

**Bindungstopografie  
allosterisch/orthosterischer Hybridagonisten  
an M<sub>2</sub>-Acetylcholinrezeptoren**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Johannes Antony

aus Bitburg

Bonn im November 2007



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

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Mohr

Zweitgutachter: Prof. Dr. Eberhard Schlicker

Fachnaher Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Jaehde

Fachangrenzender Gutachter: Prof. Dr. Rainer Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 08.02.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2008



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



<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren.....	1
1.2	Allosterische Modulation .....	3
1.3	Therapeutische Aspekte der allosterischen Modulation .....	8
1.4	Die Entwicklung der allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen .....	10
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit .....	13
<b>2</b>	<b>Methoden und Materialien .....</b>	<b>15</b>
2.1	Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe ...	15
2.1.1	Herstellung einer Membransuspension.....	15
2.1.2	Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry .....	16
2.2	Membransuspensionen aus transfizierten COS7-Zellen .....	16
2.2.1	Molekularbiologische Arbeiten .....	17
2.2.2	Zellbiologische Arbeiten.....	19
2.2.3	Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford .....	23
2.3	Radioligand-Bindungsstudien .....	24
2.3.1	Massenwirkungsgesetz.....	24
2.3.2	Homologe Konkurrenz.....	25
2.3.3	Heterologe Konkurrenz .....	29
2.3.4	Allosterische Interaktion.....	32
2.3.5	Kinetik der Radioligandbindung .....	40
2.3.6	Durchführung der Untersuchungen.....	43
2.4	Statistische Methoden .....	53
2.5	Materialien .....	56
2.5.1	Geräte und Apparaturen .....	56
2.5.2	Verbrauchsmaterialien .....	57
2.5.3	Reagenzien.....	58
2.5.4	Verwendete Lösungen und Puffer.....	59
2.5.5	Auflistung der Herstellerfirmen.....	60
2.5.6	Computerprogramme .....	61
2.6	Strukturformeln der eingesetzten Verbindungen.....	62
2.6.1	Radioliganden .....	62
2.6.2	Antagonisten an Muskarinrezeptoren .....	63

2.6.3	Agonisten an Muskarinrezeptoren.....	64
2.6.4	Allosterische Modulatoren an Muskarinrezeptoren .....	65
2.6.5	Muskarinische allosterisch/orthosterische Hybridsubstanzen .....	66
2.6.6	Nukleotide .....	67
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>69</b>
3.1	<b>Bindungseigenschaften der Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe.....</b>	<b>69</b>
3.2	<b>Bindungseigenschaften der Membransuspensionen aus transfizierten COS7-Zellen .....</b>	<b>74</b>
3.3	<b>Abhängigkeit der Ligand-Bindung von der G-Protein-Kopplung porciner M<sub>2</sub>-Rezeptoren .....</b>	<b>78</b>
3.3.1	GDP-Empfindlichkeit der [ <sup>3</sup> H]OxoM-Bindung .....	78
3.3.2	Nukleotid-Effekt in [ <sup>3</sup> H]NMS-Agonist-Kompetitionsexperimenten....	79
3.4	<b>Untersuchungen zur Kinetik der [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren .....</b>	<b>86</b>
3.5	<b>Interaktion von DDT-5 mit [<sup>3</sup>H]NMS an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren .....</b>	<b>91</b>
3.6	<b>Inhibitionsexperimente mit dem Radioagonisten [<sup>3</sup>H]OxoM und dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren .....</b>	<b>92</b>
3.7	<b>Abhängigkeit der Ligand-Bindung von der G-Protein-Kopplung in COS7-Zellen exprimierter humaner M<sub>2</sub>-Rezeptoren .....</b>	<b>98</b>
3.8	<b>Kinetik der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation an M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin-Mutanten .....</b>	<b>100</b>
3.9	<b>Verzögerung der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation durch allosterisch/ orthosterische Hybridsubstanzen .....</b>	<b>104</b>
3.9.1	DDT-5 .....	106
3.9.2	MMH5-6 .....	109
3.10	<b>Beeinflussung der Affinität orthosterischer Agonisten durch M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin und allosterische Epitope .....</b>	<b>112</b>
3.10.1	Acetylcholin.....	113
3.10.2	Oxotremorin M .....	118
3.10.3	Iperoxo .....	120
3.10.4	Pilocarpin .....	124
3.11	<b>Beeinflussung der Affinität allosterischer Modulatoren durch M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin .....</b>	<b>128</b>

3.11.1	W84 .....	128
3.11.2	SH30 .....	131
3.11.3	Naphmethonium.....	132
3.11.4	EHW477 .....	135
<b>3.12</b>	<b>Bindungstopografie der allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen an M<sub>2</sub>-Rezeptoren.....</b>	<b>137</b>
3.12.1	DDT-5 .....	138
3.12.2	MMH5-6 .....	145
<b>3.13</b>	<b>M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität von Hexamethonium .....</b>	<b>151</b>
<b>3.14</b>	<b>Beeinflussung der McN-A-343-Affinität durch M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan .....</b>	<b>153</b>
<b>3.15</b>	<b>Beeinflussung der Atropin-Affinität durch M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan.....</b>	<b>155</b>
<b>3.16</b>	<b>Beeinflussung der Methoctramin-Affinität durch M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin, M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan .....</b>	<b>156</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>161</b>
4.1	G-Protein-Kopplung der porcinen M <sub>2</sub> -Rezeptoren .....	161
4.2	G-Protein-Kopplung der in COS7-Zellen exprimierten Muskarinrezeptoren .....	162
4.3	Kurvenanpassung bei [ <sup>3</sup> H]NMS-Agonist-Kompetitions- experimenten.....	163
4.4	Befunde zur Kinetik der [ <sup>3</sup> H]OxoM-Dissoziation an porcinen M <sub>2</sub> -Rezeptoren .....	165
4.5	Epitopabhängigkeit der Bindung der allosterisch/ortho- sterischen Hybridsubstanzen an [ <sup>3</sup> H]NMS-besetzte Rezeptoren...	167
4.6	Epitopabhängigkeit der Bindung orthosterischer Agonisten an M <sub>2</sub> -Rezeptoren .....	169
4.7	Epitopabhängigkeit der Bindung allosterischer Modulatoren an M <sub>2</sub> -Rezeptoren .....	175
4.8	Hybrid-Bindungstopografie der allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen.....	178
4.9	Anwendung eines Bindungsmodells für allosterisch/ orthosterische Hybridliganden .....	181
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>187</b>

<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>191</b>
<b>7</b>	<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>199</b>
7.1	Wissenschaftliche Originalarbeiten.....	199
7.2	Abstrakta/Kongressmitteilungen .....	199

# 1 Einleitung

Die Wirkungen des Neurotransmitters Acetylcholin können nach Dale (1914) eingeteilt werden in Muskarin-artige Wirkungen, die durch Atropin aufgehoben werden können, und Nikotin-artige Wirkungen, die durch Curare antagonisiert werden können. Später stellte sich heraus, dass die Effekte des Acetylcholins über zwei verschiedenartige Rezeptoren vermittelt werden, nämlich die muskarinischen und die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren. Bei den nikotinischen Acetylcholinrezeptoren handelt es sich um Ligand-gesteuerte Ionenkanäle, die im Gehirn, in den vegetativen Ganglien und an der neuromuskulären Endplatte lokalisiert sind.

## 1.1 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Die muskarinischen Acetylcholinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Der Rezeptorantagonist Pirenzepin bot Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts erstmals die Möglichkeit, auf Bindungsebene zwischen Muskarinrezeptoren aus dem Herzen und solchen aus dem Gehirn zu differenzieren (Hammer et al., 1980). Dies deutete auf das Vorhandensein von verschiedenen Muskarinrezeptor-Subtypen hin. In den folgenden Jahren konnten in Klonierungsstudien 5 verschiedene Muskarinrezeptor-Subtypen nachgewiesen werden (Kubo et al., 1986a, b; Bonner et al., 1987, 1988; Peralta et al., 1987). Die Subtypen M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub> weisen jeweils eine eigenständige Verteilung im zentralen und peripheren Nervensystem auf (Hulme et al., 1990; Caulfield, 1993; Caulfield und Birdsall, 1998; Eglén, 2005): M<sub>1</sub>-Rezeptoren werden vor allem von neuronalen Zellen exprimiert. Eine hohe M<sub>1</sub>-Rezeptordichte weisen Cortex und Hippocampus auf. M<sub>2</sub>-Rezeptoren werden in der Peripherie als vorherrschender Muskarinrezeptor-Subtyp von Herzgewebe exprimiert. Darüber hinaus kommen M<sub>2</sub>-Rezeptoren in verschiedenen Gehirngebieten und an der glatten Muskulatur vor. M<sub>3</sub>-Rezeptoren werden in der Peripherie von glatter Muskulatur und exokrinen Drüsen exprimiert, außerdem gibt es M<sub>3</sub>-Rezeptoren im ZNS. M<sub>4</sub>-Rezeptoren werden vor allem im ZNS exprimiert, hier besonders im Striatum. Eine Expression von M<sub>5</sub>-Rezeptoren, die als letzter Subtyp kloniert worden sind, gibt es im ZNS, jedoch ist die Rezeptordichte hier im Vergleich zu den anderen Muskarinrezeptor-Subtypen

gering (Wess, 2003).  $M_5$ -Rezeptoren werden u.a. exprimiert von Dopaminneuronen der Substantia nigra.

Als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren handelt es sich bei den Muskarinrezeptoren um Proteine, die die Zellmembran mit 7 transmembranären Domänen (TM1-TM7) durchziehen. Aus diesem Aufbau ergibt sich das Vorhandensein von 3 extrazellulären (e1-3) sowie 3 intrazellulären Schleifen (i1-i3). Das aminoterminal Ende des Proteins mit potenziellen N-Glykosilierungsstellen befindet sich extrazellulär, das C-terminale Ende intrazellulär. Charakteristisch für alle Muskarinrezeptor-Subtypen ist eine sehr große 3. intrazelluläre Schleife (i3), die wichtig für die Spezifität der G-Protein-Kopplung ist (Wess, 1993). Hinsichtlich ihrer Signaltransduktion können die Muskarinrezeptor-Subtypen in zwei Gruppen eingeteilt werden: Die Subtypen  $M_1$ ,  $M_3$  und  $M_5$  sind über  $G_q$ -Proteine an eine Aktivierung der Phospholipase C gekoppelt. Diese Aktivierung führt zu einer verstärkten Bildung von Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) und schließlich zu einem Ansteigen der intrazellulären Calcium-Konzentration. Die Aktivierung der Subtypen  $M_2$  und  $M_4$  führt über  $G_i$ -Proteine zu einer Hemmung der Adenylatcyclase und damit zu einem Absinken der intrazellulären Konzentration an cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Außerdem kann es durch Aktivierung von  $M_2$ - bzw.  $M_4$ -Rezeptoren zu einer verlängerten Öffnungsdauer von Kalium- sowie unselektiven Kationen-Kanälen kommen (Eglen, 2005).

Die Aktivierung von muskarinischen Acetylcholinrezeptoren in der Peripherie führt zu den typischen Wirkungen des parasympathischen Nervensystems wie der Kontraktion glatter Muskulatur, der Sekretion exokriner Drüsen oder der Verlangsamung des Herzschlags. Muskarinrezeptoren im ZNS sind an einer Vielzahl von kognitiven, sensorischen und motorischen Funktionen beteiligt (Wess, 2004). Nach der Entdeckung verschiedener Muskarinrezeptor-Subtypen wurde versucht, bestimmten Subtypen physiologische Funktionen zuzuordnen. Eine solche Zuordnung ist erschwert worden durch einen Mangel an Subtyp-selektiven Agonisten bzw. Antagonisten und die Tatsache, dass in den meisten Organen bzw. nativen Geweben mehrere Muskarinrezeptor-Subtypen exprimiert werden. Fortschritte in der Beschreibung der physiologischen Funktionen einzelner Subtypen sind durch den Einsatz von Knockout-Mäusen erzielt worden, in denen das Gen eines oder mehrerer Muskarinrezeptor-Subtypen ausgeschaltet worden ist (Wess, 2003; Wess, 2004):  $M_1$ -Rezeptor-Knockout-Mäuse zeigten eine

Hyperaktivität, die auf eine vermehrte Dopamin-Freisetzung im Striatum zurückgeführt wurde. Aus diesem Befund ergibt sich eventuell eine Perspektive für den Einsatz von  $M_1$ -Rezeptorantagonisten in der Parkinson-Behandlung. An isolierten Vorhöfen aus  $M_2$ -Rezeptor-Knockout-Mäusen konnte durch den Muskarinrezeptoragonisten Carbachol keine Bradykardie ausgelöst werden. Durch den zentral wirksamen Agonisten Oxotremorin können bei Wildtypmäusen Tremor, Akinesie und ein analgetischer Effekt ausgelöst werden. Oxotremorin-vermittelter Tremor und Akinesie wurden durch Ausschaltung des  $M_2$ -Rezeptors aufgehoben, der analgetische Effekt des Oxotremorin war stark vermindert. Aus den Befunden ergibt sich eine mögliche Anwendung von  $M_2$ -Agonisten als Analgetika oder zur Verlangsamung der Herzfrequenz. Bei  $M_3$ -Rezeptor-Knockout-Mäusen zeigte sich eine reduzierte Futteraufnahme, eine verminderte Kontraktion glatter Muskulatur durch den Agonisten Carbachol und eine verminderte Speichelsekretion.  $M_4$ -Rezeptor-Knockout-Mäuse wiesen eine vermehrte motorische Aktivität auf, die mit einem inhibitorischen Effekt von normalerweise im Striatum vorhandenen  $M_4$ -Rezeptoren auf Dopaminneurone erklärt wird. Bei Mäusen, bei denen sowohl der  $M_2$ - als auch der  $M_4$ -Rezeptor ausgeschaltet worden waren, zeigte sich ein vollständiges Fehlen des analgetischen Effekts von Oxotremorin. Der Anteil des  $M_2$ -Rezeptors am analgetischen Effekt des Oxotremorins war dabei größer als der Anteil des  $M_4$ -Rezeptors.  $M_5$ -Rezeptoren, die vom Endothel zerebraler Arterien exprimiert werden, erwiesen sich in Knockout-Studien als Mediatoren des vasodilatierenden Effekts des Acetylcholins. Außerdem war bei striatalem Gewebe von  $M_5$ -Rezeptor-Knockout-Mäusen die Dopamin-freisetzende Wirkung des Oxotremorins vermindert. Dieser Befund wird mit dem Fehlen von die Dopamin-Freisetzung erleichternden  $M_5$ -Heterorezeptoren erklärt.

## 1.2 Allosterische Modulation

Allosterische Liganden binden an von der klassischen, orthosterischen Bindungsstelle topografisch verschiedene Bindungsstellen an Rezeptorproteinen wie Enzymen, Ligand-gesteuerten Ionenkanälen oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Auf diese Weise sind allosterische Liganden in der Lage, die Bindung eines orthosterischen Liganden, aber auch die Rezeptoraktivität zu modulieren (Christopoulos und Kenakin, 2002; Christopoulos, 2002). Bei der orthosterischen

Bindungsstelle handelt es sich um die Bindungsstelle des endogenen Agonisten eines Rezeptors bzw. um die Substratbindungsstelle eines Enzyms. Eine allosterische Beeinflussung wurde erstmals entdeckt bei Enzymen, deren biologische Aktivität durch Bindung von Liganden an von der Substrat-Bindungs-tasche verschiedene Bindungsstellen verändert werden kann. Die meisten Ligand-gesteuerten Ionenkanäle weisen neben der Agonist- bzw. Neurotransmitter-Bindungsstelle weitere Haftareale auf, über die die Aktivität des Rezeptors allosterisch moduliert werden kann (Krušek et al., 2004). Für eine Reihe G-Protein-gekoppelter Rezeptoren sind in den letzten Jahren allosterische Modulatoren entdeckt worden, u.a. für  $\alpha_{1A}$ - und  $\alpha_{1B}$ -Adrenozeptoren (Leppik und Birdsall, 2000; Leppik et al., 2000), Adenosin-Rezeptoren (Gao und Ijzerman, 2000; Gao et al., 2001; Ijzerman et al., 2001), Dopamin-D<sub>2</sub>-Rezeptoren (Hoare und Strange, 1996) und muskarinische Acetylcholinrezeptoren.

Eine allosterische Interaktion von Testsubstanzen an G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kann sowohl in Radioligand-Bindungsstudien (Christopoulos und Kenakin, 2002) als auch in funktionellen Experimenten untersucht werden (Lanzafame et al., 1997; Ehlert, 2005). Da allosterische Liganden an ein von der orthosterischen Bindungsstelle topografisch verschiedenes Haftareal binden, ist für sie eine Beeinflussung der Assoziation und Dissoziation eines orthosterischen Liganden charakteristisch. An Muskarinrezeptoren führen allosterische Modulatoren in der Regel zu einer Hemmung der Assoziation und Verzögerung der Dissoziation (Mohr et al., 2003). In Dissoziationsexperimenten, in denen die orthosterische Bindungsstelle eines Rezeptors mit einem Radioorthoster besetzt ist, z.B. im Falle von Muskarinrezeptoren mit [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin ([<sup>3</sup>H]NMS), kann die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit einer allosterisch bindenden Testsubstanz untersucht werden. Die Beeinflussung der Gleichgewichtsbindung eines Orthosters ergibt sich als Ergebnis aus dem Ausmaß der Assoziations-hemmung und Dissoziationsverzögerung durch den Modulator (siehe Kapitel 2.3.4). Allosterische Liganden zeigen in Gleichgewichts-Bindungsexperimenten ein von kompetitiven orthosterischen Liganden abweichendes Bindungsverhalten: Häufig zeigt sich eine submaximale Inhibition der Orthoster-Bindung, da der allosterische Modulator nicht mit dem Orthoster um die gleiche Bindungsstelle konkurriert. Durch das Prinzip der allosterischen Modulation ist eine Förderung der Orthoster-Bindung möglich. Eine solche Förderung der Orthoster-Bindung, auch

als positive Kooperativität bezeichnet, ist ein besonderer Effekt mancher allosterischer Modulatoren und kann nicht durch eine kompetitive Interaktion an der orthosterischen Bindungsstelle erreicht werden. Neben der Beeinflussung der Bindung kann auch die intrinsische Aktivität orthosterischer Agonisten wie Pilocarpin moduliert werden (Zahn et al., 2002).

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren waren die ersten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, bei denen eine Beeinflussung durch allosterische Modulatoren gefunden wurde. Lüllmann et al. (1969) publizierten mit einer allosterischen Interaktion an Muskarinrezeptoren im Einklang stehende Befunde: In Organbadexperimenten mit antagonistischen Alkan-Bisammonium-Verbindungen wie W84 ergab sich gegenüber dem Agonisten Carbachol eine einem Maximum entgegengesetzte Verschiebung der Agonist-Dosis-Wirkungskurve. Clark und Mitchelson (1976) fanden ebenfalls in Organbadexperimenten einen sättigbaren antagonistischen Effekt von Gallamin gegenüber Acetylcholin bzw. Carbachol, der auf eine andere als eine kompetitive Interaktion mit diesen Agonisten hindeutete. Mit dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin wurde es möglich, die Interaktion von Gallamin mit Muskarinrezeptoren auf molekularer Ebene zu untersuchen. Sowohl in Gleichgewichts- als auch in Dissoziationsexperimenten zeigte das Bindungsverhalten von Gallamin eine allosterische Interaktion an (Stockton et al., 1983). Das ternäre Komplexmodell nach Ehlert (1988) erklärte die Beeinflussung der Bindung orthosterischer Liganden durch allosterische Modulatoren auf Basis einer möglichen Bildung von ternären Komplexen aus Rezeptor, orthosterischem Liganden und allosterischem Modulator. Tuček et al. (1990) berichteten erstmals über eine Förderung der [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung an Muskarinrezeptoren durch Alcuronium, einen nur durch eine allosterische Interaktion möglichen Effekt.

An allen 5 Muskarinrezeptor-Subtypen kann die Bindung orthosterischer Liganden durch allosterische Modulatoren verändert werden. Dabei zeigen die meisten allosterischen Modulatoren die höchste Affinität zum M<sub>2</sub>-Rezeptor und die niedrigste Affinität zum M<sub>5</sub>-Rezeptor (Ellis et al., 1991; Jakubík et al., 1995). Für von ihrer chemischen Struktur her unterschiedliche allosterische Modulatoren ist an Muskarinrezeptoren eine „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ („common allosteric site“) gefunden worden (Ellis und Seidenberg, 1992; Waelbroeck, 1994). Die allosterische Bindungsstelle befindet sich im Bereich der extrazellulären Schleifen des Rezeptorproteins oberhalb der orthosterischen Bindungsstelle

(Leppik et al., 1994; Proška und Tuček, 1994), die im Bereich der transmembranären Domänen lokalisiert ist (Wess, 1993).

Neben der Modulation der Bindung eines orthosterischen Liganden und der Modulation der intrinsischen Aktivität eines orthosterischen Agonisten gibt es noch einen weiteren Mechanismus, über den allosterische Modulatoren die Rezeptorfunktion beeinflussen können, nämlich direkten allosterischen Agonismus (Langmead und Christopoulos, 2006). Für den  $M_1$ -prävalenten Partialagonisten AC-42 wurde eine von der Carbachol-, also orthosterischen Bindungsstelle, unabhängige Aktivierung des  $M_1$ -Rezeptors gezeigt (Spalding et al., 2002) sowie in Radioligand-Bindungsstudien ein typisch allosterisches Bindungsverhalten (Langmead et al., 2006). Die intrinsische Aktivität des Partialagonisten McN-A-343 an  $M_2$ -Rezeptoren wurde durch Epitope der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ beeinflusst und die Substanz interagiert in Radioligand-Bindungsstudien mit [ $^3$ H]NMS allosterisch (May et al., 2007b). Sur et al. (2003) zeigten, dass N-Desmethylozapin  $M_1$ -Rezeptoren über eine von der Acetylcholin-Bindungsstelle verschiedene, also allosterische Bindungsstelle aktiviert.

Durch Mutagenese-Studien konnten einzelne Aminosäuren identifiziert werden, die Bestandteil der allosterischen Bindungsstelle von Muskarinrezeptoren sind. Bei diesen Epitopen handelt es sich in der Mehrzahl um Aminosäuren aus dem Bereich der 2. und 3. extrazellulären Schleife bzw. aus dem Übergangsbereich zur 7. transmembranären Domäne des Rezeptorproteins. Leppik et al. (1994) zeigten, dass es bei Mutation einer Sequenz aus 4 Aminosäuren im Bereich der 2. extrazellulären Schleife des  $M_2$ -Rezeptors, von denen 3 saure Aminosäuren waren, zu einem deutlichen Affinitätsverlust von Gallamin kam. Matsui et al. (1995) identifizierten in einer breit angelegten Mutagenese-Studie unter anderem die in den Muskarinrezeptor-Subtypen konservierten Epitope  $M_1^{101}$ Tryptophan und  $M_1^{400}$ Tryptophan als wichtig für die Gallamin-Bindung an sowohl freie, nicht Orthoster-besetzte Rezeptoren als auch [ $^3$ H]NMS-besetzte  $M_1$ -Rezeptoren.

Da allosterische Modulatoren in der Regel die größte Subtyp-Selektivität zwischen  $M_2$ - und  $M_5$ -Rezeptor aufweisen, ist mit chimären  $M_2/M_5$ -Rezeptoren sowie punktmutierten Rezeptoren untersucht worden, welche Bereiche des Rezeptorproteins bzw. welche Aminosäuren für diese  $M_2/M_5$ -Selektivität verantwortlich sind. [ $^3$ H]NMS-Dissoziations-Experimente mit chimären  $M_2/M_5$ -Rezeptoren, in denen Teile der Aminosäuresequenz des für allosterische Modulatoren niedrigaffinen  $M_5$ -

Rezeptors gegen den hochaffinen  $M_2$ -Rezeptor ausgetauscht worden waren, deuteten auf das Vorhandensein von wichtigen Epitopen für die Allosterbindung im Bereich der 2. extrazellulären Schleife und 7. transmembranären Domäne, also in der Nähe der 3. extrazellulären Schleife, hin (Ellis und Seidenberg, 2000). Als Ergebnis der Untersuchung von chimären  $M_2/M_5$ -Rezeptoren und punktmutierten  $M_2$ -Rezeptoren konnte die  $M_2/M_5$ -Selektivität der Bindung allosterischer Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ bzw. Caracurin V-Typ an [ $^3$ H]NMS-besetzte Rezeptoren durch  $M_2^{423}$ Threonin und ein noch genauer zu identifizierendes Epitop im Bereich der 2. extrazellulären Schleife des  $M_2$ -Rezeptors erklärt werden (Buller et al., 2002). Voigtländer et al. (2003) zeigten mit Hilfe von punktmutierten  $M_2$ -Rezeptoren, in denen einzelne Aminosäuren gegen die korrespondierenden Aminosäuren im  $M_5$ -Rezeptor ausgetauscht worden waren, dass die  $M_2/M_5$ -Selektivität der genannten Modulatoren vollständig auf die beiden Epitope  $M_2^{177}$ Tyrosin im Bereich der 2. extrazellulären Schleife und das zuvor schon identifizierte  $M_2^{423}$ Threonin zurückzuführen war. Darüber hinaus führte eine Mutation von  $M_2^{177}$ Tyrosin und  $M_2^{423}$ Threonin zu einem Affinitätsverlust von Alkan-Bisammonium-Typ-Modulatoren bzw. Diallylcaracurin V bei der Interaktion mit freien, nicht Orthoster-besetzten  $M_2$ -Rezeptoren.

