pK _D		
	5 mM Na, K, P _i -Puffer 23°C	3/50 mM Mg-Tris-Puffer 37°C	10 mM Hepes-Puffer 30°C
M ₂ wt	9,85 ± 0,06 (n = 13)	9,69 ± 0,14 (n = 3)	9,64 ± 0,15 (n = 10)
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	9,64 ^s ± 0,06 (n = 8)	9,67 ± 0,04 (n = 5)	9,37 ± 0,09 (n = 7)
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	10,75 ^s ± 0,27 (n = 4)	n.b.	9,53 ± 0,07 (n = 6)
M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	9,89 ^{Prilla} (9,88; 9,91)	n.b.	9,44 ± 0,04 (n = 4)
M ₂ ⁴²³ Thr→His	10,05 ± 0,10 (n = 10)	9,73 ± 0,06 (n = 5)	9,60 ± 0,09 (n = 6)
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	10,43 ^s ± 0,20 (n = 4)	n.b.	9,88 ± 0,08 (n = 11)
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	10,27 ^s ± 0,14 (n = 5)	9,76 ± 0,06 (n = 5)	9,63 ± 0,16 (n = 7)
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	10,14 ± 0,14 (n = 3)	n.b.	9,56 ± 0,09 (n = 6)
M ₅ wt	10,09 ± 0,15 (n = 10)	9,75 ± 0,07 (n = 6)	9,56 ± 0,09 (n = 11)
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Ala	9,77 ^{Prilla} (9,80; 9,74)	n.b.	9,51 ± 0,09 (n = 3)
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Thr	9,89 ^{Prilla} (9,92; 9,86)	n.b.	9,29 ± 0,04 (n = 3)

Tabelle 65: Affinität des orthosterischen Liganden [³H]N-Methylscopolamin (NMS) zu den angegebenen Rezeptorproteinen unter verschiedenen Inkubationsbedingungen. Der negative dekadische Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D ist ein Maß für die Affinität von NMS am Rezeptor und wurde in homologen Kompetitionsexperimenten ermittelt. Aufgeführt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus der Anzahl n unabhängiger Experimente. Die kursiv angegebenen Daten wurden von Prilla et al. (2006) ermittelt, da nur zwei Experimente durchgeführt wurden, sind hier der Mittelwert und die beiden Einzelwerte der Versuche aufgeführt. pK_D-Werte von Rezeptormutanten, die sich signifikant vom am entsprechenden Wildtyp ermittelten Wert unterscheiden, sind mit ^s gekennzeichnet. n.b.: nicht bestimmt.

Einfluss des Austausches von Aminosäuren auf die Affinität von [³H]NMS

Betrachtet man den Einfluss einzelner Mutationen auf die Affinität von [³H]NMS im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C, so zeigt sich, dass durch den Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin die Affinität von [³H]NMS im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor signifikant erniedrigt wird, während durch den Austausch M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²³Threonin→Histidin, M₂⁴²²Tryptophan→Alanin und M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin eine Erhöhung der Bindungsneigung erfolgt. Die beobachteten Affinitätssteigerungen beim Austausch der Epitope M₂⁴²²Tryptophan→Alanin und M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin stehen im Gegensatz zu den von S. Prilla beobachteten Affinitätswerten, die in ihren Versuchen an diesen Rezeptormutanten eine geringere Affinität des Antagonisten [³H]N-Methylscopolamin im Vergleich zum M₂-Rezeptor nachweisen konnte (Prilla et al., 2006: pK_D-Wert an M₂⁴²²Trp→Ala: 9,61 ± 0,07; an M₂⁴²⁷Trp→Ala: 9,88 ± 0,16; am M₂-Wildtyp: 10,13 ± 0,06). Unter den anderen beobachteten Inkubationsbedingungen zeigte sich durch keine Mutation eine veränderte Bindungsneigung von [³H]NMS, daher ist davon auszugehen, dass die im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C beobachtete signifikante Affinitätsänderung, auch im Hinblick auf die gegensätzliche Aussage im Vergleich mit den von Prilla erhobenen Befunden, eher auf zufällige Unterschiede zurückzuführen ist und nicht auf einer durch Mutation von Epitopen der allosterischen Bindungsstelle veränderten Affinität des Antagonisten [³H]NMS zum Rezeptorprotein beruht.

Der Austausch von Aminosäuren im Rezeptorprotein hat unter den untersuchten Inkubationsbedingungen keinen nennenswerten Einfluss auf die Affinität von [³H]NMS.

Einfluss verschiedener Inkubationsbedingungen auf die Affinität von [³H]NMS

Vergleicht man die pK_D-Werte der einzelnen Rezeptormutanten in den unterschiedlichen Inkubationsmedien miteinander, so lässt sich feststellen, dass sich alle im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C erhobenen pK_D-Werte signifikant von den an der gleichen Rezeptormutante im 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C ermittelten Daten unterscheiden und die Affinität im 10 mM Hepes-Puffer jeweils geringer ist. Da die Untersuchungen von Staschen (1994) gezeigt hatten, dass der Einfluss der Temperatur auf den pK_D-Wert von [³H]NMS an Muskarinrezeptoren im Temperaturintervall von 23°C bis 37°C sehr gering ist ($\Delta pK_D = 0,077$), scheint eine Temperaturänderung nicht in erster Linie für Änderungen der Affinität von [³H]NMS beim Wechsel der Inkubationsbedingungen vom 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C zum 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C oder zum 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C verantwortlich zu sein. Die niedrigere Affinität von [³H]NMS im Inkubationspuffer mit höheren Ionenkonzentrationen steht im Einklang mit dem in der Literatur erwähnten hemmenden Einfluss von mono- und divalenten

Kationen auf die Affinität von [^3H]NMS zu Muskarinrezeptoren (Pedder et al., 1991; Hou et al., 1996), erscheint jedoch auf Grund des geringen Ausmaßes des Affinitätsverlustes biologisch unbedeutsam.

Einfluss der Inkubationsbedingungen und des Austausches von Aminosäuren auf die Dissoziationskinetik von [^3H]NMS

Allgemeine Beobachtungen

Die Dissoziation von [^3H]NMS vom Rezeptorprotein wird durch verschiedene Teilbedingungen der in dieser Arbeit variierten Inkubationsbedingungen beeinflusst. Einerseits übt eine Temperaturänderung im Rahmen der allgemeinen Reaktionskinetik einen Einfluss auf die Dissoziationsgeschwindigkeit aus. Staschen (1994) konnte nachweisen, dass der Einfluss unterschiedlicher Reaktionstemperaturen in einem Magnesium-Tris-Puffer im exponentiellen Zusammenhang mit der Reaktionsgeschwindigkeit stand und durch den von Arrhenius beschriebenen allgemeinen Zusammenhang der Reaktionsgeschwindigkeit von der Temperatur erklärt werden kann. Neben der Temperatur haben auch die einzelnen ionischen Komponenten der Inkubationspuffer einen Einfluss auf die Dissoziationsgeschwindigkeit von [^3H]NMS. Waelbroeck et al. (1997) zeigten an Muskarinrezeptoren vom Subtyp M_1 , dass monovalente Kationen wie Natrium, Kalium oder Lithium in der Lage sind, die Dissoziationsgeschwindigkeit von [^3H]NMS vom Rezeptor zu beschleunigen. Divalente Kationen hingegen verzögern die Dissoziation des orthosterischen Liganden [^3H]NMS vom Rezeptorprotein (Waelbroeck et al., 1997; Burgmer et al., 1998). Der von Waelbroeck et al. (1997) beobachtete Einfluss von monovalenten Kationen, die in steigenden Konzentrationen eine Dissoziationsbeschleunigung hervorriefen, konnte durch Mutation der Aminosäure $M_1^{71}\text{Aspartat}\rightarrow\text{Asparagin}$ aufgehoben werden. Der Austausch der korrespondierenden Aminosäure im M_2 -Rezeptor ($M_2^{69}\text{Aspartat}$) führte in einem 50 mM Na, K, P_i -Puffer in den von Leppik et al. (1994) erhobenen Befunden zu einer Verlangsamung der Dissoziationsgeschwindigkeit von [^3H]NMS. Ebenso kann die Geschwindigkeit der [^3H]NMS-Dissoziation durch den Austausch von Epitopen der allosterischen Bindungsstelle beeinflusst werden (Buller et al., 2001; Voigtländer et al., 2003; Prilla et al., 2006).

Eigene Beobachtungen

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit erhobenen Befunde erlauben einen Rückschluß darauf, ob die Veränderungen der Dissoziationsgeschwindigkeit durch Mutation von Epitopen der allosterischen Bindungsstelle in verschiedenen Inkubationsmedien ein unterschiedliches Ausmaß einnehmen. Somit kann beurteilt werden, ob sich die Bedeutung von Epitopen der allosterischen Bindungsstelle für die [^3H]NMS-Dissoziation durch den Wechsel von Inkubationsbedingungen

ändert. Möchte man vergleichen, welche Auswirkungen Mutationen auf die Dissoziationsgeschwindigkeit von [³H]NMS unter verschiedenen Inkubationsbedingungen haben, so muß berücksichtigt werden, dass durch den Wechsel der Inkubationsbedingungen selbst schon die Dissoziationsgeschwindigkeit beeinflusst wird. Daher wurden in der folgenden Darstellung die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{-1}) von [³H]NMS von den unterschiedlichen Rezeptormutanten jeweils im Verhältnis zu der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante von [³H]NMS vom M₂-Rezeptor, bzw. bei M₅-Rezeptormutanten vom M₅-Rezeptor im entsprechenden Inkubationspuffer angegeben.

Rezeptor	Geschwindigkeitskonstanten k_{-1} [min^{-1}] der [^3H]NMS-Dissoziation							
	Na, K, P _i -Puffer 23°C		Hepes-Puffer 30°C		Mg-Tris-Puffer 23°C		Mg-Tris-Puffer 37°C	
	k_{-1}	$k_{-1\text{wild}}/$ $k_{-1\text{Mut}}$	k_{-1}	$k_{-1\text{wild}}/$ $k_{-1\text{Mut}}$	k_{-1}	$k_{-1\text{wild}}/$ $k_{-1\text{Mut}}$	k_{-1}	$k_{-1\text{wild}}/$ $k_{-1\text{Mut}}$
M ₂ wt	0,1711 ± 0,0054 (n = 24)	1,0	0,4070 ± 0,0173 (n = 19)	1,0	0,0368 ± 0,0046 (n = 4)	1,0	0,1855 ± 0,0069 (n = 13)	1,0
M ₂ ¹⁷⁵ Glu→Ala	<i>0,1308^R</i>	<i>1,3</i>	0,3763 ± 0,0284 (n = 4)	1,1	n.b.	--	n.b.	--
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	0,1231 ± 0,0061 (n = 20)	1,4	0,2756 ± 0,0293 (n = 23)	1,5	0,0282 ^{n.s.} ± 0,0008 (n = 3)	1,3	0,1456 ± 0,0053 (n = 10)	1,3
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	0,0871 ± 0,0026 (n = 3)	2,0	0,2263 ± 0,0071 (n = 13)	1,8	n.b.	--	n.b.	--
M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	<i>0,0823 ±</i> <i>0,0029^P</i>	<i>2,1</i>	0,4491 ± 0,0129 (n = 3)	0,9	n.b.	--	n.b.	--
M ₂ ⁴²³ Thr→His	0,0474 ± 0,0013 (n = 21)	3,6	0,2061 ± 0,0052 (n = 18)	2,0	0,0181 ± 0,0014 (n = 3)	2,0	0,1024 ± 0,0045 (n = 10)	1,8
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	0,0331 ± 0,0011 (n = 3)	5,2	0,0896 ± 0,0020 (n = 11)	4,5	n.b.	--	n.b.	--
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²² Trp→Ala	0,1732 ^{n.s.} ± 0,0036 (n = 5)	1,0	0,3876 ± 0,0079 (n = 3)	1,1	n.b.	--	n.b.	--
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	0,0288 ± 0,0006 (n = 15)	5,9	0,1165 ± 0,0042 (n = 17)	3,5	0,0095 ± 0,0002 (n = 3)	3,9	0,0578 ± 0,0012 (n = 10)	3,2
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	0,0141 ± 0,0004 (n = 3)	12,1	0,0408 ± 0,0016 (n = 9)	10,0	n.b.	--	n.b.	--
M ₅ wt	0,0063 ± 0,0003 (n = 25)	1,0	0,0236 ± 0,0007 (n = 15)	1,0	0,0030 ± 0,0003 (n = 3)	1,0	0,0291 ± 0,0029 (n = 11)	1,0
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Ala	<i>0,0109 ±</i> <i>0,0001^P</i>	<i>0,6</i>	0,0384 ± 0,0016 (n = 6)	0,1	n.b.	--	n.b.	--
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Thr	<i>0,0167 ±</i> <i>0,0007^P</i>	<i>0,4</i>	0,0459 ± 0,0010 (n = 3)	0,5	n.b.	--	n.b.	--

Tabelle 66: Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten (k_{-1} -Werte) des Antagonisten [^3H]NMS an den angegebenen Muskarinrezeptoren unter verschiedenen Inkubationsbedingungen. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler von n unabhängigen Einzelbestimmungen aufgeführt. Die Bedeutung eines Austausches von Aminosäuren für die Dissoziationshalbwertszeit von [^3H]NMS wird durch das Verhältnis, in dem der k_{-1} -Wert der jeweiligen Mutante ($k_{-1\text{Mut}}$) zum k_{-1} -Wert am M₂-Rezeptor, bzw. M₅-Rezeptor ($k_{-1\text{wild}}$) steht, verdeutlicht. k_{-1} -Werte, die sich nicht signifikant vom Wert am M₂-Rezeptor unterschieden, sind mit ^{n.s.} gekennzeichnet. Die kursiv angegebenen Daten wurden von Prilla et al. (2006) und Raasch (Dissertationsschrift 2003) erhoben und sind durch das hochgestellte Namenszeichen entsprechend kenntlich gemacht. Die Abkürzung n.b. steht für nicht bestimmt.

Die in Tabelle 66 aufgeführten Werte verdeutlichen, dass im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C vor allem der Austausch der Aminosäuren M₂⁴²³Threonin→Histidin und M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin

einen Einfluss auf die Dissoziationsgeschwindigkeit von [³H]NMS hat. Diese Befunde wurden von Prilla et al. (2006) dahingehend interpretiert, dass die Aminosäure Threonin am Eingang der orthosterischen Bindungsstelle im M₂-Rezeptor lokalisiert ist und so die Dissoziation orthosterischer Liganden beeinflussen kann. Das Einführen der Aminosäure Histidin scheint für die Dissoziationsgeschwindigkeit von [³H]NMS von größerer Bedeutung zu sein als der Ersatz des Threonins durch Alanin, wie der Vergleich der Dissoziationshalbwertszeiten von [³H]NMS an der Mutante M₂⁴²³Threonin→Histidin und M₂⁴²³Threonin→Alanin zeigt. Das Einfügen der Aminosäure Histidin behindert nach dem M₂-Rezeptormodell (Prilla et al., 2006) den Zugang des orthosterischen Liganden [³H]NMS zu seiner Bindungstasche und verlangsamt ebenso die Dissoziation vom Rezeptor.

Betrachtet man die Dissoziationsgeschwindigkeiten des Liganden [³H]NMS von den untersuchten Rezeptormutanten unter anderen Inkubationsbedingungen, so zeigen die errechneten Verhältniszahlen, dass die Verlangsamung der Dissoziationsgeschwindigkeit auf etwa das fünffache der Geschwindigkeit vom M₂-Rezeptor durch den Austausch der Aminosäure M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin auch unter den Inkubationsbedingungen des 10 mM Hepes-Puffers zu beobachten ist. Ebenso bleiben die Verhältnisse an den meisten anderen untersuchten Rezeptormutanten bestehen. Die Verlangsamung der Dissoziation, die durch den Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin zu beobachten war, ist unter den physiologischeren Inkubationsbedingungen jedoch nicht so stark ausgeprägt wie im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Auffallend ist auch, dass im 10 mM Hepes-Puffer der Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Alanin keinen Einfluss auf die Dissoziationsgeschwindigkeit hat, während ein solcher Effekt noch im Na, K, P_i-Puffer beobachtbar war. Der störende Einfluss der eingefügten Aminosäure Histidin auf die Bindung von [³H]NMS ist unter den Inkubationsbedingungen des 10 mM Hepes-Puffers nicht so stark ausgeprägt wie im Na, K, P_i-Puffer. Dies deutet darauf hin, dass die Aminosäure Histidin oder auch Threonin eventuell unter diesen Inkubationsbedingungen eine andere Stellung im Rezeptorprotein einnehmen könnten. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für dieses Phänomen wäre, dass es sich bei dem störenden Einfluss auf die Bindungskinetik um polare Wechselwirkungen von Aminosäuren mit [³H]NMS handelt. Mit höheren Ionenkonzentrationen im Hepes-Puffer könnte durch elektrostatische Abschirmung dieser polare Effekt im Hepes-Puffer reduziert sein.

IV.2 EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE EPITOPABHÄNGIGKEIT

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob die beobachteten Wirksamkeitsunterschiede allosterischer Modulatoren beim Wechsel der Inkubationsbedingungen in erster Linie durch die Änderung der Inkubationstemperatur oder durch die Änderung der ionalen Zusammensetzung des Inkubationsmediums hervorgerufen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Wirksamkeit des Modulators Gallamin in Dissoziationsverzögerungsversuchen zwar durch die Inkubationstemperatur beeinflusst wird, die Effekte einer Temperaturänderung jedoch weitaus kleiner sind als die, die durch den Wechsel der Pufferzusammensetzung hervorgerufen werden.

Beobachtungen zur Temperaturabhängigkeit der Wirksamkeit allosterischer Modulatoren

Die Wirksamkeit allosterischer Modulatoren an Muskarinrezeptoren kann in geringem Maße durch die Temperatur beeinflusst werden (Pedder et al., 1991; Staschen, 1994). In Untersuchungen zur dissoziationsverzögernden Wirksamkeit des Modulators W84 an [3 H]NMS-besetzten Muskarinrezeptoren konnte Staschen (1994) eine leichte Steigerung der Wirksamkeit beim Absenken der Inkubationstemperatur von 37°C ($EC_{50,diss} = 1,2 \mu M$) auf 23°C ($EC_{50,diss} = 0,4 \mu M$) beobachten, die jedoch auf Grund der geringen Wirksamkeitsunterschiede nicht biologisch relevant zu sein scheint. In Gleichgewichtsbindungsstudien ließ sich von Staschen nur ein geringer Einfluss der Temperatur auf die Wirksamkeit von W84 auf die Gleichgewichtsbindung von [3 H]NMS beobachten. Bei Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der Wirksamkeit des Modulators Gallamin fanden Pedder et al. (1991) eine höhere Wirksamkeit von Gallamin in Gleichgewichtsbindungsstudien mit [3 H]NMS bei niedrigeren Inkubationstemperaturen. Diese Experimente wurden bei 30°C und bei 4°C durchgeführt, die Experimente bei 4°C wurden bis zu sieben Tage lang inkubiert. Da jedoch keine kinetischen Experimente zur dissoziationsverzögernden Wirksamkeit des Modulators parallel hierzu durchgeführt wurden, kann nicht genau beurteilt werden, ob sich bei diesen Versuchen in der entsprechenden Inkubationszeit ein Reaktionsgleichgewicht einstellen konnte. Staschen (1994) fand ein ähnliches Phänomen für die Wirksamkeit von W84, konnte jedoch in Computeranalysen zeigen, dass eine höhere Wirksamkeit von W84 in Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen bei 4°C im Vergleich zu Inkubationstemperaturen von 23°C und 37°C auf eine Überschätzung der Wirksamkeit von W84 durch nicht erreichte Gleichgewichtsbedingungen im Experiment zurückzuführen war.

Ergebnisse dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden beim Wechsel der Inkubationsbedingungen vom 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C zum 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C und zum 10 mM Hepes-Puffer bei 30°C große Änderungen der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit des Modulators Gallamin festgestellt. Inwiefern sich Änderungen der Inkubationstemperatur auf die Epitopabhängigkeit eines allosterischen Modulators auswirken, war bisher nicht bekannt. Der Einfluss unterschiedlicher Inkubationstemperaturen auf die Epitopabhängigkeit von Gallamin an NMS-besetzten Rezeptoren wurde in dieser Arbeit im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C und bei 23°C untersucht. Die Untersuchungen erfolgten mit dem Modulator Gallamin, da sich die Wirksamkeit dieses allosterischen Modulators als sehr stark abhängig von den Inkubationsbedingungen erwiesen hatte. In Tabelle 67 sind die bei 23°C und bei 37°C im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer ermittelten Daten für die Affinität des Modulators Gallamin einander gegenübergestellt.

Rezeptor	23°C pEC _{0.5,diss}	37°C pEC _{0.5,diss}	Δ pEC _{0.5,diss} (pEC _{0.5,diss} 23°C - pEC _{0.5,diss} 37°C)	p-Wert (t-Test)
M ₂ wt	5,15 ± 0,03 (n = 3-4)	4,82 ± 0,04 (n = 3-4)	0,33	0,0027
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	4,01 ± 0,06 (n = 3)	3,85 ± 0,02 (n = 3)	0,16	0,0647
M ₂ ⁴²³ Thr→His	5,21 ± 0,08 (n = 3)	4,66 ± 0,05 (n = 3)	0,55	0,0029
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3,99 ± 0,04 (n = 3)	3,63 ± 0,04 (n = 3)	0,36	0,0031
M ₅ wt	2,77 ± 0,05 (n = 3)	2,75 ± 0,04 (n = 4)	0,02	0,7704

Tabelle 67: pEC_{0.5,diss}-Werte des Modulators Gallamin in Dissoziationsverzögerungsversuchen im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 23°C und 37°C. Aufgeführt sind Mittelwerte ± Standardfehler von n unabhängigen Einzelbestimmungen. Angegeben ist jeweils als Δ pEC_{0.5,diss}-Wert die Absolutdifferenz zwischen der Affinität des Modulators Gallamin zum Rezeptor bei 23°C und bei 37°C, sowie der jeweilige p-Wert eines t-Testes für die bei verschiedenen Temperaturen ermittelten Affinitätsparameter.

Der Vergleich der unter verschiedenen Temperaturen ermittelten Kenngrößen zeigt, dass es beim Wechsel der Inkubationstemperaturen zu leichten Affinitätsänderungen des Modulators Gallamin kommt, die für den M₂-Rezeptor, die Mutante M₂⁴²³Threonin→Histidin und ebenso für die Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²³Threonin→Histidin auch statistische Signifikanz besitzen. Das Gesamtbild der Epitopabhängigkeit bleibt jedoch beim Wechsel der Inkubationstemperatur überwiegend erhalten. Sowohl bei 23°C als auch bei 37°C unterscheidet sich die Affinität von Gallamin an der Rezeptormutante M₂⁴²³Threonin→Histidin nicht signifikant von der am M₂-Rezeptor, der Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin führt unter beiden Bedingungen zu einem starken Affinitätsabfall. Die Affinität von Gallamin zur Doppelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin + ⁴²³Threonin→Histidin unterscheidet sich bei 23°C nicht signifikant von der an der Einzelmutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin, bei 37°C findet sich ein

statistisch signifikanter Unterschied (t-Test: $p = 0,0079$), der mit einer absoluten Differenz von 0,22 log-Einheiten jedoch eher gering ausfällt.

Die ermittelten Affinitätsveränderungen bei Temperaturänderung sind im Vergleich zu den Änderungen, die beim Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i -Puffer zum 3/50 mM Mg-Tris-Puffer beobachtet werden, eher unbedeutend. Dies wird in Abbildung 55 verdeutlicht.

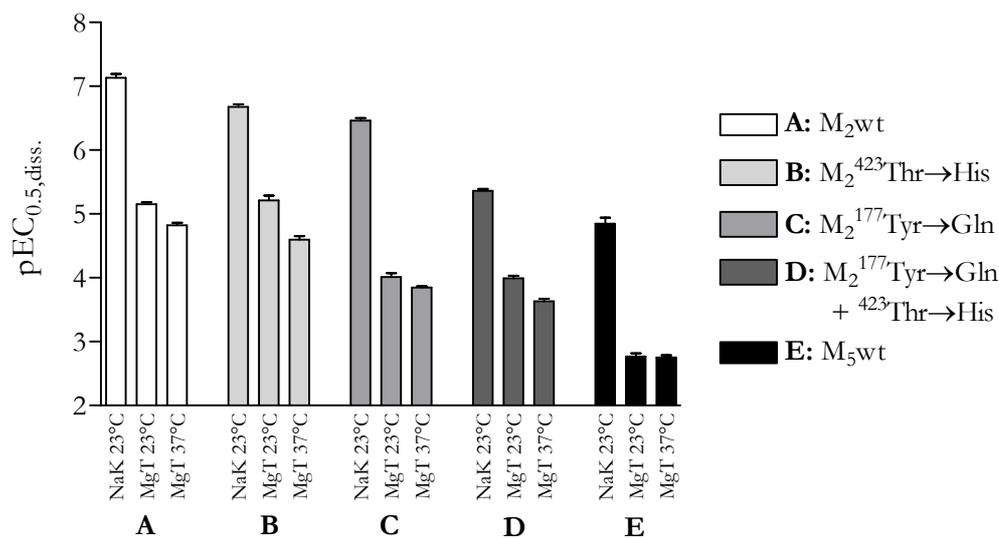


Abbildung 55: Gegenüberstellung der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit ($pEC_{0.5,diss}$ -Werte) des Modulators Gallamin an den angegebenen Rezeptorproteinen im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C (NaK 23°C), im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 23°C (MgT 23°C) sowie bei 37°C (MgT 37°C).

Für die beim Wechsel der Inkubationsbedingungen beobachteten Affinitätsänderungen des Modulators Gallamin scheint somit die ionale Zusammensetzung des Inkubationsmediums von maßgeblicher Bedeutung zu sein, während die Änderung der Inkubationstemperatur eine geringere Rolle spielt. Die beobachtete Erhöhung der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit eines allosterischen Modulators bei niedrigeren Inkubationsbedingungen steht im Einklang mit den von Staschen (1994) für den Modulator W84 erhobenen Befunden. In seinen Untersuchungen war der Effekt der Temperatur sowohl auf die assoziations- als auf die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit dieses Modulator feststellbar und ließ sich mit dem allgemeinen Zusammenhang der exponentiellen Temperaturabhängigkeit nach der Arrhenius-Gleichung erklären, wonach für exotherme Reaktionen eine gesteigerte Affinität, bzw. Wirksamkeit bei niedrigeren Reaktionstemperaturen zu erwarten ist.

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde zur Temperaturabhängigkeit der Wirkung von Gallamin am NMS-besetzten Rezeptor zeigen, dass Änderungen der Inkubationstemperatur nur geringen Einfluss auf die Wirksamkeit von Gallamin und auf den Beitrag der Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin zur M₂/M₅-Subtypselektivität von Gallamin haben.

IV.3 VERGLEICH DER EPITOPABHÄNGIGKEIT UNTER VERSCHIEDENEN INKUBATIONSBEDINGUNGEN

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Relevanz der Epitope M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin für die Epitopabhängigkeit der M_2/M_5 -Subtypselektivität allosterischer Modulatoren unter verschiedenen Inkubationsbedingungen zu untersuchen. Weiterhin sollte die Bedeutung der Aminosäuren M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan für die Basisaffinität allosterischer Modulatoren geklärt werden. Als allosterische Modulatoren wurden das stark pufferabhängige Gallamin, das mittelstark pufferabhängige W84, sowie das wenig pufferabhängige Alcuronium ausgewählt. Die Ergebnisse zur Relevanz dieser Aminosäuren unter den verschiedenen Bedingungen sind im folgenden substanzbezogen dargestellt.

IV.3.1 W84

Allgemeine Beobachtungen zur Epitopabhängigkeit von W84

Nachfolgend wird eine Übersicht zum aktuellen Kenntnisstand zur Epitopabhängigkeit von W84 im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C gegeben.

Die beiden Epitope M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin konnten als relevant für die M_2/M_5 -Subtypselektivität dieses Modulators identifiziert werden (Buller et al., 2002; Voigtländer et al., 2003). Der Austausch dieser beiden Aminosäuren in die korrespondierenden Aminosäuren Glutamin, bzw. Histidin des M_5 -Rezeptors führte in Dissoziationsverzögerungsversuchungen am NMS-besetzten Rezeptor zum Absinken der Affinität auf das Niveau des M_5 -Rezeptors. In weiteren Untersuchungen konnte jedoch geklärt werden, dass der beobachtete Affinitätsabfall im Vergleich zum M_2 -Rezeptor, der sich durch den Austausch der Aminosäure M_2^{423} Threonin→Histidin am NMS-besetzten Rezeptor beobachten ließ, auf einen störenden Einfluss der eingeführten Aminosäure Histidin für die Bindung des Modulators an die allosterische Bindungsstelle zurückzuführen ist (Prilla et al., 2006). Die Interaktion von W84 mit der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin scheint im wesentlichen durch aromatische Effekte und π - π -Wechselwirkungen bedingt zu sein. Huang et al. (2005) konnten zeigen, dass durch das Einfügen der Aminosäuren Serin oder Alanin an Stelle von M_2^{177} Tyrosin die Affinität des Modulators W84 ausgehend vom M_2 -Rezeptor ähnlich stark gesenkt wurde wie durch die Mutation M_2^{177} Tyrosin→Glutamin. Wurde hingegen statt der Aminosäure Tyrosin die aromatische Aminosäure Phenylalanin in den M_2 -Rezeptor eingeführt, so sank die Affinität von

W84 nicht so stark ab. Für die Basisaffinität von W84 zu NMS-besetzten Muskarinrezeptoren hat die Aminosäure M_2^{422} Tryptophan eine große Bedeutung, während die Aminosäure M_2^{427} Tryptophan kaum einen Beitrag zur Affinität des Modulators leistet, jedoch für das kooperative Verhalten eine Rolle zu spielen scheint (Prilla et al., 2006). Am freien Rezeptor findet sich auch ein Beitrag zur Basisaffinität der Aminosäure M_2^{422} Tryptophan, ebenso eine leichte Bedeutung der Aminosäure M_2^{427} Tryptophan. In Docking-Simulationen wird postuliert, dass sich am NMS-besetzten Rezeptor eine Phthalimid-Gruppe von W84 sandwichartig zwischen den aromatischen Strukturen der Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{422} Tryptophan einlagert.

IV.3.1.1 Epitopabhängigkeit am besetzten Rezeptor

M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin

Die Bedeutung der beiden Epitope M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin für die M_2/M_5 -Subtypselektivität von W84 an NMS-besetzten Rezeptoren unter verschiedenen Inkubationsbedingungen ist in den Balkendiagrammen in Abbildung 56 dargestellt.

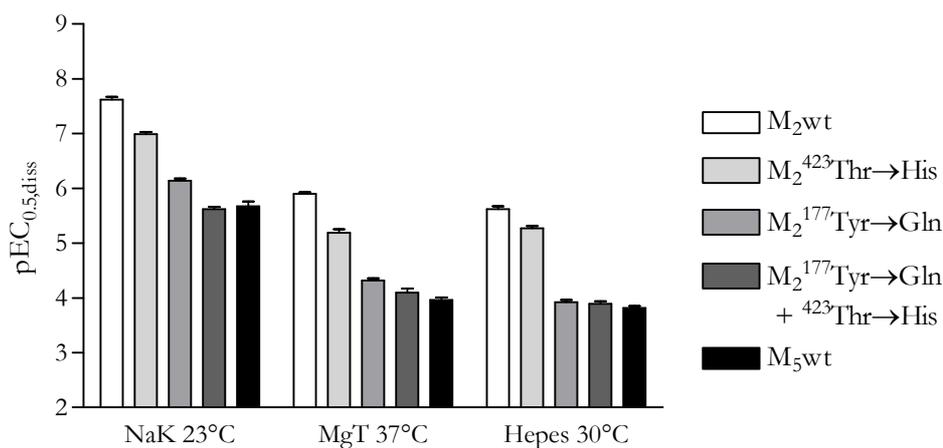


Abbildung 56: $pEC_{0.5,diss}$ -Werte von W84, die die Affinität der Modulatoren zu den untersuchten NMS-besetzten Rezeptoren im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C (NaK 23°C), im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C (MgT 37°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) widerspiegeln.

Der Vergleich der $pEC_{0.5,diss}$ -Werte unter verschiedenen Inkubationsbedingungen am NMS-besetzten Rezeptor zeigt, dass sich beim Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i -Puffer zum 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bzw. zum 10 mM Hepes-Puffer eine große Wirksamkeitsverschiebung beobachten lässt. Hingegen ändert sich die Wirksamkeit von W84 beim Vergleich der Bedingungen des 3/50 mM Mg-Tris-Puffers und des 10 mM Hepes-Puffers nur geringfügig. Die Epitopabhängigkeit von W84 am NMS-besetzten Rezeptor bleibt beim Wechsel der Inkubationsbedingungen weitestgehend erhalten, wenn auch der Anteil, den die Epitope zur M_2/M_5 -Subtypselektivität des Modulators leisten, verändert wird. Der relative Anteil, den die Aminosäuren an der M_2/M_5 -Subtypselektivität haben, ist in Tabelle 68 dargestellt. Dabei wird die

Differenz der $pEC_{0.5,diss}$ -Werte von W84 am M_2 - und am M_5 -Wildtyp-Rezeptor als Absolutwert für die M_2/M_5 -Subtypselektivität dieser Substanz als 100%-Niveau festgelegt. Der durch den Austausch der Aminosäuren im M_2 -Rezeptor erfolgte Affinitätsverlust im Vergleich zum M_2 -Wildtyp-Rezeptor wird als Differenz aus den $pEC_{0.5,diss}$ -Werten am jeweiligen mutierten Rezeptor und am M_2 -Wildtyp quantifiziert. Der Quotient aus diesem Affinitätsverlust und der Gesamtdifferenz der M_2/M_5 -Subtypselektivität gibt den Anteil des jeweiligen Epitopes an der Subtypselektivität an.

Rezeptor	$\Delta_{rel.} M_2/M_5$ ($pEC_{0.5,diss}$) (M_2-M_x/M_2-M_5) [%]		
	5 mM Na, K, P_i - Puffer 23°C	3/50 mM Mg-Tris- Puffer 37°C	10 mM Hepes- Puffer 30°C
M_2 wt	0	0	0
M_2^{423r} Thr→His	32	37	19
M_2^{177r} Tyr→Gln	76	81	94
M_2^{177r} Tyr→Gln + 423r Thr→His	103	93	96
M_5 wt	100	100	100

Tabelle 68: Relative Bedeutung der aufgeführten Aminosäuren für die M_2/M_5 -Subtypselektivität des Modulators W84 an NMS-besetzten Rezeptoren unter den Bedingungen des 5 mM Na, K, P_i -Puffers bei 23°C, des 3/50 mM Mg-Tris-Puffers bei 37°C und des 10 mM Hepes-Puffers bei 30°C. Der Affinitätsabfall im Vergleich zum M_2 -Rezeptor (M_2-M_x) am jeweiligen Rezeptor M_x wird dabei im Verhältnis zur M_2/M_5 -Subtypselektivität (M_2-M_5) betrachtet.

Tabelle 68 zeigt, dass die Relevanz des Epitopes M_2^{423r} Threonin durch den Wechsel zu physiologischeren Inkubationsbedingungen abnimmt, während die Bedeutung des Epitopes M_2^{177r} Tyrosin zunimmt. Im 10 mM Hepes-Puffer ist die relative Bedeutung dieses einzelnen Epitopes sogar genauso groß wie beim gemeinsamen Austausch der Aminosäuren M_2^{177r} Tyrosin und M_2^{423r} Threonin. Diese Inkubationsbedingung scheint zu einer alleinigen Abhängigkeit der M_2/M_5 -Subtypselektivität von der Aminosäure M_2^{177r} Tyrosin zu führen.

Prilla et al. (2006) konnten bei Versuchen im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C nachweisen, dass der Affinitätsverlust von W84 an der NMS-besetzten Rezeptormutante M_2^{423r} Threonin→Histidin durch einen störenden Einfluss des Histidins zustande kommt. An dem mutierten Rezeptor M_2^{423r} Threonin→Alanin ließ sich kein Affinitätsverlust für den Modulator W84 beobachten. Das in den M_2 -Rezeptor eingeführte Histidin ragt nach den Modellvorstellungen eines dreidimensionalen Rezeptormodells in den Raum der Bindungstasche des Modulators W84 hinein und stört so die Interaktion der Phthalimidgruppe des Modulators W84 mit den Aminosäuren M_2^{177r} Tyrosin und M_2^{422r} Tryptophan. Die beobachtete verminderte Bedeutung eines Austausches von M_2^{423r} Threonin→Histidin unter physiologischeren Pufferbedingungen deutet darauf hin, dass der störende Einfluss des ausgetauschten Histidins unter diesen Bedingungen geringer ausgeprägt ist. Dieser störende Einfluss des Histidins könnte entweder durch direkte Interaktion von Kationen mit der Aminosäure Histidin vermindert werden, die daraufhin ihre

Stellung im Rezeptorprotein verändern könnte. Unter physiologischeren Inkubationsbedingungen könnte aber auch durch Bindung der Kationen an andere Rezeptorbereiche und evtl. spezifische kationische Bindungsstellen die Konformation der allosterischen Bindungsstelle so verändert werden, dass die Einführung der Aminosäure Histidin eine weniger störende Wirkung hat. Eine weitere Erklärung für die veränderte Bedeutung der Rezeptormutante M_2^{423} Threonin→Histidin könnte darin begründet sein, dass durch höhere Ionenkonzentrationen in Anlehnung an den Hofmeister-Effekt polare Wechselwirkungen vermindert und hydrophobe Wechselwirkungen verstärkt werden (Baldwin, 1996; Vogel et al., 2001). Die störende Wirkung des Histidins auf die Bindung von W84 könnte dann zurückgedrängt sein, wenn es sich hierbei um eine Störwirkung handelt, die durch polare Effekte vermittelt wird. Auch könnten die hydrophoben Wechselwirkungen des Phthalimid-Ringes mit M_2^{177} Tyrosin und M_2^{422} Tryptophan so verstärkt werden, dass die störende Wirkung der Aminosäure Histidin vermindert wird.

Die starke Änderung der Wirksamkeit des Modulators W84 beim Wechsel der Inkubationsbedingungen wird nicht durch die Änderungen der Epitopabhängigkeit der M_2/M_5 -Subtypselektivität beim Pufferwechsel erklärt und ist daher eher auf den Einfluss der Inkubationsbedingungen auf Epitope zurückzuführen, die die Basisaffinität des Modulators W84 vermitteln.

M_2^{175} Glutamat, M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan

Die Bedeutung der Epitope M_2^{175} Glutamat, M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan für die Basisaffinität von W84 am NMS-besetzten Rezeptor wurde auf Grund der geringen Wirksamkeitsänderungen beim Wechsel vom 3/50 mM Mg-Tris-Puffer zum 10 mM Hepes-Puffer in den vorangegangenen Experimenten lediglich unter den Bedingungen des 10 mM Hepes-Puffers überprüft. Eine Übersicht über die Epitopabhängigkeiten unter den untersuchten Inkubationsbedingungen gibt das Balkendiagramm in Abbildung 57.

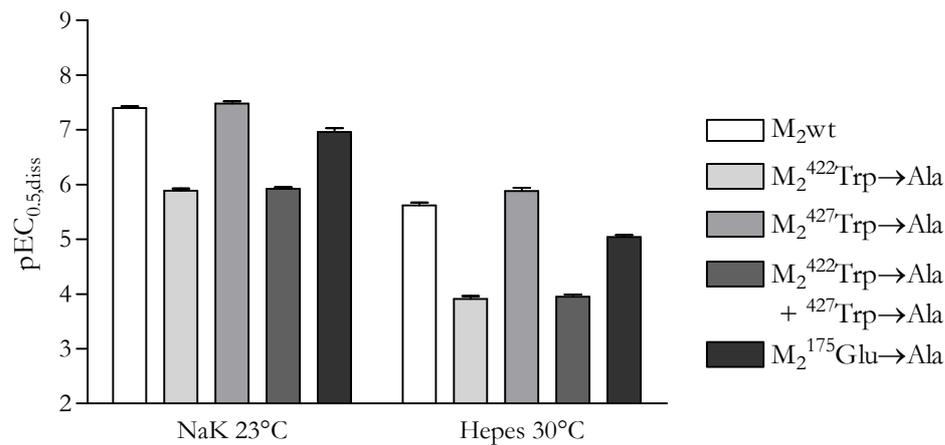


Abbildung 57: pEC_{0.5,diss}-Werte von W84, welche die Affinität des Modulators zu den untersuchten NMS-besetzten Rezeptoren im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C (NaK 23°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) widerspiegeln. Die dargestellten Affinitätswerte im 5 mM Na, K, P_i-Puffer wurden von Raasch (M_2^{175} Glutamat → Alanin: Raasch, Dissertationsschrift 2003) und Prilla (übrige Rezeptorproteine: Prilla, Dissertationsschrift 2006) ermittelt.

Die Übersicht in Abbildung 57 zeigt, dass die Wirksamkeit des allosterischen Modulators W84 zwar durch den Wechsel der Inkubationsbedingungen beeinflusst wird, die Wirksamkeitsverschiebungen jedoch an allen untersuchten Rezeptormutanten ähnlich groß sind. Somit scheinen die beobachteten Wirksamkeitsverschiebungen beim Wechsel der Inkubationsbedingungen nicht auf eine veränderte Bedeutung der Aminosäuren M_2^{175} Glutamat, M_2^{422} Tryptophan oder M_2^{427} Tryptophan zurückzuführen zu sein.

IV.3.1.2 Epitopabhängigkeit am unbesetzten Rezeptor

M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin

Die beiden Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin haben auch am unbesetzten Muskarinrezeptor eine Bedeutung für die M_2/M_5 -Subtypselektivität des Modulators W84. In Experimenten im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C (Prilla, Dissertationsschrift 2006) zeigte sich, dass die M_2/M_5 -Subtypselektivität am unbesetzten Rezeptorprotein im Gegensatz zum NMS-besetzten Rezeptor nicht alleinig durch diese beiden Aminosäuren vermittelt wird. Eine Übersicht der Bedeutung der beiden Epitope M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin für die M_2/M_5 -Subtypselektivität des Modulators W84 am unbesetzten Rezeptor unter den in dieser Arbeit untersuchten Inkubationsbedingungen wird in Abbildung 58 gegeben.

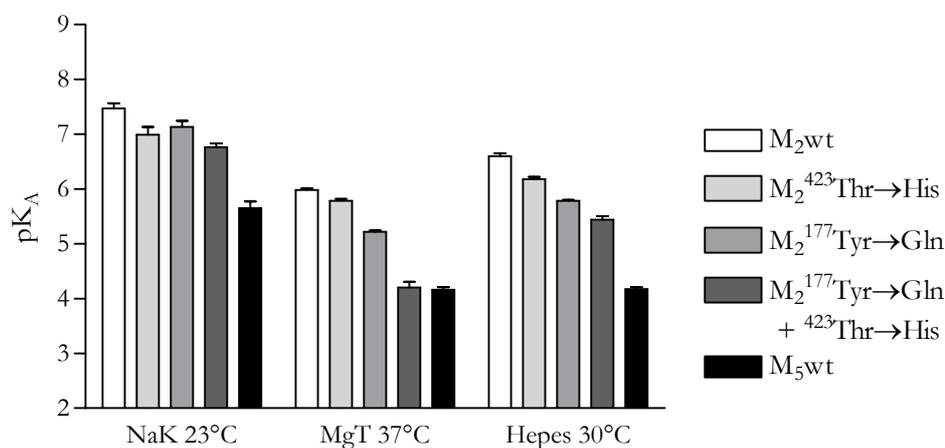


Abbildung 58: pK_A -Werte von W84, welche ein Maß für die Affinität von W84 zu den untersuchten unbesetzten Rezeptoren im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C (NaK 23°C), im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C (MgT 37°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) darstellen.

Beim Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i -Puffer zum 3/50 mM Mg-Tris-Puffer kommt es an allen Rezeptormutanten zu einem starken Abfall der Affinität von W84, beim Wechsel vom 3/50 mM Mg-Tris-Puffer zum 10 mM Hepes-Puffer steigt das Affinitätsniveau von W84 jedoch wieder leicht an (während dieser Wechsel am NMS-besetzten Rezeptor zu einer leichten Affinitätsabnahme führt, siehe IV.3.1.1, Abbildung 56). Die relative Bedeutung der Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin für die M_2/M_5 -Subtypselektivität des Modulators W84 unter verschiedenen Inkubationsbedingungen wird in Tabelle 69 veranschaulicht.

Rezeptor	$\Delta_{\text{rel.}} M_2/M_5$ (pK _A) (M ₂ -M _x /M ₂ -M ₅) [%]		
	5 mM Na, K, P _i - Puffer, 23°C	3/50 mM Mg-Tris- Puffer, 37°C	10 mM Hepes- Puffer, 30°C
M ₂ wt	0	0	0
M ₂ ^{423T} Thr→His	19	11	17
M ₂ ^{177T} Tyr→Gln	26	42	34
M ₂ ^{177T} Tyr→Gln + ^{423T} Thr→His	39	98	48
M ₅ wt	100	100	100

Tabelle 69: Relative Bedeutung der aufgeführten Aminosäuren für die M₂/M₅-Subtypselektivität von W84 an unbesetzten Rezeptoren unter den Bedingungen des 5 mM Na, K, P_i-Puffers bei 23°C, des 3/50 mM Mg-Tris-Puffers bei 37°C und des 10 mM Hepes-Puffers bei 30°C.

Die Bedeutung der untersuchten Aminosäuren für die M₂/M₅-Subtypselektivität von W84 an unbesetzten Rezeptoren wird in geringerem Ausmaß durch den Wechsel der Inkubationsbedingungen beeinflusst. Auffallend ist, dass die Doppelmutante M₂^{177T}Tyrosin→Glutamin + ^{423T}Threonin→Histidin im 3/50 mM Mg-Tris-Puffers scheinbar vollständig die M₂/M₅-Subtypselektivität von W84 zu erklären vermag, während dies bei den anderen beiden Pufferbedingungen nicht der Fall ist. Ein methodisches Problem soll deshalb nicht ausgenommen werden, da die Ermittlung der pK_A-Werte teilweise sehr lange Inkubationszeiten erfordert. Am unbesetzten Rezeptor zeigt die Änderung der Inkubationsbedingungen nicht die gleichen Auswirkungen auf die Affinität von W84 zu den untersuchten Rezeptorproteinen wie am besetzten Rezeptor. Dies wird besonders deutlich bei der Betrachtung des Wechsels vom 3/50 mM Mg-Tris-Puffer zum 10 mM Hepes-Puffer. Führt dieser Wechsel am NMS-besetzten Rezeptor zu einer Affinitätsabnahme, so beobachtet man am unbesetzten Rezeptor eine Affinitätszunahme. Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede zwischen besetzten und unbesetzten Rezeptoren wäre, dass der orthosterische Ligand NMS durch seine Bindung potentielle Bindungsstellen für die Kationen im Inkubationspuffer besetzt, diese wären am unbesetzten Rezeptorprotein frei für die Ionen des Inkubationspuffers zugänglich und könnten durch ihre Bindung Einfluss auf die Konformation der allosterischen Bindungsstelle oder das Bindungsverhalten des allosterischen Modulators haben.

Die untersuchten Epitope sind unter allen drei Inkubationsbedingungen am unbesetzten Rezeptor für W84 bindungsrelevant. Affinitätsänderungen beim Wechsel der Puffermedien sind wahrscheinlich auf eine veränderte Relevanz von Epitopen zurückzuführen, die Basisaffinität vermitteln.

M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan

Die Bedeutung der Aminosäuren M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan für die Basisaffinität von W84 an unbesetzten Rezeptoren unter verschiedenen Inkubationsbedingungen wird im Balkendiagramm in Abbildung 59 veranschaulicht.

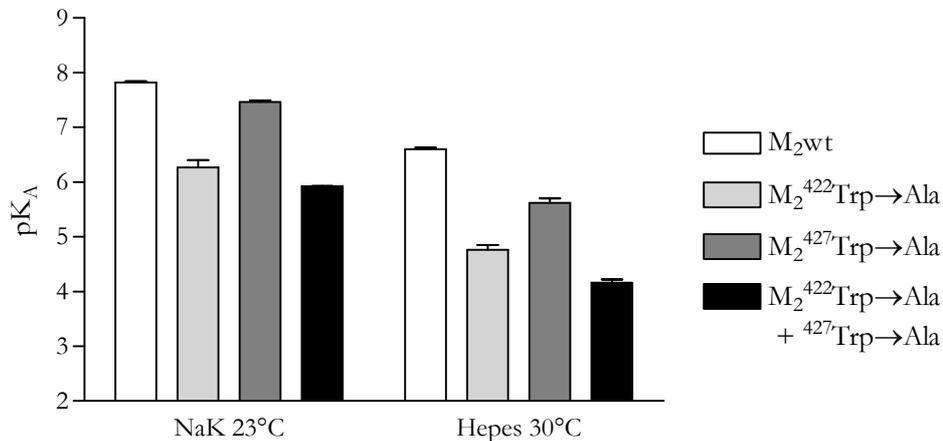


Abbildung 59: pK_A -Werte von W84, die die Affinität des Modulators zu den untersuchten unbesetzten Rezeptoren im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C (NaK 23°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) widerspiegeln. Die dargestellten Affinitätswerte im 5 mM Na, K, P_i -Puffer wurden Prilla (Prilla, Dissertationsschrift 2006) ermittelt.

Die Gegenüberstellung der Affinitätswerte von W84 in Abbildung 59 an den untersuchten unbesetzten Rezeptorproteinen zeigt, dass die Veränderung der Inkubationsbedingungen nicht zu einer grundsätzlich veränderten Epitopabhängigkeit der Basisaffinität führt. Sowohl die Aminosäure M_2^{422} Tryptophan als auch die Aminosäure M_2^{427} Tryptophan leisten einen Beitrag zur Basisaffinität von W84 an unbesetzten Rezeptoren. Allerdings scheint sich die Bedeutung der Aminosäure M_2^{422} Tryptophan unter den physiologischeren Inkubationsbedingungen des 10 mM Hepes-Puffers im Vergleich zum 5 mM Na, K, P_i -Puffer etwas zu vergrößern.

Für die beobachteten Wirksamkeitsverschiebungen an unbesetzten Rezeptoren beim Wechsel der Inkubationsbedingungen scheint keine grundsätzlich veränderte Abhängigkeit der Basisaffinität von den Epitopen M_2^{422} Tryptophan oder M_2^{427} Tryptophan verantwortlich zu sein.

Die Bedeutung aller untersuchten Epitope für W84 bleibt sowohl am NMS-besetzten als auch am unbesetzten Rezeptor beim Wechsel der Inkubationsbedingungen weitestgehend erhalten. Beim Wechsel zu physiologischeren Bedingungen steigert sich die Relevanz des Epitopes M_2^{177} Tyrosin sowohl am besetzten als auch am unbesetzten Rezeptor. Die Bedeutung des Epitopes M_2^{423} Threonin für die M_2/M_5 -Subtypeselektivität von W84 am NMS-besetzten Rezeptor nimmt bei physiologischeren Inkubationsbedingungen ab.

IV.3.2 Gallamin

Allgemeine Beobachtungen zur Epitopabhängigkeit von Gallamin

Erkenntnisse zur Epitopabhängigkeit von Gallamin, die in Untersuchungen im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C erhoben wurden (Huang et al., 2005; Leppik et al., 1996; Prilla et al., 2003), sollen im folgenden kurz dargestellt werden, insofern sie in dieser Arbeit untersuchte Epitope betreffen. Die beiden Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin zeigten im 5 mM Na, K, P_i-Puffer eine Bedeutung für die M₂/M₅-Subtypselektivität von Gallamin an NMS-besetzten Rezeptoren (Prilla, Dissertationsschrift 2006), jedoch können beide Aminosäuren die M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators an NMS-besetzten Rezeptoren nicht vollständig erklären. Bei Untersuchungen, die die Art der Interaktion des Epitopes M₂¹⁷⁷Tyrosin mit Gallamin betrachteten, zeigte sich im Gegensatz zu W84, dass die Interaktion nicht in erster Linie durch aromatische Wechselwirkungen vermittelt wird (Huang et al., 2005). Der Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin in die aromatische Aminosäure Phenylalanin führte zu einem ähnlichen Affinitätsabfall wie dies der Austausch in die polare Aminosäuren Serin oder die neutrale Aminosäure Alanin mit sich brachte. Hingegen scheint die Affinität von Gallamin am NMS-besetzten Rezeptor stark durch die sauren Aminosäuren der zweiten extrazellulären Schleife beeinflusst zu werden. Leppik et al. (1996) beobachteten in Untersuchungen, in denen die saure EDGE-Sequenz (EDGE: Glutaminsäure-Asparaginsäure-Glycin-Glutaminsäure) in Position M₂¹⁷²⁻¹⁷⁵ in die neutrale korrespondierende Sequenz des M₁-Rezeptors mutiert wurde, (LAGQ: Leucin-Alanin-Glycin-Glutamin) einen großen Affinitätsverlust von Gallamin am NMS-besetzten Rezeptor. Die Aminosäure M₂¹⁷⁵Glutamat ist im M₂- und im M₅-Rezeptor konserviert und könnte für die Basisaffinität von Gallamin zu diesen beiden Rezeptorsubtypen verantwortlich sein, während die anderen sauren Aminosäuren im M₂-Rezeptor auch Relevanz für die M₂/M₅-Subtypselektivität von Gallamin haben könnten. Die Mutation der sauren Aminosäure M₂¹⁷³Aspartat scheint keinen Effekt für die Bindung von Gallamin am NMS-besetzten Rezeptor zu haben (Voigtländer, Dissertationsschrift 2003). Die beiden Aminosäuren M₂¹⁷²Glutamat und M₂¹⁷⁵Glutamat sind beide wichtig für die Affinität von Gallamin zu NMS-besetzten Muskarinrezeptoren (Huang et al., 2005). Der Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin führt zu einem Affinitätsabfall von Gallamin am NMS-besetzten Rezeptor. Ob hier ein störender Einfluss der eingebrachten Aminosäure Histidin wie bei W84 zum Affinitätsverlust führt, ist bisher noch nicht geklärt worden.

Für die Basisaffinität von Gallamin zu NMS-besetzten Rezeptoren hat die Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan eine große Bedeutung, der Austausch dieser Aminosäure lässt einen Affinitätsabfall am entsprechenden mutierten NMS-besetzten Rezeptor im Vergleich zum

M₂-Rezeptor beobachten (Prilla et al., 2006), der Austausch des Tryptophans in Position M₂⁴²⁷ hat hingegen keine Auswirkung auf die Bindungsneigung von Gallamin.

Am freien Rezeptorprotein zeigt sich durch Mutation der Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin und M₂⁴²³Threonin→Histidin ein Absinken der Affinität von Gallamin, wobei der Effekt bei Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin deutlich größer ist als beim Austausch der Aminosäure M₂⁴²³Threonin. Die Untersuchung der Relevanz der Epitope M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan für die Basisaffinität von Gallamin am unbesetzten Rezeptor im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C zeigte, dass es beim Austausch dieser Aminosäuren zu einem Affinitätsabfall kommt (Prilla et al., 2006).

IV.3.2.1 Epitopabhängigkeit am NMS-besetzten Rezeptor

M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin

In der folgenden Abbildung werden die unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen ermittelten Muster der Epitopabhängigkeit der M₂/M₅-Subtypselektivität von Gallamin einander gegenübergestellt.

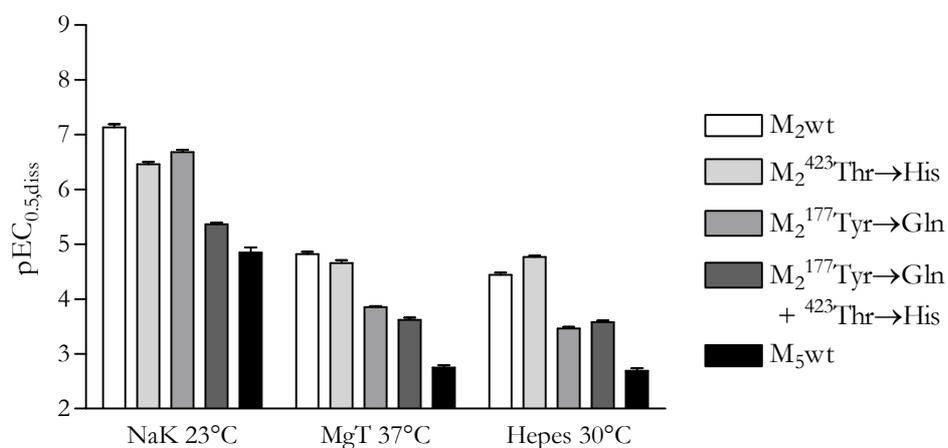


Abbildung 60: pEC_{0.5,diss}-Werte von Gallamin, die die Affinität des Modulators zu den untersuchten NMS-besetzten Rezeptoren im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C (NaK 23°C), im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C (MgT 37°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) widerspiegeln.

Aus Abbildung 60 ist ersichtlich, dass es beim Wechsel der Inkubationsbedingungen vom 5 mM Na, K, P_i-Puffer zum 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bzw. zum 10 mM Hepes-Puffer zu einem ausgeprägten Abfall der Affinität von Gallamin zu allen untersuchten Rezeptorproteinen kommt. Der Unterschied beim Vergleich der Affinitätsmuster bei den Inkubationsbedingungen des 3/50 mM Mg-Tris-Puffers und des 10 mM Hepes-Puffers ist – wie schon bei den Untersuchungen mit W84 festgestellt wurde – eher gering ausgeprägt. Hingegen zeigt sich, dass sich die Relevanz der einzelnen Epitope für die M₂/M₅-Subtypselektivität von Gallamin am NMS-besetzten Rezeptor beim Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i-Puffer zu physiologischeren

Bedingungen ändert. Dies wird in Tabelle 70 verdeutlicht, in der die relative Bedeutung der einzelnen Aminosäuren für die M_2/M_5 -Subtypselektivität unter den beobachteten Inkubationsbedingungen aufgeführt wird.

Rezeptor	$\Delta_{rel.} M_2/M_5$ ($pEC_{0.5,diss}$) (M_2-M_x/M_2-M_5) [%]		
	5 mM Na, K, P_i - Puffer, 23°C	3/50 mM Mg-Tris- Puffer, 37°C	10 mM Hepes- Puffer, 30°C
M_2 wt	0	0	0
M_2^{423} Thr→His	20	8	-19
M_2^{177} Tyr→Gln	23	47	56
M_2^{177} Tyr→Gln + 423 Thr→His	78	58	49
M_5 wt	100	100	100

Tabelle 70: Relative Bedeutung der aufgeführten Aminosäuren für die M_2/M_5 -Subtypselektivität von Gallamin an NMS-besetzten Rezeptoren unter den Bedingungen des 5 mM Na, K, P_i -Puffers bei 23°C, des 3/50 mM Mg-Tris-Puffers bei 37°C und des 10 mM Hepes-Puffers bei 30°C.

Die Gegenüberstellung in Tabelle 70 zeigt, dass die Bedeutung der Aminosäure M_2^{423} Threonin erheblich durch die Inkubationsbedingungen beeinflusst wird. Während die Ergebnisse im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C noch auf eine Relevanz dieser Aminosäure für die M_2/M_5 -Subtypselektivität von Gallamin schließen lassen, nimmt diese Bedeutung beim Wechsel zum 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C stark ab. Unter den Inkubationsbedingungen des 10 mM Hepes-Puffers scheint die Aminosäure sogar eher einen störenden Einfluss für die Interaktion von Gallamin mit dem Rezeptorprotein zu haben.