Im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje (Pharmazeutisches Institut, Universität Düsseldorf) durchgeführte Andock-Simulationen in einem dreidimensionalen Modell des  $M_2$ -Rezeptors führten zur Hypothese, dass das dem  $M_2^{423}$ Threonin benachbarte  $M_2^{422}$ Tryptophan wichtig für die Bindung allosterischer Modulatoren sein könnte. Bei Mutation von  $M_2^{422}$ Tryptophan bzw.  $M_5^{477}$ Tryptophan kam es zu einem deutlichen Affinitätsverlust bei der Bindung allosterischer Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ und von Gallamin an sowohl freie als auch [ $^3$ H]NMS-besetzte Rezeptoren (Prilla et al., 2006). Diese beiden Tryptophane korrespondieren zu dem oben genannten  $M_1^{400}$ Tryptophan (Matsui et al., 1995). Offenbar ist dieses Epitop also für die Subtyp-unabhängige Basisaffinität allosterischer Modulatoren wichtig.

Mit [ $^3$ H]Dimethyl-W84 ist ein hochaffiner Radioligand für die „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ des  $M_2$ -Rezeptors entwickelt worden, mit dem es möglich ist, kompetitive Interaktionen allosterischer Modulatoren an dieser Bindungsstelle zu untersuchen (Tränkle et al., 1998a). Es zeigte sich, dass die durch direkte Messung mit [ $^3$ H]Dimethyl-W84 bestimmten Affinitätsparameter allo-

sterischer Modulatoren in guter Übereinstimmung mit den aus der indirekten Messung mit dem Radioorthoster [<sup>3</sup>H]NMS bestimmten Parametern waren, d.h. das Kooperativitätsmodell der allosterischen Interaktion wurde durch den Einsatz des Radioallosters [<sup>3</sup>H]Dimethyl-W84 bestätigt (Tränkle et al., 1999; Tränkle et al., 2003).

Radioligand-Bindungsstudien sowie Molecular Modelling-Untersuchungen mit dem Modulator Duo3 und einem allosterisch wirksamen Tacrin-Dimer ergaben, dass die „gemeinsame allosterische Bindungsstelle“ des M<sub>2</sub>-Rezeptors in 2 Domänen unterteilt werden kann, wobei die eine Domäne nahe dem Eingang zur orthosterischen Bindungsstelle lokalisiert ist und die zweite Domäne in größerem Abstand zur orthosterischen Bindungsstelle (Tränkle et al., 2005).

### **1.3 Therapeutische Aspekte der allosterischen Modulation**

Das Prinzip der allosterischen Modulation bietet gegenüber der klassischen kompetitiven Interaktion an der orthosterischen Bindungsstelle mit Rezeptoragonisten oder Rezeptorantagonisten eine Reihe von Vorteilen (Christopoulos und Kenakin, 2002; Christopoulos, 2002; Birdsall und Lazareno, 2005; Wess, 2005). Die Wirkung eines allosterischen Modulators, der die Bindung des endogenen Rezeptoragonisten fördert bzw. hemmt und damit die Rezeptor-vermittelten funktionellen Effekte verstärkt bzw. antagonisiert, ist sättigbar. Der Maximaleffekt eines allosterischen Modulators wird bestimmt durch die Kooperativität mit dem orthosterischen Liganden, d.h. durch das Ausmaß der gegenseitigen Beeinflussung der Bindungsneigung. Bei Besetzung aller allosterischen Bindungsstellen durch den Modulator wird ein maximaler allosterischer Effekt erreicht, während die Wirkung eines orthosterischen Liganden prinzipiell durch Erhöhung seiner Konzentration immer weiter gesteigert werden kann. Aus dem allosterischen Wirkmechanismus ergibt sich eine verminderte Gefahr einer Überdosierung und eventuell die Möglichkeit, mit hohen Dosen des Modulators einen Depoteffekt zu erzielen: Auf diese Weise könnte über längere Zeit die therapeutisch gewünschte Beeinflussung eines Rezeptors erreicht werden ohne die Gefahr einer zu starken Stimulation bzw. Inhibition der Rezeptorfunktion wie bei hohen Dosen eines orthosterischen Liganden.

Durch allosterische Modulation der Bindung des endogenen Agonisten eines Rezeptors könnte eine der physiologischen Situation besser entsprechende Beeinflussung dieses Rezeptors erreicht werden als mit der Dauerstimulation durch einen orthosterischen Agonisten: Der allosterische Modulator würde die Wirkung des endogenen Agonisten nur dann verstärken, wenn der Agonist physiologisch ausgeschüttet wurde. Somit bliebe das räumliche und zeitliche Muster der Neurotransmitterwirkung erhalten und die Signaltransduktion würde durch den allosterischen Modulator spezifisch verstärkt.

Im Vergleich zur orthosterischen Bindungsstelle sind allosterische Bindungsstellen G-Protein-gekoppelter Rezeptoren innerhalb von Rezeptor-Subtypen in ihrer Aminosäuresequenz typischerweise weniger konserviert (Wess, 2005; Gao und Jacobson, 2006). Allosterische Bindungsstellen könnten daher von Rezeptoragonisten bzw. -antagonisten, die auch an die orthosterische Bindungsstelle binden, als zusätzliche Haftpunkte am Rezeptor genutzt werden, um Subtyp-Selektivität zu erlangen (Messer, 2004). Aufgrund des besonderen Wirkmechanismus allosterischer Modulatoren ist darüber hinaus eine besondere Art der Selektivität innerhalb von Rezeptor-Subtypen möglich, eine sogenannte „absolute Subtyp-Selektivität“ (Birdsall et al., 1997; Lazareno et al., 1998): Ein allosterischer Modulator könnte die Bindung des endogenen Agonisten an einem Rezeptor-Subtyp spezifisch fördern, während die Bindung an den anderen Subtypen nicht beeinflusst würde. Diese besondere Form der Subtyp-Selektivität ist Folge der kooperativen Interaktion eines Modulators mit einem orthosterischen Liganden, also der möglichen Bildung von ternären Komplexen aus Rezeptor, orthosterischem Liganden und allosterischem Modulator, und ist durch eine kompetitive Interaktion an der orthosterischen Bindungsstelle nicht erreichbar.

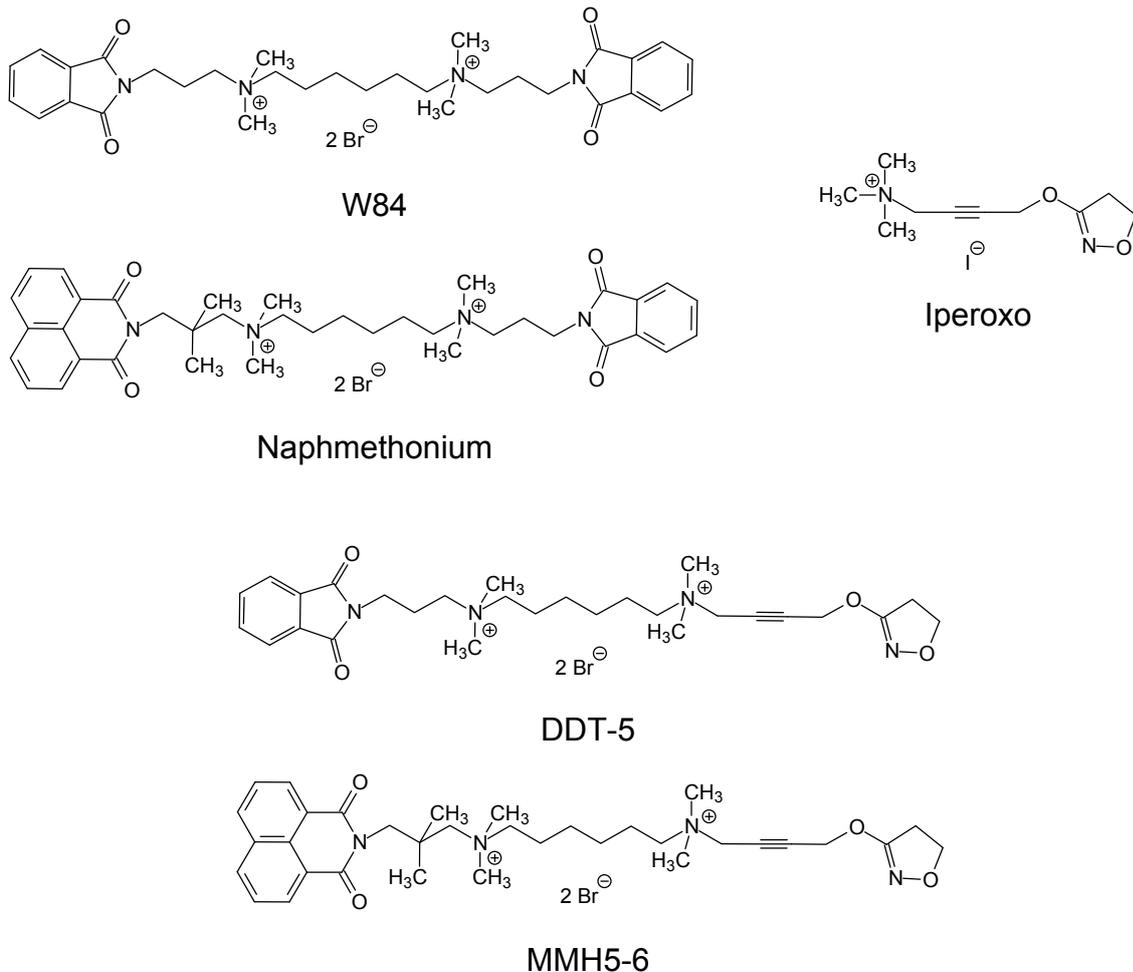
Das allosterische Wirkprinzip ist verwirklicht in der Arzneistoffgruppe der Benzodiazepine, die die Bindung von  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, bei denen es sich um Ligand-gesteuerte Ionenkanäle handelt, fördern. Ein anerkannter Vorteil der Benzodiazepine ist die relative Sicherheit bei einer Überdosierung. Mit Cinacalcet (Mimpara<sup>®</sup>) ist mittlerweile der erste allosterische Modulator eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors als Arzneistoff zugelassen worden. Cinacalcet wirkt am Calcium-sensitiven Rezeptor der Nebenschilddrüse, indem es die Empfindlichkeit des Rezeptors gegenüber extrazellulärem Calcium erhöht und damit die Parathormon-Ausschüttung vermindert (Nagano und

Nemeth, 2005). Die Substanz ist indiziert zur Behandlung des sekundären Hyperparathyreoidismus.

## **1.4 Die Entwicklung der allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen**

Die orthosterische Bindungsstelle von Muskarinrezeptoren befindet sich im Bereich der transmembranären Domänen des Rezeptorproteins, während die allosterische Bindungsstelle im Bereich der extrazellulären Schleifen lokalisiert ist. Die allosterische Bindungsstelle weist im Vergleich eine größere Variabilität der Aminosäuresequenz auf als die orthosterische Bindungsstelle, an die an allen 5 Muskarinrezeptor-Subtypen der Neurotransmitter Acetylcholin bindet (Hulme et al., 1990; Wess, 1993; Eglén, 2005). Um zu Subtyp-selektiven Agonisten bzw. Antagonisten zu gelangen, erscheint daher eine zusätzliche Interaktion von Liganden, die ihre agonistische bzw. antagonistische Wirkung über die orthosterische Bindungsstelle vermitteln, mit der allosterischen Bindungsstelle als möglicher Mechanismus. Portoghese (1989) beschrieb die Entwicklung von bivalenten Opioid-Rezeptorantagonisten, deren Subtyp-Selektivität durch zwei mögliche Mechanismen erklärt wurde: Durch gleichzeitige Bindung an zwei Opioid-, also orthosterische Bindungsstellen, oder durch gleichzeitige Bindung an eine Opioid- sowie eine „akzessorische“, also allosterische Bindungsstelle. Green et al. (1996) untersuchten die Bindungstopografie des  $\beta_2$ -Rezeptoragonisten Salmeterol und erklärten die lange Wirksamkeit mit einer „verankerten Bindung“ am  $\beta_2$ -Rezeptor, bei der die Substanz neben der Interaktion mit der orthosterischen Bindungsstelle mit ihrer Seitenkette mit einer weiteren „Exo-Bindungsstelle“ interagiert. Befunde von Tränkle et al. (1998b) legten nahe, dass der  $M_2$ -prävalente Antagonist AF-DX 384 neben der für die antagonistische Wirkung wichtigen Interaktion mit der orthosterischen Bindungsstelle seine Subtyp-selektivität durch eine Interaktion mit der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ des  $M_2$ -Rezeptors gewinnt. Rajeswaran et al. (2001) synthetisierten eine Reihe von dimeren Muskarinrezeptoragonisten. Molecular Modelling-Untersuchungen wiesen auf eine mögliche gleichzeitige Interaktion des hochaffinsten Agonisten mit der Acetylcholin-Bindungsstelle und einer „akzessorischen“ Bindungsstelle des  $M_1$ -Rezeptors hin. Steinfeld et al. (2007) entwickelten einen

M<sub>2</sub>-prävalenten Muskarinrezeptorantagonisten. Ergebnisse von Interaktionsstudien mit typischen allosterischen Modulatoren sowie mit verkürzten Derivaten des Antagonisten deuteten auf eine Interaktion mit der orthosterischen und der „gemeinsamen allosterischen Bindungsstelle“ des M<sub>2</sub>-Rezeptors hin. Die Subtypselektivität des Antagonisten wurde auf die allosterische Interaktion zurückgeführt. Bei den von Tränkle et al. (1998b) und Steinfeld et al. (2007) vorgestellten M<sub>2</sub>-Rezeptor-Liganden handelte es sich um Antagonisten. Ein neuer Ansatz, um zu Subtyp-selektiven muskarinischen Agonisten zu gelangen, ist die Entwicklung von Hybridsubstanzen, die aus einem von einem allosterischen Modulator abgeleiteten Molekülteil und einem Teil eines klassischen, nicht Subtyp-selektiven Agonisten bestehen. Für die Synthese solcher Hybridsubstanzen im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. De Amici (Universität Mailand) wurde als allosterischer Molekülteil ein Fragment der allosterischen Modulatoren W84 bzw. Naphmethonium gewählt (siehe Abb. 1). Von diesen Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ ist bekannt, dass sie eine M<sub>2</sub>-Prävalenz der Bindung an freie bzw. [<sup>3</sup>H]NMS-besetzte Muskarinrezeptoren aufweisen. Als orthosterischer Molekülteil, der mit dem allosterischen Molekülteil kovalent verbunden wurde, wurden die nicht Subtyp-selektiven muskarinischen Agonisten Oxotremorin, Oxotremorin M bzw. Derivate dieser Agonisten, die ebenfalls im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. De Amici synthetisiert worden waren, gewählt. Die auf diese Weise erhaltenen Hybridsubstanzen zeigten in Organbadexperimenten eine antagonistische Wirkung bzw. in funktionellen GTP $\gamma$ S-Bindungsexperimenten an M<sub>2</sub>-Rezeptoren teilweise eine partialagonistische Wirkung (Disingrini et al., 2006). Der orthosterische Molekülteil der Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6, die im Rahmen dieser Arbeit in Radioligand-Bindungsstudien untersucht wurden, ist abgeleitet von dem klassischen Agonisten Iperoxo (siehe Abb. 1).



**Abb. 1:** Strukturformeln der allosterischen Modulatoren W84 und Naphmethonium, des orthosterischen Agonisten Iperoxo sowie der allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6.

Iperoxo ist ein Derivat des Oxotremorin M, das in Organbadexperimenten mit den Subtypen  $M_1$ ,  $M_2$  und  $M_3$  gegenüber Oxotremorin M eine erhöhte Wirksamkeit und eine volle intrinsische Aktivität, jedoch wie Oxotremorin M keine Subtypselektivität gezeigt hatte (Dallanoce et al., 1999; Barocelli et al., 2000; Barocelli et al., 2001). Die beiden Hybridsubstanzen mit einem Iperoxo-Anteil, also DDT-5 und MMH5-6, hatten sich im Gegensatz zu den von Disingrini et al. (2006) untersuchten Hybridsubstanzen in  $GTP\gamma S$ -Bindungsexperimenten (Schmalenbach, Dissertation 2006) und Organbadexperimenten (Dallanoce et al., unpublizierte Ergebnisse) als Vollagonisten erwiesen. Würden die Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 eine allosterisch/orthosterische Hybrid-Bindungstopografie aufweisen, könnten sie durch eine Interaktion mit der allosterischen Bindungsstelle Subtyp-Selektivität

gewinnen, während durch eine Interaktion mit der orthosterischen Bindungsstelle die Rezeptoraktivierung ausgelöst würde.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit bei den Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 an M<sub>2</sub>-Rezeptoren eine allosterisch/orthosterische Hybrid-Bindungstopografie vorlag und ob sich hieraus eine M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität der Bindung ergab. In Radioligand-Bindungsstudien wurden innerhalb der allosterischen und innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle punktmutierte M<sub>2</sub>-Rezeptoren eingesetzt um zu erörtern, ob die Affinität der Hybridsubstanzen von sowohl allosterischen Epitopen als auch einem orthosterischen Epitop beeinflusst wurde. Subtyp-selektive M<sub>2</sub>-Agonisten könnten als Analgetika oder zur Verlangsamung der Herzfrequenz bei nur geringer Beeinflussung der Herzkraft therapeutisch eingesetzt werden.

### **1.5 Zielsetzung dieser Arbeit**

Hauptziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Bindungstopografie der aus einem von einem allosterischen Modulator abgeleiteten Molekülteil und einem von dem orthosterischen Agonisten Iperoxo abgeleiteten Molekülteil aufgebauten allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 an M<sub>2</sub>-Rezeptoren. In Radioligand-Bindungsstudien mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin ([<sup>3</sup>H]NMS) wurde das Konzept der Hybridsubstanzen, die mit dem Ziel einer besonderen, nämlich allosterisch/orthosterischen Bindungstopografie entwickelt worden waren, auf molekularer Ebene überprüft. Hierzu wurden in Gleichgewichts-Bindungsexperimenten mit [<sup>3</sup>H]NMS, in denen die Bindung an freie, nicht Orthoster-besetzte Rezeptoren betrachtet wird, innerhalb der allosterischen Bindungsstelle punktmutierte Rezeptoren sowie Punktmutanten des orthosterischen Epitops M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin eingesetzt. Es sollte geprüft werden, inwieweit es bei der Bindung der Hybridsubstanzen zu einer Interaktion mit der allosterischen und orthosterischen Bindungsstelle kommt. Im Vergleich zu DDT-5 und MMH5-6 wurde das Bindungsverhalten klassischer Agonisten wie Iperoxo an diesen Mutanten untersucht. Bei den klassischen Agonisten wurde geprüft, ob deren Affinität durch Mutation von Epitopen der allosterischen Bindungsstelle beeinflusst wurde. Da in den Hybridsubstanzen ein allosterischer Molekülteil vom Alkan-Bisammonium-Typ enthalten ist, wurde als Vergleich außerdem das

Bindungsverhalten allosterischer Modulatoren dieses Typs an Punktmutanten des orthosterischen Epitops M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin charakterisiert. Hierdurch wurde geprüft, ob die Affinität allosterischer Modulatoren durch Mutation dieses orthosterischen Epitops verändert wurde. Im Vergleich zu den klassischen Agonisten Acetylcholin und Iperoxo wurde die M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität der Bindung der allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen an freie Rezeptoren ermittelt.

In Dissoziationsexperimenten, in denen die Bindung an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzte Rezeptoren betrachtet wird, wurde die für eine allosterische Interaktion typische dissoziationsverzögernde Wirkung der Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 untersucht. Es wurde geprüft, ob die Hybridsubstanzen bei der Bindung an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzte Rezeptoren eine M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität aufwiesen und in ihrer Affinität von Epitopen beeinflusst wurden, die als wichtig für die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit allosterischer Modulatoren identifiziert worden waren.

## 2 Methoden und Materialien

### 2.1 Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe

#### 2.1.1 Herstellung einer Membransuspension

Für einen Teil der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Radioligand-Bindungsstudien wurden aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe gewonnene  $M_2$ -Rezeptoren eingesetzt. Die porcinen  $M_2$ -Rezeptoren weisen eine sehr große Homologie zur Aminosäuresequenz des humanen  $M_2$ -Rezeptors auf (Peralta et al., 1987) und das Gewebe des Hausschwein-Herzventrikels enthält von den muskarinischen Acetylcholinrezeptoren fast ausschließlich den Subtyp  $M_2$ , der bei verschiedenen Säugetieren der vorherrschende Muskarinrezeptor-Subtyp im Herzgewebe ist (Brodde und Michel, 1999). Die zur Herstellung einer  $M_2$ -Rezeptor-Membransuspension vorgesehenen frischen Schweineherzen wurden im Schlachthof Köln abgeholt und in Form von ca. 40 g schweren Stücken bis zur Membranpräparation bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Alle Schritte der Membranpräparation wurden in einer Kühlkammer bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt. Zunächst wurde eines der eingefrorenen Stücke aufgetaut, mit einem Wiegemesser möglichst fein zerteilt und mit einer 0,32-molaren Saccharose-Lösung (L11; Zusammensetzung der Lösungen: siehe Kapitel 2.5.4) gewaschen, um anhaftende Blutreste zu entfernen. Danach erfolgte eine weitere Zerkleinerung mittels eines Waring-Blendor-Homogenisators (G29, fünfmal 10 sec auf Stufe „high“). Die erhaltene Suspension wurde mit Saccharose-Lösung auf ca. 800 ml aufgefüllt und mit Hilfe eines elektrisch betriebenen Glashomogenisators (G22, 1750 rpm) homogenisiert. Nun wurde ein Zentrifugationsschritt (G5, 1500 rpm, 11 min) zur Abtrennung Partikel hoher Dichte durchgeführt. Der Überstand wurde einem weiteren Zentrifugationsschritt (G5, 32000 rpm, 41 min) zur Abtrennung der rezeptorhaltigen Membranfragmente zugeführt. Die erhaltenen „Pellets“ wurden in Aqua dest. aufgenommen, in Portionen zu 1 ml aliquotiert und bis zur Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### **2.1.2 Bestimmung des Proteingehalts nach Lowry**

Zur Bestimmung des Proteingehalts der ersten im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Membransuspension aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe (Verlust der übrigen Membransuspensionen vor der Bestimmung des Proteingehalts aufgrund eines technischen Defekts) wurde die Methode nach Lowry et al. (1951) angewendet (siehe Kapitel 3.1, Tab. 7 bzw. Tab. 8). Bei dieser Methode kommt es zunächst durch Zugabe einer alkalischen Kupfer(II)-sulfat-Lösung zu dem Proteingemisch zur Bildung eines Komplexes zwischen Peptidbindungen und Kupfer(II)-Ionen. Dieser Komplex reduziert im zweiten Reaktionsschritt das Folin-Ciocalteu-Reagenz, welches hierbei einen Farbumschlag von gelb nach blau erfährt. Die Intensität der Blaufärbung kann zur Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt werden.

Zunächst wurde eine Kalibrierlösung aus humanem Serumalbumin (R1) in 5 mM Na,K,P<sub>i</sub>-Puffer mit 7 Proteinkonzentrationen von 0 bis 2 mg/ml hergestellt. Die Membransuspension aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe wurde im Verhältnis 1:2, 1:4 und 1:8 in dem gleichen Puffer verdünnt. Je 0,2 ml der so vorbereiteten Proben wurden in Reagenzgläser pipettiert und mit 2,0 ml einer vorher hergestellten Arbeitslösung versetzt. Die Arbeitslösung bestand aus 100 Teilen einer Natriumcarbonat-Lösung 2 %, 1 Teil einer Kupfersulfat-Lösung 1 % und 1 Teil einer Natrium-Kalium-Tartrat-Lösung 2 %. Nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde je 0,2 ml Folin-Ciocalteu-Reagenz (R9, 1:4 in Aqua dest. verdünnt) unter Schütteln zugegeben und danach wurden die Proben 30 min unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Licht-Absorption durch die Proben bei einer Wellenlänge von 500 nm mittels eines UV-Fotometers (G26). Aus den gemessenen Absorptionswerten der Kalibrierlösung wurde mittels der Computersoftware Excel<sup>®</sup> eine Kalibriergerade erstellt. Durch Einsetzen der Absorptionswerte der verschiedenen Membransuspension-Verdünnungen in die Gleichung der Kalibriergeraden wurde der Proteingehalt bestimmt.

## **2.2 Membransuspensionen aus transfizierten COS7-**

### **Zellen**

Zur Expression von humanen sowie punktmutierten Muskarinrezeptoren für die Verwendung in Radioligand-Bindungsstudien wurde im Rahmen dieser Arbeit eine

COS7-Zelllinie eingesetzt. Bei den COS7-Zellen handelt es sich um Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), die in Kultur einschichtig wachsen. Die COS7-Zellen wurden mit Plasmiden, die die entsprechenden humanen bzw. punktmutierten Muskarinrezeptorgene enthielten, transient transfiziert und danach einer Membranpräparation, d.h. Gewinnung der nach der jeweiligen Transfektion exprimierten Rezeptoren, zugeführt. Die im Rahmen dieser Arbeit bei den Transfektionen eingesetzten Plasmide, die für humane bzw. punktmutierte Rezeptoren kodierten, waren bereits im Arbeitskreis vorhanden, sodass keine Mutagenese zur Erzeugung dieser Rezeptormutanten durchgeführt werden musste. Um eine Vervielfältigung der im Rahmen der Mutagenese erzeugten Plasmide zu ermöglichen, waren im Arbeitskreis *E. coli*-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transformiert worden. Die mit einer bestimmten DNA transformierten *E. coli*-Zellen wurden in Form von „Glycerol-Stocks“ bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.1 Molekularbiologische Arbeiten**

Um die für Transfektionen benötigte Plasmid-DNA zu vervielfältigen, wurden Übernachtskulturen dieser Bakterien angesetzt: Es wurde mit einer sterilen Pipette eine kleine Menge des noch gefrorenen „Glycerol-Stocks“ entnommen und damit 500 ml eines vorher autoklavierten, Ampicillin-haltigen LB-Mediums (R13) angeimpft. Dem LB-Medium wurde Ampicillin zugesetzt, da die verwendeten Plasmide allesamt ein Ampicillin-Resistenzgen enthielten und somit nur Bakterien wachsen konnten, die die Plasmid-DNA aufgenommen hatten. Nach dem Animpfen wurde der Ansatz für 16-18 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 200 rpm in einem Schüttelinkubator (G19) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Isolierung der amplifizierten DNA. Außerdem konnten mit der frischen Bakterienkultur neue „Glycerol-Stocks“ hergestellt werden. Hierzu wurden 900  $\mu\text{l}$  der Bakterienkultur mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und mit 300  $\mu\text{l}$  einer 60 %igen Glycerol-Lösung (L3) in einem sterilen Einfrierröhrchen (M10) vermischt. Das Einfrierröhrchen wurde zügig bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.2.1.1 Plasmid-DNA-Gewinnung

Zur Gewinnung der in einer Übernachtskultur amplifizierten Plasmid-DNA wurde ein Plasmid-Maxi-Kit der Firma Qiagen (M21) eingesetzt. Die bei dem Verfahren eingesetzten Puffer und Trennsäulen waren Bestandteil des „Kits“.

Die Bakterienzellen wurden zunächst abzentrifugiert (G3, 7000 rpm, 30 min, 4°C), der Überstand aus Nährmedium wurde verworfen. Das Zellsediment wurde in 10 ml RNase A-haltigen Tris-EDTA-Puffer (Bestandteil des „Kits“) resuspendiert. Durch Zugabe von 10 ml eines alkalischen, Natrium-Dodecylsulfat-haltigen Puffers erfolgte eine Lyse der Zellen. Freiwerdende RNA wurde durch die enthaltene RNase abgebaut und durch im Lysepuffer enthaltene NaOH wurden Proteine, chromosomale DNA und Plasmid-DNA denaturiert. Nach Zugabe des Lyse-Puffers wurde eine Inkubationszeit von 5 min genau eingehalten, damit es nicht zu einer irreversiblen Denaturierung der Plasmid-DNA kam. Im nächsten Schritt wurden 10 ml eines Kaliumacetat-Puffers zur Neutralisation des Lysats zugegeben. Aufgrund der hohen Salzkonzentration wurde Kaliumdodecylsulfat ausgefällt und damit die in Salz-Detergens-Komplexe eingeschlossene chromosomale DNA sowie Proteine und Zelltrümmer. Die kleinere, ringförmig geschlossene Plasmid-DNA dagegen verblieb in Lösung und wurde bei Neutralisation des pH-Werts renaturiert. Das Präzipitat wurde nun abzentrifugiert (G3, 12000 rpm, 30 min, 4°C) und der Überstand auf vorher mit einem Äquilibriumspuffer behandelte Anionenaustauscher-Harz-Säulen gegeben. Das Anionenaustauscher-Harz bindet die negativ geladenen Nukleinsäuren. Aufgrund des im Lysat vorliegenden Salzgehalts und pH-Werts wird nur die Plasmid-DNA zurückgehalten, während andere Bestandteile des Lysats (abgebaute RNA, Proteine) im Durchfluss erscheinen. Anschließend wurde zweimal 30 ml eines Waschpuffers mittlerer Salzkonzentration auf die Säulen gegeben, um anhaftende Verunreinigungen zu entfernen. Die Elution der von den Säulen gebundenen Plasmid-DNA erfolgte mit 15 ml eines Elutionspuffers hoher Salzkonzentration. Aus der eluierten Lösung wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und Schütteln ausgefällt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde abzentrifugiert (4300 rpm, 80 min, 4°C) und die erhaltenen DNA-Sedimente mit 5 ml Ethanol 70 % salzfrei gewaschen. Nach Zugabe der Ethanol-Lösung erfolgte eine weitere Zentrifugation (4300 rpm, 15 min, 4°C). Der Überstand aus Ethanol-Lösung wurde entfernt und

die DNA-Sedimente wurden kurz an der Luft getrocknet. Danach wurde die DNA in 600 µl sterilem TE-Puffer (L12) aufgenommen, in Einfrierröhrchen (M10) überführt und bei -20°C eingefroren.

### **2.2.1.2 DNA-Gehaltsbestimmung**

Gehalt und Reinheit der Plasmid-DNA wurden fotometrisch (G26) bestimmt. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 260 nm, da doppelsträngige DNA hier ein Absorptionsmaximum zeigt. Für die Messung wurde die Plasmid-DNA-Lösung im Verhältnis 1:50 mit Aqua dest. verdünnt. Die Bestimmung des Hintergrundwertes der Absorption (Blank) erfolgte mit reinem Aqua dest.. Der DNA-Gehalt in µg/µl errechnete sich anhand der folgenden Gleichung:

$$\text{Plasmid-DNA-Gehalt } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{(260)} \cdot 0,05 \cdot 50 \quad (\text{Gl. 1})$$

Zusätzlich wurde die Absorption der Probe bei 280 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge zeigen Proteine eine starke Absorption. Reine DNA-Proben weisen ein Verhältnis der Absorptionswerte  $A_{(260)}/A_{(280)}$  von 1,8 bis 2 auf. Dieser Quotient nimmt mit zunehmender Proteinverunreinigung ab.

## **2.2.2 Zellbiologische Arbeiten**

### **2.2.2.1 Kultivierung von COS7-Zellen**

Alle Arbeitsschritte in der Zellkultur mit COS7-Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank (G15) mit laminarem Luftstrom ausgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank (G25) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Begasung und einer Luftfeuchtigkeit von 96 % in 10- bzw. 15 cm-Kulturschalen (M6, M7). Als Nährmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, R6) mit einem Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum (FKS, R8) und 1 % eines Penicillin-Streptomycin-Gemischs verwendet (R16).

Alle 2-3 Tage erreichten die COS7-Zellen eine 80-100 %ige Konfluenz, sodass sie auf neue Kulturschalen verteilt werden konnten. Dazu wurde zunächst das alte Nährmedium abgesaugt und die anhaftenden Zellen mit 37°C warmen PBS-Puffer (L8) gewaschen. Nach Zugabe von 5 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (R24) pro 15 cm-Kulturschale folgte eine 5-minütige Inkubationszeit im Brutschrank, in der die anhaftenden Zellen abgelöst wurden. Nun wurde durch Zugabe von 5 ml FKS-

haltigem Nährmedium das Trypsin inaktiviert und die Zellsuspension konnte im Verhältnis von 1:2 bis 1:4 auf neue, mit frischem Nährmedium befüllte Kulturschalen verteilt werden.

### **2.2.2.2 Einfrieren von COS7-Zellen**

Um genügend COS7-Zellen für den Start des Zyklus aus Vermehrung der Zellen, Transfektion und Membranpräparation vorrätig zu halten, wurde von Zeit zu Zeit ein Teil der in Kultur befindlichen Zellen eingefroren. Dazu wurden die Zellen einer 15 cm-Kulturschale nach dem in Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Verfahren geerntet. Die erhaltene Zellsuspension (5 ml Trypsin-EDTA-Lösung + 5 ml FKS-haltiges Nährmedium) wurde in ein 50 ml Falcon-Gefäß (M4) überführt und bei 1000 x g (G3) 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das „Zellpellet“ in 3 ml frischem Nährmedium resuspendiert. Je 900 µl dieser Zellsuspension wurden zusammen mit 100 µl DMSO in ein Einfrierröhrchen (M10) überführt, durchmischt und in flüssigem Stickstoff bis zur Reaktivierung eingefroren.

### **2.2.2.3 Reaktivieren eingefrorener COS7-Zellen**

Um COS7-Zellen neu in Kultur zu nehmen, wurde ein nach der in Kapitel 2.2.2.2 beschriebenen Methode behandeltes Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und aufgetaut. Die im Einfrierröhrchen enthaltene Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt, in das 10 ml FKS-haltiges Nährmedium vorgelegt worden waren. Durch den folgenden Zentrifugationsschritt (G3, 1000 x g, 4 min) wurden die Zellen von dem DMSO-haltigen Nährmedium abgetrennt, das nun abgesaugt wurde. Das „Zellpellet“ wurde in frischem Nährmedium resuspendiert und in eine 10 cm-Kulturschale überführt. Nach ca. 24 h waren die Zellen angewachsen und konnten auf eine 15 cm-Kulturschale umgesetzt werden. Die Kultivierung der Zellen auf großen (15 cm) Kulturschalen erfolgte durch „Splitten“ im Verhältnis 1:2 bis 1:4 alle 2-3 Tage.

### **2.2.2.4 Transiente Transfektion von COS7-Zellen**

Die für verschiedene Wildtyp- und punktmutierte Muskarinrezeptoren kodierende DNA wurde transient in COS7-Zellen transfiziert. Nach der Transfektion wurden die entsprechenden Muskarinrezeptoren von den COS7-Zellen vorübergehend

exprimiert und konnten mittels einer Membranpräparation für Radioligand-Bindungsstudien gewonnen werden. Dabei wurde ein viertägiger Zyklus eingehalten:

- 1.Tag: Aussäen der COS7-Zellen
- 2.Tag: Transfektion
- 4.Tag: Membranpräparation

Am ersten Tag wurden die COS7-Zellen ausgesät, d.h. auf eine bestimmte Zellzahl pro Kulturschale verteilt. Dazu wurden jeweils die COS7-Zellen von 4 konfluent bewachsenen 15 cm-Kulturschalen nach dem in Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Verfahren geerntet. Die auf diese Weise erhaltenen 40 ml Zellsuspension wurden in ein Falcon-Gefäß überführt und zentrifugiert (G3, 1000 x g, 4 min, Raumtemperatur). Das erhaltene „Zellpellet“ wurde nach Absaugen des Trypsin-haltigen Nährmediums in 20 ml frischem Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl pro ml wurde eine Neubauer-Zählkammer (G18) eingesetzt. An den Rand der Kammer wurden wenige  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension pipettiert, die sich aufgrund von Kapillarkräften gleichmäßig in der Kammer verteilte. Da die Kammer, die aus vier markierten Quadranten bestand, ein definiertes Volumen von 0,1  $\mu\text{l}$  hatte, konnte die Zellzahl durch Auszählen der Zellen pro Quadrant unter dem Mikroskop (G2) bestimmt werden. Die Zellsuspension wurde danach in einer Konzentration von  $1,6 \cdot 10^6$  Zellen pro 10 cm-Kulturschale auf neue Kulturschalen verteilt und bis zum nächsten Tag im Brutschrank (G25) inkubiert.

Am zweiten Tag folgte die Transfektion der Zellen mittels des Verfahrens der Lipofektion. Alle Arbeitsschritte wurden unter einer Werkbank mit laminarem Luftstrom (G15) unter Verwendung von sterilen Pipettenspitzen durchgeführt. Für die Transfektion sollten die am Vortag ausgesäten COS7-Zellen zu diesem Zeitpunkt eine Konfluenz von 60-80 % erreicht haben.

In zehn sterilen PP-Reaktionsgefäßen (M15) wurden zunächst je 290  $\mu\text{l}$  eines FKS- und Penicillin/Streptomycin-freien Nährmediums (R6) vorgelegt. Die sonst bei der Kultivierung von COS7-Zellen nötigen Zusatzstoffe zum Nährmedium hätten an dieser Stelle die für die Transfektion nötige Bildung von Liposomen gestört. Zu dem Nährmedium wurden nun je 6  $\mu\text{g}$  der gewünschten Plasmid-DNA pipettiert, die PP-Reaktionsgefäße wurden kurz gemischt (Vortex Genie 2<sup>®</sup>, G28), um die

DNA im Nährmedium zu verteilen und danach kurz zentrifugiert (G10), um die gesamte Menge an Nährmedium im unteren Bereich der PP-Reaktionsgefäße zu sammeln. Nun wurde in jedes PP-Reaktionsgefäß 30 µl Polyfect<sup>®</sup> Transfektionsreagenz (R18) pipettiert, die Gefäße wiederum kurz gemischt (G28) und danach 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Durch das Transfektionsreagenz wird die Plasmid-DNA in Liposomen eingeschlossen. Die gebildeten Polyfect<sup>®</sup>-DNA-Komplexe binden an die Zelloberfläche der COS7-Zellen und werden durch Endozytose aufgenommen. Nach Verschmelzen der aufgenommenen Endosomen mit Lysosomen der Zellen wird der pH-Wert in den Lysosomen durch das Transfektions-Reagenz abgepuffert (in Lysosomen herrscht normalerweise ein saurer pH), sodass die lysosomalen Nukleasen inaktiviert werden und eine Aufnahme der Plasmid-DNA in den Zellkern ermöglicht wird.

Während der Inkubationszeit zur Liposomenbildung wurde das alte Nährmedium von den 10 zu transfizierenden 10 cm-Kulturschalen abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS-Puffer gewaschen und es wurde in jede Schale 7 ml frisches Nährmedium (DMEM + 10 % FKS + 1 % Pen/Strep) zugegeben.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Liposomenbildung durch Zugabe von je 1 ml Nährmedium (DMEM + 10 % FKS + 1 % Pen/Strep) pro PP-Reaktionsgefäß beendet. Der Inhalt der PP-Reaktionsgefäße wurde vermischt und es wurde jeweils der Inhalte eines Gefäßes auf eine durch den Wechsel des Nährmediums vorbereitete Kulturschale gegeben. Die so behandelten Kulturschalen wurden nun 2 Tage lang im Brutschrank (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) zur Expression der auf den Plasmiden kodierten Muskarinrezeptoren inkubiert.

### **2.2.2.5 Membranpräparation aus transfizierten COS7-Zellen**

Am vierten Tag des Transfektionszyklus erfolgte die Gewinnung der Muskarinrezeptoren durch eine Membranpräparation. Die bei der Membranpräparation angewendeten Lösungen und Materialien mussten nicht steril sein, da die COS7-Zellen bei der Membranpräparation zerstört und nicht weiter in Kultur gehalten wurden.

Da üblicherweise jeweils 10 Kulturschalen mit einer bestimmten Plasmid-DNA transfiziert worden waren, wurden diese bei der Membranpräparation als eine Charge gemeinsam bearbeitet. Zunächst wurde das Nährmedium von den 10

Kulturschalen abgesaugt und die anhaftenden Zellen vorsichtig mit 2 ml PBS-Puffer (L8) gewaschen. Der Waschpuffer wurde abgesaugt und in jede Schale wurden nun 4 ml eines eisgekühlten 5 mM Na,K,P<sub>i</sub>-Puffers (L7) gegeben. Mittels eines Zellschabers (M22) wurden die Zellen vom Boden der Kulturschale abgelöst und die entstandene Zellsuspension in zwei Zentrifugenröhrchen überführt. Unter Eiskühlung wurden die Zellen nun mit einem Polytron-Homogenisator (G21, dreimal 10 s auf Stufe 6) zerkleinert. Durch den folgenden Zentrifugationsschritt (G3, 18000 rpm, 30 min, 4°C) wurden die rezeptorhaltigen Membranfragmente abgetrennt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die beiden „Pellets“ in je 2 ml 5 mM Na,K,P<sub>i</sub>-Puffer (L7) resuspendiert. Diese Suspension wurde in einen Potter-Elvehjem-Glashomogenisator (G22) überführt und die beiden Zentrifugenröhrchen je dreimal mit 2 ml des 5 mM Na,K,P<sub>i</sub>-Puffers gespült. Die Spüllösungen wurden ebenfalls in den Glashomogenisator gegeben und die gesamte Suspension wurde per Hand homogenisiert. Das Volumen wurde nun mit 5 ml Na,K,P<sub>i</sub>-Puffer auf 21 ml ergänzt, sodass pro transfizierter 10 cm-Kulturschale ca. 2 ml Membransuspension erhalten wurde. Die Membransuspension wurde in 0,5 ml- bzw. 1 ml-Aliquots auf PP-Reaktionsgefäße verteilt und bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren.

### **2.2.3 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford**

Der Proteingehalt der Membransuspensionen aus COS7-Zellen wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Bei dieser Methode wird der Farbstoff Coomassie-Brilliant Blau verwendet, der mit Proteinen in saurer Lösung farbige Komplexe bildet. Durch die Komplexbildung mit Proteinen wird das Absorptionsmaximum von Coomassie-Brilliant Blau in den längerwelligen Bereich zu einer Wellenlänge von 595 nm verschoben. Durch Absorptionmessung bei 595 nm kann die Proteinkonzentration in Lösung unter Verwendung einer Kalibrierlösung bekannter Konzentration bestimmt werden.

Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurde das Bradford-Reagenz der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, GER) verwendet (R3). Das im Kühlschrank gelagerte Bradford-Reagenz wurde auf Raumtemperatur gebracht und in der Zwischenzeit eine Kalibrierlösung unter Verwendung von humanem Serumalbumin (R1) mit 6 Proteinkonzentrationen von 0 bis 1,5 mg/ml hergestellt. Das humane Serumalbumin wurde wie die COS7-Proteine aus Membran-

präparationen in 5 mM Na,K,P<sub>i</sub>-Puffer (L7) gelöst. Von jeder der verschiedenen Konzentrationen der Kalibrierlösung wurden zweimal 0,1 ml in Reagenzgläser pipettiert (M1) und mit je 3,0 ml Bradford-Reagenz versetzt. Nach kurzem Schütteln und einer Inkubationszeit von mindestens 5 min, in der sich die Protein-Farbstoff-Komplexe bildeten, wurde die Absorption der Proben zügig bei einer Wellenlänge von 595 nm mittels eines UV-Fotometers (G4) gemessen. Das UV-Fotometer erstellte im Kalibrierungsmodus aus den gemessenen Absorptionswerten eine Kalibriergerade, sodass das Gerät danach bei der Messung der COS7-Membransuspensionen neben der Absorption einen Proteingehalt (mg/ml) angeben konnte. Bei der Messung der Absorption der COS7-Membransuspensionen wurden die gleichen Arbeitsschritte wie bei der Messung der Kalibrierlösung durchgeführt: Zweimal 0,1 ml Membransuspension wurden in Reagenzgläsern mit je 3,0 ml Bradford-Reagenz vermischt und nach einer mindestens 5-minütigen Inkubationszeit zügig UV-fotometrisch vermessen.

## 2.3 Radioligand-Bindungsstudien

Die aus Herzventrikelgewebe des Hausschweins bzw. transfizierten COS7-Zellen gewonnenen Muskarinrezeptoren wurden in Radioligand-Bindungsstudien zur Charakterisierung des Bindungsverhaltens von muskarinischen Liganden eingesetzt. Bei den Testsubstanzen handelte es sich um orthosterische Liganden, allosterische Modulatoren und allosterisch/orthosterische Hybrids-substanzen. Im Folgenden sollen theoretische Grundlagen von Radioligand-Bindungsstudien erläutert werden.

### 2.3.1 Massenwirkungsgesetz

Die reversible Reaktion eines Liganden L mit einem Rezeptor R kann durch das Massenwirkungsgesetz beschrieben werden:



Dabei steht [R] für die Konzentration des Rezeptors, [L] für die Konzentration des Liganden und [RL] für die Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe.  $k_{+1}$  bzw.  $k_{-1}$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- bzw. Dissoziationsreaktion der Rezeptor-Ligand-Komplexe.

Die Geschwindigkeit der Assoziation des Liganden an den Rezeptor ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$v_{\text{hin}} = k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] \quad (\text{Gl. 3})$$

Dementsprechend gilt für die Geschwindigkeit der Dissoziation der Rezeptor-Ligand-Komplexe:

$$v_{\text{rück}} = k_{-1} \cdot [RL] \quad (\text{Gl. 4})$$

Im Gleichgewichtszustand laufen Hin- und Rückreaktion mit gleicher Geschwindigkeit ab, sodass sich die Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe nicht mehr ändert. Im dynamischen Gleichgewicht gilt:

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

Aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation ( $k_{-1}$ ) und der Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation ( $k_{+1}$ ) ergibt sich die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_D$ , deren reziproker Wert die Gleichgewichts-Assoziationskonstante  $K_A$  ist:

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} = \frac{1}{K_A} \quad (\text{Gl. 6})$$

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_D$  (Einheit: mol/l) entspricht derjenigen Ligand-Konzentration, bei der eine halbmaximale Rezeptorbesetzung vorliegt. Der  $K_D$ -Wert ist ein Maß für die Affinität des Liganden zum Rezeptor. Ein niedriger  $K_D$ -Wert bedeutet eine hohe Rezeptoraffinität des Liganden.

### 2.3.2 Homologe Konkurrenz

Mittels homologer Konkurrenzexperimente werden die Bindungseigenschaften einer rezeptorhaltigen Membransuspension charakterisiert. Es wird die Affinität des eingesetzten Liganden in Form des  $K_D$ -Wertes bestimmt sowie die Konzentration der spezifischen Bindungsstellen in Form des  $B_{\text{max}}$ -Wertes.

In mit einem radioaktiv markierten Liganden durchgeführten homologen Konkurrenzexperimenten konkurriert dieser mit dem strukturidentischen, nicht

markierten Liganden um die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor. Die Konzentration des Radioliganden wird konstant gehalten, während die Konzentration des nicht markierten Inhibitors stufenweise erhöht und dadurch der Radioligand zunehmend aus seiner spezifischen Bindung verdrängt wird. Die Gesamtbindung des Radioliganden wird in Abwesenheit des nicht markierten Liganden bestimmt. Zur Bestimmung der unspezifischen Radioligandbindung wird ein Überschuss eines strukturverschiedenen, nicht markierten Kompetitors eingesetzt, der in der eingesetzten Konzentration alle spezifischen Bindungsstellen besetzt.

Zur Auswertung dieser Experimente wird die gemessene Radioaktivität gegen den dekadischen Logarithmus der molaren Konzentration des nicht markierten Liganden aufgetragen. Per Computersoftware erfolgt eine nichtlineare Regressionsanalyse der Daten, bei der die „4-Parameter-logistische Gleichung“ (Barlow und Blake, 1989) angewendet wird:

$$B_{\text{ges}} = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + (\text{IC}_{50} / 10^{[X]})^{n_H}} \quad (\text{Gl. 7})$$

$B_{\text{ges}}$ :	Gesamtbindung des Radioliganden
Min:	Unteres Kurvenplateau (entspricht der unspezifischen Bindung des Radioliganden)
Max:	Oberes Kurvenplateau (Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit des Inhibitors)
$\text{IC}_{50}$ :	Wendepunkt der Regressionskurve (Konzentration des Inhibitors, welche die spezifische Bindung des Radioliganden auf die Hälfte absenkt)
[X]:	Konzentration des Inhibitors
$n_H$ :	Hill-Koeffizient (Maß für die Kurvensteilheit)

Ist das Steilheitsmaß  $n_H$  (Hill-Koeffizient) nicht signifikant verschieden von -1, deutet dies auf eine homogene Rezeptorpopulation und auf molekularer Ebene auf eine 1:1-Interaktion des Liganden mit dem Rezeptorprotein hin.

Mit Hilfe des Wendepunktes der sigmoiden Inhibitionskurve, dem  $\text{IC}_{50}$ -Wert, kann die Affinität des Inhibitors zu dem durch den Radioliganden markierten Rezeptor berechnet werden. Wenn die Kompetitionsreaktion zwischen Radioligand und Inhibitor im Gleichgewicht ist, kann der  $K_I$ -Wert nach der Gleichung von Cheng und Prusoff (1973) berechnet werden:

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad (\text{Gl. 8})$$

Im Spezialfall der homologen Kompetition sind Radioligand und Inhibitor strukturidentisch, sodass sie die gleiche Rezeptoraffinität aufweisen. Es gilt  $K_I = K_D$ . Durch Einsetzen in die Cheng-Prusoff-Gleichung kann diese vereinfacht werden:

$$K_I = K_D = IC_{50} - [L] \quad (\text{Gl. 9})$$

Neben der Affinität eines Liganden kann durch homologe Kompetitionsexperimente die Konzentration der spezifischen Bindungsstellen  $B_{\max}$  bestimmt werden. Die Gesamtzahl der spezifischen Bindungsstellen ergibt sich als Summe der freien Rezeptoren und der in Form von Rezeptor-Ligand-Komplexen vorliegenden Rezeptoren:

$$B_{\max} = [R] + [RL] \quad (\text{Gl. 10})$$

Zur Berechnung des  $B_{\max}$ -Wertes kann eine Gleichung nach DeBlasi et al. (1989) angewendet werden:

$$B_{\max} = \frac{B_0 \cdot IC_{50}}{[L]} \quad (\text{Gl. 11})$$

$B_{\max}$ :	Anzahl der spezifischen Bindungsstellen
$B_0$ :	spezifische Radioligandbindung in Abwesenheit eines Inhibitors
$IC_{50}$ :	Konzentration des Inhibitors, welche die Bindung des Radioliganden auf die Hälfte absenkt
$[L]$ :	Radioligandkonzentration

Eine weitere Möglichkeit der Bestimmung von  $K_D$  und  $B_{\max}$  beruht auf den Gleichungen 6 und 10. Zur Herleitung dieser Gleichung wird Gleichung 10 mit der Ligandkonzentration  $[L]$  multipliziert.

$$B_{\max} \cdot [L] = [R] \cdot [L] + [RL] \cdot [L] \quad (\text{Gl. 12})$$

Das Produkt  $[R] \cdot [L]$  wird um den Faktor  $[RL]/[RL]$  ergänzt, um die Gleichung des  $K_D$ -Wertes (Gl. 6) einsetzen zu können. Durch Ausmultiplizieren und Umformen erhält man die Sättigungsisotherme nach Langmuir:

$$[RL] = \frac{B_{\max} \cdot [L]}{K_D + [L]} \quad (\text{Gl. 13})$$

[RL]: Konzentration der Rezeptor-Ligand-Komplexe  
(spezifische Radioligandbindung)

In Sättigungsexperimenten müssen hohe Radioligandkonzentrationen eingesetzt werden, da eine annähernd vollständige Besetzung der spezifischen Bindungsstellen mit Radioligand zur Bestimmung von  $B_{\max}$  und  $K_D$  erforderlich ist.