Für die Relevanz des Epitopes M_2^{177} Tyrosin lässt sich eine Zunahme der Bedeutung beim Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i -Puffer zu physiologischeren Inkubationsbedingungen mit höheren Ionenstärken beobachten. Es ließe sich vermuten, dass dies, ebenso wie für W84 postuliert, auf eine Verstärkung hydrophober Wechselwirkungen bei höheren Ionenkonzentrationen zurückführen sei. Jedoch zeigten die Untersuchungen von Huang et al. (2005), dass die Affinität von Gallamin zur Aminosäure M_2^{177} Tyrosin nicht durch aromatische Wechselwirkungen dominiert wird. Die gestiegene Bedeutung der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin für die M_2/M_5 -Subtypselektivität von Gallamin könnte auch auf eine veränderte Ausnutzung des Raumes innerhalb der allosterischen Bindungsstelle zurückzuführen sein. Hier könnte die Interaktion von Kationen mit Bereichen der allosterischen Bindungsstelle zu einer verstärkten Wechselwirkung mit der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin führen. Ebenso wäre es möglich, dass bei Mutation der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin unter den Versuchsbedingungen des 5 mM Na, K, P_i -Puffers bei 23°C andere Bindungsstellen von Gallamin stärker genutzt werden, die unter den physiologischeren Pufferbedingungen nicht mehr zur Verfügung stehen. Dies würde dann unter den Bedingungen mit höheren Ionenkonzentrationen zu größeren Affinitätsabfällen von Gallamin bei Mutation der Aminosäure M_2^{177} Tyrosin→Glutamin führen.

M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan

Eine Übersicht über die Bedeutung der Epitope M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan für die Basisaffinität von Gallamin zu NMS-besetzten Rezeptoren unter verschiedenen Inkubationsbedingungen wird in Abbildung 61 gegeben.

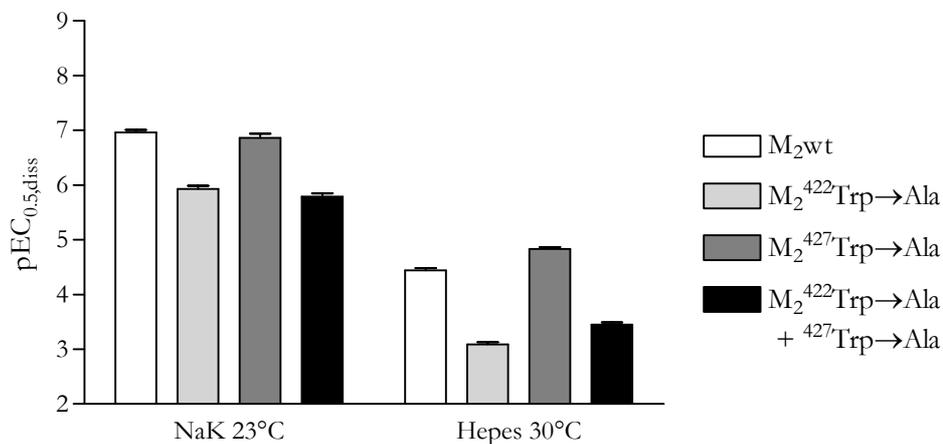


Abbildung 61: $pEC_{0.5,diss}$ -Werte von Gallamin, welche die Affinität des Modulators zu den untersuchten NMS-besetzten Rezeptoren im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C (NaK 23°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) widerspiegeln. Die dargestellten Affinitätswerte im 5 mM Na, K, P_i -Puffer wurden Prilla (Prilla, Dissertationsschrift 2006) ermittelt.

Die Gegenüberstellung der Bedeutung der beiden Aminosäuren M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan für die Basisaffinität von Gallamin unter verschiedenen Inkubationsbedingungen zeigt, dass die Aminosäure M_2^{422} Tryptophan unter den beiden untersuchten Bedingungen affinitätsgebende Eigenschaften für diesen Modulator besitzt. Unter den Bedingungen des 10 mM Hepes-Puffers ist der Affinitätsverlust von Gallamin durch den Austausch dieser Aminosäure um 0.3 logarithmische Einheiten höher als im 5 mM Na, K, P_i -Puffer. Die Aminosäure M_2^{427} Tryptophan hingegen, deren Austausch im 5 mM Na, K, P_i -Puffer zu keinem Verlust der Bindungsneigung von Gallamin führte, besitzt unter den Bedingungen des 10 mM Hepes-Puffers eine leicht störende Wirkung für die Interaktion von Gallamin mit dem Rezeptor. Unter beiden untersuchten Bedingungen leistet dieses Epitop keinen affinitätsgebenden Beitrag für die Bindung von Gallamin.

Im Vergleich mit dem Bindungsverhalten von W84 lässt sich jedoch sagen, dass es bei W84 nicht wie bei Gallamin zu einer etwas stärkeren Bedeutung der Aminosäure M_2^{422} Tryptophan für die Basisaffinität beim Wechsel der Inkubationsbedingungen kommt. Dies spricht dafür, dass keine veränderte Stellung der Aminosäuren im Rezeptorprotein die unter verschiedenen Inkubationsbedingungen beobachteten Änderungen der Bedeutung dieses Epitopes zur Folge hat, sondern dass sich die allosterischen Modulatoren anders in der Bindungstasche orientieren.

Dies könnte dann der Fall sein, wenn für die Modulatoren unterschiedliche Epitope für die Basisaffinität relevant sind und wenn diese Epitope wiederum unterschiedlich durch die veränderten Inkubationsbedingungen beeinflusst würden.

IV.3.2.2 Epitopabhängigkeit am unbesetzten Rezeptor

M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin

Die Bedeutung der Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin für die M_2/M_5 -Subtypselektivität von Gallamin am unbesetzten Rezeptorprotein unter den untersuchten Inkubationsbedingungen wird im Balkendiagramm in Abbildung 62 dargestellt.

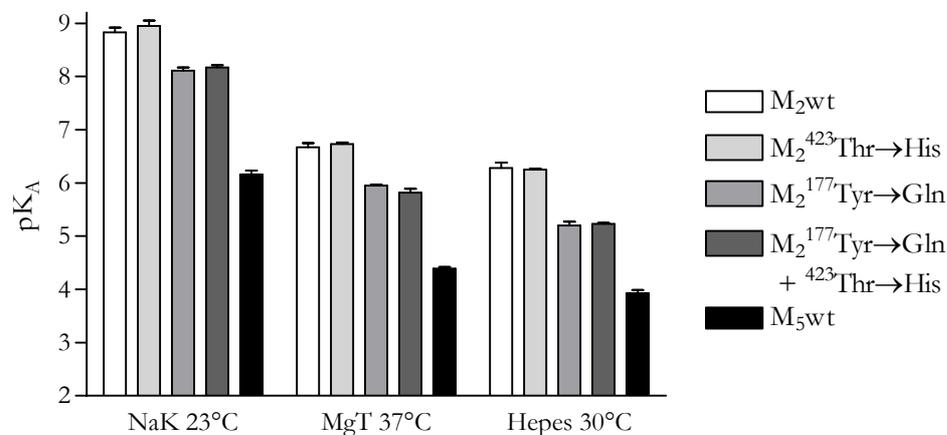


Abbildung 62: p_{K_A}-Werte von Gallamin, welche ein Maß für die Affinität des Modulators zu den untersuchten unbesetzten Rezeptoren im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C (NaK 23°C), im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C (MgT 37°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) darstellen.

Beim Wechsel der Inkubationsbedingungen vom 5 mM Na, K, P_i-Puffer zum 3/50 mM Mg-Tris-Puffer lässt sich, wie aus Abbildung 62 hervorgeht, ein starker Affinitätsabfall von Gallamin an allen untersuchten Rezeptorproteinen beobachten. Beim Wechsel vom 3/50 mM Mg-Tris-Puffer zum 10 mM Hepes-Puffer ist dieser Affinitätsabfall wiederum beobachtbar, jedoch nicht so stark ausgeprägt: die Affinitätsmuster unter diesen beiden Inkubationsbedingungen sind einander sehr ähnlich. Die relative Bedeutung der untersuchten Aminosäuren für die M_2/M_5 -Subtypselektivität unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen wird in Tabelle 71 veranschaulicht.

Rezeptor	$\Delta_{\text{rel.}} M_2/M_5$ (pK _A) (M_2-M_x/M_2-M_5) [%]		
	5 mM Na, K, P _i - Puffer, 23°C	3/50 mM Mg-Tris- Puffer, 37°C	10 mM Hepes- Puffer, 30°C
M ₂ wt	0	0	0
M ₂ ⁴²³ Thr→His	-4	-3	1
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	27	32	46
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	25	37	45
M ₅ wt	100	100	100

Tabelle 71: Relative Bedeutung der aufgeführten Aminosäuren für die M₂/M₅-Subtypselektivität von Gallamin an unbesetzten Rezeptoren unter den Bedingungen des 5 mM Na, K, P_i-Puffers bei 23°C, des 3/50 mM Mg-Tris-Puffers bei 37°C und des 10 mM Hepes-Puffers bei 30°C.

Unter allen drei Inkubationsbedingungen besitzt das Epitop M₂⁴²³Threonin keine Relevanz für die M₂/M₅-Subtypselektivität am unbesetzten Rezeptor. Der Austausch des Epitopes M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin führt unter allen drei Inkubationsbedingungen zu einem Abfall der Bindungsneigung von Gallamin, jedoch scheint dieser Effekt im 10 mM Hepes-Puffer etwas ausgeprägter zu sein als unter den beiden anderen untersuchten Bedingungen. Die M₂/M₅-Subtypselektivität am unbesetzten Rezeptor wird unter allen drei Inkubationsbedingungen nicht vollständig durch das Epitop M₂¹⁷⁷Tyrosin erklärt. Die Änderung der Inkubationsbedingungen führt demnach zu keiner veränderten Epitopabhängigkeit von Gallamin von den beiden Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin. Die deutlichen Änderungen in der Epitopabhängigkeit, die sich bei Pufferwechsel am NMS-besetzten Rezeptor zeigten, scheinen sich am unbesetzten Rezeptorprotein für Gallamin nicht wiederzufinden. Das von Gallamin genutzte Haftareal an Muskarinrezeptoren wird also am NMS-besetzten Rezeptor in anderem Ausmaß durch veränderte Inkubationsbedingungen beeinflusst als am unbesetzten Rezeptor.

M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan

Die Relevanz, die die beiden Aminosäuren M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan für die Basisaffinität von Gallamin am unbesetzten Rezeptorprotein unter verschiedenen Inkubationsbedingungen haben, wird in Abbildung 63 verdeutlicht.

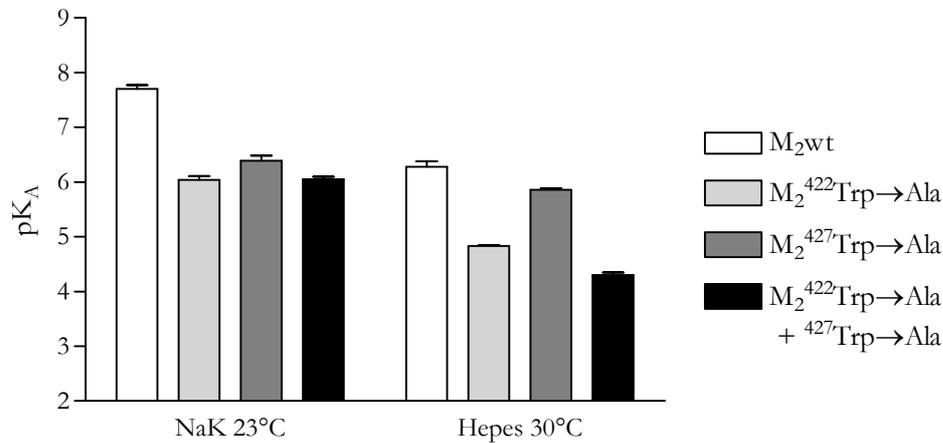


Abbildung 63: pK_A -Werte von Gallamin, die die Affinität des Modulators zu den untersuchten unbesetzten Rezeptoren im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C (NaK 23°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) widerspiegeln. Die dargestellten Affinitätswerte im 5 mM Na, K, P_i -Puffer wurden von Prilla (Prilla, Dissertationsschrift 2006) ermittelt.

Die untersuchten Epitope M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan haben unter beiden betrachteten Inkubationsbedingungen eine Bedeutung für die Basisaffinität von Gallamin. Die Relevanz der Aminosäure M_2^{422} Tryptophan scheint durch die verschiedenen Pufferbedingungen nicht beeinflusst zu werden, dagegen besitzt die Aminosäure M_2^{427} Tryptophan unterschiedlich starke Bedeutung für die Basisaffinität von Gallamin zum unbesetzten M_2 -Rezeptor in verschiedenen Puffermedien. Im 5 mM Na, K, P_i -Puffer zeigt sich beim Austausch dieses Epitopes ein Affinitätsabfall von 1,31 dekadischen Einheiten, im 10 mM Hepes-Puffer nur ein Abfall von 0,42 Einheiten. Die Anwesenheit höherer Ionenkonzentrationen scheint also zu einer Verminderung der Interaktion von Gallamin mit dieser Aminosäure am freien Rezeptorprotein zu führen. Wie schon am besetzten Rezeptor beobachtet, scheinen veränderte Inkubationsbedingungen die Interaktion von Gallamin mit diesem Epitop zu beeinflussen. Sowohl am besetzten als auch am unbesetzten Rezeptor scheint sich unter den physiologischeren Inkubationsbedingungen des 10 mM Hepes-Puffers der „Störfaktor“ des Inkubationsmediums für die Interaktion mit von Gallamin mit M_2^{427} Tryptophan zu erhöhen: am NMS-besetzten Rezeptor wird aus einer fehlenden Bedeutung im 5 mM Na, K, P_i -Puffer eine störende Wirkung, am freien Rezeptor nimmt die Bedeutung dieses Epitopes ab.

Bis auf M₂⁴²³Threonin behalten alle untersuchten Epitope unter physiologischeren Inkubationsbedingungen Relevanz für die Bindung von Gallamin. Am NMS-besetzten Rezeptor kommt es bei physiologischeren Bedingungen zu einem Bedeutungsverlust von M₂⁴²³Threonin, am unbesetzten Rezeptor besitzt dieses Epitop kaum Relevanz für die Interaktion von Gallamin mit dem freien Rezeptor. Sowohl am NMS-besetzten als auch am unbesetzten Rezeptor führen physiologischere Bedingungen zu einer größeren Bedeutung von M₂¹⁷⁷Tyrosin. Der Beitrag des Epitopes M₂⁴²²Tryptophan zur Basisaffinität von Gallamin bleibt in allen untersuchten Puffermedien erhalten, während das für die Interaktion mit dem NMS-besetzten Rezeptor bedeutungslose M₂⁴²⁷Tryptophan am unbesetzten Rezeptor bei den physiologischeren Bedingungen des HEPES-Puffers eine geringere Relevanz hat als im Na, K, P_i-Puffer.

IV.3.3 Alcuronium

Allgemeine Beobachtungen zur Epitopabhängigkeit von Alcuronium

Alcuronium wird in seiner Wirkung an NMS-besetzten M₂-Rezeptoren nur geringfügig durch einen Wechsel der Inkubationsbedingungen beeinflusst (Tränkle et al., 1996). Die M₂/M₅-Subtypselektivität an NMS-besetzten Rezeptoren wird im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C unter anderem durch die Epitope M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin vermittelt, wobei noch weitere Epitope beteiligt sind (Prilla, Dissertationsschrift 2006). In Untersuchungen im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C am Brandel-Harvester an chimären Muskarinrezeptoren, die Anteile des M₂- und des M₅-Rezeptors enthielten, konnten Buller und Dittmann (Buller et al., 2002; Dittmann, Dissertationsschrift 2004) am NMS-besetzten chimären Rezeptor CR6, der die Aminosäuren 1-69 und 339-466 aus dem M₂-Rezeptor und die Aminosäuresequenz 77-445 aus dem M₅-Rezeptor enthält, eine Affinität von Alcuronium beobachten, die nahe an der Affinität zum NMS-besetzten M₅-Rezeptor liegt. Dies bedeutet, dass wahrscheinlich neben dem Epitop M₂¹⁷⁷Tyrosin weitere Epitope aus den Bereichen der 2. und 3. extrazellulären Schleife für die M₂/M₅-Subtypselektivität dieses Modulators verantwortlich sind. Es gibt Anhaltspunkte aus Studien mit M₂/M₃-chimären Rezeptoren, die darauf hindeuten, dass dem Epitop M₂⁴¹⁹Asparagin eine Relevanz für die Affinität von Alcuronium zu NMS-besetzten M₂-Rezeptoren zukommt (Krejčí und Tuček, 2001), darauf weisen auch QSAR-Studien zur Interaktion von Alcuronium mit dem M₂-Rezeptor hin (Jöhren, Dissertationsschrift 2003).

Für die Basisaffinität von Alcuronium zu NMS-besetzten Rezeptoren ist die Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan von Bedeutung, während die Aminosäure M₂⁴²⁷Tryptophan eher einen

störenden Einfluss auf die Interaktion des Modulators mit dem Rezeptorprotein besitzt (Prilla, Dissertationsschrift 2006).

Zur Bedeutung der Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin für die Affinität von Alcuronium zu freien Rezeptoren gibt es nur wenige Hinweise in der verfügbaren Literatur. Studien von Krejčí und Tuček (2001) konnten zeigen, dass bei Einführung von Teilen des M_2 -Rezeptors in den M_3 -Rezeptor die Affinität von Alcuronium zu den entsprechenden unbesetzten Rezeptorproteinen relativ zum M_3 -Rezeptor gesehen gesteigert werden konnte. Affinitätssteigerungen konnten bei der Einführung der gesamten zweiten extrazellulären Schleife sowie bei der Einführung der Aminosäure M_2^{419} Asparagin in den M_3 -Rezeptor beobachtet werden.

Auf die Rolle einzelner Epitope für das positiv kooperative Verhalten von Alcuronium mit dem orthosterischen Liganden N-Methylscopolamin wird in einem separaten Kapitel dieser der Arbeit eingegangen (siehe IV.5).

IV.3.3.1 Epitopabhängigkeit am NMS-besetzten Rezeptor

M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin

Es soll zunächst die Rolle der Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin für die Epitopabhängigkeit der M_2/M_5 -Subtypselektivität von Alcuronium an NMS-besetzten Rezeptoren unter verschiedenen Inkubationsbedingungen erörtert werden. Zur Veranschaulichung der Bedeutung dieser Aminosäuren dient das Balkendiagramm in Abbildung 64.

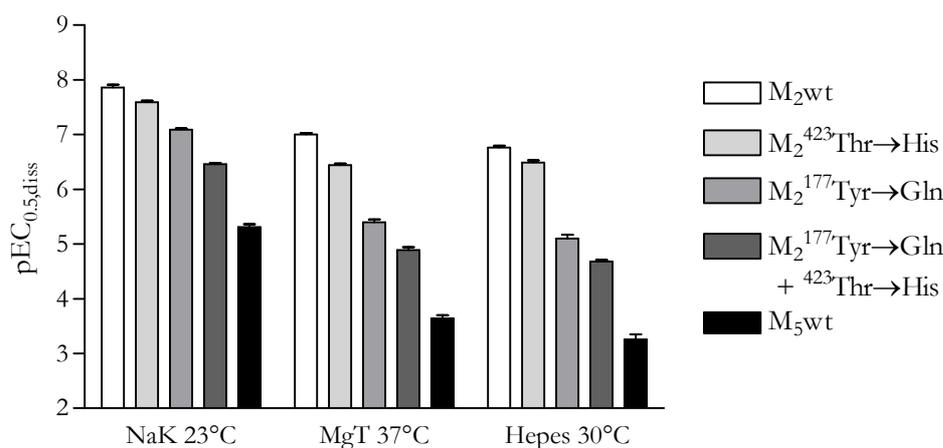


Abbildung 64: $pEC_{0.5,diss}$ -Werte von Alcuronium, welche die Affinität des Modulators zu den untersuchten NMS-besetzten Rezeptoren im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C (NaK 23°C), im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C (MgT 37°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) widerspiegeln.

Aus Abbildung 64 ist ersichtlich, dass der Wechsel der Inkubationsbedingungen nur zu relativ geringen Affinitätsänderungen am M_2 -Rezeptor führt. Dies bestätigt die bisherigen Befunde, die Alcuronium als wenig pufferabhängige Substanz einstufen (Tränkle et al., 1996; Schröter et al., 2000). Auffallend ist jedoch, dass es hingegen am NMS-besetzten M_5 -Rezeptor zu einem stärkeren Affinitätsabfall kommt, auch an den Rezeptormutanten M_2^{177} Tyrosin→Glutamin, sowie M_2^{177} Tyrosin→Glutamin + 423 Threonin→Histidin lässt sich dies feststellen. Die geringe Beeinflussbarkeit der Affinität von Alcuronium durch verschiedene Inkubationsbedingungen bezieht sich also lediglich auf den M_2 -Rezeptor, am M_5 -Rezeptor ist die Pufferabhängigkeit anders ausgeprägt. Es ist zu beachten, dass dieses Phänomen auch zu einer größeren M_2/M_5 -Subtypselektivität von Alcuronium im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer oder im 10 mM Hepes-Puffer im Vergleich mit dem 5 mM Na, K, P_i -Puffer führt. Die erhöhte M_2/M_5 -Subtypselektivität unter Inkubationsbedingungen mit höheren Ionenkonzentrationen lässt sich rein rechnerisch mit der gestiegenen Bedeutung des Epitopes M_2^{177} Tyrosin begründen. Betrag der beobachtete Affinitätsabfall beim Austausch dieser Aminosäure in der Mutante M_2^{177} Tyrosin→Glutamin im Vergleich mit dem M_2 -Rezeptor im 5 mM Na, K, P_i -Puffer 0,77 logarithmische Einheiten, so findet sich im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer eine Affinitätsdifferenz von 1,60 und im 10 mM Hepes-Puffer von 1,66 logarithmischen Einheiten. Ein Vergleich der Affinitätsdifferenzen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen ergibt also, dass beim Austausch des Epitopes M_2^{177} Tyrosin im Vergleich mit dem 5 mM Na, K, P_i -Puffer im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer ein um 0,83 log-Einheiten höhere und im 10 mM Hepes-Puffer ein um 0,89 log-Einheiten höherer Affinitätsabfall zu beobachten ist. Das Ausmaß der Affinitätsdifferenz zwischen dem M_2 - und dem M_5 -Rezeptor beträgt im 5 mM Na, K, P_i -Puffer 2,55 log-Einheiten, im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer sind es 3,64 und 10 mM Hepes-Puffer 3,50 log-Einheiten. Die M_2/M_5 -Subtypselektivität nimmt im Vergleich mit dem 5 mM Na, K, P_i -Puffer im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer um 1,09 log-Einheiten und im 10 mM Hepes-Puffer um 0,95 log-Einheiten zu. Die Zunahme der M_2/M_5 -Subtypselektivität unter physiologischeren Inkubationsbedingungen verläuft also parallel zur gesteigerten Ausnutzung des Epitopes M_2^{177} Tyrosin durch Alcuronium. Eine Bedeutungszunahme in diesem Ausmaß lässt sich nicht am Epitop M_2^{423} Threonin beobachten.

Die relative Bedeutung der untersuchten Epitope für die M_2/M_5 -Subtypselektivität in verschiedenen Inkubationsmedien wird in Tabelle 72 verdeutlicht.

Rezeptor	$\Delta_{rel.} M_2/M_5$ (pEC _{0.5,diss}) (M_2-M_x/M_2-M_5) [%]		
	5 mM Na, K, P _i - Puffer, 23°C	3/50 mM Mg-Tris- Puffer, 37°C	10 mM Hepes- Puffer, 30°C
M ₂ wt	0	0	0
M ₂ ^{423r1} Thr→His	11	17	8
M ₂ ^{177r1} Tyr→Gln	30	48	47
M ₂ ^{177r1} Tyr→Gln + ^{423r1} Thr→His	55	63	59
M ₅ wt	100	100	100

Tabelle 72: Relative Bedeutung der aufgeführten Aminosäuren für die M₂/M₅-Subtypselektivität von Alcuronium an NMS-besetzten Rezeptoren unter den Bedingungen des 5 mM Na, K, P_i-Puffers bei 23°C, des 3/50 mM Mg-Tris-Puffers bei 37°C und des 10 mM Hepes-Puffers bei 30°C.

Die Bedeutung des Epitopes M₂^{423r1}Threonin bleibt auch beim Wechsel der Inkubationsbedingungen weiterhin bestehen, dieses Phänomen war bei W84 und Gallamin nicht beobachtbar. Nähere Untersuchungen der Relevanz der durch die Mutation M₂^{423r1}Threonin→Histidin eingeführten Aminosäure Histidin im 10 mM Hepes-Puffer zeigten in dieser Arbeit, dass es sich beim beobachteten Affinitätsabfall nicht um eine Störwirkung des eingeführten Histidins handelt. Alcuronium interagiert also mit dem Epitop M₂^{423r1}Threonin direkt. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass dies im 5 mM Na, K, P_i-Puffer auch zu beobachten ist, da der Affinitätsabfall durch den Austausch der Aminosäure M₂^{423r1}Threonin→Histidin unter diesen Bedingungen genauso groß ist wie im 10 mM Hepes-Puffer. Ob eine Bedeutungsabnahme des Epitopes M₂^{423r1}Threonin beim Wechsel der Inkubationsbedingungen nur bei solchen Modulatoren beobachtbar ist, bei denen der Affinitätsabfall bei Mutation der Aminosäure M₂^{423r1}Threonin→Histidin nur auf einer störenden Wirkung des Histidins für die Interaktion mit dem Rezeptor beruht, könnten Untersuchungen der Relevanz dieses Epitopes für Gallamin geben. Damit ließe sich die veränderte Epitopabhängigkeit eines Modulators an der Bindungsstelle M₂^{423r1}Threonin unter physiologischeren Inkubationsbedingungen als Indikator für eine störende Wirkung der Aminosäure Histidin für die Interaktion dieses Modulators mit dem Rezeptor sehen.

M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan

Die Rolle der beiden Epitope M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan für die Basisaffinität von Alcuronium zum NMS-besetzten Rezeptor unter verschiedenen Inkubationsbedingungen wird durch die Balkendiagramme in Abbildung 65 veranschaulicht.

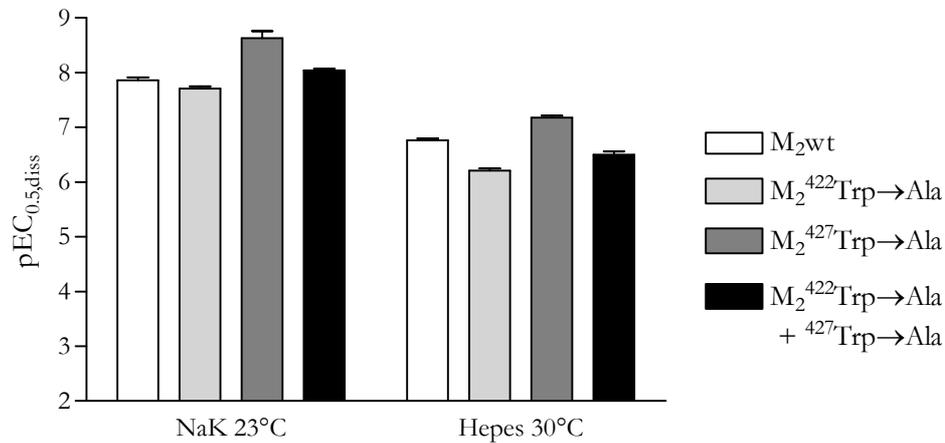


Abbildung 65: $pEC_{0.5,diss}$ -Werte von Alcuronium, welche die Affinität des Modulators zu den untersuchten NMS-besetzten Rezeptoren im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C (NaK 23°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) widerspiegeln.

Die Änderung der Inkubationsbedingungen führt zu leichten Änderungen der Bedeutung der Aminosäuren M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan am NMS-besetzten Rezeptor. Während das Epitop M_2^{422} Tryptophan im 5 mM Na, K, P_i -Puffer keine Relevanz für die Interaktion von Alcuronium mit dem Rezeptor zu haben scheint, kommt es im 10 mM Hepes-Puffer beim Austausch dieser Aminosäure zu einem leichten Affinitätsabfall. Die Aminosäure M_2^{427} Tryptophan scheint unter beiden untersuchten Inkubationsbedingungen eine störende Wirkung für die Bindung von Alcuronium an den Rezeptor zu haben, diese ist jedoch unter den Bedingungen des 10 mM Hepes-Puffers etwas geringer ausgeprägt. Die beiden Epitope scheinen also im 10 mM Hepes-Puffer - wenn überhaupt - lediglich geringfügig anders genutzt zu werden als unter den Bedingungen des 5 mM Na, K, P_i -Puffers.

IV.3.3.2 Epitopabhängigkeit am unbesetzten Rezeptor

M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin

Die Bedeutung der Epitope M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin für die M_2/M_5 -Subtypselektivität von Alcuronium am freien Rezeptorprotein unter den untersuchten Inkubationsbedingungen wird in Abbildung 66 dargestellt.

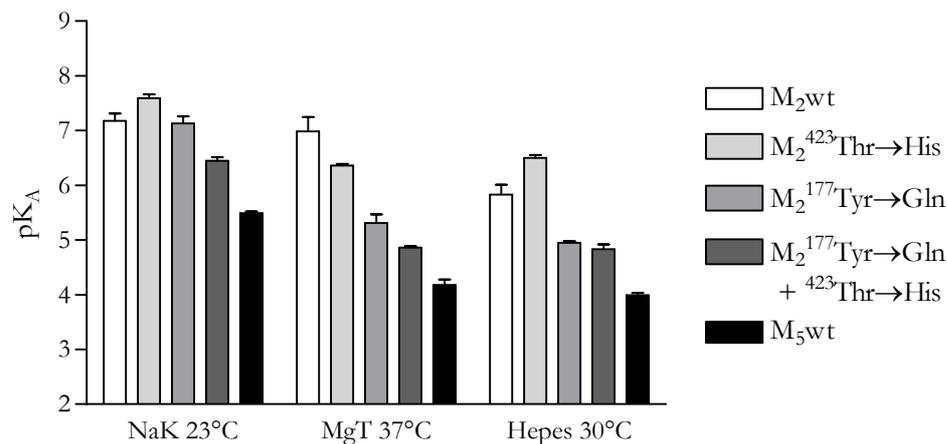


Abbildung 66: p_{K_A}-Werte von Alcuronium, welche ein Maß für die Affinität des Modulators zu den untersuchten unbesetzten Rezeptoren im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C (NaK 23°C), im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C (MgT 37°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) darstellen.