Die fraktionelle Rezeptorbesetzung  $B_f$  gibt den Anteil der Ligand-besetzten Rezeptoren an der Gesamtzahl der Rezeptoren an:

$$B_f = \frac{[RL]}{[R] + [RL]} \quad (\text{Gl. 14})$$

Durch Einsetzen von Gleichung 10 und Gleichung 13 in Gleichung 14 ergibt sich:

$$B_f = \frac{[L]}{[L] + K_D} \quad (\text{Gl. 15})$$

Bei Einsatz einer Radioligandkonzentration, die dem  $K_D$ -Wert des Liganden entspricht, ergibt sich also eine fraktionelle Rezeptorbesetzung von 50 %. Um eine fraktionelle Rezeptorbesetzung von annähernd 100 % zu erreichen, müssen Radioligandkonzentrationen eingesetzt werden, die um ein Vielfaches größer als der  $K_D$ -Wert sind.

Die Sättigungsisotherme nach Langmuir (Gl. 13) lässt sich nach Scatchard (1949) umformen, sodass sich eine Geradengleichung (in der Form  $y = m \cdot x + n$ ) ergibt:

$$\frac{[RL]}{[L]} = -\frac{1}{K_D} \cdot [RL] + \frac{B_{\max}}{K_D} \quad (\text{Gl. 16})$$

Die Scatchard-Transformation ist eine Möglichkeit, um  $B_{\max}$  und  $K_D$  aus einem homologen Kompetitionsexperiment zu bestimmen. Dazu wird die spezifische Bindung des Radioliganden  $[RL]$  gegen den Quotienten aus spezifischer Bindung

und freier Konzentration des Radioliganden  $[RL]/[L]$  aufgetragen. Der  $K_D$ -Wert ergibt sich als negativer Kehrwert der Steigung der Regressionsgeraden, der  $B_{max}$ -Wert als Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse. Die per Computersoftware durchführbare nichtlineare Regressionsanalyse wird heute häufiger zur Bestimmung der genannten Bindungsparameter eingesetzt als die lineare Regressionsanalyse nach Scatchard.

Für die Anwendbarkeit der Scatchard-Gleichung sind von Bennett und Yamamura (1985) Voraussetzungen formuliert worden: Die Reaktion zwischen Rezeptor und Ligand muss dem Massenwirkungsgesetz folgen und ihr Gleichgewicht erreicht haben. Der  $B_{max}$ -Wert der Membransuspension (fmol/mg Protein) darf nicht größer sein als 10 % des  $K_D$ -wertes (nmol/l) des eingesetzten Radioliganden. Es muss eine einheitliche Rezeptor- und Ligandpopulation vorliegen. Bei dem Bindungsexperiment dürfen nicht mehr als 10 % des eingesetzten Radioliganden gebunden werden, da die freie Radioligandkonzentration als konstant angesehen wird.

### 2.3.3 Heterologe Konkurrenz

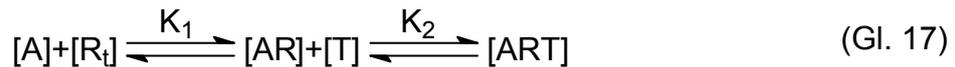
Die Inhibitionskonstante  $K_i$  eines Liganden, der mit  $[^3H]NMS$  bzw.  $[^3H]OxoM$  um die orthosterische Bindungsstelle konkurriert, ergibt sich aus dem  $IC_{50}$ -Wert des Inhibitors durch Anwendung der Cheng/Prusoff-Korrektur:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad (\text{Gl. 8})$$

Zur Berechnung des  $K_i$ -wertes, der der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten des Inhibitors entspricht, werden also die Radioligandkonzentration  $[L]$  sowie der  $K_D$ -Wert des Radioliganden benötigt. Eine Voraussetzung für die Berechnung von  $K_i$ -Werten ist ein nicht signifikant von -1 verschiedenes Steilheitsmaß  $n_H$  der Inhibitionskurven, wie es für ein einstufiges Bindungssystem, z.B. bei kompetitiven Antagonisten typisch ist.

#### 2.3.3.1 Bindungsverhalten von Agonisten

Bei der Reaktion zwischen einem Agonisten und einem Rezeptor handelt es sich bei Vorhandensein von an den Rezeptor koppelnden G-Proteinen um ein zweistufiges Bindungssystem (Kenakin, 1997):



[A]:	Agonist-Konzentration
[R <sub>i</sub> ]:	Gesamt-Rezeptorkonzentration
[T]:	G-Protein-Konzentration
K <sub>1</sub> ,K <sub>2</sub> :	Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten

Die im ersten Reaktionsschritt gebildeten Agonist-Rezeptorkomplexe können weiterreagieren zu ternären Komplexen aus Agonist, Rezeptor und G-Protein. Dadurch wird [R<sub>i</sub>] aus der Gleichgewichtsreaktion mit [A] entzogen und es werden mehr Agonist-Rezeptor-Komplexe gebildet als eigentlich erlaubt nach K<sub>1</sub>. Dieser Effekt führt zu einer Linksverschiebung der Agonist-Inhibitionskurve, also einer Affinitätserhöhung. Wenn in einer Membranpräparation oder in einem nativen Gewebe G-Proteine, die an die jeweiligen Rezeptoren koppeln, vorhanden sind, führt dies also zur Entstehung von zwei unterschiedlichen Rezeptorzuständen: Es gibt einen G-Protein-gekoppelten, für Agonisten hochaffinen Zustand und einen G-Protein-entkoppelten, für Agonisten niedrigaffinen Zustand. Diese Rezeptorzustände stellen für Agonisten zwei unterschiedliche Bindungsstellen dar, sodass Inhibitionskurven mit einem Steilheitsmaß resultieren, das signifikant größer als -1 ist. Agonisten zeigen demnach in Radioligand-Bindungsstudien ein komplexes Bindungsverhalten. Wird die oben beschriebene Cheng/Prusoff-Gleichung bei diesen Inhibitionskurven angewendet, so ergeben sich aufgrund der flachen Kurvensteilheit apparente Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K<sub>app</sub>. Alternativ können Radioantagonist-Agonist-Inhibitionskurven mit einem Modell, das zwei Bindungsstellen beinhaltet, analysiert werden. In diesem Fall erhält man für einen Agonisten zwei Affinitätskonstanten, K<sub>i hochaffin</sub> und K<sub>i niedrigaffin</sub>. Zur Regressionsanalyse mit einem Modell, das zwei Bindungsstellen beinhaltet, kann folgende Gleichung verwendet werden:

$$B_{\text{ges}} = (\text{Max} - \text{Min}) \left( \frac{\text{Fraktion1}}{(1 + 10^{(\log[X] - \log IC_{50 \text{ hochaffin}})})} + \frac{1 - \text{Fraktion1}}{(1 + 10^{(\log[X] - \log IC_{50 \text{ niedrigaffin}})})} \right) + \text{Min} \quad (\text{Gl. 18})$$

- $B_{\text{ges}}$ : Gesamtbindung des Radioliganden  
 Max: Oberes Kurvenplateau  
 Min: Unteres Kurvenplateau  
 Fraktion1: Anteil des hochaffinen Kompartiments an der Gesamtbindung  
 1-Fraktion1: Anteil des niedrigaffinen Kompartiments an der Gesamtbindung  
 [X]: Konzentration des Inhibitors  
 $IC_{50 \text{ hochaffin}}$ : 1. Wendepunkt der Regressionskurve (Konzentration des Inhibitors, welche die Bindung des Radioliganden an das hochaffine Kompartiment auf die Hälfte absenkt)  
 $IC_{50 \text{ niedrigaffin}}$ : 2. Wendepunkt der Regressionskurve (Konzentration des Inhibitors, welche die Bindung des Radioliganden an das niedrigaffine Kompartiment auf die Hälfte absenkt)

Mittels eines F-Tests kann geprüft werden, ob Bindungsdaten ausreichend durch eine monophasische Kurvenanpassung mit einem konstanten Steilheitsmaß  $n_H = -1$  oder besser durch eine biphasische Kurvenanpassung mit Gleichung 18 beschrieben werden. Eine Analyse mit Gleichung 18 bietet sich vor allem bei von ihrer Gestalt her stark biphasischen Inhibitionskurven an.

Das gerade beschriebene komplexe Bindungsverhalten betrifft Agonisten, nicht aber Antagonisten, denn Antagonisten bewirken ja definitionsgemäß keine Bildung von ternären Komplexen mit Rezeptor und G-Protein. Ein Antagonist bindet an den G-Protein-gekoppelten und entkoppelten Zustand mit gleicher Affinität, sodass durch Radioantagonisten beide Rezeptorzustände markiert werden.

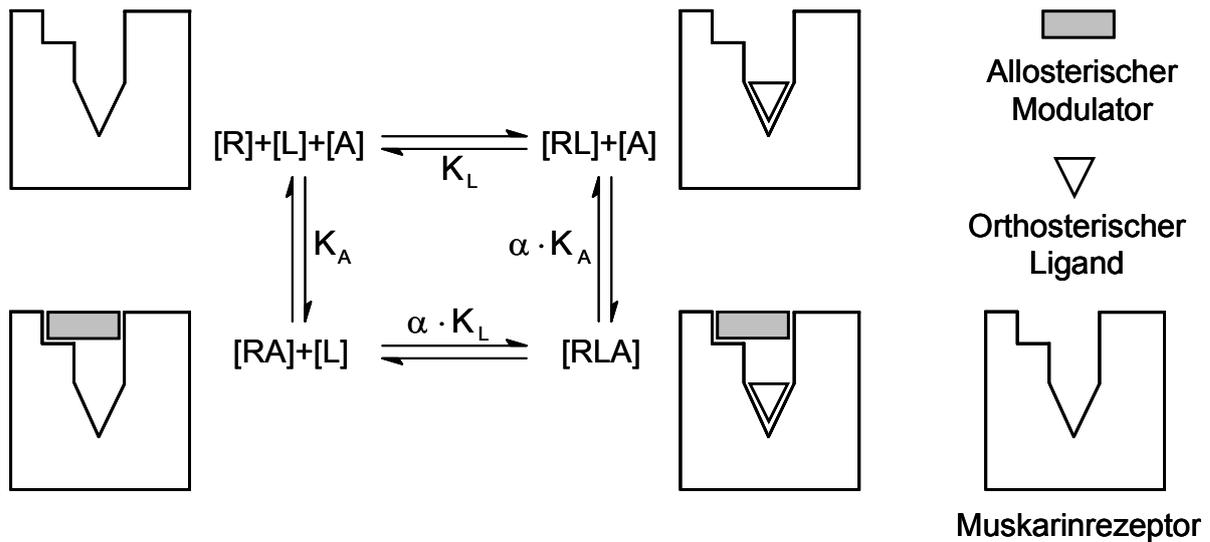
Der Anteil der G-Protein-gekoppelten, also für Agonisten hochaffinen Rezeptoren, kann durch die Zugabe von Guanylnukleotiden, also z.B. Guanosintriphosphat (GTP) oder GTP-Analoga, vermindert werden: Ein Überschuss an Guanylnukleotid führt zu einer Destabilisierung der ternären Komplexe aus Agonist, Rezeptor und G-Protein und damit zu einer Entkopplung der Rezeptoren vom G-Protein. Bei einer quantitativen Entkopplung kommt es zu einer Aufhebung des hochaffinen Rezeptorzustandes, damit zu einem Affinitätsverlust des Agonisten und einer Rückkehr des Steilheitsmaßes  $n_H$  in der Radioantagonist-Agonist-Inhibition zu -1 (Kenakin, 1997). Ein durch Zugabe von Guanylnukleotiden bewirkter Affinitätsverlust (bei Einsatz von GTP als „GTP-Shift“ bezeichnet) ist typisch für das Bindungsverhalten von Agonisten. Guanylnukleotide haben keinen Einfluss auf

das Bindungsverhalten von Antagonisten, da deren Affinität zum G-Protein-gekoppelten und -entkoppelten Zustand gleich ist.

In Bindungsstudien mit einem Radioantagonisten werden sowohl der hochaffine als auch der niedrigaffine Rezeptorzustand untersucht, während bei Zugabe eines Überschusses Guanylnukleotid nur der niedrigaffine Rezeptorzustand untersucht wird. Durch den Einsatz von radioaktiv markierten Agonisten, z.B. [<sup>3</sup>H]Oxotremorin M, kann der hochaffine Rezeptorzustand alleine betrachtet werden. In den üblicherweise eingesetzten nanomolaren Konzentrationen bindet der Radioagonist nur an den hochaffinen Rezeptorzustand und markiert nur diesen.

### **2.3.4 Allosterische Interaktion**

Bei den beiden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Radioliganden handelte es sich um orthosterische Liganden, d.h. die Liganden besitzen Affinität zur orthosterischen Bindungsstelle der Rezeptoren, in diesem Fall Muskarinrezeptoren. Neben der kompetitiven Interaktion, also der Konkurrenz um die gleiche Bindungsstelle, ist es auch möglich, dass Liganden an eine weitere spezifische Bindungsstelle am Rezeptorprotein, eine sogenannte allosterische Bindungsstelle binden. Da es sich bei der orthosterischen und allosterischen Bindungsstelle um unterschiedliche Haftareale am Rezeptorprotein handelt, ist es möglich, dass sich ternäre Komplexe aus dem Rezeptor, dem orthosterischen Ligand und dem allosterischen Modulator bilden. Zur Beschreibung dieser allosterischen Interaktion kann das ternäre Komplexmodell (Ehlert, 1988), auch als Kooperativitätsmodell bezeichnet, verwendet werden:



**Abb. 2:** Ternäres Komplexmodell (Kooperativitätsmodell) nach Ehlert (1988). Piktogramm mit Rezeptorbesetzungszuständen modifiziert nach Mohr et al. (2003).

[R]:	Konzentration der freien Rezeptoren
[L]:	Konzentration des orthosterischen Liganden
[A]:	Konzentration des allosterischen Liganden
[RL], [RA],	Konzentration der entsprechenden Rezeptor-
[RLA]:	Ligand-Komplexe
$K_L$ :	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des orthosterischen Liganden
$K_A$ :	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des allosterischen Liganden
$\alpha$ :	Kooperativitätsfaktor

Durch die Bindung eines Liganden an den Rezeptor bilden sich binäre Komplexe. Die Affinität des Rezeptors für den Liganden, der an die noch unbesetzte Bindungsstelle bindet, kann hierdurch verändert werden, was als Kooperativität bezeichnet wird. Im Falle positiver Kooperativität zwischen Alloster und Orthoster kommt es zu einer Bindungsförderung, im Falle negativer Kooperativität zu einer gegenseitigen Bindungshemmung und bei neutraler Kooperativität wird die Bindung nicht beeinflusst. Das Ausmaß der Kooperativität wird durch den Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  bestimmt, wobei  $\alpha$ -Werte zwischen 0 und 1 einer positiven Kooperativität,  $\alpha = 1$  einer neutralen und  $\alpha$ -Werte größer 1 einer negativen Kooperativität entsprechen.

Die Wirkung allosterischer Modulatoren auf die Bindung von orthosterischen Liganden, die mittels radioaktiv markierter Orthostere gemessen werden kann, kommt durch eine Beeinflussung der Bindungskinetik zu Stande. Allosterische Modulatoren beeinflussen die Rezeptor-Assoziation und -Dissoziation des Orthosters. In der Regel wird an Muskarinrezeptoren die Assoziation des Orthosters gehemmt und die Dissoziation verzögert. Eine Assoziationshemmung führt zu einer Bindungshemmung, während eine Dissoziationsverzögerung bindungsfördernd wirkt. Für das Ausmaß der Assoziationshemmung des Orthosters ist die Affinität des allosterischen Modulators zu freien Rezeptoren maßgeblich, für das Ausmaß der Dissoziationsverzögerung die Affinität des Allosters zu Orthoster-besetzten Rezeptoren. Der Gesamteffekt eines Allosters auf die Orthosterbindung, also die Kooperativität, ergibt sich als Resultat der Beeinflussung von Rezeptor-Assoziation und -Dissoziation des Orthosters. Bei positiver Kooperativität ist die Affinität des allosterischen Modulators zu Orthoster-besetzten Rezeptoren höher als zu freien Rezeptoren, d.h. es überwiegt die Dissoziationsverzögerung. Negative Kooperativität ist Folge einer höheren Affinität des Allosters zu freien als zu Orthoster-besetzten Rezeptoren, d.h. es überwiegt die Assoziationshemmung. Bei neutraler Kooperativität heben sich die Effekte des allosterischen Modulators auf Assoziation und Dissoziation des Orthosters auf, da das Alloster gleiche Affinität zu freien und Orthoster-besetzten Rezeptoren aufweist und somit die Orthoster-Bindung unbeeinflusst lässt.

Aus dem gerade beschriebenen ternären Modell der allosterischen Interaktion ist eine Gleichung abgeleitet worden, mit Hilfe derer die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_A$  des allosterischen Modulators und der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  berechnet werden können (Ehlert, 1988):

$$B_A = B_0 \cdot \frac{[L] + K_L}{[L] + K_L \cdot \frac{K_A + [A]}{K_A + \frac{[A]}{\alpha}}} \quad (\text{Gl. 19})$$

- $B_A$ : spezifische Bindung des Radioliganden in Anwesenheit des allosterischen Modulators
- $B_0$ : spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des allosterischen Modulators
- $K_L$ : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Radioliganden

$K_A$ :	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des allosterischen Modulators
$\alpha$ :	Kooperativitätsfaktor
$[A]$ :	Konzentration des allosterischen Modulators
$[L]$ :	Konzentration des Radioliganden

In Gleichgewichts-Bindungsexperimenten wird eine konstante Radioligandkonzentration eingesetzt sowie variierende Konzentrationen des allosterischen Modulators. Zur Analyse der erhaltenen Daten muss die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_L$  des Radioliganden vorher in homologen Wettbewerbsexperimenten bestimmt worden sein.

Bei neutraler Kooperativität ändert sich die Gleichgewichtsbindung des Orthosters in Anwesenheit des allosterischen Modulators nicht, sodass eine nichtlineare Regressionsanalyse nach Gleichung 19 nicht möglich ist. Nach dem ternären Modell der allosterischen Interaktion gilt:

$$\alpha \cdot K_A = EC_{0,5diss} \quad (\text{Gl. 20})$$

$EC_{0,5diss}$  wird in kinetischen Experimenten bestimmt und entspricht derjenigen Alloster-Konzentration, die die Radioligand-Dissoziation halbmaximal reduziert. Zur Analyse der Gleichgewichts-Bindungsdaten von neutral kooperativen Substanzen wird in Gleichung 19  $K_A$  durch den Quotienten  $EC_{0,5diss}/\alpha$  ersetzt.

Die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_A$ , der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  sowie der  $EC_{0,5diss}$ -Wert eines allosterischen Modulators werden häufig in Form des negativen dekadischen Logarithmus als  $pK_A$ -,  $p\alpha$ - und  $pEC_{0,5diss}$ -Wert angegeben. Aus Gleichung 20 ergibt sich:

$$pK_A = pEC_{0,5diss} - p\alpha \quad (\text{Gl. 21})$$

Nach dem Kooperativitätsmodell (Ehlert, 1988) entspricht der Wert  $p\alpha$  also der Differenz in log-Einheiten der Affinität eines allosterischen Modulators zu freien Rezeptoren ( $pK_A$ ) und der Affinität zu Ligand-besetzten Rezeptoren ( $pEC_{0,5diss}$ ).

Bei der Analyse der Gleichgewichts-Bindungsdaten von allosterischen Modulatoren mittels der Ehlert-Gleichung (Gl. 19) wurden von der Computersoftware Regressionskurven mit einem konstanten Steilheitsmaß von -1 berechnet. Die beiden im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten allosterisch/orthosterischen

Hybridsbstanzen waren einerseits Agonisten und zeigten andererseits ein allosterisches Bindungsverhalten. In heterologen Interaktionsexperimenten mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin und den agonistischen allosterisch/orthosterischen Hybridsbstanzen könnten sich eventuell Inhibitionskurven mit einem signifikant von -1 verschiedenen Steilheitsmaß ergeben (siehe Kapitel 2.3.3.1). Für die Analyse von Gleichgewichts-Bindungsdaten allosterischer Modulatoren ist eine Gleichung, die ein variables Steilheitsmaß enthält, von Tränkle et al. (2003) aufbauend auf einer Gleichung von Lazareno und Birdsall (1995) entwickelt worden:

$$B_{LX} = B_0 \cdot \frac{(1 + K_L \cdot [L]) \cdot (1 + \alpha \cdot (K_X \cdot [X])^{n_H})}{1 + (K_X \cdot [X])^{n_H} + K_L \cdot [L] \cdot (1 + \alpha \cdot (K_X \cdot [X])^{n_H})} \quad (\text{Gl. 22})$$

$B_{LX}$ :	spezifische Bindung des Radioliganden in Anwesenheit der allosterischen Substanz
$B_0$ :	spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der allosterischen Substanz
$K_L$ :	Gleichgewichts-Assoziationskonstante des Radioliganden
$K_X$ :	Gleichgewichts-Assoziationskonstante der allosterischen Substanz
$\alpha$ :	Kooperativitätsfaktor
$[X]$ :	Konzentration der allosterischen Substanz
$[L]$ :	Konzentration des Radioliganden
$n_H$ :	Steilheitsmaß

Im Gegensatz zu der Ehlert-Gleichung (Gl. 19) handelt es sich bei den Affinitätsparametern  $K_L$  und  $K_X$  dieser Gleichung um Assoziationskonstanten. Der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  ist invers zu dem in der Ehlert-Gleichung enthaltenen Kooperativitätsfaktor, d.h. ein nach Gleichung 22 berechneter Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  zwischen 0 und 1 bedeutet negative Kooperativität, 1 eine neutrale Kooperativität und ein Kooperativitätsfaktor  $> 1$  eine positive Kooperativität. Wird bei der nichtlinearen Regressionsanalyse nach Gleichung 22 ein Steilheitsmaß  $n_H = -1$  vorgegeben, so ergeben sich nach Bildung des Kehrwertes der gleiche Affinitätsparameter und Kooperativitätsfaktor für eine allosterische Substanz wie bei Anwendung der Ehlert-Gleichung (Gl. 19). Die Anwendung von Gleichung 22 mit Steilheitsmaß  $n_H = -1$  entspricht also der Anwendung der Ehlert-Gleichung. Bei

der Analyse der Gleichgewichts-Bindungsdaten der allosterisch/orthosterischen Hybridspezies wurde Gleichung 22 angewendet und jeweils mittels eines F-Tests geprüft, ob die Daten signifikant besser durch ein Steilheitsmaß von  $n_H = -1$  oder ein von  $-1$  abweichendes, d.h. in der Regressionsanalyse bestimmtes, Steilheitsmaß  $n_H$  beschrieben wurden. Dieses Verfahren wurde bei den einzelnen Experimenten angewendet. Zur Berechnung der Mittelwerte des Affinitätsparameters  $K_A$  bzw.  $K_X$  und Kooperativitätsfaktors  $\alpha$  wurden die Werte der nach F-Test bevorzugten Analyse aus den Einzelexperimenten verwendet.

Eine Voraussetzung für die korrekte Bestimmung von  $\alpha$  und  $K_A$  bzw.  $K_X$  ist, dass sich die Reaktion zum Zeitpunkt der Messung im Gleichgewicht befindet. Zur Berechnung der Inkubationszeit eines heterologen Interaktionsexperiments wurde folgende Gleichung nach Lazareno und Birdsall (1995) verwendet:

$$t_{1/2\text{obs}} = t_{1/2\text{off}} \cdot \left( 1 + \frac{[A]}{EC_{0,5\text{diss}}} \right) \quad (\text{Gl. 23})$$

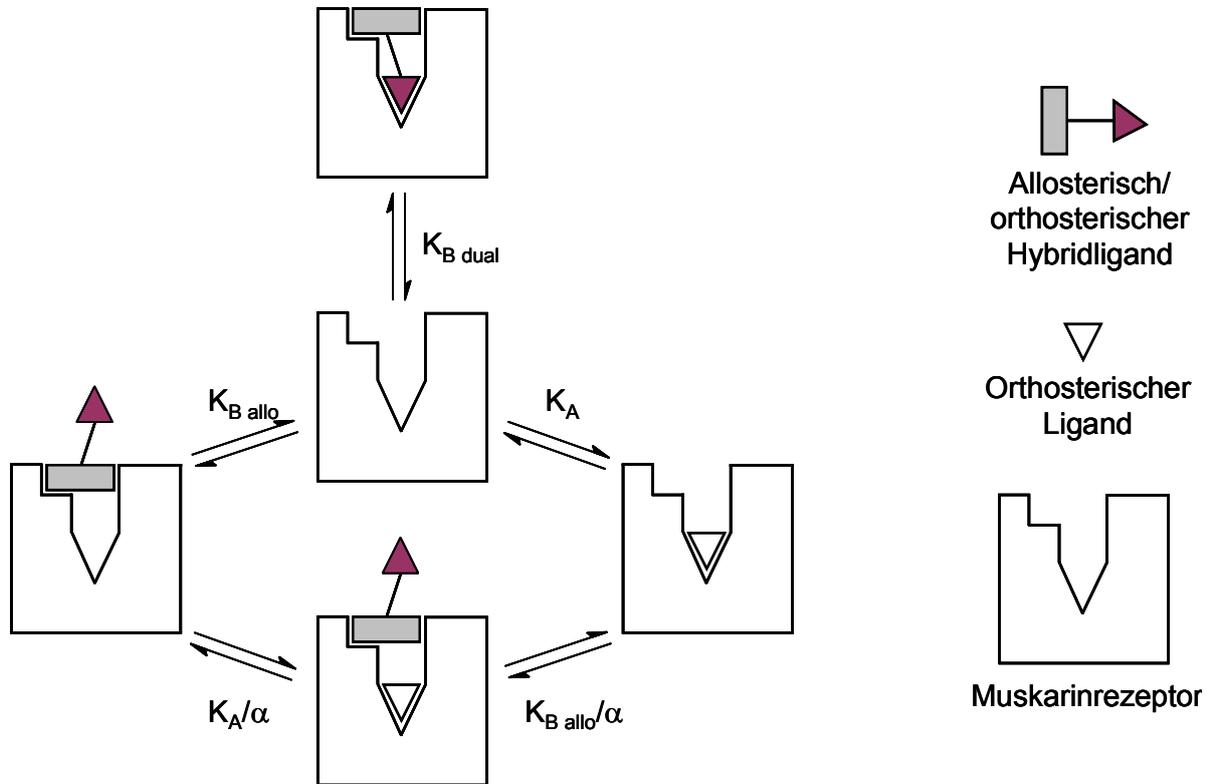
$t_{1/2\text{obs}}$ :	Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung
$t_{1/2\text{off}}$ :	Dissoziations-Halbwertszeit des Radioliganden unter Kontrollbedingungen
[A]:	Konzentration des allosterischen Modulators
$EC_{0,5\text{diss}}$ :	Konzentration des allosterischen Modulators, die die Radioligand-Dissoziation halbmaximal verzögert

Die Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung  $t_{1/2\text{obs}}$  entspricht also der um die Dissoziationsverzögerung durch das Alloster korrigierten Halbwertszeit der Radioligand-Dissoziation unter Kontrollbedingungen. Für die Inkubationszeit der Versuche wurde angenommen, dass sich die Reaktion nach der fünffachen Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung ( $5 \cdot t_{1/2\text{obs}}$ ) im Gleichgewicht befindet.

### 2.3.4.1 Bindungsmodell allosterisch/orthosterischer Hybridliganden

Bei der allosterischen Bindungsstelle handelt es sich um ein von der orthosterischen Bindungsstelle verschiedenes Haftareal am Rezeptorprotein. Daher erscheint es möglich, dass ein bitopischer Ligand an die allosterische und die orthosterische Bindungsstelle gleichzeitig bindet. Für das Bindungsverhalten eines solchen bitopischen Liganden ist von May et al. (2007a) ein Modell entwickelt worden. Dieses Modell berücksichtigt neben den vier Zuständen, die im Ehlert-

Modell der allosterischen Interaktion vorhanden sind (siehe Abb. 2), einen fünften Zustand, in dem ein bitopischer Ligand sowohl an die allosterische als auch die orthosterische Bindungsstelle gebunden hat:



**Abb. 3:** Bindungsmodell für Hybridliganden, die an die allosterische und die orthosterische Bindungsstelle gleichzeitig binden können. Modifiziert nach May et al. (2007a).

- $K_A$  : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des orthosterischen Liganden
- $K_{B\text{ allo}}$  : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Bindung des Hybridliganden an die allosterische Bindungsstelle
- $K_{B\text{ dual}}$  : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Bindung des Hybridliganden im dualen Bindungsmodus
- $\alpha$  : Kooperativitätsfaktor

Für einen Hybridliganden ergeben sich zwei Affinitätsparameter,  $K_{B\text{ allo}}$  und  $K_{B\text{ dual}}$ .  $K_{B\text{ allo}}$  entspricht der Affinität des Hybridliganden bei Bindung an die allosterische Bindungsstelle alleine,  $K_{B\text{ dual}}$  der Affinität des Hybridliganden bei gleichzeitiger Bindung an die allosterische und orthosterische Bindungsstelle, also der Affinität im dualen Bindungsmodus. In dem Modell nach May et al. bedeuten Kooperativitätsfaktoren  $\alpha > 1$  eine positive Kooperativität des Hybridliganden mit dem zur Markierung der orthosterischen Bindungsstelle eingesetzten Radio-

liganden, ein Kooperativitätsfaktor  $\alpha = 1$  eine neutrale Kooperativität und  $\alpha$ -Werte  $< 1$  eine negative Kooperativität. Durch die kompetitive Interaktion eines Hybridliganden mit dem Radioliganden an der orthosterischen Bindungsstelle wird dessen Bindung vermindert. Bei einer deutlich ausgeprägten positiven Kooperativität, die Folge der Bindung des Hybridliganden an die allosterische Bindungsstelle ist, kann es nach May et al. (2007a) insgesamt dennoch zu einer Bindungsförderung eines orthosterischen Liganden durch einen allosterisch/orthosterischen Hybridliganden kommen.

Für die Analyse von Interaktionsexperimenten allosterisch/orthosterischer Hybridliganden mit einem orthosterischen Radioliganden ist in der Publikation von May et al. (2007a) eine Gleichung enthalten, die die fraktionelle Rezeptorbesetzung durch das Radioorthoster beschreibt:

$$\rho_A = \frac{[A]}{[A] + K_A \left( 1 + [B] \left( \frac{1}{K_{B \text{ dual}}} + \frac{1}{K_{B \text{ allo}}} \right) \right) \left( 1 + \frac{\alpha[B]}{K_{B \text{ allo}}} \right)} \quad (\text{Gl. 24})$$

$\rho_A$ :	Fraktionelle Rezeptorbesetzung
$[A]$ :	Konzentration des Radioliganden
$[B]$ :	Konzentration des Hybridliganden
$K_A$ :	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Radioliganden
$K_{B \text{ allo}}$ :	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Bindung des Hybridliganden an die allosterische Bindungsstelle
$K_{B \text{ dual}}$ :	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Bindung des Hybridliganden im dualen Bindungsmodus
$\alpha$ :	Kooperativitätsfaktor

Gleichung 24 wurde dem Arbeitskreis Mohr von dem Seniorautor der Publikation von May et al., Prof. Dr. A. Christopoulos (Monash-Universität, Australien), in einer für die nichtlineare Regressionsanalyse mit der Computersoftware Prism<sup>®</sup> geeigneten Form zur Verfügung gestellt.

### 2.3.5 Kinetik der Radioligandbindung

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Experimenten, die unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt werden, wird in kinetischen Experimenten die Wirkung allosterischer Modulatoren auf die Radioligandbindung in Abhängigkeit von der Zeit betrachtet. Wie bereits erwähnt, können allosterische Liganden an Muskarinrezeptoren die Assoziation eines Orthosters an den Rezeptor hemmen und die Dissoziation verzögern. Eine Assoziationshemmung eines Orthosters, in diesem Fall der Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS oder [<sup>3</sup>H]OxoM, kann auch durch einen kompetitiven Antagonisten an der orthosterischen Bindungsstelle bewirkt werden, während ein dissoziationsverzögernder Effekt spezifisch für allosterische Modulatoren ist (Kostenis und Mohr, 1996). Eine Hemmung der Dissoziation von Radioligand-Rezeptor-Komplexen kann nur über eine von der besetzten orthosterischen verschiedene, also allosterische Bindungsstelle vermittelt werden. Dissoziationsexperimente dienen also der Detektion eines allosterischen Bindungsverhaltens von Testsubstanzen und der Messung der allosterischen Wirksamkeit.

In Gleichgewichts-Bindungsexperimenten kann eine stark negative Kooperativität, die Folge eines allosterischen Bindungsverhaltens ist, nicht direkt von einer kompetitiven Interaktion einer Testsubstanz mit einem zur Markierung der orthosterischen Bindungsstelle eingesetzten Radioliganden unterschieden werden. Eine unveränderte Gleichgewichtsbindung des Radioliganden kann Folge einer neutralen Kooperativität einer allosterischen Testsubstanz mit dem Orthoster sein oder Folge einer fehlenden Interaktion der Testsubstanz mit dem Rezeptor. In diesen Fällen kann eine eventuelle allosterische Interaktion von Testsubstanzen durch Dissoziationsexperimente untersucht werden.

Die Veränderung der Konzentration der Radioligand-Rezeptor-Komplexe, die in Dissoziationsexperimenten betrachtet wird, ergibt sich als Summe der beiden Teilprozesse Rezeptor-Ligand-Assoziation und Rezeptor-Ligand-Dissoziation:

$$\frac{d[RL]}{dt} = k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] - k_{-1} \cdot [RL] \quad (\text{Gl. 25})$$

Durch Zugabe eines ca. tausendfachen Überschusses eines nicht markierten orthosterischen Liganden wird beim Start der Dissoziationsexperimente die Radioligand-Rezeptor-Assoziation quasi unterbunden. Es gilt in diesem Fall:

$$\frac{d[RL]}{dt} = -k_{-1} \cdot [RL] \quad (\text{Gl. 26})$$

Die Abnahme der Gesamtbindung des Radioliganden lässt sich durch eine monoexponentielle Funktion, wie sie für viele Zerfallsprozesse charakteristisch ist, beschreiben:

$$[B_t] = [B_0] \cdot e^{-k_{-1}t} + u \quad (\text{Gl. 27})$$

- [B<sub>t</sub>]: Gesamtbindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t  
[B<sub>0</sub>]: Gesamtbindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t = 0  
(Start der Dissoziationsreaktion)  
u: unspezifische Bindung des Radioliganden

Die Halbwertszeit der Dissoziation  $t_{1/2}$  gibt die Zeit an, innerhalb derer die Konzentration der Radioligand-Rezeptor-Komplexe auf die Hälfte des Ausgangswertes abnimmt. Durch Umformen von Gleichung 27 erhält man:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{-1}} \quad (\text{Gl. 28})$$

Eine durch allosterische Modulatoren bewirkte Dissoziationsverzögerung führt zu einer Verminderung der Geschwindigkeitskonstanten  $k_{-1}$  und zu einer Verlängerung der Dissoziations-Halbwertszeit des Orthosters.  $k_{-1}$ -Werte, die in Gegenwart von allosterischen Modulatoren bestimmt wurden, werden als apparente Geschwindigkeitskonstanten bezeichnet, da das Ausmaß der Dissoziationsverzögerung abhängig vom Anteil der Alloster-besetzten an den Gesamt Rezeptoren ist: Die Geschwindigkeit der Orthoster-Dissoziation wird bestimmt durch das Verhältnis zwischen dem Anteil der Orthoster-Moleküle, die mit einer bestimmten Geschwindigkeitskonstante von nicht Alloster-besetzten Rezeptoren dissoziieren, und dem Anteil der Orthoster-Moleküle, die mit einer bestimmten Geschwindigkeitskonstante von Alloster-besetzten Rezeptoren dissoziieren. Zur Auswertung eines Dissoziationsexperimentes wurden die

apparenten Geschwindigkeitskonstanten in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit des allosterischen Modulators gegen den Logarithmus der eingesetzten Modulator-Konzentrationen aufgetragen. An die Datenpunkte wurde durch computergestützte, nichtlineare Regression gemäß Gleichung 7 eine sigmoidale Kurve angepasst. Der Wendepunkt dieser Kurve wird als  $EC_{0,5diss}$  bezeichnet und entspricht derjenigen Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer Verlangsamung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Orthosters auf die Hälfte des Kontrollwertes führt.  $EC_{0,5diss}$  entspricht derjenigen Alloster-Konzentration, bei der an 50 % der Orthoster-besetzten Rezeptoren Alloster gebunden ist und ist ein Maß für die Affinität von allosterischen Modulatoren zu Orthoster-besetzten Rezeptoren (Tränkle et al., 1998a). Ist das Plateau einer Dosis-Effekt-Kurve von Dissoziationsexperimenten mit einem allosterischen Modulator signifikant verschieden von 0 % bedeutet dies, dass der Modulator nicht in der Lage ist, die Dissoziation des Orthosters vom Rezeptor vollständig zu verhindern. Ein von -1 signifikant verschiedenes Steilheitsmaß  $n_H$  deutet auf ein komplexes Bindungsverhalten des allosterischen Modulators hin, also eine von einem 1:1-Verhältnis abweichende Interaktion zwischen Alloster und Rezeptorprotein.

Ein besonderes Verfahren zur Untersuchung des Effekts von allosterischen Modulatoren auf die Orthoster-Dissoziation ist die sogenannte Zweipunkt-Kinetik. Das Verfahren ist von Kostenis und Mohr (1996) beschrieben worden. Hierbei wird die Radioligandbindung beim Start der Dissoziationsreaktion ( $t = 0$ ) und zu einem bestimmten Zeitpunkt  $t$  im Verlauf der Dissoziation gemessen. Voraussetzung für die Anwendbarkeit von Zweipunkt-kinetischen Messungen ist ein mono-exponentieller Verlauf der Radioligand-Dissoziation. Der Zeitpunkt  $t$  sollte so gewählt werden, dass er einerseits im steilen Bereich der Dissoziationskurve des Radioliganden liegt und andererseits ein genügend großes Messfenster, also Differenz der Radioligandbindung zwischen den Zeitpunkten  $t = 0$  und  $t$ , erhalten wird. Vorteile der Zweipunkt-Kinetik gegenüber der Untersuchung von kompletten Dissoziationsverläufen sind der geringere experimentelle Aufwand und ein höherer Versuchsdurchsatz.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Radioligand-Dissoziation für die verschiedenen bei der Zweipunkt-Kinetik eingesetzten Alloster-Konzentrationen lassen sich folgendermaßen berechnen:

$$k_{-1} = \frac{\ln\left(\frac{B_{t,\text{spez}}}{B_{0,\text{spez}}}\right)}{t} \quad (\text{Gl. 29})$$

- $B_{t,\text{spez}}$ : spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt  $t$   
 $B_{0,\text{spez}}$ : spezifische Bindung des Radioliganden beim Start der Dissoziationsreaktion ( $t = 0$ )  
 $t$ : Zeitpunkt der Beendigung der Radioligand-Dissoziation (Vakuumfiltration)

Die Auswertung der Dosis-Effekt-Kurven erfolgte analog dem Verfahren bei kompletten Dissoziationsverläufen durch Auftragung der apparenten Geschwindigkeitskonstanten in Prozent des Kontrollwertes ohne Alloster gegen den Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators.

### 2.3.6 Durchführung der Untersuchungen

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsstudien wurde entweder der Antagonist [ $^3\text{H}$ ]N-Methylscopolamin ([ $^3\text{H}$ ]NMS) oder der Agonist [ $^3\text{H}$ ]Oxotremorin M ([ $^3\text{H}$ ]OxoM) zur Markierung der orthosterischen Bindungsstelle von Muskarinrezeptoren eingesetzt. Die Versuche wurden in einem Na,K,P<sub>i</sub>-Puffer (L7) bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Temperatur von 23°C durchgeführt. Kinetische Versuche mit [ $^3\text{H}$ ]NMS bzw. [ $^3\text{H}$ ]OxoM wurden zur Verlangsamung der Dissoziation teilweise bei einer abgesenkten Temperatur durchgeführt. Die Bestimmung der unspezifischen Radioligandbindung erfolgte in Gegenwart eines Atropin-Überschusses (1  $\mu\text{M}$  bei Versuchen mit Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe, 3  $\mu\text{M}$  bei Versuchen mit Membransuspensionen aus COS7-Zellen). In Gegenwart eines Atropin-Überschusses, der zur Besetzung aller Muskarinrezeptoren führt, verbleibt nur die unspezifische Radioligandbindung an in der Membransuspension enthaltene Proteine oder das bei den Versuchen eingesetzte Filtermaterial. Die membrangebundene Radioaktivität wurde durch Filtration abgetrennt. Bei Experimenten mit Hausschwein-Herzventrikelhomogenat erfolgte die Abtrennung mittels Handfiltration über Glasfaser-Rundfilter (M9), bei Experimenten mit Membransuspensionen aus COS7-Zellen, also klonierten Muskarinrezeptoren, wurden ein Brandel-Filtrationssystem (G7) und Glasfaserfiltermatten (M8) eingesetzt. Die einzelnen Proben

wurden nach der Filtration in Szintillationsgefäße (M20) überführt und es wurde je Gefäß 5 ml eines Szintillationscocktails (R19) zugegeben. Während einer anschließenden mindestens zweistündigen Inkubationszeit wurde durch den Szintillationscocktail die membrangebundene Radioaktivität aus den Filtern freigesetzt. Die Messung dieser Radioaktivität erfolgte durch einen Flüssig-Szintillationszähler (G6).

### 2.3.6.1 Homologe Konkurrenzexperimente

Wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, dienen homologe Konkurrenzexperimente der Bestimmung von  $K_D$  und  $B_{max}$  einer rezeptorhaltigen Membransuspension. Im Rahmen dieser Arbeit wurden als Grundlage für weitere Bindungsexperimente homologe Konkurrenzexperimente mit [ $^3H$ ]NMS und [ $^3H$ ]OxoM und Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikelhomogenat durchgeführt, während in Bindungsexperimenten an klonierten Muskarinrezeptoren nur [ $^3H$ ]NMS eingesetzt wurde. Da die Affinität von [ $^3H$ ]OxoM zu Muskarinrezeptoren geringer und die unspezifische Bindung größer ist, wurde eine höhere Konzentration dieses Radioliganden eingesetzt als die in gewöhnlichen [ $^3H$ ]NMS-Versuchen verwendete Radioligandkonzentration. In Versuchen mit innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle punktmutierten  $M_2$ -Rezeptoren, nämlich den Mutanten  $M_2^{104}$ Tyrosin→Alanin und  $M_2^{104}$ Tyrosin→Serin, wurde aufgrund der stark verminderten N-Methylscopolamin-Affinität eine Konzentration von 1 nM [ $^3H$ ]NMS eingesetzt. Bei Versuchen an Handfiltrationsanlagen wurden die einzelnen Messpunkte dreifach bestimmt. Aufgrund einer geringeren Schwankung der Messwerte bei Einsatz eines maschinellen Filtrationsverfahrens wurde in den Versuchen am Brandel-Harvester eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Ansätze für Versuche mit Muskarinrezeptoren aus Hausschwein-Herzventrikelhomogenat wurden in mit einem Silanisierungsreagenz (R22) behandelte PP-Reaktionsgefäße pipettiert. Bei Versuchen mit klonierten Muskarinrezeptoren wurden Einweg-Borosilikat-Reagenzgläser (M1) verwendet, die für ein späteres Abfiltrieren des Reaktionsansatzes mit dem Brandel-Harvester geeignet waren. Die Versuchsansätze bei der homologen Konkurrenz waren folgendermaßen zusammengesetzt:

Volumen [ $\mu$ l]	Zugegebene Lösung	Konzentration im Versuchsansatz
100	[ $^3$ H]NMS in Aqua dest.	0,2 nM oder 1 nM
	oder	
100	[ $^3$ H]OxoM in Aqua dest.	1 nM
50	Aqua dest. (Gesamtbindung)	
	oder	
50	Atropin in Aqua dest. (unspezifische Bindung)	1 $\mu$ M oder 3 $\mu$ M
	oder	
50	NMS-Verdünnungsreihe in Aqua dest.	1/30 der zugegebenen Konzentration
	oder	
50	OxoM-Verdünnungsreihe in Aqua dest.	1/30 der zugegebenen Konzentration
1100	Inkubationspuffer	5 mM Na,K,P <sub>i</sub> -Puffer
250	Membransuspension in Puffer	
1500	Gesamtvolumen	

**Tab. 1:** Ansatzschema der homologen Konkurrenzexperimente mit [ $^3$ H]N-Methylscopolamin bzw. [ $^3$ H]Oxotremorin M. Als Membransuspension wurden aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe bzw. aus transient transfizierten COS7-Zellen gewonnene Muskarinrezeptoren eingesetzt.

Der zum Radioliganden strukturidentische Kompetitor, also unmarkiertes N-Methylscopolamin bzw. Oxotremorin M, wurde in steigenden Konzentrationen von 1 pM bis 1  $\mu$ M eingesetzt. Bei Versuchen mit Hausschwein-Herzventrikelhomogenat wurden 8 Konzentrationen der unmarkierten Substanz eingesetzt, während bei Versuchen am Brandel-Harvester 10 Konzentrationen (entspricht der vollständigen Belegung eines halben Filters) eingesetzt wurden. Von der mit 5 mM Puffer verdünnten Membransuspension wurde soviel eingesetzt, dass einerseits die membrangebundene Radioaktivität ein ausreichend großes Szintillationssignal ergab, andererseits aber nicht mehr als 10 % des eingesetzten Radioliganden weggebunden wurde. Die Inkubationszeit für die Versuche ergab sich als Fünffaches der Dissoziations-Halbwertszeit des Radioliganden an dem jeweiligen Rezeptor bzw. der Rezeptormutante, mindestens jedoch 2 h. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion wie in Kapitel 2.3.6.4 beschrieben durch Filtration beendet und die membrangebundene Radioaktivität wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben bestimmt.

### 2.3.6.2 Heterologe Interaktionsexperimente

In heterologen Interaktionsexperimenten mit [<sup>3</sup>H]NMS bzw. [<sup>3</sup>H]OxoM wurde die Gleichgewichtsbindung von allosterischen Modulatoren, orthosterischen Liganden und allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen untersucht. Es wurde folgendes Ansatzschema verwendet:

Volumen [μl]	Zugegebene Lösung	Konzentration im Versuchsansatz
100	[ <sup>3</sup> H]NMS in Aqua dest.	0,2 nM oder 1 nM
oder		
100	[ <sup>3</sup> H]OxoM in Aqua dest.	1 nM
50	Aqua dest. (Gesamtbindung)	
oder		
50	Atropin in Aqua dest. (unspezifische Bindung)	1 μM oder 3 μM
oder		
50	allosterischer Modulator in Aqua dest.	1/30 der zugegebenen Konzentration
oder		
50	orthosterischer Ligand in Aqua dest.	1/30 der zugegebenen Konzentration
oder		
50	Hybridsubstanz in Aqua dest.	1/30 der zugegebenen Konzentration
1100	Inkubationspuffer	5 mM Na,K,P <sub>i</sub> -Puffer
250	Membransuspension in Puffer	
1500	Gesamtvolumen	

**Tab. 2:** Ansatzschema der heterologen Kompetitionsexperimente mit [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin bzw. [<sup>3</sup>H]Oxotremorin M. Als Membransuspension wurden aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe bzw. aus transient transfizierten COS7-Zellen gewonnene Muskarinrezeptoren eingesetzt.

#### 2.3.6.2.1 Heterologe Kompetition

In heterologen Kompetitionsexperimenten wurden vom Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS strukturell verschiedene orthosterische Liganden eingesetzt. Es wurde die Affinität von orthosterischen Antagonisten und Agonisten zu Wildtyp- und punktmutierten Muskarinrezeptoren bestimmt. Wie in den homologen Kompetitionsexperimenten

wurde als Inkubationszeit das Fünffache der Dissoziations-Halbwertszeit des Radioliganden an dem jeweiligen Rezeptor gewählt, mindestens jedoch 2 h.

#### **2.3.6.2.2 Allosterische Interaktionsexperimente**

In dieser Art der Versuche wurde der Effekt von typischen allosterischen Modulatoren sowie von zwei allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen auf die [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindung untersucht. Die Hybridsubstanzen sind an dieser Stelle aufgeführt, da sie eine, für eine allosterische Interaktion typische, nicht vollständige Inhibition der spezifischen Radioligandbindung aufwiesen. Für die Berechnung der Inkubationszeit wurde Gleichung 23 nach Lazareno und Birdsall angewendet, wobei die Inkubationszeit für die höchste im Versuch eingesetzte Konzentration der allosterisch wirksamen Testsubstanz berechnet wurde.