Bei Betrachtung der Balkendiagramme in Abbildung 66 scheint es bei reiner Betrachtung der Bedeutung des Epitopes M_2^{177} Tyrosin durch den Wechsel der Inkubationsbedingungen zu einer veränderten Bedeutung dieser Aminosäure für die Bindung von Alcuronium an den unbesetzten Rezeptor zu kommen. Jedoch war die Ermittlung des p_{K_A}-Wertes an der Rezeptormutante M_2^{177} Tyrosin→Glutamin im 5 mM Na, K, P_i-Puffer mit experimentellen Schwierigkeiten verbunden (siehe auch III.3.1.3.1), daher kann keine Aussage über die Bedeutung dieses Wertes gemacht werden. Eine Bedeutung des Epitopes M_2^{177} Tyrosin→Glutamin für die Affinität von Alcuronium am freien Rezeptor zeigt sich im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer und im 10 mM Hepes-Puffer.

Die Bedeutung der einzelnen Epitope für die M_2/M_5 -Subtypselektivität von Alcuronium am unbesetzten Rezeptor unter den untersuchten Inkubationsbedingungen wird in Tabelle 73 veranschaulicht.

Rezeptor	$\Delta_{\text{rel.}} M_2/M_5$ (pK _A) (M_2-M_x/M_2-M_5) [%]		
	5 mM Na, K, P _i - Puffer, 23°C	3/50 mM Mg-Tris- Puffer, 37°C	10 mM Hepes- Puffer, 30°C
M ₂ wt	0	0	0
M ₂ ⁴²³ Thr→His	-24	22	-36
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	3	60	48
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	43	76	54
M ₅ wt	100	100	100

Tabelle 73: Relative Bedeutung der aufgeführten Aminosäuren für die M₂/M₅-Subtypselektivität von Alcuronium an unbesetzten Rezeptoren unter den Bedingungen des 5 mM Na, K, P_i-Puffers bei 23°C, des 3/50 mM Mg-Tris-Puffers bei 37°C und des 10 mM Hepes-Puffers bei 30°C.

Die Bedeutung des Epitopes M₂⁴²³Threonin ist unter allen drei untersuchten Bedingungen gering. Im Mg-Tris-Puffer führt der Austausch dieses Epitopes zu keinem signifikanten Affinitätsabfall im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor (siehe III.3.1.3.2), während sich beim Austausch dieses Epitopes unter den anderen betrachteten Inkubationsbedingungen eine signifikante Affinitätszunahme beobachten lässt. Die Aminosäure M₂⁴²³Threonin leistet also für die Affinität von Alcuronium unter allen drei untersuchten Inkubationsbedingungen keinen oder einen negativen Beitrag. Dabei wird die störende Wirkung durch die Aminosäure Threonin selbst und nicht durch das eingeführte Histidin verursacht, wie Untersuchungen an der Rezeptormutante M₂⁴²³Threonin→Alanin ergaben. Es ergibt sich keine wesentliche Änderung der Bedeutung des Epitopes M₂⁴²³Threonin beim Wechsel der Inkubationsbedingungen.

M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan

Die Bedeutung der Aminosäuren M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan für die Basisaffinität von Alcuronium zum unbesetzten Rezeptor unter den untersuchten Inkubationsbedingungen wird in Abbildung 67 verdeutlicht.

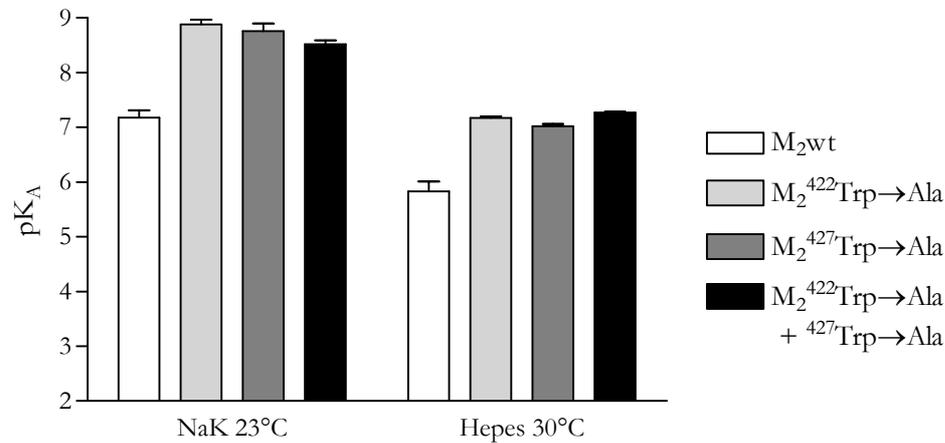


Abbildung 67: pK_A -Werte von Alcuronium, welche die Affinität des Modulators zu den untersuchten unbesetzten Rezeptoren im 5 mM Na, K, P_i -Puffer bei 23°C (NaK 23°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) widerspiegeln.

Aus Abbildung 67 geht hervor, dass die beiden Aminosäuren M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan unter den beiden untersuchten Inkubationsbedingungen einen störenden Einfluss auf die Interaktion von Alcuronium mit dem unbesetzten Rezeptor haben. In beiden Inkubationsmedien verhält sich dieser störende Anteil nicht additiv, die Interaktion von Alcuronium mit diesen beiden Aminosäuren findet also nicht unabhängig von den einzelnen Aminosäuren statt. Unter den Bedingungen des 10 mM Hepes-Puffers ist die störende Wirkung etwas geringer ausgeprägt als unter den Bedingungen des 5 mM Na, K, P_i -Puffers. Wechselnde Inkubationsmedien haben keinen Einfluss auf die beobachtete Störwirkung der entsprechenden Aminosäuren und beeinflussen somit nicht die Bedeutung dieser beiden Aminosäuren für die Basisaffinität von Alcuronium zu unbesetzten Rezeptoren.

Die Epitopabhängigkeit von Alcuronium bleibt beim Wechsel zu physiologischeren Inkubationsbedingungen sowohl am NMS-besetzten als auch am unbesetzten Rezeptor erhalten. Sowohl am besetzten als auch am unbesetzten Rezeptor kommt es zu einer großen Steigerung der Bedeutung von M_2^{177} Tyrosin, die vor allem am NMS-besetzten Rezeptor mit einer Vergrößerung der M_2/M_5 -Subtypselektivität beim Wechsel zum Hepes-Puffer einhergeht. Die Bedeutung der Epitope M_2^{422} Tryptophan und M_2^{427} Tryptophan bleibt beim Wechsel der

Inkubationsmedien bestehen, dies gilt auch für den störenden Einfluss dieser beider Aminosäuren für die Interaktion von Alcuronium mit dem unbesetzten Rezeptorprotein.

IV.3.4 Diallylcaracurin V

Die Untersuchungen zur Epitopabhängigkeit der M_2/M_5 -Subtypselektivität an NMS-besetzten Rezeptoren bei den Modulatoren W84, Gallamin und Alcuronium verdeutlichten, dass die Wirksamkeit des stark pufferabhängigen Modulators Gallamin im 5 mM Na, K, P_i -Puffer eine große Beeinflussbarkeit durch den Austausch der Aminosäure M_2^{423} Threonin→Histidin zeigte, während dies beim wenig pufferabhängigen Modulator Alcuronium nicht der Fall war. Daher wurden zwei weitere allosterische Modulatoren auf die Abhängigkeit ihrer M_2/M_5 -Subtypselektivität von den Epitopen M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin hin untersucht: Diallylcaracurin V und CARBEM. Bei diesen Modulatoren handelte es sich um Caracurinderivate, von denen der Modulator Diallylcaracurin V eine Abhängigkeit seiner dissoziationsverzögernden Wirkung von der Aminosäure M_2^{423} Threonin zeigt, während bei CARBEM durch den Austausch dieser Aminosäure keine Affinitätsänderung zum NMS-besetzten Rezeptorprotein feststellbar war (Buller, Dissertationsschrift 2002; Voigtländer et al., 2003). Der Vergleich der Pufferabhängigkeit dieser Substanzen und der Abhängigkeit ihrer Affinität von der Aminosäure M_2^{423} Threonin sollte Aufschluß darüber geben, ob das Ausmaß der Pufferabhängigkeit einer Substanz mit ihrer "Threonin-Abhängigkeit" korreliert.

Diallylcaracurin V zeigt ebenso wie W84 eine vollständige Abhängigkeit seiner M_2/M_5 -Subtypselektivität am NMS-besetzten Rezeptor von den beiden Epitopen M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin (Voigtländer et al., 2003; Prilla et al., 2006). Im Gegensatz zu W84 beruht jedoch der im 5 mM Na, K, P_i -Puffer beobachtete Affinitätsabfall beim Austausch der Aminosäure M_2^{423} Threonin→Histidin nicht auf einer störenden Wirkung des eingeführten Histidins (Prilla et al., 2006). Die Abhängigkeit der M_2/M_5 -Subtypselektivität von Diallylcaracurin V an NMS-besetzten Rezeptoren von den beiden Aminosäuren M_2^{177} Tyrosin und M_2^{423} Threonin wurde lediglich unter den Bedingungen des 5 mM Na, K, P_i -Puffers und im 10 mM Hepes-Puffer überprüft. Da die Änderungen der dissoziationsverzögernden Wirksamkeiten der drei Modulatoren W84, Gallamin und Alcuronium beim Wechsel vom 3/50 mM Mg-Tris-Puffer zum 10 mM Hepes-Puffer jeweils sehr gering ausfielen, wurde auf Untersuchungen im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer verzichtet, da dieses mit großer Wahrscheinlichkeit keine zusätzlichen Erkenntnisse geliefert hätte. Die Epitopabhängigkeit von Diallylcaracurin V an

NMS-besetzten Rezeptoren unter den beiden untersuchten Inkubationsbedingungen wird in den Balkendiagrammen in Abbildung 68 dargestellt.

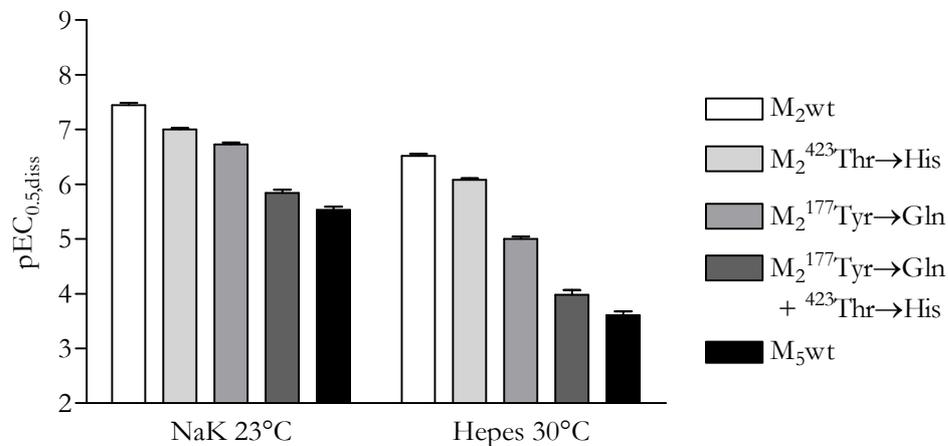


Abbildung 68: pEC_{0.5,diss}-Werte von Diallylcaracurin V, welche die Affinität des Modulators zu den untersuchten NMS-besetzten Rezeptoren im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C (NaK 23°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) widerspiegeln.

Aus Abbildung 68 ist ersichtlich, dass es durch den Wechsel der Inkubationsbedingungen zu einem Abfall der Wirksamkeit von Diallylcaracurin V an allen untersuchten Rezeptorproteinen kommt. Dabei ist der Affinitätsabfall relativ gesehen zum M₂-Rezeptor bei Austausch der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin im 10 mM Hepes-Puffer mit 1,52 log-Einheiten um 0,81 log-Einheiten größer als im 5 mM Na, K, P_i-Puffer mit 0,71 log-Einheiten. Das Ausmaß der M₂/M₅-Subtypselektivität von Diallylcaracurin V am NMS-besetzten Rezeptor nimmt beim Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i-Puffer zum 10 mM Hepes-Puffer von 1,91 auf 2,91 log-Einheiten um 1,00 log-Einheiten zu. Das höhere Ausmaß der M₂/M₅-Subtypselektivität scheint sich hier - wie auch schon bei Alcuronium beobachtet - fast allein durch die gesteigerte Bedeutung des Epitopes M₂¹⁷⁷Tyrosin zu ergeben. Die Bedeutung des Epitopes M₂⁴²³Threonin bleibt beim Wechsel der Inkubationsbedingungen hingegen bestehen. Der relative Anteil der beiden Aminosäuren an der M₂/M₅-Subtypselektivität am NMS-besetzten Rezeptor in den untersuchten Inkubationsmedien wird in Tabelle 74 dargestellt.

Rezeptor	$\Delta_{\text{rel. M}_2/\text{M}_5} (\text{pEC}_{0.5,\text{diss}})$ (M ₂ -M _x /M ₂ -M ₅) [%]	
	5 mM Na, K, P _i -Puffer, 23°C	10 mM Hepes-Puffer, 30°C
M ₂ wt	0	0
M ₂ ⁴²³ Thr→His	23	15
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	37	52
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	84	87
M ₅ wt	100	100

Tabelle 74: Relative Bedeutung der aufgeführten Aminosäuren für die M₂/M₅-Subtypselektivität von Diallylcaracurin V an NMS-besetzten Rezeptoren unter den Bedingungen des 5 mM Na, K, P_i-Puffers bei 23°C und des 10 mM Hepes-Puffers bei 30°C.

Aus Tabelle 74 ist ersichtlich, dass die Bedeutung des Epitopes M_2^{177} Tyrosin für die M_2/M_5 -Subtypselektivität von Diallylcaracurin V am NMS-besetzten Rezeptor beim Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i -Puffer zum 10 mM Hepes-Puffer zunimmt. Für das Epitop M_2^{423} Threonin kommt es bei der Betrachtung der relativen prozentualen Anteile wie in Tabelle 74 zu einem scheinbaren Bedeutungsverlust. Jedoch ist der absolute Affinitätsabfall beim Austausch der Aminosäure M_2^{423} Threonin→Histidin unter beiden Inkubationsbedingungen gleich groß. Die Abnahme der relativen Bedeutung dieses Epitopes ist Folge des erhöhten Ausmaßes der M_2/M_5 -Subtypselektivität von Diallylcaracurin V unter den Bedingungen des 10 mM Hepes-Puffers. Auffallend ist, dass bei Diallylcaracurin V der Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i -Puffer zum 10 mM Hepes-Puffer im Gegensatz zu den Modulatoren W84 und Gallamin nicht zu einer veränderten Relevanz des Epitopes M_2^{423} Threonin führt. Bei der Wechselwirkung von Diallylcaracurin V mit dieser Aminosäure handelt es sich um eine direkte Interaktion mit der Aminosäure Threonin (Prilla et al., 2006). In diesem Fall scheint sich also unter den physiologischeren Inkubationsbedingungen keine veränderte Bedeutung dieses Epitopes zu ergeben. Es ließe sich somit postulieren, dass sich die bei W84 und Gallamin im Vergleich mit dem 5 mM Na, K, P_i -Puffer beobachtete Änderung der Bedeutung dieses Epitopes im 10 mM Hepes-Puffer auf eine modifizierte Störwirkung der Aminosäure Histidin für die Bindung dieser Substanzen zurückführen lässt. Handelt es sich hingegen bei der Interaktion eines allosterischen Modulators mit diesem Epitop um eine direkte Wechselwirkung wie bei Alcuronium oder Diallylcaracurin V, so scheint diese Bedeutung nicht durch eine Änderung der Inkubationsbedingungen beeinflusst zu werden.

IV.3.5 CARBEM

CARBEM unterscheidet sich von Diallylcaracurin V in struktureller Hinsicht durch die Einführung eines voluminösen Dimethoxybenzyl-Restes an Stelle des Diallyl-Restes in das Caracurin V-Grundgerüst (Zlotos et al., 2000). Als Modulator, der im Na, K, P_i-Puffer keine Abhängigkeit seiner M₂/M₅-Subtypselektivität vom Epitop M₂⁴²³Threonin zeigt, sollte geklärt werden, ob CARBEM auch in Korrelation dazu eine verminderte Beeinflussbarkeit in seiner Wirksamkeit durch verschiedene Inkubationsmedien zeigt. In Abbildung 69 sind die Affinitätsmuster von CARBEM unter den untersuchten Inkubationsbedingungen in Balkendiagrammen dargestellt.

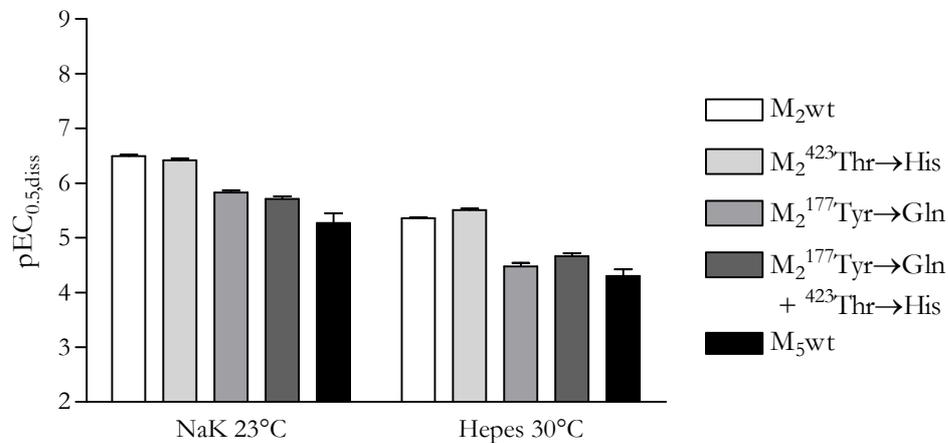


Abbildung 69: pEC_{0.5,diss}-Werte von CARBEM, welche die Affinität des Modulators zu den untersuchten NMS-besetzten Rezeptoren im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C (NaK 23°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) widerspiegeln.

Aus Abbildung 69 ist ersichtlich, dass es beim Wechsel der Inkubationsbedingungen zu einem leichten Affinitätsabfall von CARBEM an allen untersuchten Rezeptorproteinen kommt. Das Bild der Epitopabhängigkeit bleibt beim Wechsel des Puffermediums erhalten, allerdings spielt die Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin insgesamt eine größere Rolle für die M₂/M₅-Subtypselektivität des Modulators. Dies wird in Tabelle 75 deutlich, die die relative Bedeutung der einzelnen Epitope für die M₂/M₅-Subtypselektivität in den untersuchten Inkubationsmedien auflistet.

Rezeptor	$\Delta_{\text{rel.}} M_2/M_5$ (pEC _{0.5,diss}) (M_2-M_x/M_2-M_5) [%]	
	5 mM Na, K, P _i -Puffer, 23°C	10 mM Hepes-Puffer, 30°C
M ₂ wt	0	0
M ₂ ^{423r} Thr→His	7	-13
M ₂ ^{177r} Tyr→Gln	54	84
M ₂ ^{177r} Tyr→Gln + ^{423r} Thr→His	64	67
M ₅ wt	100	100

Tabelle 75: Relative Bedeutung der aufgeführten Aminosäuren für die M₂/M₅-Subtypselektivität von CARBEM an NMS-besetzten Rezeptoren unter den Bedingungen des 5 mM Na, K, P_i-Puffers bei 23°C und des 10 mM Hepes-Puffers bei 30°C.

Die gestiegene Bedeutung des Epitopes M₂^{177r}Tyrosin liegt einerseits an dem etwas größeren Beitrag zur Bindung des Modulators, das heißt, der Affinitätsabfall beim Austausch dieses Epitopes ist im 10 mM Hepes-Puffer etwas stärker ausgeprägt als im 5 mM Na, K, P_i-Puffer, andererseits wird das Ausmaß der M₂/M₅-Subtypselektivität selbst beim Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i-Puffer zum 10 mM Hepes-Puffer etwas geringer. Die M₂/M₅-Subtypselektivität scheint unter den Bedingungen des 10 mM Hepes-Puffers fast vollständig durch die Aminosäure M₂^{177r}Tyrosin vermittelt zu werden.

Die beim Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i-Puffer zum 10 mM Hepes-Puffer am M₂-Rezeptor beobachtete Wirksamkeitsverschiebung ist mit 1,36 log-Einheiten noch stärker ausgeprägt als die Puffer-Abhängigkeit von Diallylcaracurin V, obwohl dieses eine deutliche Abhängigkeit von der Aminosäure M₂^{423r}Threonin zeigt. Beim Vergleich dieser beiden Substanzen scheint sich keine Bestätigung der Annahme zu finden, dass das Ausmaß des Wirksamkeitsabfalls beim Austausch der Aminosäure M₂^{423r}Threonin mit der Pufferabhängigkeit eines Modulators korreliert.

CARBEM zeigt in seinem Verhalten Ähnlichkeit mit sogenannten atypischen allosterischen Modulatoren. So sind die Konzentrations-Effekt-Kurven der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit auffallend steil mit Hill-Koeffizienten, die signifikant größer sind als der Wert -1. Weiterhin lässt sich eine geringe Pufferabhängigkeit der Wirksamkeit von CARBEM beobachten, wie es auch schon für den atypischen allosterischen Modulator Duo3 festgestellt werden konnte (Schröter et al., 2000). Wie Duo3 weist CARBEM auch ein sehr geringes Ausmaß der M₂/M₅-Subtypselektivität auf. Für Duo3 liegt die von Tränkle et al. (2005) im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C beobachtete Differenz der Wirksamkeiten am M₂- und am M₅-Rezeptor bei 1,16 log-Einheiten, für CARBEM findet sich unter den gleichen Bedingungen eine Differenz von 1,36 log-Einheiten. Duo3 zeigt ebenso wie CARBEM keine Abhängigkeit der M₂/M₅-Subtypselektivität vom Epitop M₂^{423r}Threonin (Tränkle et al., 2005). Bei CARBEM scheint es sich also wie bei der Substanz Duo3 um einen atypischen allosterischen Modulator zu handeln. Atypische allosterische Modulatoren scheinen in ihrer M₂/M₅-Subtypselektivität nicht

stark vom Epitop M₂⁴²³Threonin abhängig zu sein. Dieses Phänomen korreliert mit einer geringen Beeinflussbarkeit der Wirksamkeit der atypischen Modulatoren durch unterschiedliche Inkubationsbedingungen. Dies legt nahe, dass der von den atypischen Modulatoren genutzte Raum innerhalb der allosterischen Bindungsstelle nicht so stark durch die Anwesenheit verschiedener Salze beeinflusst wird, wie dies bei den typischen allosterischen Modulatoren W84 oder Gallamin der Fall war. Die im Vergleich mit W84 veränderte Ausnutzung der Bindungstasche durch CARBEM oder Duo3 scheint einherzugehen mit einem Bindungsmodus, der nicht über das Epitop M₂⁴²³Threonin vermittelt wird.

IV.4 EINFLUSS DER INKUBATIONSBEDINGUNGEN AUF DIE KOOPERATIVITÄT ALLOSTERISCHER MODULATOREN

Allgemeine Beobachtungen

Das kooperative Verhalten allosterischer Modulatoren mit einem orthosterischen Liganden an einem Rezeptor wird gekennzeichnet durch die unterschiedliche Bindungsneigung des allosterischen Modulators zum durch einen orthosterischen Liganden besetzten oder unbesetzten Rezeptorzustand. Neben dieser Affinitätsdifferenz, die die Größe des Kooperativitätsfaktors α beeinflusst, zeigt dieser Faktor an, ob durch den allosterischen Modulator in Gleichgewichtsbindungsversuchen eine Erhöhung oder Erniedrigung der Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Modulators erfolgt. Ein positiv kooperativer Modulator hat eine höhere Bindungsneigung zum orthosterisch-besetzten Rezeptor und stabilisiert damit diesen Zustand. Dies führt zu einer Erhöhung der Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Modulators durch Zugabe des allosterischen Modulators. Negativ kooperative Modulatoren haben hingegen eine höhere Bindungsneigung zum unbesetzten Rezeptorzustand als zum orthosterisch-besetzten Rezeptor und erniedrigen dementsprechend konzentrationsabhängig die Gleichgewichtsbindung eines orthosterischen Liganden. Es gibt Anzeichen dafür, dass die unterschiedliche Zusammensetzung eines Inkubationsmediums einen Einfluss auf das Ausmaß des kooperativen Verhaltens eines allosterischen Modulators haben kann. Dong et al. (1995) konnten feststellen, dass die Anwesenheit bestimmter Kationen wie NaCl oder CaCl₂ für ein positiv kooperatives Verhalten des Modulators Alcuronium mit dem orthosterischen Liganden NMS notwendig waren. Bei Versuchen in einem Inkubationsmedium, das nur Hepes-Salz enthielt, beobachteten die Autoren lediglich ein neutral kooperatives Verhalten von Alcuronium mit NMS. Die Effekte der Salze waren auch an solubilisierten Rezeptoren zu beobachten, was auf die Unabhängigkeit dieses Effektes von der G-Protein-Kopplung des Rezeptors hinweist. Weitere Studien von

Schröter et al. (2000) betrafen das Ausmaß der Wirksamkeitsverschiebungen, die ein Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C zum 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C auf die Assoziationsverzögerung und die Dissoziationsverzögerung allosterischer Modulatoren hat. In diesen Versuchen konnten die Autoren für die Substanzen Alcuronium, WDuo3 und Duo3 gleiche Verschiebungen der assoziationsverzögernden und der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit beim Wechsel des Inkubationsmediums beobachten, was bedeutet, dass sich der aus diesen Versuchen berechnete Kooperativitätsfaktor der Substanzen beim Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C zum 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C nicht ändert. Für Gallamin konnte festgestellt werden, dass die Wirksamkeit der Assoziationsverzögerung dieses Modulators stärker beeinflusst wird als die Dissoziationsverzögerung, was eine Erhöhung der negativen Kooperativität von Gallamin unter den Bedingungen des 3/50 mM Mg-Tris-Puffers bei 37°C im Vergleich mit dem 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C zur Folge hatte (Schröter et al., 2000).

Durch die Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, lassen sich die Kooperativitätsfaktoren der untersuchten allosterischen Modulatoren unter drei verschiedenen Inkubationsbedingungen vergleichen. Die Kooperativitätsfaktoren der allosterischen Modulatoren W84, Gallamin und Alcuronium unter verschiedenen Inkubationsbedingungen werden im Folgenden substanzbezogen betrachtet.

IV.4.1 W84

In den folgenden Balkendiagrammen sind die in Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen unter verschiedenen Inkubationsbedingungen ermittelten Kooperativitätsfaktoren von W84 dargestellt.

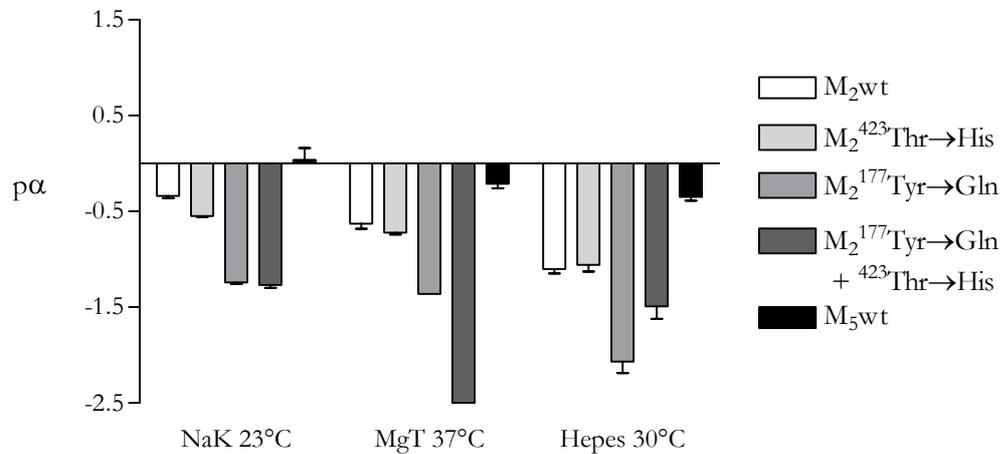


Abbildung 70

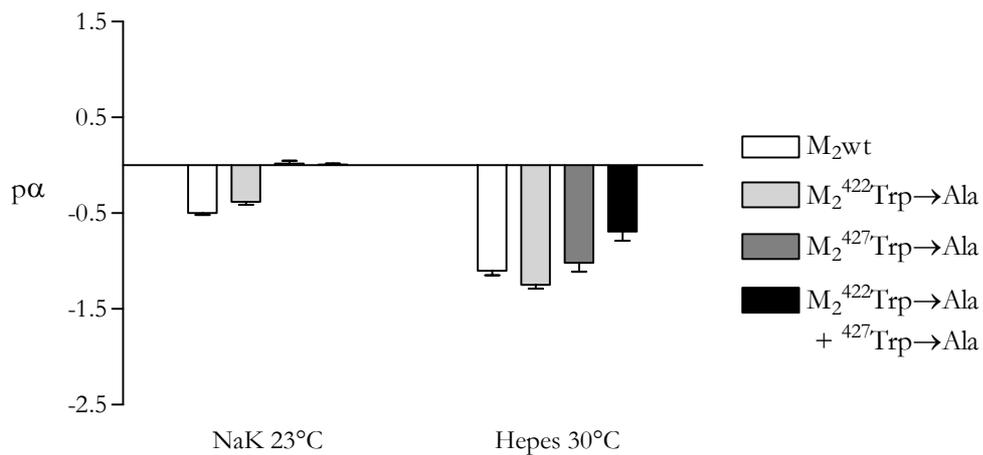


Abbildung 71

Abbildung 70-71: Kooperativitätsfaktoren für die Interaktion von W84 mit N-Methylscopolamin im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C (NaK 23°C), im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C (MgT 37°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) an den angegebenen Rezeptorproteinen. Der Kooperativitätsfaktor ist als negativer dekadischer Logarithmus des Wertes α ($-\log \alpha = p\alpha$) quantifiziert. $p\alpha$ -Werte, die über den Wert von $-2,5$ hinausgehen, sind im Diagramm mit offenem Balken nach unten als Wert von $-2,5$ dargestellt. Die in Abbildung 71 dargestellten Kooperativitätsfaktoren im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C wurden von Prilla ermittelt (Prilla et al., 2006).