#### **2.3.6.2.3 Experimente zur G-Protein-Kopplung**

In Experimenten zur G-Protein-Kopplung der verwendeten Rezeptoren wurde der Einfluss von Guanylnukleotiden auf die Affinität eines Agonisten untersucht. Als Agonist wurde entweder der endogene Agonist an Muskarinrezeptoren Acetylcholin, Oxotremorin M, das Oxotremorin M-Derivat Iperoxo oder die allosterisch/orthosterische Hybridsubstanz DDT-5 eingesetzt. Das Guanylnukleotid wurde in einer fixen Konzentration von 100 µM im gesamten Versuchsansatz nach folgendem Schema eingesetzt:

Volumen [µl]	Zugegebene Lösung	Konzentration im Versuchsansatz
100	[ <sup>3</sup> H]NMS in Aqua dest.	0,2 nM
50	Aqua dest. (Gesamtbindung)	
oder		
50	Atropin in Aqua dest. (unspezifische Bindung)	1 µM oder 3 µM
oder		
50	Agonist in Aqua dest.	1/30 der zugegebenen Konzentration
50	Guanylnukleotid in Puffer	1/30 der zugegebenen Konzentration
1050	Inkubationspuffer	5 mM Na,K,P <sub>i</sub> -Puffer
250	Membransuspension in Puffer	
1500	Gesamtvolumen	

**Tab. 3:** Ansatzschema der Experimente zur G-Protein-Kopplung der verwendeten Rezeptoren mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin und einem Agonisten. Die Experimente wurden mit aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe bzw. mit aus transient transfizierten COS7-Zellen gewonnenen Muskarinrezeptoren durchgeführt.

Als Guanylnukleotid wurde Guanosindiphosphat (GDP), Guanosintriphosphat (GTP) oder das hydrolysestabile GTP-Analogon Guanylylimidodiphosphat (Gpp(NH)p) verwendet.

### 2.3.6.3 Kinetische Experimente

#### 2.3.6.3.1 Untersuchung eines kompletten Dissoziationsverlaufs (Hausschwein-Herzventrikelhomogenat)

Es wurden komplette Dissoziationsverläufe des Radioliganden [<sup>3</sup>H]OxoM an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren unter verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht, um die OxoM-Dissoziation einem mono- oder biphasischen Verlauf zuordnen zu können. Die Versuche wurden in 5 mM Na,K,P<sub>i</sub>-Puffer bei einem pH-Wert von 7,4 durchgeführt. In Versuchen bei 23°C wurde die [<sup>3</sup>H]Oxotremorin M-Dissoziation über 2 h beobachtet, in Versuchen bei 13°C über 4 h. In bis zu fünf 50 ml-Erlenmeyerkolben (G11) wurde jeweils der folgende Versuchsansatz pipettiert:

Volumen [ $\mu$ l]	Zugegebene Lösung	Konzentration im Versuchsansatz
1600	[ $^3$ H]OxoM in Aqua dest.	0,5 oder 1 oder 1,5 nM
200	Aqua dest.	
16800	Inkubationspuffer	5 mM Na,K,P <sub>i</sub> -Puffer
4000	Membransuspension in Puffer	
22600	Gesamtvolumen	

**Tab. 4:** Ansatzschema zur Untersuchung eines kompletten Dissoziationsverlaufs von [ $^3$ H]Oxotremorin M mittels manueller Einzelfiltration. Als Membransuspension wurden aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe gewonnene Muskarinrezeptoren eingesetzt.

Mit der Zugabe des Homogenats in die Erlenmeyerkolben begann eine Inkubations-Zeit von 30 min (bzw. 60 min bei 13°C) bis zum Start der Dissoziationsreaktion, in der sich Radioligand-Rezeptor-Komplexe bildeten. Nach 30 min (bzw. 60 min) wurden 3 Proben von je 1 ml zur Bestimmung der Gesamtbindung entnommen. Der Start der Dissoziationsreaktion erfolgte durch Zugabe von 1,4 ml einer Atropinlösung (1  $\mu$ M Endkonzentration im Versuchsansatz). Danach wurden nach einem festgelegten Zeitplan aus jedem Erlenmeyerkolben 20 Proben zu 1 ml entnommen und wie in Kapitel 2.3.6.4.1 beschrieben manuell filtriert. Die membrangebundene Radioaktivität wurde durch einen Szintillationszähler (G6) bestimmt. Die Auswertung der erhaltenen Bindungsdaten erfolgte durch die Software GraphPad Prism<sup>®</sup> (Version 4.03): Mittels eines F-Tests wurde geprüft, ob die erhaltenen Dissoziationsverläufe signifikant besser durch eine monoexponentielle Funktion, also einen monophasischen Dissoziationsverlauf, oder durch eine biexponentielle Funktion, also einen biphasischen Dissoziationsverlauf, beschrieben wurden.

### 2.3.6.3.2 Untersuchung eines kompletten Dissoziationsverlaufs (klonierte Rezeptoren)

An M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin-Rezeptormutanten wurden Bestimmungen der Dissoziations-Halbwertszeit des Radioliganden [ $^3$ H]NMS durchgeführt. Diese Versuche am Brandel-Harvester wurden in Einweg-Borosilikat-Gläsern (M1) nach folgendem Schema angesetzt:

Volumen [ $\mu$ l]	Zugegebene Lösung	Konzentration im Versuchsansatz
10	[ $^3$ H]NMS in Aqua dest.	1 nM
10	Aqua dest. (Gesamtbindung)	
	oder	
10	Atropin in Aqua dest. (unspezifische Bindung)	3 $\mu$ M
480	Inkubationspuffer	5 mM Na,K,P <sub>i</sub> -Puffer
500	Membransuspension in Puffer	
1000	Gesamtvolumen	

**Tab. 5:** Ansatzschema zur Untersuchung eines kompletten Dissoziationsverlaufs von [ $^3$ H]NMS mit Filtration am Brandel-Harvester. Als Membransuspension wurden Muskarinrezeptoren aus transient transfizierten COS7-Zellen verwendet.

Die Gesamtbindung sowie die unspezifische Bindung wurden vierfach bestimmt. Die Bindung des Radioliganden zu den verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf des Dissoziationsvorganges wurde doppelt bestimmt. Der Radioligand, Inkubationspuffer und Aqua dest. (Gesamtbindung) bzw. Atropin (unspezifische Bindung) wurden in den Reaktionsgläschen vorgelegt. Bei der anschließenden Zugabe von jeweils 500  $\mu$ l der verdünnten Membransuspension wurde ein Zeitplan eingehalten, sodass der im Reaktionsgläschen enthaltene Radioligand jeweils 30 min mit Membransuspension inkubiert wurde. In dieser Zeit bildeten sich Radioligand-Rezeptor-Komplexe. Die Dissoziationsreaktion wurde danach durch Zugabe von je 1 ml eines Atropin-Überschusses (3  $\mu$ M Endkonzentration im Versuchsansatz) gestartet. Der Start der Dissoziationsreaktion erfolgte bei jeweils zwei Reaktionsgläschen zu bestimmten Zeitpunkten vor Beendigung der Reaktion durch Abfiltrieren, da die Bindung zu den verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Dissoziationsreaktion doppelt bestimmt werden sollte. Nach dem Abfiltrieren wurde die membrangebundene Radioaktivität wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben bestimmt. Bei einem monoexponentiellen Dissoziationsverlauf kann die Dissoziations-Halbwertszeit des Radioliganden nach Gleichung 28 berechnet werden.

### 2.3.6.3.3 Zweipunkt-Dissoziationsexperimente

Zur Untersuchung des Effekts von allosterisch wirksamen Verbindungen auf die Kinetik der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation an klonierten Muskarinrezeptoren, in diesem Fall humanen und humanen punktmutierten Muskarinrezeptoren, wurde das Verfahren der Zweipunkt-Kinetik angewendet. Die Versuche wurden am Brandel-Harvester mit Einweg-Borosilikat-Gläsern durchgeführt. Gesamtbindung, unspezifische Bindung und der Kontrollwert der Radioliganddissoziation wurden vierfach bestimmt, während die Dissoziationskonstante in Anwesenheit einer bestimmten Konzentration der allosterisch wirksamen Verbindung doppelt bestimmt wurde. Der Versuchsansatz war folgendermaßen zusammengesetzt:

Volumen [µl]	Zugegebene Lösung	Konzentration im Versuchsansatz
10	[ <sup>3</sup> H]NMS in Aqua dest.	1 nM
10	Aqua dest. (Gesamtbindung)	
10	oder Atropin in Aqua dest. (unspezifische Bindung)	3 µM
480	Inkubationspuffer	5 mM Na,K,P <sub>i</sub> -Puffer
500	Membransuspension in Puffer	
1000	Gesamtvolumen	

**Tab. 6:** Ansatzschema zur Untersuchung der Beeinflussung der [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin-Dissoziation durch allosterisch wirksame Verbindungen mittels Zweipunkt-Kinetik.

Nach Zugabe der 500 µl Membransuspension zu dem restlichen Versuchsansatz (siehe Tab. 6) folgte eine Inkubationszeit von 30 min. In dieser Zeit bildeten sich Radioligand-Rezeptorkomplexe. Die Radioligand-Dissoziation wurde nach den 30 min durch Zugabe von je 1 ml einer Atropin-Lösung (3 µM Endkonzentration im Versuchsansatz) pro Reaktionsgläschen gestartet. Die verwendeten Startlösungen enthielten für die Bestimmung des Kontrollwertes der Dissoziation nur Atropin, für die Untersuchung des dissoziationsverzögernden Effekts steigende Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz. In die Reaktionsgläschen zur Bestimmung der Gesamt- und unspezifischen Bindung wurde die Membransuspension erst 30 min vor der Filtration gegeben, um eine entsprechende Inkubationszeit von

Radioligand und Membransuspension wie bei den Reaktionsgläschen der Dissoziationsreaktion zu erhalten. Die Differenz der Messwerte der Gesamt- und unspezifischen Bindung ergab die spezifische Radioligandbindung zum Zeitpunkt  $t = 0$ . Nach einer festgelegten Zeit, die ca. dem 1,5 fachen der Kontroll-Dissoziations-Halbwertszeit von [ $^3\text{H}$ ]NMS an dem jeweiligen Rezeptor bzw. der Rezeptormutante entsprach, wurde die Reaktion durch Abfiltrieren beendet. Die Kontroll-Dissoziations-Halbwertszeiten von [ $^3\text{H}$ ]NMS an verschiedenen Muskarinrezeptoren waren schon innerhalb der Arbeitsgruppe bestimmt worden, sodass direkt mit der Durchführung von Zweipunkt-Kinetik-Messungen begonnen werden konnte. Nach dem Abfiltrieren wurde die membrangebundene Radioaktivität nach dem in Kapitel 2.3.6 beschriebenen Verfahren bestimmt. Aus den erhaltenen Bindungsdaten wurden wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben Konzentrations-Effekt-Kurven erstellt.

#### **2.3.6.4 Filtrationsmethoden**

##### **2.3.6.4.1 Einzelfiltration an Handfiltrationsanlagen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Versuche mit porcinen  $M_2$ -Rezeptoren aus Hausschwein-Herzventrikelhomogenat an Handfiltrationsanlagen durchgeführt. Die Versuche wurden in 5 mM Na,K, $P_i$ -Puffer (L7) durchgeführt. Bei der Filtration wurden Glasfaser-Rundfilter (M9) eingesetzt, die zuvor zur Reduktion der unspezifischen Radioligandbindung für mindestens 2 h in einer 0,25 % Polyethylenimin-Lösung (L9) aufbewahrt worden waren. Unmittelbar vor Filtration der Proben wurden die Filter in der Filtrationsanlage platziert und mit 5 ml eines eisgekühlten Na,K, $P_i$ -Puffers gespült. Nach Filtration der Proben von 1 ml Volumen wurden die Filter zügig mit zweimal 5 ml eines eisgekühlten Na,K, $P_i$ -Puffers gespült, um die unspezifische Bindung des Radioliganden an den Filter zu vermindern. Die Filtration der Proben und die Spülschritte wurden mittels eines von einer Vakuumpumpe erzeugten Unterdrucks durchgeführt. Nach der Filtration wurden die einzelnen Filter mit einer Pinzette in Szintillationsgefäße (M20) überführt und mit 5 ml eines Szintillations-Cocktails versetzt. Die Bestimmung der membrangebundenen Radioaktivität erfolgte nach einer mindestens zweistündigen Einwirkzeit des Szintillations-Cocktails durch einen Flüssig-Szintillationszähler (G6).

### 2.3.6.4.2 Filtration durch Filtermatten mittels des Brandel-Harvesters

Die Versuche mit klonierten Muskarinrezeptoren wurden an einem Brandel-Harvester (G7) durchgeführt. Dieses Filtrationssystem ermöglicht die gleichzeitige Filtration von 48 Einzelproben über eine Filtermatte (M8). Die einzelnen Proben wurden in Borosilikat-Gläsern in einem speziell für die Filtration am Brandel-Harvester geeigneten Ständer angesetzt. 30 min vor dem Filtrationszeitpunkt wurden die Filtermatten zur Reduktion der unspezifischen Bindung in eine 0,1 % Polyethylenimin-Lösung eingelegt. Der Harvester wurde kurz vor dem Abfiltrieren des Versuchsansatzes mit eisgekühltem Na,K,P<sub>i</sub>-Puffer (L6) durchgespült und danach wurde die Filtermatte in den Filtrationsblock des Harvesters eingelegt. Unmittelbar nach Abfiltrieren des Versuchsansatzes wurde die Filtermatte mit eisgekühltem Na,K,P<sub>i</sub>-Puffer (L6) gespült, wobei bei Versuchen an den Rezeptormutanten M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin→Alanin und M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin→Serin aufgrund der verminderten [<sup>3</sup>H]NMS-Affinität einmal gespült wurde während bei allen anderen Versuchen zweimal gespült wurde. Nach der Filtration waren wegen des Anpressdrucks im Filterblock die 48 von den Einzelproben stammenden kreisrunden Areale auf der Filtermatte gut erkennbar und wurden mit einer Pinzette in Szintillationsgefäße überführt. Nach Zugabe von je 5 ml eines Szintillations-Cocktails und einer Einwirkzeit von mindestens 2 h erfolgte die Bestimmung der membrangebundenen Radioaktivität mittels eines Szintillationszählers.

## 2.4 Statistische Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit angewandten statistischen Methoden sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Das arithmetische Mittel  $\bar{x}$  ergibt sich bei einer Anzahl von  $n$  Einzelwerten aus der Summe der Einzelwerte  $x_i$  nach der folgenden Gleichung:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (\text{Gl. 30})$$

Ein Maß für die Streuung von Messwerten ist deren Standardabweichung SD (englisch: standard deviation). Die Standardabweichung entspricht der Quadratwurzel der Varianz  $s^2$ :

$$SD = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (\text{Gl. 31})$$

Der Standardfehler des Mittelwertes SEM (englisch: standard error of the mean) ergibt sich aus der Standardabweichung nach folgender Formel:

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (\text{Gl. 32})$$

Bei den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Messwerten wurde jeweils das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM berechnet. Die Berechnung erfolgte durch die Software GraphPad Prism<sup>®</sup>. Wenn ein Messwert nur zweimal bestimmt wurde, wurden der Mittelwert und die beiden Einzelwerte angegeben.

Zum Vergleich der Varianzen von zwei Datensätzen wurde ein F-Test durchgeführt.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{mit } s_1^2 > s_2^2 \quad (\text{Gl. 33})$$

$s_1^2$ :            Varianz des Datensatz 1  
 $s_2^2$ :            Varianz des Datensatz 2

Der auf diese Weise berechnete F-Wert (Prüfgröße) wurde von der Software GraphPad InStat<sup>®</sup> mit einem aus der F-Verteilung vorgegebenen F-Wert verglichen. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  von 5 % wurde ein p-Wert berechnet. Lag dieser p-Wert unter der Grenze von 0,05 ( $p < 0,05$ ), ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied der verglichenen Varianzen. Vor der Durchführung eines Mittelwertvergleichs mittels t-Test wurde auf diese Weise geprüft, ob ein statistisch signifikanter Unterschied in einem Streuungsparameter zwischen zwei Datensätzen bestand.

Bei der Analyse der Bindungsdaten war es häufig erforderlich zu überprüfen, durch welches von zwei verwandten Modellen die Daten signifikant besser

beschrieben wurden, z.B. bei einem Dissoziationsexperiment durch einen mono- oder biexponentiellen Verlauf oder bei einem heterologen Konkurrenzexperiment durch ein konstant = -1 gesetztes oder durch ein freilaufendes Steilheitsmaß. Hierzu wurden die beiden verwandten Modelle mittels eines F-Tests, der die Summe der vertikalen Abstandsquadrate der Einzelwerte von der angepassten Kurve sowie die Freiheitsgrade der Modelle berücksichtigt, verglichen:

$$F = \frac{(ss_{\text{null}} - ss_{\text{alt}}) / (df_{\text{null}} - df_{\text{alt}})}{ss_{\text{alt}} / df_{\text{alt}}} \quad (\text{Gl. 34})$$

$ss_{\text{null}}$ :	Summe der Abstandsquadrate bei Anwendung der einfacheren Gleichung (Nullhypothese)
$ss_{\text{alt}}$ :	Summe der Abstandsquadrate bei Anwendung der komplexeren Gleichung (Alternativhypothese)
$df_{\text{null}}$ :	Anzahl der Freiheitsgrade der einfacheren Gleichung
$df_{\text{alt}}$ :	Anzahl der Freiheitsgrade der komplexeren Gleichung

Der berechnete F-Wert wurde von der Software GraphPad Prism<sup>®</sup> mit einem für die Anzahl der Freiheitsgrade vorgegebenen Wert verglichen und daraus ein p-Wert errechnet. Bei der Anwendung des F-Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % vorgegeben, sodass bei einem p-Wert < 0,05 die Nullhypothese verworfen und damit die Daten signifikant besser durch das komplexere Modell beschrieben wurden.

Zum Vergleich des Mittelwertes zweier unterschiedlicher Datensätze wurde im Rahmen dieser Arbeit ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ( $p < 0,05$ ) durchgeführt. Ein p-Wert < 0,05 bedeutet einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten. Voraussetzung für die Anwendung des t-Tests sind eine Normalverteilung der verglichenen Daten sowie kein signifikanter Unterschied in der Standardabweichung. Vor Durchführung des t-Tests durch die Software GraphPad InStat<sup>®</sup> wurden mittels des oben beschriebenen F-Tests die Standardabweichungen der beiden Datensätze verglichen. Bei einem signifikanten Unterschied in der Standardabweichung wurde der t-Test mit Welch-Korrektur durchgeführt.

## 2.5 Materialien

### 2.5.1 Geräte und Apparaturen

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
G1	Accu-Jet <sup>®</sup> Pipettierhilfe	Brand
G2	Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss
G3	Beckman Avanti J-20 XP Zentrifuge	BeckC
G4	Beckman DU 640 Spectrofotometer	BeckC
G5	Beckman Optima <sup>™</sup> LE-80K Ultracentrifuge	BeckC
G6	Beckman LS 6500 Szintillationszähler	Beckl
G7	Brandel Harvester, M-24	BioM
G8	Deckgläser 20x26 mm, für Neubauer-Zählkammer	Marie
G9	Elix <sup>®</sup> Destillieranlage	Milli
G10	Eppendorf 5417C Zentrifuge	Epp
G11	Erlenmeyerkolben 50 ml	Labo
G12	Finnpipette <sup>®</sup> digital Pipetten, verschiedene Größen	Ther
G13	Finnpipette <sup>®</sup> Multistep-Pipette	Ther
G14	GFL <sup>®</sup> -Schüttelwasserbad 1083, 1086	GFL
G15	Herasafe <sup>®</sup> -Werkbank HS15, Klasse II	Hera
G16	Julabo <sup>®</sup> TW12 Wasserbad mit Kühlfunktion	Jul
G17	Milli-Q <sup>®</sup> Biocel A10 Reinstwasseranlage	Milli
G18	Neubauer Zählkammer	Marie
G19	Orbital Shaker, Model 420	The
G20	pH 523 pH-Meter	WTW
G21	Polytron-Homogenisator	Kine
G22	Potter Elvehjem Glashomogenisator	JaKu
G23	Scotsman AF 100 AS-E 230/50/1 Eismaschine	Scot
G24	Thermoforma -80°C Gefrierschrank	Ther
G25	Thermoforma Series II Water Jacketed CO <sub>2</sub> - Inkubator	Ther
G26	Ultrospec 3300 pro UV-Fotometer	Bioch
G27	Variomag <sup>®</sup> Elektronikrührer mit Heizfunktion	H+P

G28	Vortex Genie 2 <sup>®</sup> G-560 E	Sci
G29	Waring-Blendor-Homogenisator	War
G30	Waagen AG204, B2002-S, PB 403-S	Met

## 2.5.2 Verbrauchsmaterialien

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Artikel-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
M1	Borosilikat-Reagenzgläser 16x100 mm	FB51330	Fish
M2	Cellstar <sup>®</sup> 10 ml, 25 ml Einmalpipetten		Grein
M3	Chromatografie-Flasche G16 klar	300140	CS
M4	Falcon tubes 15 ml, 50 ml steril		Grein
M5	Finnpipette <sup>®</sup> -Multistepper-Pipettenspitzen 0,5 ml, 1,25 ml, 2,5 ml, 5,0 ml		Ther
M6	Gewebekulturschale steril, 100/20 mm	664160	Grein
M7	Gewebekulturschale steril, 145/20 mm	639160	Grein
M8	Glasfaserpapier MGB 125x379 mm	2.1102. 125379 G	Munk
M9	Glasfaser Rundfilter GF6	10370018	Schlei
M10	Kryovials 1,5 ml	123263	Grein
M11	Parafilm <sup>®</sup> M Laboratory Film		Brand
M12	Pipettenspitzen 0,5-5,0 ml		Brand
M13	Pipettenspitzen TipOne <sup>®</sup> 1-200 µl	S1111-0006	Sar
M14	Pipettenspitzen TipOne <sup>®</sup> 101-1000 µl	S1111-2020	Sar
M15	PP-Reaktionsgefäße 1,5 ml	616201	Grein
M16	Rollrandgläser 15 ml mit Deckel		Labo
M17	Schraubkappe für Chromatografie-Flasche G16	300332	CS
M18	Schraubverschluss für Szintillationsgefäße 27 mm	619080	Fish
M19	SFCA Bottle Top Filter 150 ml	8-1020-05	Nalge
M20	Szintillationsgefäße aus PE 27/60 mm	619301	Fish
M21	Qiagen Plasmid Maxi Kit	12162	Qia
M22	Zellschaber 25 cm, steril	83.1830	Sar

### 2.5.3 Reagenzien

	<b>Bezeichnung</b>	<b>Artikel-Nr.</b>	<b>Hersteller</b>
R1	Albumin, human (Fraktion V)	A-1653	Sigma
R2	Ampicillin-Natrium	A-9518	Sigma
R3	Bradford-Reagent	B-6916	Sigma
R4	Dimethylsulfoxid (DMSO) 99,5 % GC	D-5879	Sigma
R5	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	S-0876	Sigma
R6	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) Nährmedium	D-5796	Sigma
R7	Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	E-9884	Sigma
R8	FKS (Fetales Kälberserum)	F-7524	Sigma
R9	Folin-Ciocalteu Phenolreagenz	109001	Merck
R10	Glycerol 99 %	G-5516	Sigma
R11	Isopropanol 99,5 %		Sigma
R12	Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	P-5379	Sigma
R13	Luria-Bertani-Medium	L-3522	Sigma
R14	Natronlauge 1N	35256	RdH
R15	PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Modified)-Pulver	D-5652	Sigma
R16	Penicillin (10000 U/ml)-Streptomycin (10 mg/ml)-Lösung	P-0781	Sigma
R17	Polyethylenimin (PEI, 50 % wässrige Lösung)	P-3143	Sigma
R18	PolyFect <sup>®</sup> Transfection Reagent	301107	Qia
R19	Ready Protein+ <sup>™</sup> Szintillationscocktail	586604	BeckC
R20	Saccharose	1.07687.1000	Merck
R21	Salzsäure 1N	23204	Grüss
R22	Sigmacote <sup>®</sup> Silanisierungsreagenz	SL-2	Sigma
R23	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	1.08382.0500	Merck
R24	Trypsin-EDTA-Lösung	T-3924	Sigma

## 2.5.4 Verwendete Lösungen und Puffer

- L1            **Ampicillin-Lösung 50 mg/ml, steril**  
750 mg Ampicillin-Na (R2) lösen in 15 ml Aqua dest., sterilfiltrieren. Aliquotieren zu je 550 µl in sterile PP-Reaktionsgefäße (M15). Lagerung bei -20°C.
- L2            **Dinatriumhydrogenphosphat-Stammlösung 0,5 M**  
178,0 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O unter leichtem Erwärmen in ca. 1,5 l Aqua dest. lösen. Auffüllen mit Aqua dest. auf ein Gesamtvolumen von 2,0 l.
- L3            **Glycerol-Lösung 60 %**  
30,3 ml Glycerol 99 % (R10) und 19,7 ml Aqua dest. mischen, sterilfiltrieren. Lagerung bei 2-8°C.
- L4            **Kaliumdihydrogenphosphat-Stammlösung 0,5 M**  
68,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1,0 l Aqua dest. lösen. Lagerung unter Lichtausschluss.
- L5            **Luria-Bertani-Medium, Ampicillin-haltig**  
12,5 g des LB-Medium-Pulvers (R13) in 500 ml Aqua dest. lösen. Lösung autoklavieren (121°C, 25 min). Nach dem Abkühlen 500 µl Ampicillin-Lösung (L1) zugeben.
- L6            **Na,K,P<sub>i</sub>-Puffer 40 mM**  
300 ml Dinatriumhydrogenphosphat-Stammlösung 0,5 M (L2) und 60 ml Kaliumdihydrogenphosphat-Stammlösung 0,5 M (L4) mit Aqua dest. auf 4,5 l auffüllen. Dieser Puffer enthält 32 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Lagerung bei 2-8°C.
- L7            **Na,K,P<sub>i</sub>-Puffer pH 7,4; 5 mM; 5,21 mM; 5,68 mM; 10,42 mM**  
Herstellung durch Verdünnen mit Aqua dest. aus Na,K,P<sub>i</sub>-Puffer 40 mM (L6). Einstellen des pH-Werts mit 1 N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Lagerung bei 2-8°C.
- L8            **PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)-Lösung, steril**  
1 Packung PBS-Pulver (R15) in 1,0 l Aqua dest. lösen. Sterilfiltration durch Einwegfilter (M19) in zwei autoklavierte 0,5 l Glasgefäße. Lagerung bei 2-8°C.
- L9            **Polyethylenimin (PEI)-Lösung 0,1 %; 0,25 %**  
Herstellung durch Verdünnen mit Aqua dest. aus PEI-Stammlösung 1 % (L10). Lagerung bei 2-8°C.
- L10          **Polyethylenimin (PEI)-Stammlösung 1 %**  
10,0 g PEI-Lösung 50 % (R17) in 490 ml Aqua dest. lösen. Lagerung bei 2-8°C.

- L11            **Saccharose-Lösung 0,32 M**  
 109,54 g Saccharose (R20) in 1,0 l Aqua dest. lösen. Lagerung bei 2-8°C.
- L12            **Tris-EDTA-Puffer (TE), steril**  
 29,2 mg Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA) (R7) unter Zugabe von etwas NaOH (1 N, R14) in ca 70 ml Aqua dest. lösen. 121,1 mg Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (R23) zugeben, pH-Wert mit 1 N HCl (R21) auf 8,0 einstellen. Lösung mit Aqua dest. auf 100,0 ml auffüllen und sterilfiltrieren. Lagerung bei 2-8°C.

### 2.5.5 Auflistung der Herstellerfirmen

BeckC	Beckman Coulter GmbH, Unterschleissheim, GER
Beckl	Beckman Instruments, Palo Alto, USA
Bioch	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
BioM	Biomedical Research and Development Laboratories, Gaithersburg, Maryland, USA
Brand	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, GER
CS	CS Chromatografie Service GmbH, Langerwehe, GER
Fish	Fisher Scientific, Schwerte, GER
GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, GER
Grein	Greiner-Bio-One, Solingen, GER
Grüss	Grüssing Diagnostika Analytika, Filsung, GER
Hera	Heraeus, Hilden, GER
H+P	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleissheim, GER
JaKu	Janke und Kunkel, IKA® Labortechnik, Staufen, GER
Jula	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, GER
Kine	Kinematica AG, Littau-Luzern, CH
Labo	Labomedic GmbH, Bonn, GER
Marie	Paul Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen, GER
Merck	Merck KgaA, Darmstadt, GER
Met	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, GER
Millipore	Millipore, Billerica, USA
Munk	Munktell Filter AB, Falun, SE
Nalge	Nalge Nunc International, Rochester, New York, USA
Qia	Qiagen GmbH, Hilden, GER
RdH	Riedel-deHaën Laborchemikalien GmbH & Co KG, Seelze, GER
Sar	Sarstedt Inc., Newton, North Carolina, USA
Schlei	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, GER
Sci	Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA
Scot	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, Illinois, USA
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GER
Ther	ThermoForma Scientific, Marietta, Ohio, USA
War	Waring, New Hartford, USA
WTW	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, GER
Zeiss	Carl Zeiss AG, Oberkochen, GER

## 2.5.6 Computerprogramme

ChemWindow<sup>®</sup> (Version 6.0; BioRad Laboratories, Philadelphia, USA):

Erstellung von chemischen Strukturformeln.

GraphPad Prism<sup>®</sup> (Version 4.03; GraphPad<sup>®</sup> Software, San Diego, USA):

Analyse und grafische Darstellung der Bindungsdaten.

GraphPad InStat<sup>®</sup> (Version 3.05; GraphPad<sup>®</sup> Software, San Diego, USA):

Statistische Auswertung der Bindungsdaten.

Microsoft<sup>®</sup> Word (Version 2003; Microsoft Corporation, Redmond, USA):

Textverarbeitung.

Microsoft<sup>®</sup> Excel (Version 2003; Microsoft Corporation, Redmond, USA):

Erstellung von Tabellen.

Microsoft<sup>®</sup> PowerPoint (Version 2003; Microsoft Corporation, Redmond, USA):

Präsentation von Ergebnissen.

Reference Manager (Version 10; ISI Research Soft, Philadelphia, USA):

Erstellung der Literaturliste für das Manuskript der Doktorarbeit.

## 2.6 Strukturformeln der eingesetzten Verbindungen

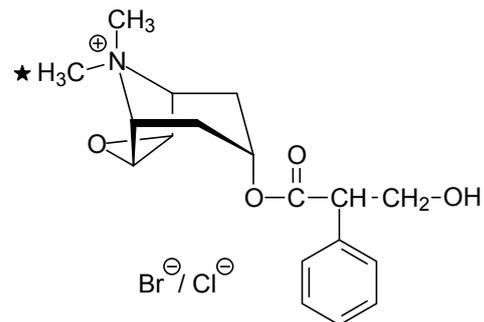
### 2.6.1 Radioliganden

In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Radioligand-Bindungsstudien wurde entweder der tritiierte Antagonist an Muskarinrezeptoren [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin oder der tritiierte Agonist [<sup>3</sup>H]Oxotremorin M eingesetzt.

#### N-Methylscopolamin (NMS)

-chlorid M: 353,8 g/mol

-bromid M: 398,3 g/mol



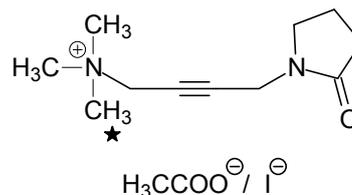
**Abb. 4:** Strukturformel des Muskarinrezeptor-Antagonisten N-Methylscopolamin. Die nicht radioaktiv markierte Substanz lag als Bromidsalz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GER) vor, die tritiierte Verbindung als Chloridsalz (PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA). Die spezifische Aktivität des [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin betrug je nach Charge 81-82 Ci/mmol.

★ : Position der radioaktiven Markierung.

#### Oxotremorin M (OxoM)

-acetat M: 254,2 g/mol

-iodid M: 322,2 g/mol



**Abb. 5:** Strukturformel des Muskarinrezeptor-Agonisten Oxotremorin M. Die nicht radioaktiv markierte Substanz lag als Iodidsalz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GER) vor, die tritiierte Verbindung als Acetatsalz (PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA). Die spezifische Aktivität des [<sup>3</sup>H]Oxotremorin M betrug je nach Charge 75,8-86,4 Ci/mmol.

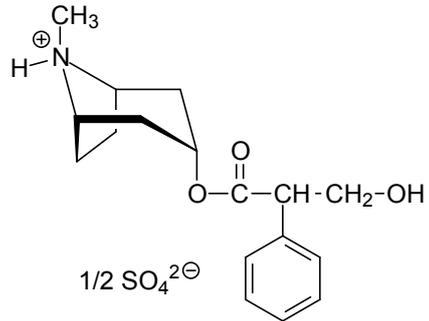
★ : Position der radioaktiven Markierung.

## 2.6.2 Antagonisten an Muskarinrezeptoren

### Atropin

-sulfat

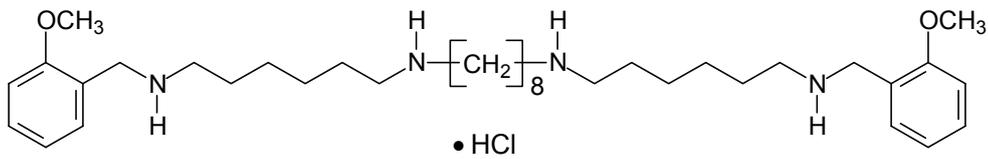
M: 676,8 g/mol



### Methoctramin

-hydrochlorid

M: 728,8 g/mol

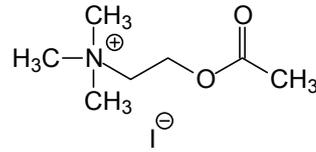


**Abb. 6:** Strukturformeln der muskarinischen Antagonisten Atropin und Methoctramin. Atropin wurde bezogen von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, GER), Methoctramin von der Firma Research Biochemicals Inc. (Natick, USA).

### 2.6.3 Agonisten an Muskarinrezeptoren

#### Acetylcholin

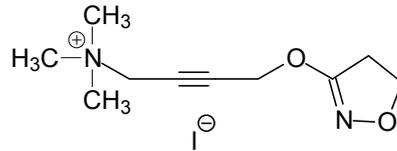
-Iodid



M: 273,1 g/mol

#### Iperoxo

-Iodid

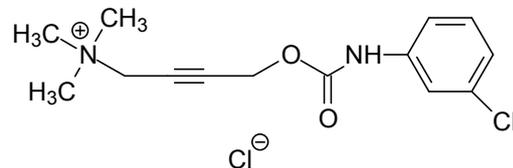


M: 324,2 g/mol

**Abb. 7:** Strukturformeln der muskarinischen Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo. Acetylcholin wurde bezogen von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, GER). Die Synthese und freundliche Bereitstellung von Iperoxo erfolgte im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. De Amici (Institut für Pharmazeutische Chemie und Toxikologie, Universität Mailand).

#### McN-A-343

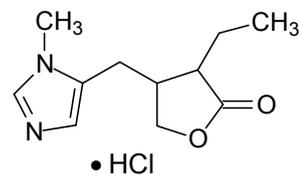
-Chlorid



M: 317,2 g/mol

#### Pilocarpin

-Hydrochlorid



M: 244,7 g/mol

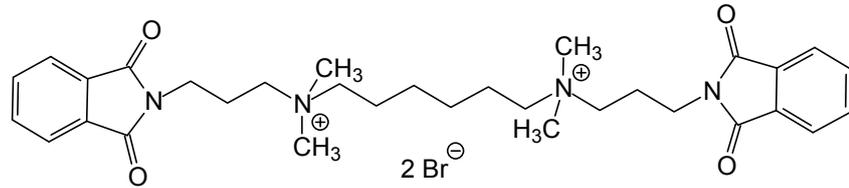
**Abb. 8:** Strukturformeln der muskarinischen Partialagonisten McN-A-343 und Pilocarpin. McN-A-343 wurde bezogen von der Firma Research Biochemicals Inc. (Natick, USA), Pilocarpin von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, GER).

## 2.6.4 Allosterische Modulatoren an Muskarinrezeptoren

### W84

-dibromid

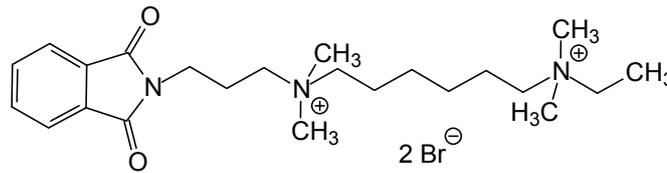
M: 708,5 g/mol



### SH30

-dibromid

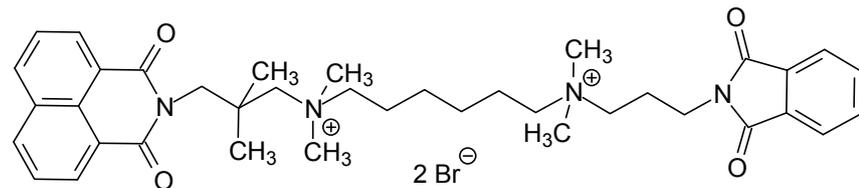
M: 549,4 g/mol



### Naphmethonium

-dibromid

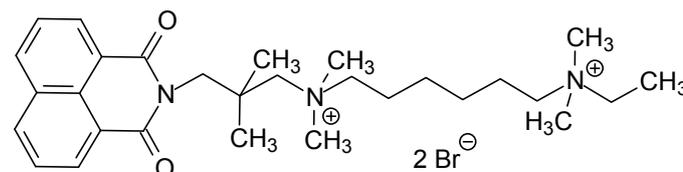
M: 786,6 g/mol



### EHW477

-dibromid

M: 627,4 g/mol

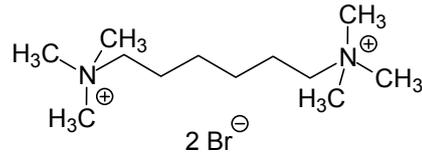


**Abb. 9:** Strukturformeln der muskarinischen allosterischen Modulatoren W84, SH30, Naphmethonium und EHW477. W84 wurde synthetisiert und zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Pfeffer (Pharmakologisches Institut, Universität Kiel). Die Synthese und freundliche Bereitstellung von SH30, Naphmethonium und EHW477 erfolgte im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutisches Institut, Universität Würzburg).

## Hexamethonium

-dibromid

M: 362,2 g/mol



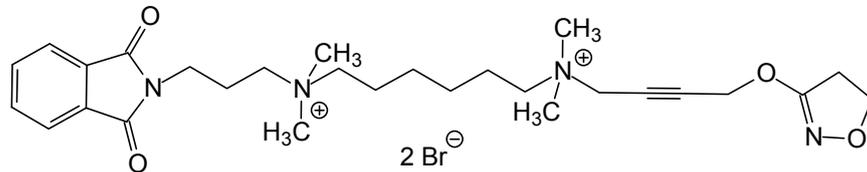
**Abb. 10:** Strukturformel des muskarinischen allosterischen Modulators Hexamethonium. Die Substanz wurde bezogen von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, GER).

## 2.6.5 Muskarinische allosterisch/orthosterische Hybridsubstanzen

### DDT-5

-dibromid

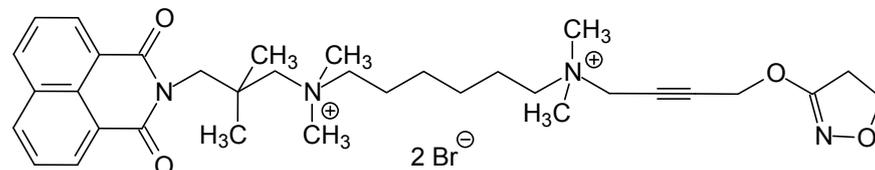
M: 685,5 g/mol



### MMH5-6

-dibromid

M: 736,6 g/mol

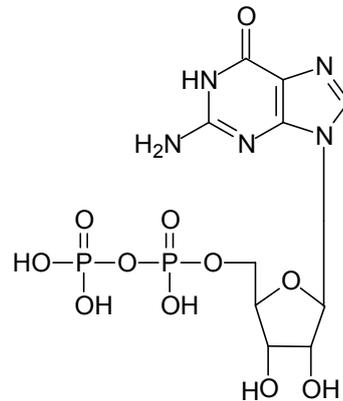


**Abb. 11:** Strukturformeln der muskarinischen allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6. Die Synthese und freundliche Bereitstellung der Hybridsubstanzen erfolgte im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. M. De Amici (Institut für Pharmazeutische Chemie und Toxikologie, Universität Mailand).

## 2.6.6 Nukleotide

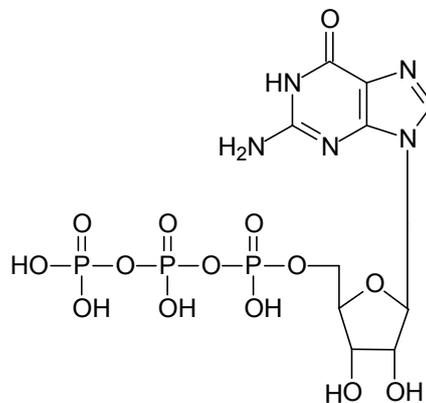
### GDP (Guanosin-5'-diphosphat)

M: 443,2 g/mol



### GTP (Guanosin-5'-triphosphat)

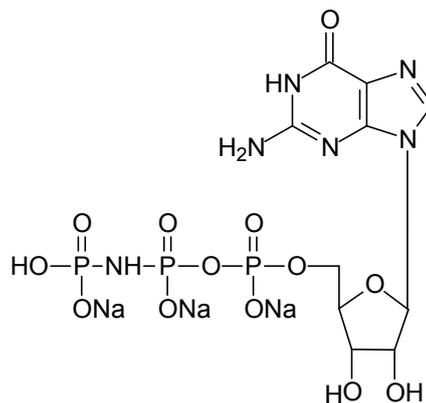
M: 523,2 g/mol



### Gpp(NH)p

#### (5'-Guanylyl-imidodiphosphat)

M: 588,1 g/mol



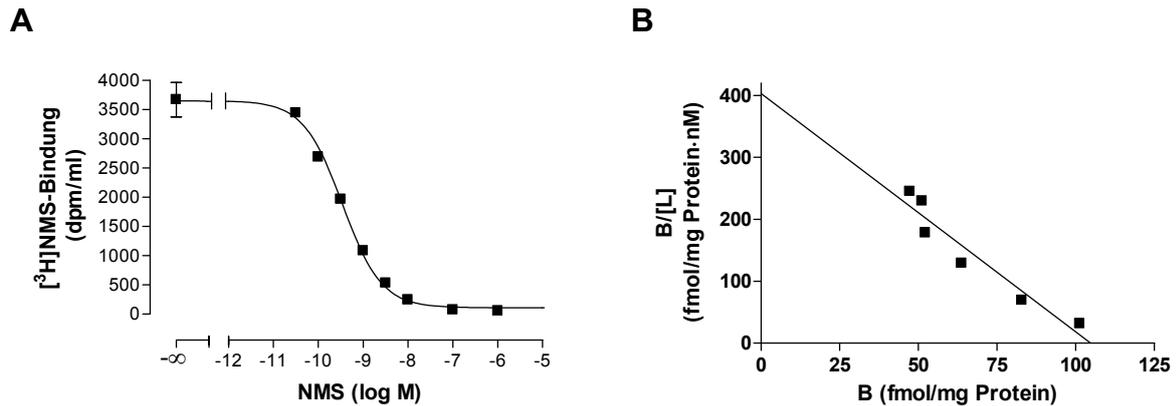
**Abb. 12:** Strukturformeln der Nukleotide GDP (Guanosin-5'-diphosphat), GTP (Guanosin-5'-triphosphat) und Gpp(NH)p (5'-Guanylyl-imidodiphosphat). Die Nukleotide wurden bezogen von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, GER).



## 3 Ergebnisse

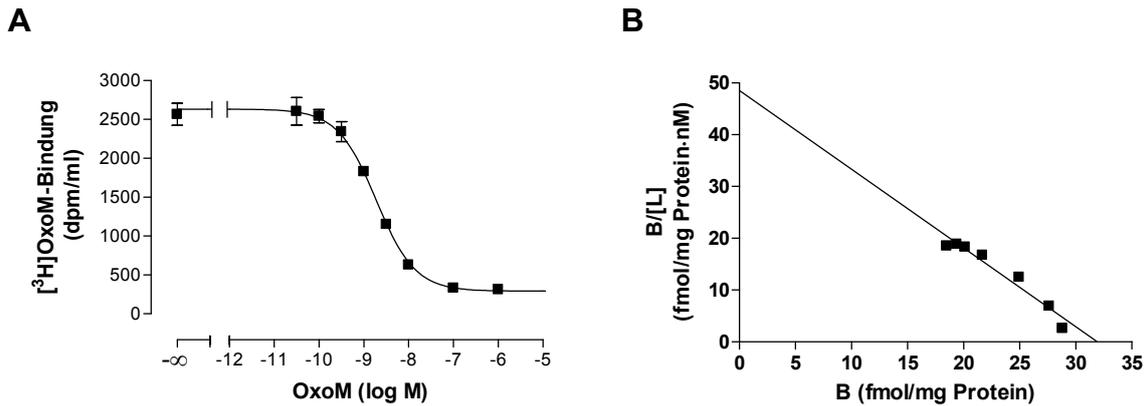
### 3.1 Bindungseigenschaften der Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe

Die [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin- bzw. [<sup>3</sup>H]Oxotremorin M-Bindungseigenschaften der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe wurden in homologen Konkurrenzexperimenten wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben bestimmt. An die aus homologen Konkurrenzexperimenten erhaltenen Bindungsdaten wurde mittels nichtlinearer Regressionsanalyse nach der „4-Parameter-logistischen Gleichung“ (Kapitel 2.3.2, Gleichung 7) eine Kurve angepasst. Die Berechnung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_D$  erfolgte nach Cheng und Prusoff (Kapitel 2.3.2, Gleichung 9), die Berechnung der Anzahl der spezifischen Bindungsstellen  $B_{max}$  nach DeBlasi (Kapitel 2.3.2, Gleichung 11). Die in Form der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_D$  erhaltene Affinität des Radioliganden wurde zur Analyse der mit den Testsubstanzen durchgeführten Bindungsstudien benötigt. Neben dem Verfahren der nichtlinearen Regressionsanalyse wurde bei den homologen Konkurrenzexperimenten mit [<sup>3</sup>H]NMS und [<sup>3</sup>H]OxoM an porcinen  $M_2$ -Rezeptoren eine Scatchard-Transformation der Bindungsdaten zur Bestimmung von  $K_D$  und  $B_{max}$  durchgeführt.



**Abb. 13:** Ergebnis eines homologen Konkurrenzexperimentes mit dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM. Die unspezifische Radioligandbindung wurde in Gegenwart von 1 μM Atropin bestimmt. **A:** Nichtlineare Regressionsanalyse der Versuchsdaten: pK<sub>D</sub> = 9,82, B<sub>max</sub> = 83 fmol/mg Membranprotein. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler einer Dreifachbestimmung. Ordinate: [<sup>3</sup>H]NMS-Gesamtbindung in dpm/ml Reaktionsansatz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des nicht markierten Kompetitors N-Methylscopolamin. Kurvenanpassung: Gleichung 7. **B:** Lineare Regressionsanalyse nach Scatchard: pK<sub>D</sub> = 9,59, B<sub>max</sub> = 105 fmol/mg Membranprotein. Ordinate: Quotient aus gebundenem und freiem Liganden in fmol/mg Protein·nM. Abszisse: Spezifische Bindung des Radioliganden in fmol/mg Protein.

In Abb. 13 ist die nichtlineare Regressionsanalyse sowie die lineare Scatchard-Transformation der Messwerte eines repräsentativen homologen Konkurrenzexperimentes mit [<sup>3</sup>H]NMS dargestellt. Es ergaben sich durch beide Analysemethoden ähnliche pK<sub>D</sub>- bzw. B<sub>max</sub>-Werte. Abb. 14 zeigt das Ergebnis der beiden Analysemethoden bei einem repräsentativen homologen Konkurrenzexperiment mit [<sup>3</sup>H]OxoM. Auch hier ergaben sich ähnliche pK<sub>D</sub>- bzw. B<sub>max</sub>-Werte.



**Abb. 14:** Ergebnis eines homologen Konkurrenzexperiments mit dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]Oxotremorin M an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 1 nM. Die unspezifische Radioligandbindung wurde in Gegenwart von 1 μM Atropin bestimmt. **A:** Nichtlineare Regressionsanalyse der Versuchsdaten: pK<sub>D</sub> = 9,05, B<sub>max</sub> = 36 fmol/mg Membranprotein. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler einer Dreifachbestimmung. Ordinate: [<sup>3</sup>H]OxoM-Gesamtbindung in dpm/ml Reaktionsansatz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des nicht markierten Kompetitors Oxotremorin M. Kurvenanpassung: Gleichung 7. **B:** Lineare Regressionsanalyse nach Scatchard: pK<sub>D</sub> = 9,18, B<sub>max</sub> = 32 fmol/mg Membranprotein. Ordinate: Quotient aus gebundenem und freiem Liganden in fmol/mg Protein·nM. Abszisse: Spezifische Bindung des Radioliganden in fmol/mg Protein.

In Tab. 7 und Tab. 8 sind die mit den beiden Analysemethoden erhaltenen Parameter der [<sup>3</sup>H]NMS- bzw. [<sup>3</sup>H]OxoM-Bindung der verwendeten Hausschwein-Herzventrikelhomogenate zusammengefasst. Die mittels linearer Regressionsanalyse nach Scatchard erhaltenen pK<sub>D</sub>- bzw. B<sub>max</sub>-Werte waren nicht signifikant verschieden von den durch nichtlineare Regressionsanalyse nach Cheng und Prusoff bzw. DeBlasi erhaltenen Werten (t-Test, p > 0,05). Zur Analyse der mit den Testsubstanzen durchgeführten Bindungsstudien wurden die aus der nichtlinearen Regressionsanalyse erhaltenen Parameter verwendet.

## Ergebnisse

Datum der Membranpräparation		n	pK <sub>D</sub>			
			Cheng & Prusoff		Scatchard	
20.01.04		6	10,10 ± 0,12		9,86 ± 0,10	
02.09.04		3	10,01 ± 0,07		9,81 ± 0,07	

Datum der Membranpräparation	Proteingehalt (mg/ml)	n	B <sub>max</sub> (fmol/ml)		B <sub>max</sub> (fmol/mg)	
			DeBlasi	Scatchard	DeBlasi	Scatchard
20.01.04	5,09 ± 0,38	6	440 ± 37	498 ± 28	87 ± 7	98 ± 5
02.09.04	n.b.	3	427 ± 32	475 ± 17	n.b.	n.b.