Aus den dargestellten $p\alpha$ -Werten geht hervor, dass die negative Kooperativität von W84 an allen untersuchten Rezeptormutanten beim Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i-Puffer zum 3/50 mM Mg-Tris-Puffer und zum 10 mM Hepes-Puffer zunimmt. Dies ist die Folge davon, dass die Affinität von W84 am besetzten und am unbesetzten Rezeptor unterschiedlich stark durch wechselnde Inkubationsbedingungen beeinflusst wird. Dieses unterschiedliche Verhalten wird

durch Tabelle 76 verdeutlicht, die die Wirksamkeitsverschiebungen beim Wechsel der Inkubationsbedingungen darstellt.

Rezeptor	NaK → Hepes		NaK → MgT		MgT → Hepes	
	$\Delta pEC_{0,5,diss}$	ΔpK_A	$\Delta pEC_{0,5,diss}$	ΔpK_A	$\Delta pEC_{0,5,diss}$	ΔpK_A
M ₂ wt	2,00	0,87	1,72	1,49	0,28	-0,62
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	2,22	1,35	1,82	1,91	0,40	-0,56
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	1,98	1,51	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
M ₂ ⁴²³ Thr→His	1,72	0,81	1,80	1,21	-0,08	-0,40
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	1,60	1,84	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	1,73	1,32	1,52	2,56	0,21	-1,24
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	1,97	1,76	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
M ₅ wt	1,85	1,48	1,71	1,49	0,14	-0,01

Tabelle 76: Ausmaß der Wirksamkeitsverschiebungen von W84 an den einzelnen NMS-besetzten ($\Delta pEC_{0,5,diss}$) oder freien (ΔpK_A) Rezeptorproteinen beim Wechsel der Inkubationsbedingungen. NaK steht für 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C, MgT für 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C und die Abkürzung Hepes für die Inkubationsbedingungen des 10 mM Hepes-Puffers mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C. Die Abkürzung n.b. steht für nicht bestimmte Werte.

Es wird deutlich, dass der Wechsel der Inkubationsbedingungen bei nahezu allen untersuchten Rezeptorproteinen am NMS-besetzten Rezeptor zu größeren Wirksamkeitsverlusten führt als am unbesetzten Rezeptor. Während es beim Wechsel vom 3/50 mM Mg-Tris-Puffer zum 10 mM Hepes-Puffer bei den untersuchten Rezeptorproteinen am NMS-besetzten Rezeptor zu einem Abfall der Wirksamkeit kommt, lässt sich am unbesetzten Rezeptor eine Wirksamkeitszunahme beobachten. Dies führt zu einer Zunahme der negativen Kooperativität von W84 im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer und im 10 mM Hepes-Puffer im Vergleich mit dem 5 mM Na, K, P_i-Puffer. Auffallend ist der Einfluss unterschiedlicher Inkubationsbedingungen auf das kooperative Verhalten von W84 mit NMS an der Rezeptormutante M₂⁴²⁷Tryptophan. Im 5 mM Na, K, P_i-Puffer lässt sich hier neutral kooperatives Verhalten beobachten, hingegen führt der Wechsel zum 10 mM Hepes-Puffer zu einem starken Abfall der Affinität am freien Rezeptor, der sogar größer ausfällt als am besetzten Rezeptor und damit zu negativer Kooperativität führt. Die Ermittlung des pK_A-Wertes an dieser Rezeptormutante wurde jedoch dadurch erschwert, dass die zur genaueren Ermittlung des Wertes benötigten einzusetzenden Konzentrationen von W84 zu unpraktikabel langen Inkubationszeiten geführt hätten. Dies wird auch daran deutlich, dass der praktisch ermittelte pEC_{0,5,diss}-Wert bei 5,88 liegt, während sich aus den Daten der Gleichgewichtsexperimente ein Wert von 4,60 errechnet. Die negative Kooperativität an dieser Rezeptormutante könnte durch die experimentellen Schwierigkeiten überschätzt worden sein,

womit sich die Diskrepanz zwischen dem theoretisch aus Daten der Gleichgewichtsbindungsstudien und dem praktisch ermitteltem $pEC_{0.5,diss}$ -Wert erklären ließe. Vermeiden ließen sich lange Inkubationszeiten durch veränderte Versuchsprotokolle und Auswerteverfahren, die unter Ungleichgewichtsbedingungen den Versuch beenden, solche Untersuchungen waren jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Der Wechsel der Inkubationsbedingungen hat - wie aus Tabelle 76 ersichtlich - unterschiedliche Auswirkungen auf NMS-besetzte und unbesetzte Rezeptoren. Wie auch schon die Untersuchungen der Epitopabhängigkeiten ergaben, scheint die allosterische Bindungsstelle am besetzten Rezeptor eine andere Konformation einzunehmen als am unbesetzten Rezeptor. Unterschiedliche Konformationen von NMS-besetzten und freien Rezeptoren bieten wahrscheinlich unterschiedliche Epitope für die Interaktion von Pufferkomponenten, die wiederum Einfluss auf die Bindung der allosterischen Modulatoren haben könnten. Eine Beeinflussung der orthosterischen Bindungsstelle durch den Inkubationspuffer könnte eine Rolle für die Affinität der allosterischen Modulatoren zum freien Rezeptorprotein eine Rolle spielen. Hier wäre eine Beeinflussung der Bindungsstelle M_2^{69} Aspartat durch Natrium-Ionen denkbar. Studien am M_1 -Rezeptor und an anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren weisen darauf hin, dass hier eine Interaktion stattfinden könnte (Horstman et al., 1990; Walbroeck et al., 1997), ebenso wurde eine Interferenz von Pufferkomponenten mit der für die Bindung von N-Methylscopolamin relevanten Aminosäure M_2^{103} Aspartat postuliert (Burgmer et al., 1998).

IV.4.2 Gallamin

Die Untersuchungen von Schröter et al. (2000) wiesen darauf hin, dass die Bindungsneigung dieses Modulators zu NMS-besetzten und unbesetzten Rezeptoren in unterschiedlichem Ausmaß durch einen Wechsel der Inkubationsbedingungen beeinflusst wird. Die in Gleichgewichtsbindungsexperimenten in verschiedenen Inkubationsmedien ermittelten Kooperativitätsfaktoren der Interaktion von Gallamin mit dem orthosterischen Liganden N-Methylscopolamin werden in den folgenden Balkendiagrammen veranschaulicht.

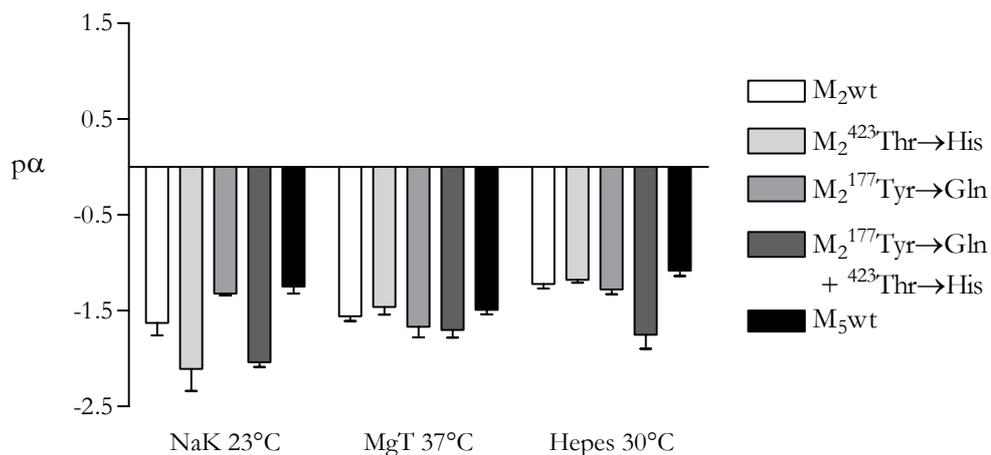


Abbildung 72

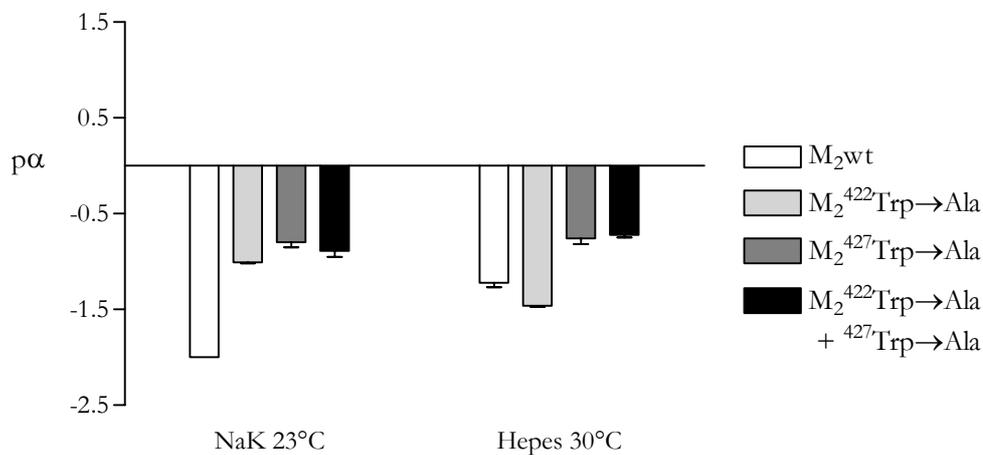


Abbildung 73

Abbildung 72-73: Kooperativitätsfaktoren für die Interaktion von Gallamin mit N-Methylscopolamin im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C (NaK 23°C), im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C (MgT 37°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) an den angegebenen Rezeptorproteinen. Der Kooperativitätsfaktor ist als negativer dekadischer Logarithmus des Wertes α ($-\log \alpha = p\alpha$) quantifiziert. Die in Abbildung 73 dargestellten Kooperativitätsfaktoren der Rezeptormutanten im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C wurden von Prilla ermittelt (Prilla et al., 2006).

Die dargestellten Kooperativitätsfaktoren zeigen, dass Gallamin unter allen untersuchten Inkubationsbedingungen an den jeweiligen Rezeptorproteinen ein ausgeprägt negativ kooperatives Verhalten mit N-Methylscopolamin zeigt. Der Wechsel der

Inkubationsbedingungen führt dabei zu leichten Änderungen des Ausmaßes der negativen Kooperativität. Der Einfluss der Inkubationsbedingungen auf die Wirksamkeitsverschiebungen an den jeweiligen NMS-besetzten und unbesetzten Rezeptormutanten, der ausschlaggebend für das kooperative Verhalten des Modulators ist, wird in Tabelle 77 veranschaulicht.

Rezeptor	NaK → Hepes		NaK → MgT		MgT → Hepes	
	$\Delta pEC_{0,5,diss}$	ΔpK_A	$\Delta pEC_{0,5,diss}$	ΔpK_A	$\Delta pEC_{0,5,diss}$	ΔpK_A
M ₂ wt	2,69	2,55	2,31	2,16	0,38	0,39
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	3,22	0,91	2,83	0,16	0,39	0,75
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	2,84	1,21	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
M ₂ ⁴²³ Thr→His	1,69	2,70	1,80	2,22	-0,11	0,48
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	2,03	0,53	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	1,78	2,94	1,74	2,35	0,04	0,59
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	2,34	1,75	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
M ₅ wt	2,16	2,23	2,10	1,77	0,06	0,46

Tabelle 77: Ausmaß der Wirksamkeitsverschiebungen von Gallamin an den einzelnen NMS-besetzten ($\Delta pEC_{0,5,diss}$) oder freien (ΔpK_A) Rezeptorproteinen beim Wechsel der Inkubationsbedingungen. NaK bezeichnet 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C, MgT steht für 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C und die Abkürzung Hepes steht für die Inkubationsbedingungen des 10 mM Hepes-Puffers mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C. Die Abkürzung n.b. steht für nicht bestimmte Werte.

Die aufgeführten Tabellenwerte vermitteln einen Eindruck der Komplexität der Interaktion des Modulators an besetzten und unbesetzten Rezeptoren und der Beeinflussbarkeit der Wirksamkeit unter wechselnden Inkubationsbedingungen. Während sich am M₂-Wildtyp-Rezeptor ein etwa gleicher Einfluss wechselnder Puffermedien auf besetzten und unbesetzten Rezeptorzustand zeigt, sind die unterschiedlichen Rezeptormutanten in verschiedenem Maße durch die Inkubationsbedingungen beeinflussbar. An der Rezeptormutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin zeigt sich eine sehr starke Beeinflussbarkeit der Wirksamkeit von Gallamin am NMS-besetzten Rezeptor, am freien Rezeptor ist diese nicht so stark ausgeprägt. Dies ist Ausdruck der gestiegenen Relevanz dieses Epitopes für die M₂/M₅-Subtypselektivität von Gallamin am NMS-besetzten Rezeptor unter den Inkubationsbedingungen des 3/50 mM Mg-Tris-Puffers und des 10 mM Hepes-Puffers. Die Wirksamkeit von Gallamin an der Rezeptormutante M₂⁴²³Threonin→Histidin hingegen wird durch wechselnde Inkubationsbedingungen stärker am unbesetzten Rezeptorprotein als am NMS-besetzten Rezeptor beeinflusst. Die Wirksamkeit des Modulators an den Rezeptormutanten M₂⁴²²Tryptophan→Alanin und M₂⁴²⁷Tryptophan→Alanin zeigt durch den Wechsel des Inkubationspuffers am NMS-besetzten Rezeptor größere

Verschiebungen als am unbesetzten Rezeptor. Der Bindungsmodus von Gallamin scheint sich je nach ausgetauschter Aminosäure leicht zu verändern, wahrscheinlich werden beim Austausch einer für die Bindung relevanten Aminosäure andere Epitope stärker genutzt, was dann zu einer veränderten Beeinflussbarkeit der Affinität durch den Wechsel der Inkubationsbedingungen führt. Auch scheint sich Gallamin am NMS-besetzten und am unbesetzten Rezeptor etwas anders in der Bindungstasche zu orientieren. Dies wird deutlich, wenn das unterschiedliche Ausmaß betrachtet wird, das der Wechsel der Inkubationsmedien auf besetzte und unbesetzte Rezeptoren haben kann.

IV.4.3 Alcuronium

Der Einfluss der Inkubationsbedingungen auf die Kooperativität von Alcuronium ist von besonderem Interesse, da dieser Modulator positiv kooperatives Verhalten mit NMS zeigt, also in der Lage ist, die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden NMS am M_2 -Rezeptor zu fördern. Dass die Salzkonzentration des verwendeten Inkubationspuffers einen Einfluss auf das Ausmaß des positiv kooperativen Verhaltens haben kann, zeigten Dong et al. (1995) in ihren Versuchen. In diesen teilweise unter Ungleichgewichtsbedingungen durchgeführten Experimenten wurde deutlich, dass die Anwesenheit bestimmter Kationen zu einer stärkeren Förderung der Bindung von N-Methylscopolamin durch Alcuronium führte. Schröter et al. (2000) kamen hingegen zu dem Ergebnis, dass die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit von Alcuronium durch einen Wechsel vom 5 mM Na, K, P_i -Puffer zum 3/50 mM Mg-Tris-Puffer genauso stark beeinflusst wird wie die assoziationsverzögernde Wirksamkeit, was letztlich auf eine gleich gebliebene Kooperativität bei Pufferwechsel hindeutet.

Da es sich bei Alcuronium um eine in der Wirksamkeit am M_2 -Rezeptor wenig durch die Inkubationsbedingungen beeinflussbare Substanz handelt, war die Untersuchung der Beeinflussbarkeit der Kooperativität dieser Substanz durch wechselnde Inkubationsmedien von besonderem Interesse. Die unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen in Gleichgewichtsbindungsexperimenten ermittelten Kooperativitätsfaktoren werden in den Balkendiagrammen in Abbildung 74-75 dargestellt.

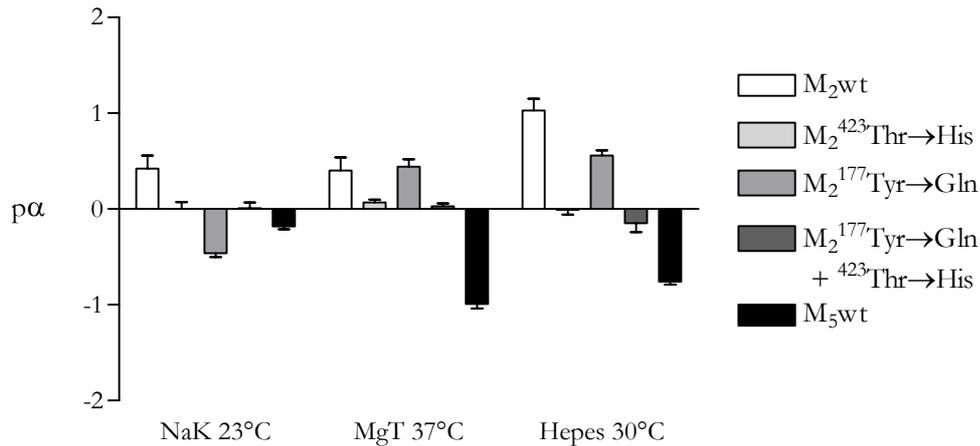


Abbildung 74

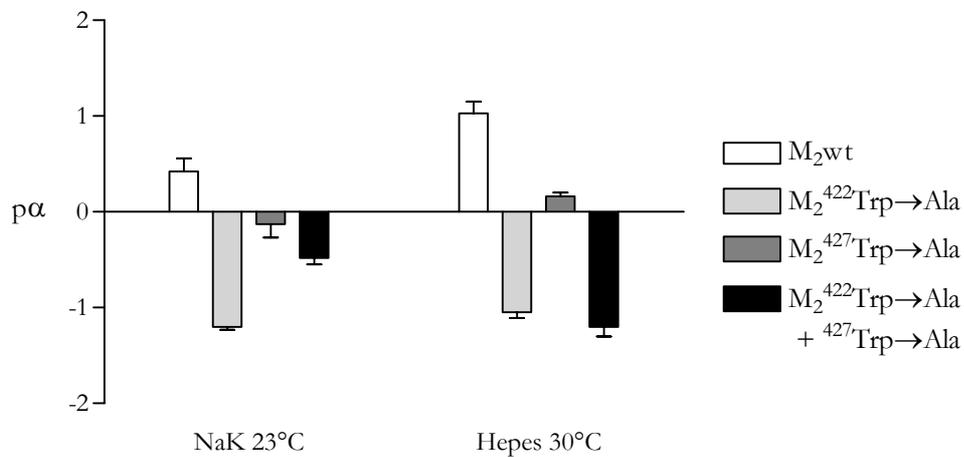


Abbildung 75

Abbildung 74-75: Kooperativitätsfaktoren der Interaktion von Alcuronium mit N-Methylscopolamin im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C (NaK 23°C), im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C (MgT 37°C) und im 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C (Hepes 30°C) an den angegebenen Rezeptorproteinen. Der Kooperativitätsfaktor ist als negativer dekadischer Logarithmus des Wertes α ($-\log \alpha = p\alpha$) quantifiziert.

Die Darstellung der Kooperativitätsfaktoren verdeutlicht, dass das kooperative Verhalten von Alcuronium in unterschiedlicher Art und Weise durch einen Wechsel der Inkubationsbedingungen beeinflusst wird. Während sich bei der Interaktion am M₂-Rezeptor eine Erhöhung der positiven Kooperativität des Modulators im 10 mM Hepes-Puffer zeigt, wird das negativ kooperative Verhalten am M₅-Rezeptor verstärkt. Auffallend ist auch, dass sich an der Rezeptormutante M₂¹⁷⁷Tyrosin→Glutamin noch positive Kooperativität beobachten lässt, während die Mutation der Aminosäure M₂⁴²³Threonin→Histidin unter allen Inkubationsbedingungen zu neutral kooperativem Verhalten führt. Auf die Relevanz einzelner Epitope für das positiv kooperative Verhalten von Alcuronium wird in einem eigenen Kapitel dieser Arbeit eingegangen (siehe IV.5). Die Größe der Wirksamkeitsverschiebungen durch den Wechsel der Inkubationsbedingungen an den einzelnen Rezeptormutanten wird in Tabelle 78 dargestellt.

Rezeptor	NaK → Hepes		NaK → MgT		MgT → Hepes	
	$\Delta pEC_{0,5,diss}$	ΔpK_A	$\Delta pEC_{0,5,diss}$	ΔpK_A	$\Delta pEC_{0,5,diss}$	ΔpK_A
M ₂ wt	1,10	1,35	0,86	0,19	0,24	1,16
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	1,99	2,18	1,69	1,82	0,30	0,36
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	1,50	1,71	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
M ₂ ⁴²³ Thr→His	1,10	1,09	1,15	1,23	-0,05	-0,14
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	1,45	1,74	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	1,78	1,62	1,57	1,59	0,21	0,03
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	1,54	1,25	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
M ₅ wt	2,05	1,50	1,67	1,31	0,38	0,19

Tabelle 78: Ausmaß der Wirksamkeitsverschiebungen von Alcuronium an den einzelnen NMS-besetzten ($\Delta pEC_{0,5,diss}$) oder freien (ΔpK_A) Rezeptorproteinen beim Wechsel der Inkubationsbedingungen. NaK bezeichnet 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C, MgT steht für 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C und die Abkürzung Hepes steht für die Inkubationsbedingungen des 10 mM Hepes-Puffers mit 10 μ M GDP-Zusatz bei 30°C. Die Abkürzung n.b. steht für nicht bestimmte Werte.

Aus den dargestellten Tabellenwerten wird ersichtlich, dass die Wirksamkeit von Alcuronium am NMS-besetzten Rezeptorprotein bei vielen untersuchten Rezeptoren weniger stark durch den Wechsel der Inkubationsbedingungen beeinflusst wird als am unbesetzten Rezeptor. Während bei den anderen betrachteten Wirksamkeitsverschiebungen von W84 und Gallamin die Effekte meist am NMS-besetzten Rezeptor stärker ausgeprägt waren und so z.B. für W84 zu einer Steigerung der negativen Kooperativität mit N-Methylscopolamin führten, verhält sich Alcuronium hier gegensätzlich. Die verstärkte positive Kooperativität am M₂-Rezeptor im 10 mM Hepes-Puffer bei Vergleich mit den anderen untersuchten Inkubationsbedingungen ergibt sich aus einer stärkeren Beeinflussbarkeit der Wirksamkeit am unbesetzten Rezeptor. Während die Affinität des Modulators zum NMS-besetzten M₂-Rezeptor beim Wechsel des Inkubationsmediums kaum abfällt, sinkt die Affinität zum freien Rezeptorprotein stärker ab, was in der Summe zu einer erhöhten positiven Kooperativität unter den Bedingungen des 10 mM Hepes-Puffers führt. Es ließe sich weiterhin annehmen, dass die gesteigerte positive Kooperativität von Alcuronium im 10 mM Hepes-Puffer zum großen Teil auf die gestiegene Relevanz des Epitopes M₂¹⁷⁷Tyrosin für die Affinität zum NMS-besetzten Rezeptor zurückzuführen ist. Die Interaktion des Modulators am M₅-Rezeptor hingegen wird am NMS-besetzten Rezeptor stärker durch den Wechsel der Inkubationsbedingungen beeinflusst als am unbesetzten Rezeptor. Dies führt dazu, dass beim Wechsel des Inkubationsmediums die Affinität von Alcuronium zum freien M₅-Rezeptor weniger stark abfällt als zum NMS-besetzten M₅-Rezeptor. Die Summe dieser Effekte führt dann zu einer

höheren Affinitätsdifferenz zwischen NMS-besetztem und unbesetztem Rezeptor. Da die Bindungsneigung von Alcuronium an den freien M_5 -Rezeptor größer ist, lässt sich unter den Inkubationsbedingungen des 3/50 mM Mg-Tris-Puffers oder des 10 mM Hepes-Puffers eine größere negative Kooperativität beobachten.

Der Wechsel der Inkubationsbedingungen hat Einfluss auf das Ausmaß der Kooperativität allosterischer Modulatoren mit NMS. Das unterschiedliche kooperative Verhalten unter verschiedenen Bedingungen ist dabei auf eine unterschiedliche Beeinflussbarkeit der Affinitäten zu NMS-besetzten und unbesetzten Rezeptoren zurückzuführen. Dabei zeigen die einzelnen untersuchten Modulatoren unterschiedliche Beeinflussbarkeiten, was wahrscheinlich auf unterschiedliche genutzte Epitope für die Basisaffinität der jeweiligen Modulatoren zurückzuführen ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen damit im Gegensatz zu den Beobachtungen von Schröter et al. (2000), die lediglich für den Modulator Gallamin eine unterschiedliche Beeinflussbarkeit am besetzten und unbesetzten Rezeptor durch den Wechsel der Inkubationspuffer feststellen konnten.

IV.5 EPITOPABHÄNGIGKEIT DER POSITIVEN KOOPERATIVITÄT VON ALCURONIUM

Alcuronium weist an M_2 -Rezeptoren positive Kooperativität mit N-Methylscopolamin auf, an Rezeptoren vom M_3 - und M_5 -Subtyp ein negativ kooperatives Verhalten. Die im Vergleich zu den Inkubationsbedingungen des 5 mM Na, K, P_i -Puffers erhöhte positive Kooperativität von Alcuronium mit dem orthosterischen Liganden N-Methylscopolamin am M_2 -Rezeptor im 10 mM Hepes-Puffer bietet die Möglichkeit, die Epitopabhängigkeit der positiven Kooperativität dieser Substanz in diesem Puffermedium genauer zu betrachten als im 5 mM Na, K, P_i -Puffer, da der Einfluss bestimmter Mutationen auf das kooperative Verhalten von Alcuronium stärker hervortritt. Aus den Untersuchungen zur M_2/M_5 -Subtypselektivität von Alcuronium an besetzten und unbesetzten Rezeptoren im 10 mM Hepes-Puffer geht hervor, dass die Aminosäure M_2^{177} Tyrosin für die Bindung von Alcuronium sowohl an den besetzten als auch an den unbesetzten Rezeptorzustand wichtig ist. Jedoch ist die Bedeutung dieser Aminosäure für den NMS-besetzten Rezeptorzustand größer als für den unbesetzten Rezeptor. Der Austausch dieses Epitopes führt jedoch in Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen nicht zu einer Veränderung des positiv kooperativen Verhaltens von Alcuronium mit N-Methylscopolamin. Diese ist weiterhin beobachtbar, wenn auch nicht mehr so stark ausgeprägt wie am M_2 -Rezeptor. Der Austausch der Aminosäure M_2^{423} Threonin \rightarrow Histidin hingegen führt zu einer Änderung des positiv kooperativen Verhaltens, an dieser Rezeptormutante zeigt sich lediglich neutrale Kooperativität von Alcuronium mit N-Methylscopolamin. Dies ist Folge einer unterschiedlichen Bedeutung der Aminosäure M_2^{423} Threonin für die Interaktion von Alcuronium mit dem NMS-besetzten und dem unbesetzten Rezeptorprotein. Am NMS-besetzten Rezeptor führt der Austausch dieses Epitopes zu einem leichten Affinitätsabfall, am unbesetzten Rezeptor allerdings zu einer Affinitätszunahme. Diese Aminosäure scheint also für die Bindung von Alcuronium an den NMS-besetzten Rezeptorzustand wichtig zu sein, während sie die Interaktion mit dem freien Rezeptorprotein stört. Da sich positive Kooperativität durch eine höhere Bindungsneigung des allosterischen Modulators zum NMS-besetzten Rezeptor als zum unbesetzten Rezeptor ergibt, führt die Summe dieser gegenteiligen Effekte dazu, dass Alcuronium an der Rezeptormutante M_2^{423} Threonin \rightarrow Histidin nur ein neutral kooperatives Verhalten mit N-Methylscopolamin zeigt. Die Einführung dieses Epitopes in den M_5 -Rezeptor führt jedoch nicht zu einer Umkehr der negativen Kooperativität von Alcuronium an diesem Rezeptorsubtyp. Vielmehr bleibt das kooperative Verhalten im Vergleich mit dem M_5 -Rezeptor unverändert. Der störende Einfluss

von M₂⁴²³Threonin am unbesetzten Rezeptorprotein scheint also durch die Einbeziehung anderer Epitope durch Alcuronium am M₂-Rezeptor zustande zu kommen.

Der Austausch des Epitopes M₂⁴²⁷Tryptophan führt unter allen untersuchten Inkubationsbedingungen zu einem Wechsel des positiv kooperativen Verhaltens zu negativer Kooperativität. Dieses Phänomen ist darauf zurückzuführen, dass sich die Affinität von Alcuronium durch den Austausch des Tryptophans zu Alanin zum freien Rezeptor noch stärker erhöht als zum NMS-besetzten Rezeptor. Das kooperative Verhalten resultiert also aus einem komplexen Zusammenspiel verschiedener affinitätsgebender oder „bindungsstörender“ Epitope, wobei sowohl für die Subtypselektivität relevante Epitope als auch für die Basisaffinität verantwortliche Epitope involviert sind.

Experimente, die lediglich das Verschwinden von positiver Kooperativität von Alcuronium mit NMS beobachten, bieten nur begrenzten Einblick in die für positive Kooperativität verantwortlichen Epitope. Aufschlussreicher sind hier Experimente, in denen versucht wird, durch die Einführung bestimmter Aminosäuren in Rezeptoren, an denen sich Alcuronium negativ kooperativ mit NMS verhält, wie z.B. in den M₅-Rezeptor, positive Kooperativität zu erreichen.

Solche Untersuchungen zur positiven Kooperativität von Alcuronium wurden bereits von Krejčí und Tuček (2001) sowie von Ellis und Seidenberg (2000) durchgeführt. Ellis und Seidenberg überprüften das kooperative Verhalten von Alcuronium an verschiedenen chimären Rezeptorkonstrukten. Dabei konnten sie zeigen, dass die Einführung der zweiten extrazellulären Schleife des M₂-Rezeptors in den M₅-Rezeptor nicht zu einer Veränderung des kooperativen Verhaltens von Alcuronium mit N-Methylscopolamin führte. An diesem chimären Rezeptor erhöhte sich zwar die Affinität von Alcuronium zum NMS-besetzten Rezeptor, jedoch zeigte sich weiterhin negative Kooperativität in Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen. Die Studien von Krejčí und Tuček (2001) konnten durch die Einführung von Aminosäuren der dritten extrazellulären Schleife des M₂-Rezeptors in den M₃-Rezeptor ein positiv kooperatives Verhalten von Alcuronium mit dem entsprechenden Rezeptorkonstrukt hervorrufen. Auffallend war dabei, dass an einer Mutante mit drei ausgetauschten Aminosäuren (M₃⁵²³Lysin→Asparagin + ⁵²⁵Phenylalanin→Valin + ⁵²⁷Asparagin→Threonin: KFN-Mutante) nur neutral kooperatives Verhalten von Alcuronium mit N-Methylscopolamin zu beobachten war, während der Austausch von fünf Aminosäuren (M₃⁵¹⁸Aspartat→Alanin + ⁵¹⁹Serin→Prolin + ⁵²³Lysin→Asparagin + ⁵²⁵Phenylalanin→Valin + ⁵²⁷Asparagin→Threonin: DSKFN-Mutante) zu positiver Kooperativität von Alcuronium an dieser Rezeptormutante wie am M₂-Rezeptor führte. Die Aminosäure Prolin kann starke Auswirkungen auf die Ausrichtung der ihr benachbarten

Aminosäuren haben (Huang et al., 2005). Die Untersuchungen von Krejčí und Tuček legen nahe, dass die Aminosäure M₂⁴¹⁴Prolin eine stellungsgebende Funktion für Epitope haben könnte, die von Alcuronium genutzt werden. Das in der KFN-Mutante eingeführte Threonin entspricht der Aminosäure M₂⁴²³Threonin und bestätigt die in dieser Arbeit erhobenen Befunde zur Relevanz dieses Epitopes für das positiv kooperative Verhalten von Alcuronium. Die Versuche von Ellis und Seidenberg (2000) zeigten jedoch an einem chimären Rezeptor, der diese Aminosäuren der dritten extrazellulären Schleife des M₂-Rezeptors in den M₃-Rezeptor einführte (CR6: hM₂ 1–69, hM₃ 77–445, hM₂ 391–466), ein negativ kooperatives Verhalten von Alcuronium mit N-Methylscopolamin. Dies könnte daran liegen, dass Bindungsstellen, die für die Affinität Alcuronium zum NMS-besetzten Rezeptor wichtig sind, zwar im M₃-Rezeptor vorhanden sind, nicht jedoch im M₅-Rezeptor. An einem chimären Rezeptor, der die Elemente hM₂1-207, rM₃252-491, hM₂389-466 enthielt, verhielt sich Alcuronium genau wie am M₂-Rezeptor positiv kooperativ mit N-Methylscopolamin. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass das Epitop M₂¹⁷⁷Tyrosin eine wichtige Rolle für die Bindung von Alcuronium an den NMS-besetzten Rezeptor hat. An Stelle dieser Aminosäure findet sich im M₃-Rezeptor als korrespondierende Aminosäure M₃²²²Phenylalanin, im M₅-Rezeptor M₅¹⁸⁴Glutamin. Huang et al. (2005) zeigten, dass die Bindung von W84 an den NMS-besetzten Rezeptor durch aromatische Wechselwirkungen des Modulators mit dem Epitop M₂¹⁷⁷Tyrosin erfolgen, durch den Austausch dieser Aminosäure in M₂¹⁷⁷Tyrosin→Phenylalanin fiel die Affinität von W84 zum NMS-besetzten Rezeptor nur leicht ab, während der Austausch in die Aminosäuren Serin oder Alanin zum stärkeren Absinken der Bindungsneigung führte. Von daher wäre es möglich, dass das Epitop M₂¹⁷⁷Tyrosin für eine aromatische Wechselwirkung von Alcuronium am NMS-besetzten M₂-Rezeptor wichtig ist und dass die korrespondierende Aminosäure M₃²²²Phenylalanin eine ähnliche Funktion für die Bindung von Alcuronium am NMS-besetzten M₃-Rezeptor übernehmen könnte. Das Fehlen einer solchen für die Bindung von Alcuronium wichtigen Aminosäure im M₅-Rezeptor könnte ein Grund dafür sein, dass sich in den Studien von Ellis und Seidenberg (2000) kein positiv kooperatives Verhalten von Alcuronium mit N-Methylscopolamin an einem Rezeptorkonstrukt beobachten ließ, das die von Krejčí und Tuček (2001) identifizierten Aminosäuren der dritten extrazellulären Schleife des M₂-Rezeptors in den M₅-Rezeptor einführte. Nähere Erkenntnisse zur Epitopabhängigkeit des kooperativen Verhaltens von Alcuronium mit N-Methylscopolamin könnten daher Experimente bringen, die die von Krejčí und Tuček (2001) erwähnten Aminosäuren zusätzlich zur Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin in den M₅-Rezeptor einführen.

V ZUSAMMENFASSUNG

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Man unterscheidet zur Zeit fünf verschiedene Subtypen von Muskarinrezeptoren, die alle neben der orthosterischen Bindungsstelle, an die z.B. der endogene Agonist Acetylcholin oder der Antagonist N-Methylscopolamin binden, ein weiteres Bindungsareal besitzen, an das sich sogenannte allosterische Modulatoren anlagern können. Durch die Bindung allosterischer Modulatoren an den Rezeptor kann die Affinität orthosterischer Liganden zum Rezeptor moduliert werden und umgekehrt.

Als allosterische Modulatoren an Muskarinrezeptoren können u.a. Alkan-bisammonium-Verbindungen wie W84 und Naphmethonium, Verbindungen wie Alcuronium und Caracurinderivate, aber auch kleinere flexiblere Moleküle wie Gallamin fungieren. Viele allosterische Modulatoren weisen eine erhöhte Affinität zum M₂-Subtyp und eine niedrigere Affinität zum M₅-Subtyp auf. In Mutagenese-Studien konnten zwei Aminosäuren identifiziert werden, die für die M₂/M₅-Subtypselektivität allosterischer Modulatoren verantwortlich sind: M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin. Neben Aminosäuren, die für die Subtypselektivität allosterischer Modulatoren eine Rolle spielen, können in allen 5 Subtypen konservierte Aminosäuren ebenso das Bindungsverhalten allosterischer Modulatoren beeinflussen. Das Epitop M₂⁴²²Tryptophan ist mitbestimmend für die Basisaffinität der Modulatoren zum Muskarinrezeptor.

Die Affinität allosterischer Modulatoren wird durch die jeweils angewandten Versuchsbedingungen beeinflusst. Beim Wechsel von den recht artifiziellen Pufferbedingungen eines Puffers aus 4 mM NaH₂PO₄ und 1 mM KH₂PO₄ bei 23°C („5 mM Na, K, P_i-Puffer“) zu den physiologischeren Versuchsbedingungen eines Puffers bestehend aus 3 mM MgHPO₄ und 50 mM Tris-HCl bei 37°C („Mg-Tris-Puffer“) kommt es zu Wirksamkeitsverschiebungen, die je nach allosterischem Modulator unterschiedliche Ausmaße einnehmen. Die Modulatoren W84 und Gallamin werden durch einen Wechsel der Inkubationsbedingungen stark in ihrer Affinität beeinflusst, der Modulator Alcuronium hingegen weniger. Das zweiwertige Magnesium-Kation kann die Affinität von W84 zur allosterischen Bindungsstelle beeinflussen.

Da die Experimente, die zur Entdeckung der Epitope allosterischer Modulatoren führten, unter den Inkubationsbedingungen eines 5 mM Na, K, P_i-Puffers durchgeführt worden waren, stellte sich die Frage, ob die so identifizierten Epitope unter physiologischeren Inkubationsbedingungen weiterhin bindungsrelevant sind. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle der identifizierten Epitope für die Bindung der allosterischen Modulatoren unter physiologischeren Pufferbedingungen abzuklären.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden ein in seiner Wirksamkeit stark pufferabhängiger

Modulator - Gallamin, ein mittelstark pufferabhängiger - W84, und das wenig pufferabhängige Alcuronium sowie weitere Testsubstanzen untersucht. Die rezeptorhaltigen Membranhomogenate wurden von COS-7-Zellen gewonnen, die mit dem entsprechenden Gen für Rezeptor-Wildtyp oder -Mutante transfiziert worden waren. Neben dem 5 mM Na, K, P_i-Puffer (4 mM NaH₂PO₄ und 1 mM KH₂PO₄ bei 23°C) und dem 3/50 mM Mg-Tris-Puffer (3 mM MgHPO₄ und 50 mM Tris-HCl bei 37°C) wurde ein Puffer bestehend aus 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 10 mM Hepes und 10 μM GDP bei 30°C („10 mM Hepes-Puffer“) eingesetzt.

Die Affinität der allosterischen Modulatoren wurde in Radioligandbindungsstudien untersucht, in denen der Einfluss der entsprechenden Substanzen auf die Bindung des radioaktiv markierten orthosterischen Liganden [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS) gemessen wurde. Zur Ermittlung der Affinität allosterischer Modulatoren zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor wurde in kinetischen Untersuchungen der pEC_{0.5,diss}-Wert bestimmt, der das Ausmaß der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit der allosterischen Substanzen quantifiziert. Die Affinität der allosterischen Substanzen zum freien Rezeptor, quantifiziert durch die Gleichgewichtsassoziationskonstante K_A, und der Kooperativitätsfaktor α der Interaktion mit NMS wurden durch Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen ermittelt, die nach dem Ehlert-Modell der ternären allosterischen Interaktion ausgewertet wurden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Bedeutung der unter artifiziellen Bedingungen identifizierten Epitope für alle untersuchten Modulatoren beim Wechsel zu physiologischeren Inkubationsbedingungen weitgehend erhalten bleibt. Dies gilt sowohl für die Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²³Threonin als auch für die Aminosäuren M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan.

Der Wechsel zu physiologischeren Bedingungen führt am NMS-besetzten Rezeptor bei den meisten Testsubstanzen zu einer stärkeren Bedeutung der Aminosäure M₂¹⁷⁷Tyrosin für die Affinität der untersuchten Modulatoren. Das Epitop M₂⁴²³Threonin verliert dabei an Relevanz für die Bindung von W84 und Gallamin, behält jedoch seine Bedeutung für Modulatoren Alcuronium und Diallylcaracurin V. Beide letztere Modulatoren zeichnen sich durch eine direkte Interaktion mit der Aminosäure Threonin am NMS-besetzten Rezeptor aus, während der beobachtete Affinitätsabfall beim Austausch M₂⁴²³Threonin→Histidin bei W84 auf eine störende Wirkung der Aminosäure Histidin zurückzuführen ist.

Die Bedeutung der Epitope M₂⁴²²Tryptophan und M₂⁴²⁷Tryptophan für die Basisaffinität allosterischer Modulatoren wird durch den Wechsel der Inkubationsbedingungen nicht verändert. Die beobachteten Wirksamkeitsverschiebungen beim Wechsel der Inkubationsmedien sind somit

auf andere Epitope zurückzuführen, die für die Basisaffinität der Modulatoren verantwortlich sind.

Die Affinität allosterischer Modulatoren wird am unbesetzten und am NMS-besetzten Rezeptor in unterschiedlichem Ausmaß durch den Wechsel der Inkubationsmedien beeinflusst, somit kommt es unter verschiedenen Bedingungen zu leichten Änderungen des Ausmaßes der Kooperativität der allosterischen Modulatoren mit NMS. In fast allen Fällen wird lediglich die Quantität, also die Größe des Kooperativitätsfaktors, und nicht die Art der kooperativen Interaktion, das heißt das Vorhandensein einer Bindungsförderung oder –senkung, verändert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass die Topographie der Bindung allosterischer Modulatoren an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren unter sehr verschiedenen Pufferbedingungen im Prinzip gleich bleibt, auch wenn sich die Bindungsaffinität der Modulatoren deutlich verändert.

VI ANHANG

VI.1 EINFLUSS DER INKUBATIONSZEIT AUF DIE BINDUNGSEIGENSCHAFTEN DER MEMBRANSUSPENSION

Um zu ermitteln, ob durch die Inkubationszeit die charakteristischen Bindungseigenschaften wie die Anzahl der Bindungsstellen B_{\max} und die Affinität des orthosterischen Liganden K_D zu den Rezeptoren einer Membransuspension beeinflusst wird, wurden an einigen Membranchargen homologe Konkurrenzexperimente mit unterschiedlicher Inkubationsdauer durchgeführt. Die dabei ermittelten Werte sind in Tabelle 79 zusammengestellt.

Membrancharge	Puffer	t_{ink} [h]	pK_D [log M]	p (t-Test)	B_{\max} [fmol/mL]	p (t-Test)
$M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ (25.06.04)	Na, K, P_i - Puffer 23°C	6	9,69 (9,72; 9,66)	0,0651	90 (87; 93)	0,1800
		15	10,37 (10,19; 10,55)		137 (160; 114)	
$M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ (25.06.04)	Na, K, P_i - Puffer 23°C	5,5	9,73 (9,52; 9,93)	0,9361	176 (216; 136)	0,6767
		8	9,71 ± 0,06 (n = 3)		147 ± 43 (n = 3)	
$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ (09.12.04)	Mg-Tris- Puffer 37°C	1,5	9,71 (9,64; 9,77)	0,5220	80 (92; 68)	0,0213
		3,5	9,65 ± 0,05 (n = 3)		145 ± 9 (n = 3)	
$M_2\text{wt}$ (19.08.04z)	Hepes-Puffer 30°C	3	9,65 ± 0,24 (n = 6)	0,9027	131 ± 18 (n = 6)	0,1018
		9	9,61 ± 0,13 (n = 4)		84 ± 15 (n = 4)	
$M_5\text{wt}$ (20.10.04)	Hepes-Puffer 30°C	9	9,66 ± 0,20 (n = 3)	0,6975	173 ± 59 (n = 3)	0,4247
		18	9,57 ± 0,08 (n = 3)		115 ± 28 (n = 3)	

Tabelle 79: Einfluss der Inkubationstemperatur (t_{ink}) auf die Anzahl der Bindungsstellen B_{\max} und den pK_D -Wert, der die Affinität von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ zu den Rezeptoren der angegebenen Membranchargen widerspiegelt. Die angegebenen p-Werte wurde im t-Test ermittelt.

Die B_{\max} -Werte der Charge der Rezeptormutante $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ vom 09.12.04 unterscheiden sich bei den unterschiedlichen Inkubationstemperaturen von 1,5 und 3,5 Stunden signifikant voneinander, bei allen anderen Membranchargen lässt sich kein signifikanter Einfluss der Inkubationstemperatur auf den pK_D -Wert oder die Anzahl der Bindungsstellen beobachten. Daher ist davon auszugehen, dass es sich bei der festgestellten signifikanten Abweichung der oben genannten Membrancharge um einen zufälligen Befund handelt, zumal die Anzahl der Bindungsstellen mit zunehmender Inkubationszeit steigt, wobei man bei einer Instabilität der

Rezeptorproteine über die Inkubationszeit eher das Gegenteil erwarten würde.

Diese Untersuchungen zeigen, dass Inkubationszeit keinen signifikanten Einfluss auf die Affinität von [³H]NMS zu den untersuchten Rezeptorproteinen oder die Anzahl der verfügbaren Bindungsstellen B_{\max} hat.

VI.2 VORVERSUCHE

VI.2.1 Einfluss von W84 auf die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung an M₂-Rezeptoren im Mg-Tris-Puffer bei 37°C am Brandel-Harvester und am Tomtec Harvester

Zur Überprüfung der eigenen Arbeitstechnik und zum Vergleich der am Tomtec-Harvester gewonnenen Versuchsergebnisse mit den am Brandel-Harvester erhaltenen, wurden [³H]NMS-Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen mit dem allosterischen Modulator W84 an M₂-Wildtyp-Rezeptoren im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C an beiden Filtrationsanlagen durchgeführt. Die aus homologen Konkurrenzexperimenten mit [³H]NMS an den beiden Filtrationsanlagen ermittelten pK_D-Werte, unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Brandel-Harvester: pK_D: 9,50; 9,36; Tomtec-Harvester: pK_D: 9,22; 8,91; t-Test, p = 0,1683). Der Modulator W84 zeigte sowohl am Tomtec-Harvester als auch am Brandel-Harvester den gleichen Einfluss auf die Bindung des Liganden [³H]N-Methylscopolamin (siehe Abbildung 76).

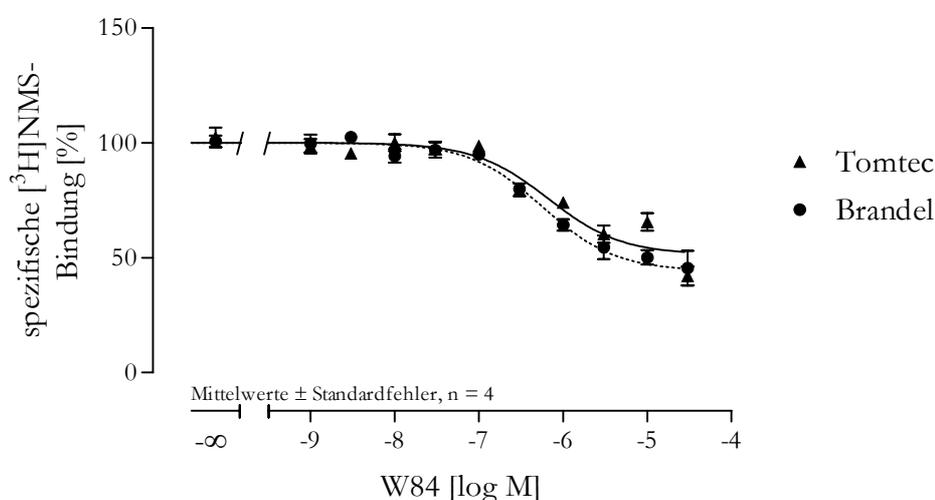


Abbildung 76: Einfluss des Modulators W84 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM in heterologen Interaktionsexperimenten an M₂-Wildtyp-COS-7-Membransuspensionen im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C bei Versuchsdurchführung am Tomtec- und am Brandel-Harvester im Vergleich. Ordinate: Prozentuale spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Logarithmus der molaren Konzentration des eingesetzten Modulators. Die abgebildeten Kurvenverläufe basieren auf den Mittelwerten der im jeweiligen Einzelversuch durch nichtlineare Regressionsanalyse unter Anwendung der Ehlert-Gleichung für das Modell der ternären Komplexbildung ermittelten Kurvencharakteristika. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte ± Standardfehler der unabhängigen Einzelversuche mit der Anzahl n.

Die Bindungsdaten wurden wie unter II.3.1.3 beschrieben mittels nichtlinearer Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung für das ternäre Modell der allosterischen Interaktion analysiert. Die Affinität (pK_A) von W84 und die minus-log-Werte des

Kooperativitätsfaktors α , der die Interaktion von W84 mit NMS am Rezeptor beschreibt, sind in Tabelle 80 wiedergegeben.

Filtrationsanlage	pK_A [log M]	$p\alpha$	Zahl der Versuche
Brandel-Harvester	$6,36 \pm 0,04$	$-0,47 \pm 0,06$	4
Tomtec-Harvester	$6,21 \pm 0,07$	$-0,32 \pm 0,04$	4

Tabelle 80: An verschiedenen Filtrationsanlagen in heterologen Interaktionsexperimenten mit W84 und [3 H]NMS 0,2 nM im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C ermittelte pK_A - und $p\alpha$ - Werte. Angegeben sind jeweils Mittelwerte \pm Standardfehler aus der Anzahl der unabhängigen Versuche.

Die an den unterschiedlichen Filtrationssystemen ermittelten $p\alpha$ - und pK_A -Werte zeigen keine signifikante Abweichung voneinander (t-Test: Vergleich der pK_A -Werte: $p = 0,1121$; Vergleich der $p\alpha$ -Werte: $p = 0,0827$).

Die Art des verwendeten Versuchs- bzw. Filtrationssystems hat keinen Einfluss auf die in Gleichgewichtsbindungsversuchen mit Membransuspensionen aus COS-7-Zellen ermittelten Daten für die Affinität des Modulators W84.

VI.2.2 Untersuchung des Einflusses der Silanisierung von Polypropylengefäßen auf die Wirksamkeit der Substanzen Alcuronium, CARBEM und CARALL in Dissoziationsverzögerungsversuchen

Bei der Durchführung von Dissoziationsverzögerungsversuchen am Tomtec-Harvester im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C zeigten die Modulatoren Alcuronium, CARBEM und CARALL eine geringere Affinität zu NMS-besetzten M₂-Rezeptoren als dies von Buller bei Experimenten am Brandel-Harvester (Buller et al., 2002; Buller, Dissertationsschrift 2002) beobachtet worden war. Die in dieser Arbeit und von Buller ermittelten Wendepunkte der Dissoziationsverzögerungskurven (pEC_{0.5,diss}-Werte: negativer dekadischer Logarithmus der Modulatorkonzentrationen, bei der eine halbmaximale Dissoziationsverzögerung beobachtet wird) für Alcuronium, CARALL und CARBEM an COS-7-Rezeptoren vom M₂-Wildtyp sind in Tabelle 81 dargestellt.

Modulator	pEC _{0.5,diss} S. Buller [log M]	pEC _{0.5,diss} diese Arbeit [log M]	p-Wert (t-Test)
Alcuronium	8,57 ± 0,05 (n = 2-5)	7,86 ± 0,05 (n = 3)	< 0,0001
CARALL	8,00 ± 0,06 (n = 2-5)	7,44 ± 0,04 (n = 4)	0,0002
CARBEM	7,05 ± 0,03 (n = 2-5)	6,50 ± 0,02 (n = 3-4)	< 0,0001

Tabelle 81: Übersicht über von Buller (Buller, Dissertationsschrift 2002) am Brandel-Harvester und in dieser Arbeit am Tomtec-Harvester ermittelten Mittelwerte ± Standardfehler aus n Einzelbestimmungen für die Wendepunkte der Konzentrations-Effekt-Kurven der Dissoziationsverzögerung der angegebenen Modulatoren im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C. Der angegebene p-Wert wurde mittels t-Test zum Vergleich der pEC_{0.5,diss}-Werte an den unterschiedlichen Harvestern ermittelt.

Da sich die am Brandel-Harvester ermittelten Wirksamkeiten der Modulatoren Alcuronium, CARBEM und CARALL signifikant von den in dieser Arbeit bei Versuchsdurchführung am Tomtec-Harvester beobachteten Werten unterschieden, wurde untersucht, ob es sich dabei um einen Adsorptions-Effekt der Modulatoren an die Oberfläche der Versuchsgefäße handelt, der durch die Silanisierung dieser Reaktionsgefäße beeinflusst werden kann. Dafür wurden Dissoziationsversuche am Tomtec-Harvester in silanisierten Polypropylen-Blöcken durchgeführt. Die dabei ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung 77-79 gemeinsam mit den an unsilanisierten Polypropylengefäßen erhobenen Daten sowie den nach den Daten von Buller (Buller, Dissertationsschrift 2002) mit Borosilikatgläsern am Brandel-Harvester simulierten Konzentrations-Effekt-Kurven dargestellt.

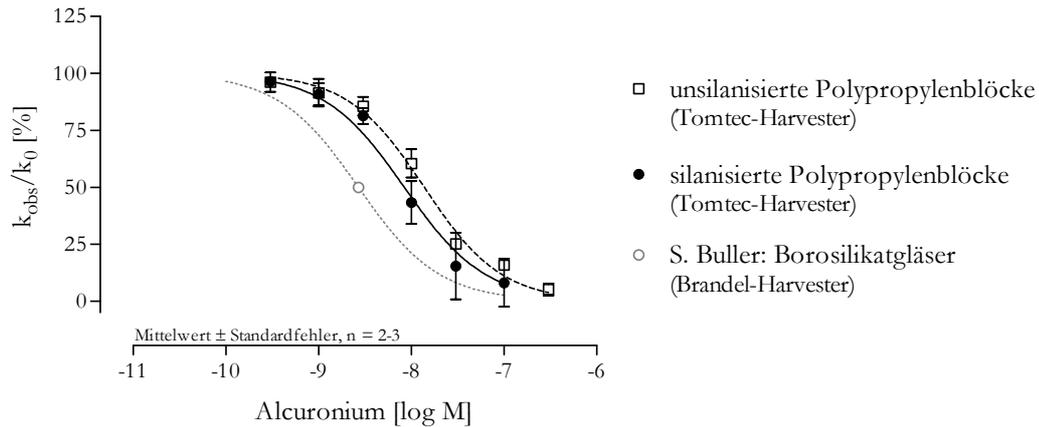


Abbildung 77

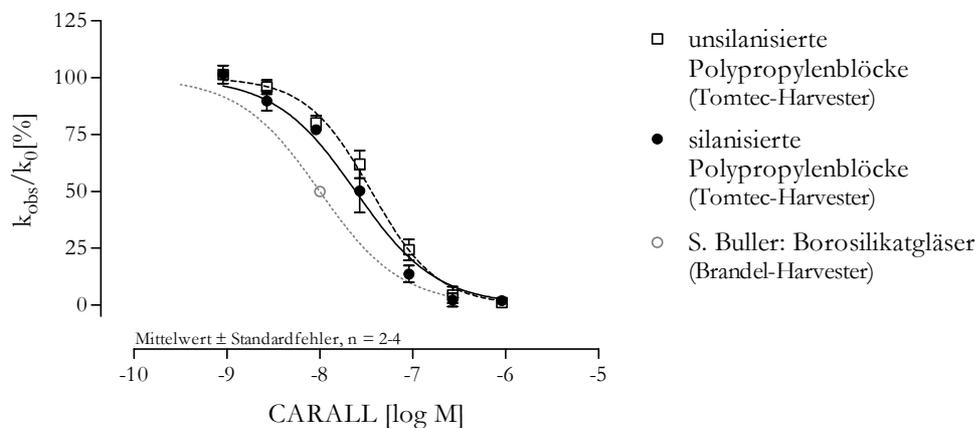


Abbildung 78

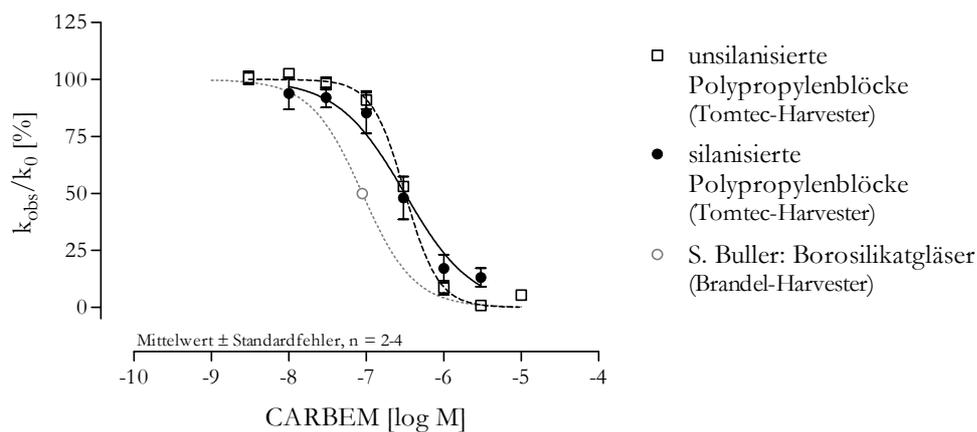


Abbildung 79

Legende zu Abbildung 77-79: Konzentrations-Effekt-Kurven für die Wirksamkeit der allosterischen Modulatoren Alcuronium, CARBEM und CARALL in Dissoziationsverzögerungsversuchen in 5 mM Na, K, Pi-Puffer bei 23°C bei Versuchsdurchführung am Tomtec-Harvester in silansierten und unilansierten Polypropylengefäßen. Zusätzlich sind die anhand der von Buller in seiner Dissertationsschrift aufgeführten Daten (Buller, Dissertationsschrift 2002) simulierten Kurvenverläufe für Dissoziationsversuche am Brandel-Harvester in Borosilikatgläsern aufgeführt. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler für die angegebene Anzahl n unabhängiger Versuche der Experimente am Tomtec-Harvester. Ordinate: beobachtete Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante in Anwesenheit des Modulators als prozentualer Wert der Dissoziationskonstante in Abwesenheit des allosterischen Modulators. Abszisse: logarithmierte molare Konzentration des eingesetzten Modulators.

In Tabelle 82 ist eine Übersicht ermittelten Kenngrößen der in Abbildung 77-79 dargestellten Versuche wiedergegeben.

Modulator	Versuchssystem	$pEC_{0,5,diss}$ [log M]	n_H	N
Alcuronium	unsilanisiert	$7,86 \pm 0,05$	$-1,05 \pm 0,10$	3
	silanisiert	$8,08 \pm 0,08$	$-1,25 \pm 0,23$	2
	<i>S. Buller</i>	$8,57 \pm 0,05$	$-1,19 \pm 0,14$	2-5
CARALL	unsilanisiert	$7,44 \pm 0,04$	$-1,23^s \pm 0,04$	4
	silanisiert	$7,61 \pm 0,05$	$-1,23 \pm 0,17$	2
	<i>S. Buller</i>	$8,00 \pm 0,06$	$-1,31 \pm 0,18$	2-5
CARBEM	unsilanisiert	$6,49 \pm 0,02$	$-2,02^s \pm 0,20$	3-4
	silanisiert	$6,50 \pm 0,07$	$-1,21 \pm 0,20$	2
	<i>S. Buller</i>	$7,05 \pm 0,03$	$-1,30^f \pm 0,12$	2-5

Tabelle 82: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven des Modulatoren Alcuronium, CARALL und CARBEM im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C am Tomtec-Harvester in silaniserten und unsilaniserten Polypropylengefäßen. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelbestimmungen. Außerdem sind die von Buller in Dissoziationsverzögerungsversuchen mit gleichen Versuchsbedingungen am Brandel-Harvester in Borosilikatgläsern ermittelten Kenngrößen aufgeführt.

Die in den Versuchen ermittelten $pEC_{0,5,diss}$ -Werte wurden mit einem t-Test miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass bei allen drei untersuchten Modulatoren eine Silanisierung der Polypropylengefäße keinen signifikanten Einfluss auf das Versuchsergebnis hatte. Sowohl die in Versuchen mit silaniserten Gefäßen als auch die in Versuchen mit unsilaniserten Gefäßen ermittelten Affinitäts-Werte unterschieden sich signifikant von den von Buller ermittelten Daten. Obwohl eine "Silanisierung" von Polypropylengefäßen bei Radioligandbindungsuntersuchungen bisher teilweise vorgenommen wurde (Duda-Johner, Dissertationsschrift 2002; Raasch, Dissertationsschrift 2003) scheint jedoch bei unpolaren Polypropylengruppen kein nucleophiler Angriff am Silanisierungsreagenz stattfinden zu können. Mundry beschreibt in seiner Dissertationsschrift zur Einbrennsilikonisierung pharmazeutischer Glaspäckmittel (Mundry, Dissertationsschrift 1999) das Vorhandensein einer kovalent gebundenen Silikonfraktion, sowie einer löslichen Silikonfraktion an silaniserten Glasoberflächen. Die Anwesenheit einer löslichen, evtl. durch Reaktion mit Oberflächenwasser gebildeten Silikonschicht an Polypropylengefäßen ist unwahrscheinlich, da bei dem hier angewendeten Verfahren die Polypropylengefäße zur Entfernung von überschüssigem Silanisierungsreagenz mit Wasser gespült werden, was wahrscheinlich eine Entfernung so einer löslichen Silikonschicht beim Waschvorgang bedingt.

Die in dieser Arbeit erhobenen Befunde zeigen, dass die Wirksamkeit allosterischer Modulatoren in den durchgeführten Dissoziationsverzögerungsversuchen nicht durch das Verfahren Silanisierung von Polypropylengefäßen beeinflussbar ist. Auf eine Silanisierung der Polypropylengefäße wurde deshalb in den weiteren Experimenten verzichtet.

Der Tomtec-Harvester bietet gegenüber dem Brandel-Harvester den Vorteil einer schnelleren Filtrationsgeschwindigkeit und dem geringeren Verbrauch von Versuchsmaterial. Da die Dissoziationsgeschwindigkeit von [³H]NMS unter den Inkubationsbedingungen im 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C und im 10 mM Hepes-Puffer mit GDP bei 30°C schneller ist als im 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C (Tränkle et al., 1996) und unter diesen Umständen eine möglichst schnelle Filtration bei der Trennung des gebundenen vom ungebundenen Radioliganden erwünscht ist (Bennet und Yamamura, 1995), wurden die weiteren Versuche zur Untersuchung der Epitopabhängigkeit allosterischer Modulatoren am Tomtec-Harvester durchgeführt. Die Vorversuche zeigen, dass die von Buller am Brandel-Harvester erhobenen experimentellen Daten nicht als Bezugsgröße für die eigene Arbeit geeignet sind. Daher wurden hier alle Daten zum Vergleich der Wirksamkeit allosterischer Modulatoren unter verschiedenen Inkubationsbedingungen einheitlich unter Verwendung eines Tomtec-Harvesters erhoben.

VI.3 TABELLARISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER BINDUNGSPARAMETER DER UNTERSUCHTEN ALLOSTERISCHEN MODULATOREN

VI.3.1 W84

W84															
Rezeptor	5 mM Na, K, P _i -Puffer, 23°C					3/50 mM Mg-Tris-Puffer, 37°C					10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP, 30°C				
	pEC _{0,5,diss} [log M]	ΔpEC _{0,5,diss} (M ₂ – M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N	pEC _{0,5,diss} [log M]	ΔpEC _{0,5,diss} (M ₂ – M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N	pEC _{0,5,diss} [log M]	ΔpEC _{0,5,diss} (M ₂ – M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	7,62 ± 0,05 7,43 (Raasch) 7,40 (Prilla)	0	-1,21 ± 0,12	-2,7 ± 3,3	3	5,90 ± 0,03	0	-1,2 ^s ± 0,10	19,18 ^s ± 1,9	4	5,62 ± 0,05	0	-0,96 ± 0,09	3,4 ± 3,0	3
M ₂ ¹⁷⁵ Glu→Ala	6,96 (Raasch)	0,47 (Raasch)				n.b.					5,04 ± 0,04	0,58	-1,11 ± 0,08	-4,5 ± 2,5	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	6,14 ± 0,04	0,63	-1,04 ± 0,09	1,1 ± 3,9	3	4,32 ± 0,04	1,58	-0,9 ± 0,08	10,38 ^s ± 2,0	4	3,92 ± 0,04	0,35	-0,94 ± 0,09	-5,9 ^s ± 2,6	3
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	5,89 (Prilla)	1,51 (Prilla)				n.b.					3,91 ± 0,05	1,71	-0,95 ± 0,10	3,8 ± 3,8	3
M ₂ ⁴²³ Thr→His	6,99 ± 0,04	1,48	-1,06 ± 0,08	-0,9 ± 2,7	3	5,19 ± 0,06	0,71	-0,9 ± 0,11	8,77 ± 5,3	3–5	5,27 ± 0,04	1,70	-0,90 ± 0,06	3,8 ± 2,1	3
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	7,48 (Prilla)	-0,08 (Prilla)				n.b.					5,88 ± 0,06	-0,26	-0,78 ^s ± 0,08	0,3 ± 8,7	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	5,62 ± 0,04	2,00	-0,97 ± 0,09	6,1 ^s ± 2,2	3	4,10 ± 0,07	1,80	-1,2 ± 0,07	9,79 ^s ± 4,0	4	3,89 ± 0,05	1,73	-0,91 ± 0,08	0,2 ± 2,8	3
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	5,92 (Prilla)	1,48 (Prilla)				n.b.					3,95 ± 0,04	1,67	-1,02 ± 0,08	-1,8 ± 2,8	3
M ₅ wt	5,67 ± 0,09	1,95	-0,95 ± 0,18	12,5 ^s ± 3,5	3-5	3,96 ± 0,05	1,94	-1,2 ^s ± 0,12	14,55 ^s ± 2,8	3-4	3,82 ± 0,03	1,80	-1,05 ± 0,07	-1,8 ± 1,9	3

Tabelle 83: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven der Wirksamkeit von W84 in Dissoziationsverzögerungsversuchen. Der pEC_{0,5,diss}-Wert gibt den negativen dekadischen Logarithmus der Modulatorkonzentration an, bei der eine halbmaximale Dissoziationsverzögerung beobachtet wurde. Der Hill-Slope n_H als Charakteristikum der Kurvensteilheit wurde, insofern er im F-Test nicht signifikant verschieden von -1 war, auf diesen Wert festgesetzt. Das obere Plateau der Kurven wurde auf den Wert von 100% festgesetzt, das untere Plateau wurde für den Fall, dass es sich im F-Test nicht signifikant vom Wert 0% unterschied, auf diesen Wert festgelegt. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterschieden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelversuche. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes bei Austausch der jeweiligen Aminosäure im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor ΔpEC_{0,5,diss} ergibt sich aus der Differenz des pEC_{0,5,diss}-Wertes von W84 am jeweiligen Rezeptor (M_x) und des pEC_{0,5,diss}-Wertes am M₂-Wildtyp-Rezeptor. Die in kursiver Schrift angegebenen Werte wurden von Prilla oder Raasch ermittelt (Raasch, Dissertationsschrift 2003; Prilla, Dissertationsschrift 2006). Wurden die jeweiligen experimentellen Daten nicht erhoben, so ist dies in der entsprechenden Tabellenzelle mit n.b. für nicht bestimmt gekennzeichnet.

W84

Rezeptor	5 mM Na, K, P_i -Puffer, 23°C					3/50 mM Mg-Tris-Puffer, 37°C					10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP, 30°C							
	pK _A [log M]	ΔpK_A (M ₂ – M _x)	p α	n	pK _A + p α	pEC _{0,5,diss} [log M]	pK _A [log M]	ΔpK_A (M ₂ – M _x)	p α	n	pK _A + p α	pEC _{0,5,diss} [log M]	pK _A [log M]	ΔpK_A (M ₂ – M _x)	p α	n	pK _A + p α	pEC _{0,5,diss} [log M]
M ₂ wt	7,47 ± 0,09 7,82 (Prilla)	0	-0,34 ± 0,02 -0,50 (Prilla)	5	7,13	7,62	5,98 ± 0,03	0	-0,63 ± 0,05	3	5,35	5,90	6,60 ± 0,03	0	-1,10 ± 0,05	3	5,50	5,62
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	7,13 ± 0,11	0,48	-1,24 ± 0,02	4	5,89	6,14	5,22 ± 0,02	0,76	-1,36 ± 0,00	3	3,86	4,32	5,78 ± 0,02	0,82	-2,07 ± 0,12	4	3,71	3,92
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	6,27 (Prilla)	1,55 (Prilla)	-0,38 (Prilla)		5,47	5,89 (Prilla)	n.b.						4,76 ± 0,09	1,84	-1,25 ± 0,04	3	3,51	3,91
M ₂ ⁴²³ Thr→His	6,99 ± 0,14	0,34	-0,55 ± 0,01	4	6,44	6,99	5,78 ± 0,04	0,20	-0,72 ± 0,02	3	5,06	5,19	6,18 ± 0,04	0,42	-1,06 ± 0,07	4	5,12	5,27
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	7,46 (Prilla)	0,36 (Prilla)	0,02 (Prilla)		7,48	7,48 (Prilla)	n.b.						5,62 ± 0,08	0,98	-1,02 ± 0,09	5	4,60	5,88
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	6,76 ± 0,07	0,71	-1,27 ± 0,03	3	5,49	5,62	4,20 ± 0,11	1,78	-4,36 ± 0,49	3	-0,16	4,10	5,44 ± 0,06	1,16	-1,49 ± 0,13	4	3,95	3,89
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	5,92 (Prilla)	1,90 (Prilla)	0,01 (Prilla)		5,93	5,92 (Prilla)	n.b.						4,16 ± 0,06	2,44	-0,69 ± 0,10	4	3,47	3,95
M ₅ wt	5,65* ± 0,12	1,82	0,04* ± 0,12	6	5,69	5,67	4,16* ± 0,05*	1,82	-0,21* ± 0,05	3	3,96	3,96	4,17* ± 0,04	2,43	-0,35* ± 0,04	5	3,82	3,82

Tabelle 84: Kenndaten des Einflusses von W84 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM ermittelt nach Filtration am Tomtec-Harvester. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt, deren Ergebnisse gemeinsam mit weiteren Kenndaten der Gleichgewichtsbindungsversuche in Tabelle 93 aufgeführt werden. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden nach der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten EC_{0,5,diss}/α ersetzt wurde. Der EC_{0,5,diss}-Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt, der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Der pK_A-Wert ist der negative dekadische Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des Modulators am jeweiligen Rezeptor. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche berechneten Parameter. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes bei Austausch der jeweiligen Aminosäure im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor ΔpK_A ergibt sich aus der Differenz des pK_A-Wertes am jeweiligen Rezeptor (M_x) und des pK_A-Wertes am M₂-Wildtyp-Rezeptor. Die in kursiver Schrift angegebenen Werte wurden von Prilla ermittelt (Prilla, Dissertationsschrift 2006). Wurden die jeweiligen experimentellen Daten nicht erhoben, so ist dies in der entsprechenden Tabellenzelle mit n.b. für nicht bestimmt gekennzeichnet.

VI.3.2 Gallamin

Gallamin										
Rezeptor	5 mM Na, K, γ -P _i -Puffer, 23°C					10 mM Hepes-Puffer mit 10 μ M GDP, 30°C				
	pEC _{0,5,diss} [log M]	Δ pEC _{0,5,diss} (M ₂ – M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N	pEC _{0,5,diss} [log M]	Δ pEC _{0,5,diss} (M ₂ – M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	7,13 ± 0,06 <i>6,96 (Prilla)</i>	0	-0,97 ± 0,11	5,4 ± 3,6	3	4,44 ± 0,04	0	-1,16 ± 0,09	-3,2 ± 3,1	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	6,68 ± 0,04	0,67	-0,88 ± 0,07	8,1 ^s ± 1,8	3	3,46 ± 0,03	0,98	-1,05 ± 0,07	-0,6 ± 2,5	3-5
M ₂ ⁴²³ Thr→His	6,46 ± 0,04	0,45	-0,97 ± 0,08	12,4 ^s ± 1,8	3	4,77 ± 0,02	-0,33	-1,18 ^s ± 0,07	0,3 ± 1,8	3-5
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	5,36 ± 0,03	1,77	-0,69 ^s ± 0,03	2,2 ± 4,7	3	3,58 ± 0,03	0,86	-1,49 ^s ± 0,15	-1,1 ± 2,8	3-4
M ₅ wt	4,85 ± 0,09	2,28	-0,81 ± 0,17	18,3 ^s ± 4,3	4	2,69 ± 0,05	1,75	-1,45 ^s ± 0,20	-5,9 ± 13,4	3
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	<i>5,93 (Prilla)</i>	<i>1,03 (Prilla)</i>				3,09 ± 0,04	1,35	-1,11 ± 0,08	-9,9 ^s ± 2,5	3
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	<i>6,86 (Prilla)</i>	<i>0,1 (Prilla)</i>				4,83 ± 0,04	-0,39	-0,99 ± 0,08	0,8 ± 2,6	3-4
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	<i>5,79 (Prilla)</i>	<i>1,17 (Prilla)</i>				3,45 ± 0,04	0,99	-1,47 ± 0,15	2,2 ± 3,2	3

Tabelle 85

Gallamin										
Rezeptor	3/50 mM Mg-Tris-Puffer, 23°C					3/50 mM Mg-Tris-Puffer, 37°C				
	pEC _{0,5,diss} [log M]	Δ pEC _{0,5,diss} (M ₂ – M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N	pEC _{0,5,diss} [log M]	Δ pEC _{0,5,diss} (M ₂ – M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	5,15 ± 0,03	0	-1,02 ± 0,07	3,7 ^s ± 1,5	3-4	4,82 ± 0,04	0	-1,07 ± 0,04	-0,3 ± 3,8	3-4
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	4,01 ± 0,06	1,14	-1,07 ± 0,15	8,7 ^s ± 3,1	3	3,85 ± 0,02	0,97	-1,15 ^s ± 0,07	5,8 ± 3,8	3
M ₂ ⁴²³ Thr→His	5,21 ± 0,08	-0,06	-1,03 ± 0,17	10,4 ^s ± 3,6	3	4,66 ± 0,05	0,16	-1,03 ± 0,10	5,1 ± 2,9	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	3,99 ± 0,04	1,16	-1,61 ^s ± 0,18	12,9 ^s ± 3,0	3	3,62 ± 0,04	1,20	-1,17 ± 0,09	-6,7 ± 6,9	3
M ₅ wt	2,77 ± 0,05	2,38	-0,94 ± 0,10	7,1 ± 6,1	3	2,75 ± 0,04	2,07	-0,93 ± 0,09	6,9 ± 5,5	4

Tabelle 86

Tabelle 85 und Tabelle 86: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven der Wirksamkeit von Gallamin in Dissoziationsverzögerungsversuchen. Der pEC_{0,5,diss}-Wert gibt den negativen dekadischen Logarithmus der Modulatorkonzentration an, bei der eine halbmaximale Dissoziationsverzögerung beobachtet wurde. Der Hill-Slope n_H als Charakteristikum der Kurvensteilheit wurde, insofern er im F-Test nicht signifikant verschieden von -1 war, auf diesen Wert festgesetzt. Das obere Plateau der Kurven wurde auf den Wert von 100% festgesetzt, das untere Plateau wurde für den Fall, dass es sich im F-Test nicht signifikant vom Wert 0% unterschied, auf diesen Wert festgelegt. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterschieden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelversuche. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes bei Austausch der jeweiligen Aminosäure im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor Δ pEC_{0,5,diss} ergibt sich aus der Differenz des pEC_{0,5,diss}-Wertes am jeweiligen Rezeptor (M_x) und des pEC_{0,5,diss}-Wertes am M₂-Wildtyp-Rezeptor. Die in kursiver Schrift angegebenen Werte wurden von Prilla ermittelt (Prilla, Dissertationsschrift 2006). Wurden die jeweiligen experimentellen Daten nicht erhoben, so ist dies in der entsprechenden Tabellenzelle mit n.b. für nicht bestimmt gekennzeichnet.

Gallamin																		
Rezeptor	5 mM Na, K, P _i -Puffer, 23°C					3/50 mM Mg-Tris-Puffer, 37°C					10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP, 30°C							
	pK _A [log M]	ΔpK _A (M ₂ – M _x)	pα	n	pK _A + pα	pEC _{0.5,diss} [log M]	pK _A [log M]	ΔpK _A (M ₂ – M _x)	pα	n	pK _A + pα	pEC _{0.5,diss} [log M]	pK _A [log M]	ΔpK _A (M ₂ – M _x)	pα	n	pK _A + pα	pEC _{0.5,diss} [log M]
M ₂ wt	8,83 ± 0,09 7,70 <i>(Prilla)</i>	0	-1,63 ± 0,13 <-2 <i>(Prilla)</i>	3	7,20	7,13	6,67 ± 0,08	0	-1,56 ± 0,05	4	5,11	4,82	6,28 ± 0,10	0	-1,22 ± 0,05	4	5,06	4,44
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	8,11 ± 0,06	0,72	-1,32 ± 0,02	3	6,79	6,68	5,95 ± 0,02	0,72	-1,67 ± 0,11	4	4,28	3,85	5,20 ± 0,07	1,08	-1,28 ± 0,05	4	3,92	3,46
M ₂ ⁴²³ Thr→His	8,95 ± 0,10	-0,12	-2,11 ± 0,23	3	6,84	6,46	6,73 ± 0,03	-0,06	-1,46 ± 0,08	4	5,27	4,66	6,25 ± 0,02	0,03	-1,18 ± 0,03	4	5,07	4,77
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	8,17 ± 0,04	0,66	-2,04 ± 0,05	3	6,13	5,36	5,82 ± 0,07	0,85	-1,70 ± 0,08	3	4,12	3,62	5,23 ± 0,02	1,05	-1,75 ± 0,15	4	3,48	3,58
M ₅ wt	6,16 ± 0,07	2,67	-1,25 ± 0,07	4	4,91	4,85	4,39 ± 0,03	2,28	-1,49 ± 0,05	3	2,90	2,75	3,93 ± 0,06	2,35	-1,08 ± 0,06	4	2,85	2,69
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	<i>6,04 (Prilla)</i>	<i>1,66 (Prilla)</i>	<i>-1,01 (Prilla)</i>		<i>5,03</i>	<i>5,93 (Prilla)</i>	n.b.						4,83 ± 0,02	1,45	-1,46 ± 0,01	3	3,37	3,09
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	<i>6,39 (Prilla)</i>	<i>1,31 (Prilla)</i>	<i>-0,80 (Prilla)</i>		<i>5,59</i>	<i>6,86 (Prilla)</i>	n.b.						5,86 ± 0,03	0,42	-0,76 ± 0,06	3	5,10	4,83
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	<i>6,05 (Prilla)</i>	<i>1,65 (Prilla)</i>	<i>-0,89 (Prilla)</i>		<i>5,16</i>	<i>5,79 (Prilla)</i>	n.b.						4,30 ± 0,05	1,98	-0,72 ± 0,03	3	3,58	3,45

Tabelle 87: Kenndaten des Einflusses von Gallamin auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM ermittelt nach Filtration am Tomtec-Harvester. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt, deren Ergebnisse gemeinsam mit weiteren Kenndaten der Gleichgewichtsbindungsversuche in Tabelle 93 aufgeführt werden. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden nach der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten EC_{0.5,diss}/α ersetzt wurde. Der EC_{0.5,diss}-Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt, der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Der pK_A-Wert ist der negative dekadische Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des Modulators am jeweiligen Rezeptor. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche berechneten Parameter. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes bei Austausch der jeweiligen Aminosäure im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor ΔpK_A ergibt sich aus der Differenz des pK_A-Wertes am jeweiligen Rezeptor (M_x) und des pK_A-Wertes am M₂-Wildtyp-Rezeptor. Die in kursiver Schrift angegebenen Werte wurden von Prilla ermittelt (Prilla, Dissertationsschrift 2006). Wurden die jeweiligen experimentellen Daten nicht erhoben, so ist dies in der entsprechenden Tabellenzelle mit n.b. für nicht bestimmt gekennzeichnet.

VI.3.3 Alcuronium

Alcuronium															
Rezeptor	5 mM Na, K, P _i -Puffer, 23°C					3/50 mM Mg-Tris-Puffer, 37°C					10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP, 30°C				
	pEC _{0,5,diss} [log M]	ΔpEC _{0,5,diss} (M ₂ - M _x)	n _H	unteres Plateau [%]	N	pEC _{0,5,diss} [log M]	ΔpEC _{0,5,diss} (M ₂ - M _x)	n _H	unteres Plateau [%]	N	pEC _{0,5,diss} [log M]	ΔpEC _{0,5,diss} (M ₂ - M _x)	n _H	unteres Plateau [%]	N
M ₂ wt	7,86 ± 0,05	0	-1,05 ± 0,10	0,9 ± 3,7	3	7,00 ± 0,03	0	-1,16 ^s ± 0,09	2,0 ± 2,9	3	6,76 ± 0,04	0	-1,25 ± 0,11	0,1 ± 4,2	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	7,09 ± 0,02	0,77	-1,21 ^s ± 0,07	-2,5 ± 2,1	3	5,40 ± 0,05	1,60	-0,86 ± 0,08	3,9 ± 3,6	3	5,10 ± 0,07	1,66	-0,89 ± 0,13	12,6 ^s ± 3,0	3
M ₂ ⁴²³ Thr→His	7,59 ± 0,03	0,27	-1,27 ^s ± 0,10	2,0 ± 2,4	3-4	6,44 ± 0,03	0,56	-1,01 ± 0,06	0,0 ± 2,2	3	6,49 ± 0,04	0,27	-1,13 ± 0,10	5,1 ± 3,0	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	6,46 ± 0,02	1,40	-1,26 ^s ± 0,06	-2,1 ± 2,1	3	4,89 ± 0,05	2,11	-0,85 ± 0,09	11,5 ± 5,0	3	4,68 ± 0,03	2,08	-0,83 ^s ± 0,05	1,1 ± 0,08	3
M ₅ wt	5,31 ± 0,05	2,55	-0,76 ^s ± 0,06	4,3 ± 6,1	5	3,64 ± 0,06	3,36	-0,98 ± 0,14	21,8 ^s ± 2,9	3	3,26 ± 0,09	3,50	-1,05 ± 0,23	16,8 ^s ± 5,5	3-4
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	7,71 ± 0,04	0,15	-0,88 ± 0,07	4,3 ± 3,5	3	n.b.					6,21 ± 0,04	0,55	-1,14 ± 0,11	-1,9 ± 2,0	3
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	8,63 ± 0,13	-0,77	-1,26 ^s ± 0,04	7,7 ^s ± 2,5	3	n.b.					7,18 ± 0,03	-0,42	-0,98 ± 0,03	-1,9 ± 2,0	3
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	8,04 ± 0,03	-0,18	-1,14 ± 0,08	7,6 ^s ± 1,6	3	n.b.					6,50 ± 0,06	0,26	-0,93 ± 0,12	9,0 ^s ± 3,0	3
M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	n.b.					n.b.					6,28 ± 0,04	0,48	-0,87 ± 0,07	0,8 ± 2,6	3
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Thr	n.b.					n.b.					3,65 ± 0,05	-0,39	-0,93 ± 0,09	2,3 ± 4,6	3
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Ala	n.b.					n.b.					3,22 ± 0,03	0,04	-0,89 ± 0,06	1,8 ± 3,5	3-6

Tabelle 88: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven der Wirksamkeit von Alcuronium in Dissoziationsverzögerungsversuchen. Der pEC_{0,5,diss}-Wert gibt den negativen dekadischen Logarithmus der Modulatorkonzentration an, bei der eine halbmaximale Dissoziationsverzögerung beobachtet wurde. Der Hill-Slope n_H als Charakteristikum der Kurvensteilheit wurde, insofern er im F-Test nicht signifikant verschieden von -1 war, auf diesen Wert festgesetzt. Das obere Plateau der Kurven wurde auf den Wert von 100% festgesetzt, das untere Plateau wurde für den Fall, dass es sich im F-Test nicht signifikant vom Wert 0% unterschied, auf diesen Wert festgelegt. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterschieden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelversuche. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes bei Austausch der jeweiligen Aminosäure im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor ΔpEC_{0,5,diss} ergibt sich aus der Differenz des pEC_{0,5,diss}-Wertes am jeweiligen Rezeptor (M_x) und des pEC_{0,5,diss}-Wertes am M₂-Wildtyp-Rezeptor. Wurden die jeweiligen experimentellen Daten nicht erhoben, so ist dies in der entsprechenden Tabellenzeile mit n.b. für nicht bestimmt gekennzeichnet.

Alcuronium																		
Rezeptor	5 mM Na, K, P _i -Puffer, 23°C					3/50 mM Mg-Tris-Puffer, 37°C					10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP, 30°C							
	pK _A [log M]	ΔpK _A (M ₂ – M _x)	pα	n	pK _A + pα	pEC _{0,5,diss} [log M]	pK _A [log M]	ΔpK _A (M ₂ – M _x)	pα	n	pK _A + pα	pEC _{0,5,diss} [log M]	pK _A [log M]	ΔpK _A (M ₂ – M _x)	pα	n	pK _A + pα	pEC _{0,5,diss} [log M]
M ₂ wt	7,18 ± 0,13	0	0,42 ± 0,14	5	7,60	7,86	6,97 ± 0,26	0	0,40 ± 0,14	4	7,37	7,00	5,83 ± 0,18	0	1,03 ± 0,12	5	6,86	6,76
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	7,13 ± 0,13	0,05	-0,46 ± 0,04	9	6,67	7,09	5,31 ± 0,16	1,66	0,44 ± 0,08	4	5,75	5,40	4,95 ± 0,03	-0,67	0,56 ± 0,05	3	5,51	5,10
M ₂ ⁴²³ Thr→His	7,59* ± 0,07	-0,41	0,002* ± 0,07	4	7,59	7,59	6,36* ± 0,03	0,61	0,07* ± 0,03	3	6,43	6,44	6,50* ± 0,05	0,88	-0,01* ± 0,05	4	6,49	6,49
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	6,45* ± 0,06	0,73	0,01* ± 0,06	3	6,46	6,46	4,86* ± 0,03	2,11	0,03* ± 0,03	3	4,89	4,89	4,83* ± 0,09	1,00	-0,15* ± 0,09	4	4,68	4,68
M ₃ wt	5,49* ± 0,03	1,69	-0,18* ± 0,03	4	5,13	5,31	4,18 ± 0,10	2,79	-0,99 ± 0,05	3	3,19	3,64	3,99 ± 0,04	1,84	-0,76 ± 0,03	4	3,23	3,26
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	8,88 ± 0,09	-1,70	-1,20 ± 0,03	5	7,68	7,71	n.b.						7,17 ± 0,03	-1,34	-1,05 ± 0,06	3	6,12	6,21
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	8,76* ± 0,14	-1,58	-0,13* ± 0,14	7	8,63	8,63	n.b.						7,02* ± 0,04	-1,19	0,16* ± 0,04	4	7,18	7,18
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	8,52* ± 0,07	-1,34	-0,48* ± 0,07	4	8,04	8,04	n.b.						7,27 ± 0,01	-1,44	-1,20 ± 0,10	3	6,07	6,50
M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	n.b.						n.b.						6,69 ± 0,14	-0,76	-0,22 ± 0,04	5	6,47	6,28
M ₃ ⁴⁷⁸ His→Thr	n.b.						n.b.						4,10 ± 0,03	-0,11	-0,65 ± 0,05	4	3,45	3,65
M ₃ ⁴⁷⁸ His→Ala	n.b.						n.b.						4,21 ± 0,04	-0,22	-1,34 ± 0,03	4	2,87	3,22

Tabelle 89: Kenndaten des Einflusses von Alcuronium auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS 0,2 nM ermittelt nach Filtration am Tomtec-Harvester. Die Daten wurden durch nichtlineare Regressionsanalyse nach der Ehlert-Gleichung berechnet. Die dafür erforderlichen Werte der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten K_D für NMS wurden in parallel dazu durchgeführten Experimenten ermittelt, deren Ergebnisse gemeinsam mit weiteren Kenndaten der Gleichgewichtsbindungsversuche in Tabelle 93 aufgeführt werden. Die mit dem Zeichen * versehenen Daten wurden nach der modifizierten Ehlert-Gleichung berechnet, bei der der Wert K_A durch den Quotienten EC_{0,5,diss}/α ersetzt wurde. Der EC_{0,5,diss}-Wert wurde in Dissoziationsverzögerungsexperimenten ermittelt, der jeweilige Mittelwert ist zusätzlich zu den Gleichgewichtsbindungsdaten aufgeführt. Der pK_A-Wert ist der negative dekadische Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des Modulators am jeweiligen Rezeptor. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler der aus der Anzahl der unabhängigen Gleichgewichtsbindungsversuche berechneten Parameter. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes bei Austausch der jeweiligen Aminosäure im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor ΔpK_A ergibt sich aus der Differenz des pK_A-Wertes am jeweiligen Rezeptor (M_x) und des pK_A-Wertes am M₂-Wildtyp-Rezeptor. Wurden die jeweiligen experimentellen Daten nicht erhoben, so ist dies in der entsprechenden Tabellenzelle mit n.b. für nicht bestimmt gekennzeichnet.

VI.3.4 Diallylcaracurin V

Diallylcaracurin V										
Rezeptor	5 mM Na, K, P _i -Puffer, 23°C					10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP, 30°C				
	pEC _{0,5,diss} [log M]	ΔpEC _{0,5,diss} (M ₂ – M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N	pEC _{0,5,diss} [log M]	ΔpEC _{0,5,diss} (M ₂ – M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	7,44 ± 0,04	0	-1,23 ^s ± 0,12	-3,2 ± 4,4	4	6,52 ± 0,03	0	-1,10 ± 0,08	-3,4 ± 2,6	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	6,73 ± 0,03	0,71	-1,74 ^s ± 0,17	-1,3 ± 2,3	3	5,00 ± 0,04	1,52	-0,92 ± 0,08	-2,4 ± 3,2	3-4
M ₂ ⁴²³ Thr→His	7,00 ± 0,02	0,44	-1,57 ^s ± 0,12	0,4 ± 2,2	3	6,08 ± 0,03	0,44	-1,03 ± 0,07	-4,4 ± 2,2	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	5,84 ± 0,06	1,60	-1,00 ± 0,12	6,4 ± 3,2	3	3,98 ± 0,09	2,54	-0,64 ^s ± 0,08	0,8 ± 49,9	3-4
M ₃ wt	5,53 ± 0,06	1,91	-0,88 ± 0,11	8,3 ± 6,2	5	3,61 ± 0,07	2,91	-0,89 ± 0,19	23,4 ± 23,4	3

Tabelle 90

VI.3.5 CARBEM

CARBEM										
Rezeptor	5 mM Na, K, P _i -Puffer, 23°C					10 mM Hepes-Puffer mit 10 µM GDP, 30°C				
	pEC _{0,5,diss} [log M]	ΔpEC _{0,5,diss} (M ₂ – M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N	pEC _{0,5,diss} [log M]	ΔpEC _{0,5,diss} (M ₂ – M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	6,50 ± 0,02	0	-2,03 ^s ± 0,18	2,0 ± 1,8	4	5,37 ± 0,02	0	-1,39 ^s ± 0,08	-0,1 ± 2,3	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	5,83 ± 0,04	0,67	-1,68 ^s ± 0,20	1,9 ± 3,5	3	4,48 ± 0,06	0,89	-1,26 ± 0,16	20,0 ^s ± 3,3	3
M ₂ ⁴²³ Thr→His	6,42 ± 0,04	0,08	-2,84 ^s ± 0,75	8,8 ^s ± 3,0	3	5,51 ± 0,03	-0,14	-1,20 ^s ± 0,09	-3,0 ± 3,2	3-4
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	5,71 ± 0,05	0,79	-1,01 ± 0,12	17,7 ^s ± 2,8	3	4,66 ± 0,05	0,71	-0,82 ± 0,09	33,2 ^s ± 2,2	3
M ₃ wt	5,27 ± 0,18	1,23	-1,11 ± 0,45	49,7 ^s ± 5,4	5	4,31 ± 0,11	1,06	-0,79 ± 0,20	47,1 ^s ± 4,3	3

Tabelle 91

Tabelle 90 und Tabelle 91: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven der Wirksamkeit der Modulatoren Diallylcaracurin V und CARBEM in Dissoziationsverzögerungsversuchen. Die aufgeführten Kenngrößen wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse nach der 4-Parameter-logistischen Gleichung ermittelt. Der pEC_{0,5,diss}-Wert gibt den negativen dekadischen Logarithmus der Modulatorkonzentration an, bei der eine halbmaximale Dissoziationsverzögerung beobachtet wurde. Der Hill-Slope n_H als Charakteristikum der Kurvensteilheit wurde, insofern er im F-Test nicht signifikant verschieden von -1 war, auf diesen Wert festgesetzt. Das obere Plateau der Kurven wurde auf den Wert von 100% festgesetzt, das untere Plateau wurde für den Fall, dass es sich im F-Test nicht signifikant vom Wert 0% unterschied, auf diesen Wert festgelegt. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterschieden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzeleruche. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes bei Austausch der jeweiligen Aminosäure im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor ΔpEC_{0,5,diss} ergibt sich aus der Differenz des pEC_{0,5,diss}-Wertes am jeweiligen Rezeptor (M_x) und des pEC_{0,5,diss}-Wertes am M₂-Wildtyp-Rezeptor.

VI.3.6 Naphmethonium (MM3A)

Naphmethonium										
Rezeptor	5 mM Na, K, ,P _i -Puffer, 23°C					10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP, 30°C				
	pEC _{0,5,diss} [log M]	ΔpEC _{0,5,diss} (M ₂ – M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N	pEC _{0,5,diss} [log M]	ΔpEC _{0,5,diss} (M ₂ – M _x)	n _H	unteres Plateau (MIN) [%]	N
M ₂ wt	9,04 <i>(Prilla)</i>	0 <i>(Prilla)</i>				7,99 ± 0,04	0	-1,06 ± 0,09	-6,7 ^s ± 2,2	3
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	7,73 <i>(Prilla)</i>	1,31 <i>(Prilla)</i>				5,42 ± 0,04	2,59	-1,10 ± 0,10	-3,4 ± 3,9	3-4
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	7,71 <i>(Prilla)</i>	1,33 <i>(Prilla)</i>				6,00 ± 0,04	1,99	-0,87 ± 0,07	4,2 ± 3,3	3-4
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²² Trp→Ala	n.b.					4,65 ± 0,09	3,34	-0,82 ± 0,15	20,0 ^s ± 3,7	3

Tabelle 92: Kenndaten der Konzentrations-Effekt-Kurven der Wirksamkeit von Naphmethonium in Dissoziationsverzögerungsversuchen. Die aufgeführten Kenngrößen wurden mittels nichtlinearer Regressionsanalyse nach der 4-Parameter-logistischen Gleichung ermittelt. Der pEC_{0,5,diss}-Wert gibt den negativen dekadischen Logarithmus der Modulatorkonzentration an, bei der eine halbmaximale Dissoziationsverzögerung beobachtet wurde. Der Hill-Slope n_H als Charakteristikum der Kurvensteilheit wurde, insofern er im F-Test nicht signifikant verschieden von -1 war, auf diesen Wert festgesetzt. Das obere Plateau der Kurven wurde auf den Wert von 100% festgesetzt, das untere Plateau wurde für den Fall, dass es sich im F-Test nicht signifikant vom Wert 0% unterschied, auf diesen Wert festgelegt. Werte für das untere Plateau, die sich im F-Test signifikant vom Wert 0% unterschieden, sind mit dem Zeichen ^s gekennzeichnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler für die Zahl N der unabhängigen Einzelversuche. Der Absolutwert des Affinitätsverlustes bei Austausch der jeweiligen Aminosäure im Vergleich mit dem M₂-Rezeptor ΔpEC_{0,5,diss} ergibt sich aus der Differenz des pEC_{0,5,diss}-Wertes am jeweiligen Rezeptor (M_x) und des pEC_{0,5,diss}-Wertes am M₂-Wildtyp-Rezeptor. Die in kursiver Schrift angegebenen Werte wurden von Prilla ermittelt (Prilla, Dissertationsschrift 2006)

VI.4 CHARAKTERISTIKA DER DURCHGEFÜHRTEN HETEROLOGEN INTERAKTIONSEXPERIMENTE

Nachfolgend aufgeführt finden sich die bei den jeweiligen Gleichgewichtsbindungsexperimenten angewandten Inkubationszeiten, die eingesetzten Radioligandkonzentrationen sowie die in parallel durchgeführten homologen Kompetitionsexperimenten ermittelten K_D -Werte der Membransuspensionen. Sind für eine Versuchsart verschiedene Inkubationszeiten angegeben, so erforderte der nach den ersten Experimenten ermittelte Kurvenverlauf zur besseren Kurvenanpassung den Einsatz höherer Modulatorkonzentrationen, was wiederum längere Inkubationszeiten zur Folge hatte.

Rezeptor	Modulator	Inkubationsmedium	t_{ink} [h]	pK_D [log M]	pR_L [log M]
M ₂ wt	W84	5 mM NaK 23°C	3,5-5	9,751	9,711
M ₂ wt	W84	3/50 mM MgT 37°C	3,5	9,693	9,718
M ₂ wt	W84	10 mM Hepes 30°C	3	9,640	9,709
M ₂ wt	Gallamin	5 mM NaK 23°C	3	9,870	9,714
M ₂ wt	Gallamin	3/50 mM MgT 37°C	2	9,693	9,718
M ₂ wt	Gallamin	10 mM Hepes 30°C	1-2	9,640	9,710
M ₂ wt	Alcuronium	5 mM NaK 23°C	8	9,942	9,718
M ₂ wt	Alcuronium	3/50 mM MgT 37°C	4	9,693	9,712
M ₂ wt	Alcuronium	10 mM Hepes 30°C	9	9,640	9,709
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	W84	5 mM NaK 23°C	15	10,014	9,707
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	W84	3/50 mM MgT 37°C	3,5	9,673	9,718
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	W84	10 mM Hepes 30°C	3	9,387	9,709
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	Gallamin	5 mM NaK 23°C	3	9,713	9,703
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	Gallamin	3/50 mM MgT 37°C	2	9,673	9,718
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	Gallamin	10 mM Hepes 30°C	3	9,387	9,709
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	Alcuronium	5 mM NaK 23°C	8	9,660	9,707
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	Alcuronium	3/50 mM MgT 37°C	4	9,673	9,712
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln	Alcuronium	10 mM Hepes 30°C	9	9,342	9,700
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	W84	10 mM Hepes 30°C	3-7	9,517	9,637
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	Gallamin	10 mM Hepes 30°C	2	9,554	9,680
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	Alcuronium	5 mM NaK 23°C	24	10,750	9,645
M ₂ ⁴²² Trp→Ala	Alcuronium	10 mM Hepes 30°C	2-5	9,517	9,637
M ₂ ⁴²³ Thr→His	W84	5 mM NaK 23°C	6-8	9,725	9,717
M ₂ ⁴²³ Thr→His	W84	3/50 mM MgT 37°C	3,5	9,713	9,712
M ₂ ⁴²³ Thr→His	W84	10 mM Hepes 30°C	2	9,587	9,710
M ₂ ⁴²³ Thr→His	Gallamin	5 mM NaK 23°C	3	10,220	9,705
M ₂ ⁴²³ Thr→His	Gallamin	3/50 mM MgT 37°C	2	9,713	9,713
M ₂ ⁴²³ Thr→His	Gallamin	10 mM Hepes 30°C	2	9,577	9,710
M ₂ ⁴²³ Thr→His	Alcuronium	5 mM NaK 23°C	8-15	10,014	9,710
M ₂ ⁴²³ Thr→His	Alcuronium	3/50 mM MgT 37°C	6	9,743	9,713

Rezeptor	Modulator	Inkubations- medium	t _{ink} [h]	pK _D [log M]	pR _L [log M]
M ₂ ⁴²³ Thr→His	Alcuronium	10 mM Hepes 30°C	2	9,551	9,716
M ₂ ⁴²³ Thr→Ala	Alcuronium	10 mM Hepes 30°C	3	9,442	9,637
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	W84	10 mM Hepes 30°C	6-9	9,839	9,638
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	Gallamin	10 mM Hepes 30°C	3	9,517	9,637
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	Alcuronium	5 mM NaK 23°C	24	10,379	9,673
M ₂ ⁴²⁷ Trp→Ala	Alcuronium	10 mM Hepes 30°C	12	9,885	9,638
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	W84	5 mM NaK 23°C	9	10,370	9,710
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	W84	3/50 mM MgT 37°C	5,5-8	9,776	9,720
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	W84	10 mM Hepes 30°C	2	9,625	9,709
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	Gallamin	5 mM NaK 23°C	5	10,368	9,714
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	Gallamin	3/50 mM MgT 37°C	3	9,776	9,721
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	Gallamin	10 mM Hepes 30°C	2	9,625	9,709
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	Alcuronium	5 mM NaK 23°C	9	10,203	9,695
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	Alcuronium	3/50 mM MgT 37°C	5	9,760	9,716
M ₂ ¹⁷⁷ Tyr→Gln + ⁴²³ Thr→His	Alcuronium	10 mM Hepes 30°C	9	9,625	9,704
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	W84	10 mM Hepes 30°C	8	9,612	9,639
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	Gallamin	10 mM Hepes 30°C	6	9,454	9,641
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	Alcuronium	5 mM NaK 23°C	24	10,140	9,645
M ₂ ⁴²² Trp→Ala + ⁴²⁷ Trp→Ala	Alcuronium	10 mM Hepes 30°C	6	9,454	9,641
M ₅ wt	W84	5 mM NaK 23°C	15-24	9,981	9,708
M ₅ wt	W84	3/50 mM MgT 37°C	8	9,581	9,720
M ₅ wt	W84	10 mM Hepes 30°C	9	9,566	9,715
M ₅ wt	Gallamin	5 mM NaK 23°C	29	10,120	6,698
M ₅ wt	Gallamin	3/50 mM MgT 37°C	7	9,581	9,720
M ₅ wt	Gallamin	10 mM Hepes 30°C	8	9,566	9,703
M ₅ wt	Alcuronium	5 mM NaK 23°C	24	9,885	9,712
M ₅ wt	Alcuronium	3/50 mM MgT 37°C	12	9,721	9,704
M ₅ wt	Alcuronium	10 mM Hepes 30°C	18	9,530	9,702
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Thr	Alcuronium	10 mM Hepes 30°C	7-12	9,291	9,634
M ₅ ⁴⁷⁸ His→Ala	Alcuronium	10 mM Hepes 30°C	12	9,514	9,633

Tabelle 93: Charakteristika der durchgeführten Gleichgewichtsbindungsexperimente. Die untersuchten Inkubationsbedingungen sind in der Tabelle mit Kurzbezeichnungen aufgeführt: 5 mM NaK 23°C bezeichnet 5 mM Na, K, P_i-Puffer bei 23°C, 3/50 mM MgT 37°C steht für 3/50 mM Mg-Tris-Puffer bei 37°C, und 10 mM Hepes 30°C für 10 mM Hepes-Puffer mit 10 μM GDP-Zusatz bei 30°C. Angegeben ist die jeweilige Inkubationszeit t_{ink} der durchgeführten Experimente, der negative dekadische Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des orthosterischen Liganden NMS (pK_D), sowie der negative dekadische Logarithmus des Mittelwertes der jeweils eingesetzten molaren Konzentration des orthosterischen Liganden [³H]NMS (pR_L).

VII LITERATURVERZEICHNIS

- Albrecht M. Singulärer N⁺/Si-Austausch im Molekülgerüst allosterischer Modulatoren vom Alkanbisammonium-Typ: Konsequenzen für die Interaktion mit muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren. Dissertationsschrift. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Universität Bonn. 2005.
- Baldwin RL. How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys J* 1996; (71): 2056-2063.
- Barlow R, Blake JF. Hill coefficients and the logistic equation. *Trends Pharmacol Sci* 1989; (10): 440-441.
- Bennet JP, Yamamura HI. Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding methods. Neurotransmitter receptor binding. New York: Raven Press, 1985; 2. ed., 2. print: 61-89.
- Birdsall NJ, Lazareno S. Allosterism at muscarinic receptors: ligands and mechanisms. *Mini Rev Med Chem* 2005; (5): 523-543.
- Block GA, Martin KJ, de Francisco AL, Turner SA, Avram MM, Suranyi MG, Hercz G, Cunningham J, Abu-Alfa AK, Messa P, Coyne DW, Locatelli F, Cohen RM, Evenepoel P, Moe SM, Fournier A, Braun J, McCary LC, Zani VJ, Olson KA, Druke TB, Goodman WG. Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* 2004; (350): 1516-1525.
- Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 1987; (237): 527-532.
- Bonner TI, Young AC, Brann MR, Buckley NJ. Cloning and expression of the human and rat m₅ muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* 1988; (1): 403-410.
- Buller S. Identifizierung von Rezeptorepitopen für die Subtyp-selektive Interaktion allosterischer Modulatoren mit muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren anhand von Mutagenese-Untersuchungen. Dissertationsschrift. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Universität Bonn. 2002.
- Buller S, Zlotos DP, Mohr K, Ellis J. 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* 2002; (61): 160-168.
- Burgmer U, Schulz U, Tränkle C, Mohr K. Interaction of Mg²⁺ with the allosteric site of muscarinic M₂ receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; (357): 363-370.
- Caulfield MP, Birdsall NJ. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 1998; (50): 279-290.
- Cheng Y, Prusoff WH. Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 1973; (22): 3099-3108.
- Christopoulos A, Lanzafame A, Mitchelson F. Allosteric interactions at muscarinic cholinergic receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1998; (25): 185-194.
- Christopoulos A. Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2002; (1): 198-210.
- Christopoulos A, May LT, Avlani VA, Sexton PM. G-protein-coupled receptor allosterism: the promise and the problem(s). *Biochem Soc Trans* 2004; (32): 873-877.

-
- Clark AL, Mitchelson F. The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. *Br J Pharmacol* 1976; (58): 323-331.
- Daiss JO, Duda-Johner S, Burschka C, Holzgrabe U, Mohr K, Tacke R. N⁺/Si Replacement as a tool for probing the pharmacophore of allosteric modulators of muscarinic M₂ receptors: Synthesis, Allosteric Potency, and Positive Cooperativity of Silicon-Based W84 Derivatives. *Organometallics* 2002; (21): 803-811.
- DeBlasi A, O'Reilly K, Motulsky HJ. Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci* 1989; (10): 227-229.
- Dittmann A. Untersuchungen zur Topologie der Interaktion atypischer allosterischer Modulatoren mit dem M₂-Acetylcholin-Rezeptor. Dissertationsschrift. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Universität Bonn. 2003.
- Dong GZ, Kameyama K, Rinken A, Haga T. Ligand binding properties of muscarinic acetylcholine receptor subtypes (m₁-m₅) expressed in baculovirus-infected insect cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; (274): 378-384.
- Dorje F, Levey AI, Brann MR. Immunological detection of muscarinic receptor subtype proteins (m₁-m₅) in rabbit peripheral tissues. *Mol Pharmacol* 1991; (40): 459-462.
- Duda-Johner S. Neuartige Silicium-haltige allosterische Modulatoren als hochpotente atypische Förderer der Gleichgewichtsbindung eines orthosterischen Liganden an muskarinischen M₂-Acetylcholin-Rezeptoren. Dissertationsschrift. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Universität Bonn. 2002.
- Eglen RM. Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog Med Chem* 2005; (43): 105-136.
- Eglen RM. Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol* 2006; (26): 219-233.
- Ehlert FJ. Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol* 1988; (33): 187-194.
- Ellis J, Huyler J, Brann MR. Allosteric regulation of cloned m₁-m₅ muscarinic receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* 1991; (42): 1927-1932.
- Ellis J, Seidenberg M, Brann MR. Use of chimeric muscarinic receptors to investigate epitopes involved in allosteric interactions. *Mol Pharmacol* 1993; (44): 583-588.
- Ellis J, Seidenberg M. Interactions of alcuronium, TMB-8, and other allosteric ligands with muscarinic acetylcholine receptors: studies with chimeric receptors. *Mol Pharmacol* 2000; (58): 1451-1460.
- Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 1981; (23): 175-182.
- Gnagey AL, Seidenberg M, Ellis J. Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 1999; (56): 1245-1253.
- Hill AV. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol (Proc)* 1910; (40): 4-7.
- Holzgrabe U, Mohr K. Allosteric modulators of ligand binding to muscarinic acetylcholine receptors. *Drug Discovery Today* 1998; (3): 214-222.

- Horstman DA, Brandon S, Wilson AL, Guyer CA, Cragoe EJ Jr., Limbird LE. An aspartate conserved among G-protein receptors confers allosteric regulation of alpha 2-adrenergic receptors by sodium. *J Biol Chem* 1990; (265): 21590-21595.
- Hou X, Wehrle J, Menge W, Ciccarelli E, Wess J, Mutschler E, Lambrecht G, Timmerman H, Waelbroeck M. Influence of monovalent cations on the binding of a charged and an uncharged ('carbo'-)muscarinic antagonist to muscarinic receptors. *Br J Pharmacol* 1996; (117): 955-961.
- Huang XP, Prilla S, Mohr K, Ellis J. Critical amino acid residues of the common allosteric site on the M₂ muscarinic acetylcholine receptor: more similarities than differences between the structurally divergent agents gallamine and bis(ammonio)alkane-type hexamethylene-bis-[dimethyl-(3-phthalimidopropyl)ammonium]dibromide. *Mol Pharmacol* 2005; (68): 769-778.
- Hulme EC, Birdsall NJ, Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; (30): 633-673.
- Hulme EC, Lu ZL, Saldanha JW, Bee MS. Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans* 2003; (31): 29-34.
- Jakubík J, Bačáková L, El-Fakahany EE, Tuček S. Subtype selectivity of the positive allosteric action of alcuronium at cloned M₁-M₅ muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; (274): 1077-1083.
- Jakubík J, Bačáková L, El-Fakahany EE, Tuček S. Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 1997; (52): 172-179.
- Jensen AA, Spalding TA. Allosteric modulation of G-protein coupled receptors. *Eur J Pharm Sci* 2004; (21): 407-420.
- Joehren K, Holtje HD. A model of the human M₂ muscarinic acetylcholine receptor. *J Comput Aided Mol Des* 2002; (16): 795-801.
- Kawashima K, Fujii T. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front Biosci* 2004; (9): 2063-2085.
- Kostenis E, Mohr K. Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation. *Trends Pharmacol Sci* 1996; (17): 280-283.
- Krejčí A, Tuček S. Changes of cooperativity between N-methylscopolamine and allosteric modulators alcuronium and gallamine induced by mutations of external loops of muscarinic M₃ receptors. *Mol Pharmacol* 2001; (60): 761-767.
- Krejčí A, Tuček S. Quantitation of mRNAs for M₁ to M₅ subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. *Mol Pharmacol* 2002; (61): 1267-1272.
- Krejčí A, Michal P, Jakubík J, Ricny J, Doležal V. Regulation of signal transduction at M₂ muscarinic receptor. *Physiol Res* 2004; (53 Suppl 1): S131-S140.
- Kubo T, Maeda A, Sugimoto K, Akiba I, Mikami A, Takahashi H, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K. Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett* 1986; (209): 367-372.
- Langmead CJ, Christopoulos A. Allosteric agonists of 7TM receptors: expanding the pharmacological toolbox. *Trends Pharmacol Sci* 2006; (27): 475-481.

-
- Lazareno S, Birdsall NJ. 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* 1995; (48): 362-378.
- Lazareno S, Popham A, Birdsall NJ. 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* 2000; (58): 194-207.
- Lazareno S, Popham A, Birdsall NJ. Analogs of WIN 62,577 define a second allosteric site on muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* 2002; (62): 1492-1505.
- Lazareno S, Doležal V, Popham A, Birdsall NJ. Thiochrome enhances acetylcholine affinity at muscarinic M₄ receptors: receptor subtype selectivity via cooperativity rather than affinity. *Mol Pharmacol* 2004; (65): 257-266.
- Lee NH, Hu J, El-Fakahany EE. Modulation by certain conserved aspartate residues of the allosteric interaction of gallamine at the m₁ muscarinic receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; (262): 312-316.
- Leppik RA, Miller RC, Eck M, Paquet JL. Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m₂ muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* 1994; (45): 983-990.
- Lüllmann H, Ohnesorge FK, Schauwecker GC, Wassermann O. Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *Eur J Pharmacol* 1969; (6): 241-247.
- Matsui H, Lazareno S, Birdsall NJ. Probing of the location of the allosteric site on m₁ muscarinic receptors by site-directed mutagenesis. *Mol Pharmacol* 1995; (47): 88-98.
- Mohr K, Trankle C, Holzgrabe U. Structure/activity relationships of M₂ muscarinic allosteric modulators. *Receptors Channels* 2003; (9): 229-240.
- Molenaar PC, Polak RL. Acetylcholine synthesizing enzymes in frog skeletal muscle. *J Neurochem* 1980; (35): 1021-1025.
- Motulsky H, Christopoulos A. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. A practical guide to curve fitting. San Diego 2003.
- Mundry T. Einbrennsilikonisierung bei pharmazeutischen Glaspackmitteln – analytische Studien eines Produktionsprozesses. Dissertationsschrift. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Humboldt-Universität Berlin. 1999.
- Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev* 2003; (55): 597-606.
- Okada T, Sugihara M, Bondar AN, Elstner M, Entel P, Buss V. The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure. *J Mol Biol* 2004; (342): 571-583.
- Okayama H, Berg P. A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1983; (3): 280-289.
- Okuma Y, Nomura Y. Roles of muscarinic acetylcholine receptors in interleukin-2 synthesis in lymphocytes. *Jpn J Pharmacol* 2001; (85): 16-19.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le TI, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. Crystal structure of rhodopsin: A G protein coupled receptor. *Science* 2000; (289): 739-745.

- Peacock M, Bilezikian JP, Klassen PS, Guo MD, Turner SA, Shoback D. Cinacalcet hydrochloride maintains long-term normocalcemia in patients with primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; (90): 135-141.
- Pedder EK, Eveleigh P, Poyner D, Hulme EC, Birdsall NJ. Modulation of the structure-binding relationships of antagonists for muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *Br J Pharmacol* 1991; (103): 1561-1567.
- Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Ramachandran J, Capon DJ. Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature* 1988; (334): 434-437.
- Prilla S. Muskarinische Acetylcholinrezeptoren: Identifizierung einer Kernregion für allosterisch-orthosterische Rezeptorinteraktionen. Dissertationsschrift. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Universität Bonn. 2006.
- Prilla S, Schrobang J, Ellis J, Holtje HD, Mohr K. Allosteric interactions with muscarinic acetylcholine receptors: complex role of the conserved tryptophan M₂⁴²²Trp in a critical cluster of amino acids for baseline affinity, subtype selectivity, and cooperativity. *Mol Pharmacol* 2006; (70): 181-193.
- Raasch A. Allosterische Modulation an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren des Subtyps M₂: Identifizierung essentieller Strukturelemente für Förderer der N-Methylscopolamin-Bindung vom Alkan-bisammonium-Typ. Dissertationsschrift. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Universität Bonn. 2003.
- Raasch A, Scharfenstein O, Tränkle C, Holzgrabe U, Mohr K. Elevation of ligand binding to muscarinic M₂ acetylcholine receptors by bis(ammonio)alkane-type allosteric modulators. *J Med Chem* 2002; (45): 3809-3812.
- Schröter A, Tränkle C, Mohr K. Modes of allosteric interactions with free and [³H]N-methylscopolamine-occupied muscarinic M₂ receptors as deduced from buffer-dependent potency shifts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; (362): 512-519.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, (74): 5463-5467.
- Sieghart W. GABA_A receptors: ligand-gated Cl⁻ ion channels modulated by multiple drug-binding sites. *Trends Pharmacol Sci* 1992; (13): 446-450.
- Staschen CM. Einfluss der Temperatur auf die Bindungseigenschaften der muskarinischen Cholinrezeptoren in Herzen und in Hirnen des Meerschweinchens für das Hexamethonium-Derivat W84. Verlag Shaker Aachen 1994.
- Tang MX, Redemann CT, Szoka FC, Jr. In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug Chem* 1996; (7): 703-714.
- Tränkle C, Dittmann A, Schulz U, Weyand O, Buller S, Jöhren K, Heller E, Birdsall NJ, Holzgrabe U, Ellis J, Holtje HD, Mohr K. Atypical muscarinic allosteric modulation: cooperativity between modulators and their atypical binding topology in muscarinic M₂ and M₂/M₅ chimeric receptors. *Mol Pharmacol* 2005; (68): 1597-1610.
- Tränkle C, Kostenis E, Burgmer U, Mohr K. Search for lead structures to develop new allosteric modulators of muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; (279): 926-933.
- Tuček S, Musílková J, Nedoma J, Proška J, Shelkovnikov S, Vorlíček J. Positive cooperativity in the binding of alcuronium and N-methylscopolamine to muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* 1990; (38): 674-680.

-
- Vogel R, Fan GB, Sheves M, Siebert F. Salt dependence of the formation and stability of the signaling state in G protein-coupled receptors: evidence for the involvement of the Hofmeister effect. *Biochemistry* 2001; (40): 483-493.
- Voigtländer A. Kooperative Interaktionen an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren: Suche nach essentiellen Aminosäuren der allosterischen Bindungsstelle von M₂-Rezeptoren. Dissertationsschrift. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät. Universität Bonn. 2003.
- Voigtländer U, Joehren K, Mohr M, Raasch A, Tränkle C, Buller S, Ellis J, Hoeltje HD, Mohr K. 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* 2003; (64): 21.
- Waelbroeck M, Boufrahi A, Elouakili A, Poloczek P. Allosteric effects of cations on muscarinic receptors. *Life Sciences* 1997; (60): 1174.
- Wess J. Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci* 1993; (14): 308-313.
- Zlotos DP, Buller S, Tränkle C, Mohr K. Bisquaternary caracurine V derivatives as allosteric modulators of ligand binding to M₂ acetylcholine receptors. *Bioorg Med Chem Lett* 2000; (10): 2529-2532.

VIII VERÖFFENTLICHUNGEN

Abstrakta/Kongressmitteilungen

Strassmann, V., Mohr, K. (2004): Dependence on receptor epitopes of a muscarinic allosteric agent under different buffer conditions. *Programm und Abstraktbuch der DPhG-Jahrestagung Regensburg (ISBN 3-00-014723-3)*: P P27.

Strassmann, V., Mohr, K. (2005): Dependence on receptor epitopes of muscarinic allosteric agents under different buffer conditions. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 371 (Suppl 1): 84.

Strassmann, V., Mohr, K. (2006): Dependence of a muscarinic allosteric agent on epitopes of orthosteric ligand-free receptors under different buffer conditions. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 372 (Suppl 1): 85.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe eine Promotionsarbeit anzufertigen. Seine hervorragende Betreuung und seine wissenschaftlichen Ratschläge haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

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

Herrn Prof. Dr. Dieter O. Fürst und Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde möchte ich herzlich für ihre Mitwirkung in der Prüfungskommission danken.

Herrn PD Dr. Christian Tränkle danke ich für seine Hilfestellung in labortechnischen Fragen und Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion.

Meinem Vater, Frau PD Dr. Ursula Müller-Breitenkamp und Dr. Marion Mohr-Andrä danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bei allen Mitgliedern der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie möchte ich mich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Den Newmanhäuslern danke ich für ihre Hilfe und Freundschaft.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Geduld, die wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.