**Tab. 7:** Charakteristische Parameter der [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin-Bindung der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben nach der Methode von Lowry. pK<sub>D</sub>: Negativer dekadischer Logarithmus der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziationskonstanten. B<sub>max</sub>: Anzahl der spezifischen Bindungsstellen bezogen auf den Proteingehalt der Membransuspension bzw. auf ein Volumen von 1 ml Membransuspension. n.b.: nicht bestimmt (Verlust des Homogenats aufgrund eines technischen Defekts).

Bei den beiden in Experimenten mit dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS eingesetzten Membranpräparationen von porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren ergab sich nach Cheng und Prusoff ein Mittelwert der N-Methylscopolamin-pK<sub>D</sub>-Werte von 10,07 ± 0,08. Dieser Wert war nicht signifikant verschieden von dem Mittelwert der N-Methylscopolamin-pK<sub>D</sub>-Werte der Membranpräparationen von humanen M<sub>2</sub>-Rezeptoren, die transient in COS7-Zellen exprimiert worden waren (10,03 ± 0,06, siehe Kapitel 3.2).

## Ergebnisse

Datum der Membranpräparation		n	pK <sub>D</sub>			
			Cheng & Prusoff		Scatchard	
20.01.04		3	9,13 ± 0,11		9,15 ± 0,11	
11.05.04		2	9,13 (8,88; 9,37)		8,99 (8,74; 9,24)	
02.09.04		3	8,89 ± 0,22		8,71 ± 0,07	

Datum der Membranpräparation	Protein-gehalt (mg/ml)	n	B <sub>max</sub> (fmol/ml)		B <sub>max</sub> (fmol/mg)	
			DeBlasi	Scatchard	DeBlasi	Scatchard
20.01.04	5,09 ± 0,38	3	170 ± 10	169 ± 10	34 ± 2	33 ± 2
11.05.04	n.b.	2	104 (79; 128)	120 (86; 154)	n.b.	n.b.
02.09.04	n.b.	3	82 ± 19	102 ± 13	n.b.	n.b.

**Tab. 8:** Charakteristische Parameter der [<sup>3</sup>H]Oxotremorin M-Bindung bei den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Membransuspensionen aus Hausschwein-Herzventrikelgewebe. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben nach der Methode von Lowry. pK<sub>D</sub>: Negativer dekadischer Logarithmus der [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziationskonstanten. B<sub>max</sub>: Anzahl der spezifischen Bindungsstellen bezogen auf den Proteingehalt der Membransuspension bzw. auf ein Volumen von 1 ml Membransuspension. n.b.: nicht bestimmt (Verlust des Homogenats aufgrund eines technischen Defekts).

Für [<sup>3</sup>H]OxoM ergab sich ein Mittelwert der pK<sub>D</sub>-Werte der drei verwendeten Homogenate von 9,04 ± 0,10. Diese Radioligand-Affinität war in guter Übereinstimmung mit der von Großmüller et al. (2006) unter identischen Versuchsbedingungen gefundenen Affinität von 9,09 ± 0,05. Bei den Membranpräparationen vom 20.01.04 und 02.09.04 wurde sowohl eine Charakterisierung der [<sup>3</sup>H]NMS- als auch der [<sup>3</sup>H]OxoM-Bindungseigenschaften durchgeführt. Die Anzahl der spezifischen Bindungsstellen B<sub>max</sub> war bei beiden Membranpräparationen für den Radioagonisten [<sup>3</sup>H]OxoM deutlich geringer als für den Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS. Wahrscheinlich waren die geringeren B<sub>max</sub>-Werte des Radioagonisten Folge einer fehlenden Erfassung des G-Protein-entkoppelten, für Agonisten niedrigaffinen Rezeptorzustandes durch [<sup>3</sup>H]OxoM in der eingesetzten Konzentration von 1 nM. Der Radioantagonist [<sup>3</sup>H]NMS dagegen markierte in der eingesetzten Konzentration von 0,2 nM sowohl den G-Protein-gekoppelten als auch den entkoppelten Rezeptorzustand.

### 3.2 Bindungseigenschaften der Membransuspensionen aus transfizierten COS7-Zellen

Bei den im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Membransuspensionen aus transfizierten COS7-Zellen handelte es sich um humane M<sub>2</sub>- und M<sub>5</sub>-Rezeptoren sowie um punktmutierte M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Als Radioligand wurde der Muskarinrezeptorantagonist [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin eingesetzt. Die Bestimmung von K<sub>D</sub> und B<sub>max</sub> in homologen Konkurrenzexperimenten erfolgte nach Cheng und Prusoff bzw. DeBlasi, auf eine Scatchard-Analyse dieser Bindungsdaten wurde verzichtet. Tab. 9 gibt einen Überblick über die charakteristischen Parameter der [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung.

Rezeptor	Datum der Membranpräparation	Proteingehalt (mg/ml)	n	pK <sub>D</sub>	B <sub>max</sub> (fmol/mg)
M <sub>2</sub> wt	11.02.05	0,169	5	10,07 ± 0,11	1617 ± 34
M <sub>2</sub> wt	10.11.05	0,181	3	10,00 ± 0,07	1065 ± 269
M <sub>2</sub> wt	12.01.06	0,284	2	9,82 (9,79; 9,85)	450 (437; 463)
M <sub>2</sub> wt	15.11.06	0,192	2	10,20 (10,15; 10,24)	1132 (1103; 1161)
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Ala	11.02.05	0,218	3	8,95 ± 0,07	793 ± 66
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Ala	10.11.05	0,196	3	9,08 ± 0,14	537 ± 50
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Phe	08.04.05	0,275	3	9,31 ± 0,18	390 ± 48
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Phe	10.11.05	0,254	2	9,62 (9,57; 9,67)	528 (517; 539)
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Phe	08.06.06	0,190	2	9,43 (9,33; 9,52)	1327 (1191; 1462)
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Ser	12.01.06	0,247	3	8,64 ± 0,03	375 ± 3
M <sub>2</sub> <sup>177</sup> Tyr→Gln	12.01.06	0,244	3	9,80 ± 0,09	434 ± 32
M <sub>2</sub> <sup>422</sup> Trp→Ala	08.04.05	0,299	3	9,80 ± 0,07	283 ± 18
M <sub>2</sub> <sup>422</sup> Trp→Ala	07.07.05	0,240	3	10,09 ± 0,10	294 ± 9
M <sub>2</sub> <sup>423</sup> Thr→Ala	05.11.04*	0,214	4	10,16 ± 0,14	730 ± 80
M <sub>2</sub> <sup>423</sup> Thr→His	19.06.03**	0,140	3	10,09 ± 0,13	1690 ± 177

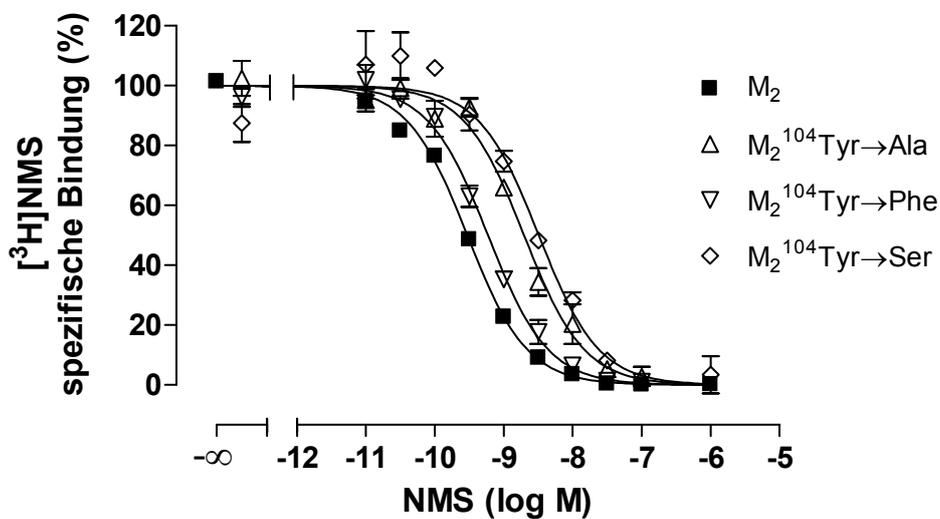
## Ergebnisse

Rezeptor	Datum der Membranpräparation	Proteingehalt (mg/ml)	n	pK <sub>D</sub>	B <sub>max</sub> (fmol/mg)
M <sub>2</sub> <sup>423</sup> Thr→His	18.09.03***	n.b.	2	10,24 (10,23; 10,25)	349 <sup>†</sup> (349; 350)
M <sub>2</sub> <sup>427</sup> Trp→Ala	08.04.05	0,281	3	9,88 ± 0,08	269 ± 19
M <sub>2</sub> <sup>427</sup> Trp→Ala	07.07.05	0,219	3	10,17 ± 0,09	465 ± 30
M <sub>2</sub> <sup>177</sup> Tyr→Gln + <sup>423</sup> Thr→His	07.07.05	0,257	4	10,06 ± 0,05	498 ± 11
M <sub>2</sub> <sup>422</sup> Trp→Ala + <sup>427</sup> Trp→Ala	08.04.05	0,219	3	10,09 ± 0,04	205 ± 10
M <sub>2</sub> <sup>422</sup> Trp→Ala + <sup>427</sup> Trp→Ala	07.07.05	0,186	3	10,10 ± 0,14	286 ± 33
M <sub>5</sub> wt	10.11.05	0,213	2	9,74 (9,71; 9,78)	531 (506; 555)

**Tab. 9:** Charakteristische Parameter der [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin-Bindung der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Membransuspensionen aus transient transfizierten COS7-Zellen. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben nach der Methode von Bradford. pK<sub>D</sub>: Negativer dekadischer Logarithmus der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziationskonstanten. B<sub>max</sub>: Anzahl der spezifischen Bindungsstellen bezogen auf den Proteingehalt der Membransuspension. \*: Das Homogenat wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau S. Prilla. \*\*: Das Homogenat wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau M. Mohr-Andrä. \*\*\*: Das Homogenat wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau V. Strassmann. n.b.: nicht bestimmt. †: B<sub>max</sub> wurde in der Einheit fmol/ml angegeben.

Unter anderem wurden in einem Epitop der orthosterischen Bindungsstelle, nämlich M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin, punktmutierte M<sub>2</sub>-Rezeptoren untersucht. Bei Mutation von M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin kam zu einem N-Methylscopolamin-Affinitätsabfall im Vergleich zu M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren (siehe Abb. 15). Der Mittelwert der pK<sub>D</sub>-Werte aller untersuchten Homogenate einer Rezeptorart verminderte sich von 10,03 ± 0,06 für M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren bei der Mutation M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin→Alanin auf 9,01 ± 0,08. Bei der Mutation M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin→Serin ergab sich ein Mittelwert des NMS-pK<sub>D</sub>-Werts von 8,64 ± 0,03, der Mittelwert bei der Mutation M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin→Phenylalanin betrug 9,43 ± 0,09. Durch Entfernung des Phenylrings des Epitops M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin (Mutation M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin→Alanin bzw. M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin→Serin) kam es also zu einem ausgeprägten NMS-Affinitätsverlust im Vergleich zu Wildtyprezeptoren, während

eine Entfernung der Hydroxylgruppe von  $M_2^{104}$ Tyrosin (Mutation  $M_2^{104}$ Tyrosin→Phenylalanin) zu einem deutlich geringeren Affinitätsverlust des Radioliganden führte. Die Phenylgruppe des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin leistete somit einen größeren Beitrag zur N-Methylscopolamin-Affinität als die Hydroxylgruppe dieses Epitops. Bei den übrigen Membranpräparationen von punktmutierten  $M_2$ -Rezeptoren, den verschiedenen  $M_2$ -Wildtyp-Membranpräparationen sowie der  $M_5$ -Wildtyp-Membranpräparation waren keine großen Unterschiede der NMS-Affinität erkennbar, der Mittelwert des  $pK_D$ -Werts lag zwischen 9,74 [ $M_5$ wt (10.11.05)] und 10,24 [ $M_2^{423}$ Thr→His (18.09.03)].



**Abb. 15:** Veränderung der N-Methylscopolamin-Affinität bei Mutation des Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM bei Experimenten mit  $M_2$ -Wildtyprezeptoren bzw.  $M_2^{104}$ Tyr→Phe-Rezeptoren und 1 nM bei Experimenten mit  $M_2^{104}$ Tyr→Ala-Rezeptoren bzw.  $M_2^{104}$ Tyr→Ser-Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-12 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des unmarkierten Kompetitors. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des nicht markierten Kompetitors N-Methylscopolamin. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Die innerhalb des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin punktmutierten Rezeptoren wurden im Rahmen dieser Arbeit in Gleichgewichts-Bindungs-experimenten eingesetzt um zu prüfen, inwieweit das Bindungsverhalten von Testsubstanzen durch die orthosterische Bindungsstelle beeinflusst wurde. Mit der Mutation  $M_2^{104}$ Tyr→Ala konnte der Effekt einer Entfernung von Phenylring und

Hydroxylgruppe an dieser Stelle des Rezeptorproteins auf die Bindung der Testsubstanzen untersucht werden, mit der Mutation  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  der Effekt einer alleinigen Entfernung der Hydroxylgruppe. Durch die Mutation  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ser}$  konnte die Beeinflussung der Bindung von Testsubstanzen durch die Entfernung des Phenylrings bei einer weiterhin vorhandenen Hydroxylgruppe an dieser Stelle des Rezeptorproteins untersucht werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Membranpräparationen aus transfizierten COS7-Zellen wurden zum Teil in dissoziationskinetischen Experimenten zur Messung des dissoziationsverzögernden Effekts von allosterisch wirksamen Testsubstanzen eingesetzt. Tab. 10 gibt einen Überblick über die in Zweipunkt-Kinetik-Experimenten erhaltenen charakteristischen Parameter der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation unter Kontrollbedingungen.

Rezeptor	n	$k_{-1}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$t_{0,5\text{diss}}$ (min)
$M_2^{\text{wt}}$	6	$0,101 \pm 0,005$	$7,0 \pm 0,3$
$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$	6	$0,179 \pm 0,012$	$4,0 \pm 0,3$
$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$	6	$0,017 \pm 0,001$	$41 \pm 1,1$
$M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	6	$0,075 \pm 0,003$	$9,3 \pm 0,4$
$M_2^{427}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	8	$0,017 \pm 0,002$	$43,2 \pm 4,8$
$M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala} + ^{427}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	8	$0,013 \pm 0,001$	$54,3 \pm 2,9$
$M_5^{\text{wt}}$	6	$0,005 \pm 0,001$	$150,4 \pm 9,2$

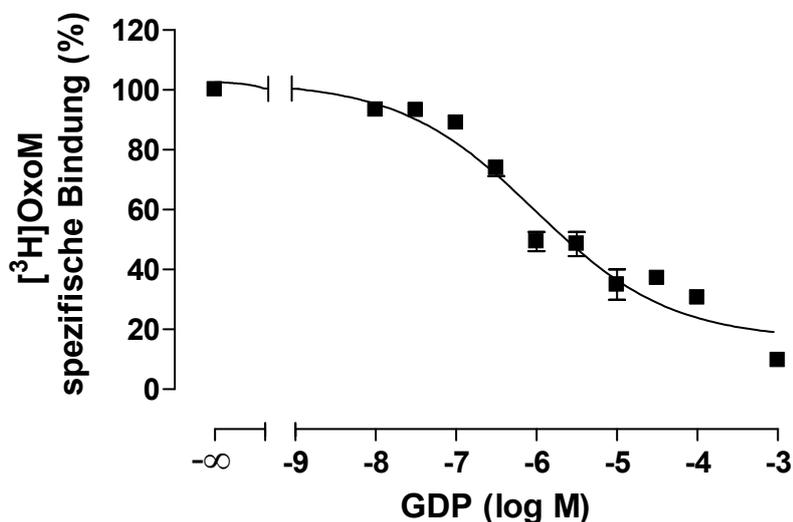
**Tab. 10:** Parameter der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation an  $M_2$ - und  $M_5$ -Wildtyprezeptoren sowie punktmutierten  $M_2$ -Rezeptoren unter Kontrollbedingungen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten.  $k_{-1}$ : Geschwindigkeitskonstante der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation ( $\text{min}^{-1}$ ).  $t_{0,5\text{diss}}$ : Halbwertszeit der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation in Minuten.

Mit Ausnahme der Mutation  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$  führten die untersuchten Mutationen zu einer Verlängerung der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziations-Halbwertszeit im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Die  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziations-Halbwertszeit an  $M_5$ -Wildtyprezeptoren war um ein Vielfaches länger als an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren.

### 3.3 Abhängigkeit der Ligand-Bindung von der G-Protein-Kopplung porciner M<sub>2</sub>-Rezeptoren

#### 3.3.1 GDP-Empfindlichkeit der [<sup>3</sup>H]OxoM-Bindung

Durch Einsatz eines Radioagonisten in nanomolarer Konzentration sollte es zu einer Markierung des G-Protein-gekoppelten, für Agonisten hochaffinen Rezeptorzustandes kommen (siehe Kapitel 2.3.3.1). Die Affinität eines Agonisten kann durch den Einsatz von Guanylnukleotiden im Überschuss vermindert werden. Zur Verminderung der Agonist-Affinität, die in Radioligand-Bindungsstudien gemessen werden kann, sind sowohl das Nukleotid Guanosindiphosphat (GDP) als auch das Nukleotid Guanosintriphosphat (GTP) geeignet (Berrie et al., 1979; Rosenberger et al., 1979, 1980). In Gleichgewichts-Bindungsexperimenten mit dem Radioagonisten [<sup>3</sup>H]Oxotremorin M wurde untersucht, inwieweit es bei den verwendeten porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren durch steigende GDP-Konzentrationen zu einer Entkopplung der Rezeptoren vom G-Protein und damit zur Verminderung der [<sup>3</sup>H]OxoM-Affinität kam. Aus Abb. 16 geht hervor, dass steigende GDP-Konzentrationen zu einer Inhibition der spezifischen [<sup>3</sup>H]OxoM-Bindung führten.



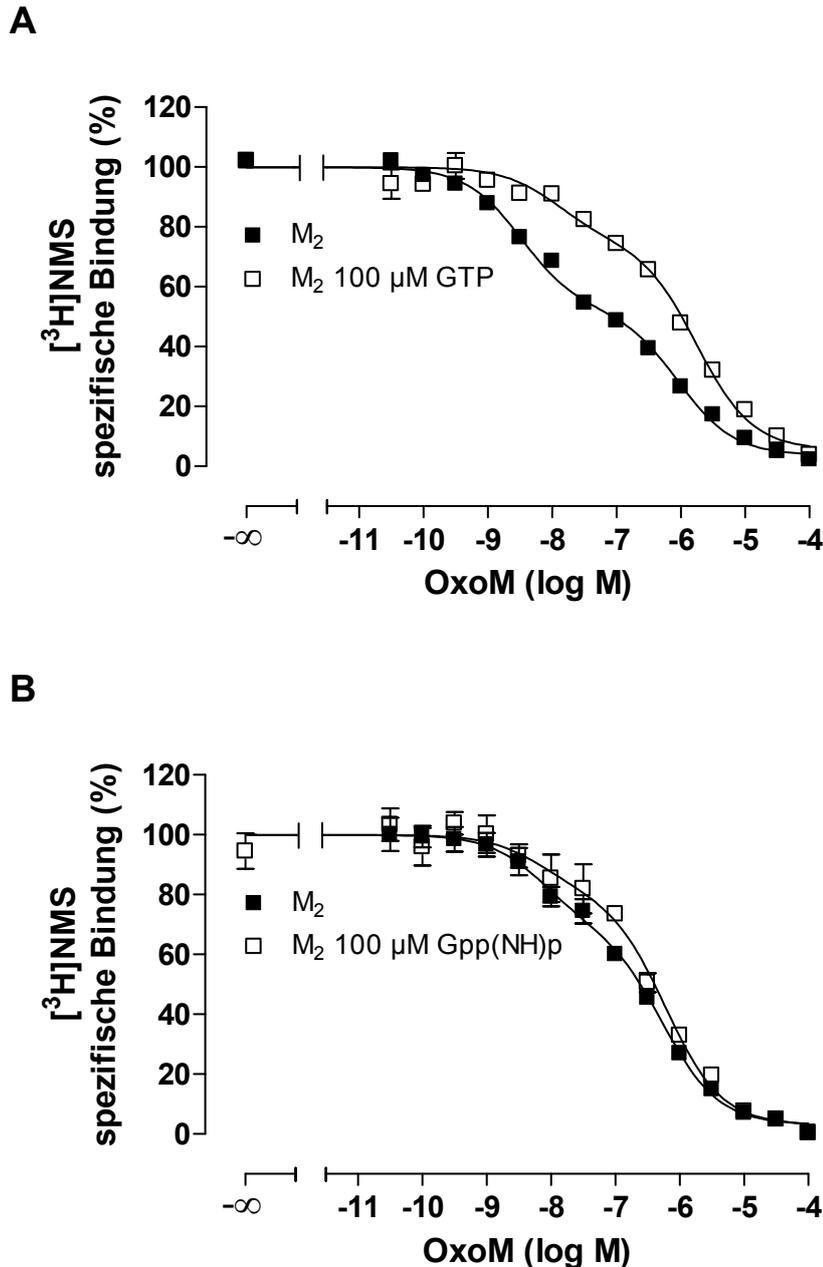
**Abb. 16:** Inhibition der spezifischen [<sup>3</sup>H]OxoM-Bindung an porcine M<sub>2</sub>-Rezeptoren durch steigende GDP-Konzentrationen. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 1 nM. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Ordinate: Spezifische [<sup>3</sup>H]OxoM-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit von GDP. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren GDP-Konzentration.

Kurvenanpassung: Gleichung 7. Steilheitsmaß  $n_H = -0,51$ , oberes Kurvenplateau = 103 %, unteres Kurvenplateau = 17 %,  $pEC_{50} = 6,02$ .

GDP verminderte die spezifische [ $^3H$ ]OxoM-Bindung mit einem  $pEC_{50}$ -Wert von  $6,02 \pm 0,16$ . Dieser  $pEC_{50}$ -Wert war in guter Übereinstimmung mit dem  $pEC_{50}$ -Wert, der für die Inhibition der [ $^3H$ ]Acetylcholin-Bindung an  $M_2$ -Rezeptoren durch GDP gefunden worden war ( $pEC_{50} = 6,15$ ; Gnagey und Ellis, 1996). Die GDP-Empfindlichkeit der Radioagonist-Bindung zeigte eine G-Protein-Kopplung der verwendeten porcinen  $M_2$ -Rezeptoren.

### **3.3.2 Nukleotid-Effekt in [ $^3H$ ]NMS-Agonist-Kompetitionsexperimenten**

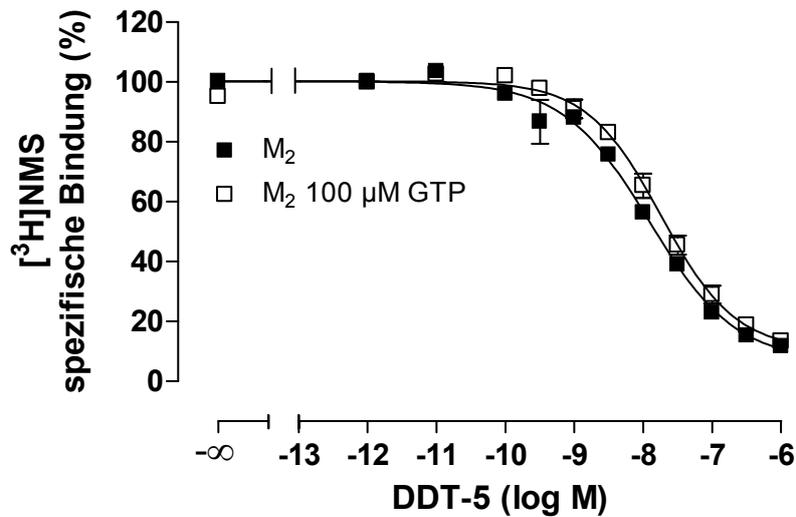
Die G-Protein-Kopplung der porcinen  $M_2$ -Rezeptoren wurde außerdem untersucht in sogenannten „GTP-Shift“-Experimenten, bei denen es durch einen Guanylnukleotid-Überschuss zu einer G-Protein-Entkopplung der Rezeptoren und damit zu einem Affinitätsverlust für Agonisten kommen sollte. Es wurde geprüft, wie stark die Beeinflussung der Bindung der allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanz DDT-5 durch Guanylnukleotide im Vergleich zu orthosterischen Agonisten war. In den Experimenten wurde GTP bzw. das hydrolysestabile GTP-Analogon Gpp(NH)p in einer Konzentration von 100  $\mu$ M im Versuchsansatz eingesetzt. Die Nukleotidkonzentration von 100  $\mu$ M entsprach Literaturangaben bei dieser Art von Experimenten (Haga et al., 1986; Tota et al., 1987; Haga et al., 1989; Maaß, Dissertation 1995; Ladner et al., 1999). Wie in Abb. 17 gezeigt, ergaben sich bei Competitionsexperimenten zwischen dem Radioantagonisten [ $^3H$ ]NMS und dem Agonisten Oxotremorin M deutlich biphasische Inhibitionskurven, die auf das Vorhandensein eines hochaffinen und niedrigaffinen Rezeptorzustandes für Agonisten hindeuteten. Die Zugabe eines GTP-Überschusses führte zu einer deutlichen Rechtsverschiebung der Inhibitionskurve, also einem Affinitätsverlust des Agonisten, der auf eine G-Protein-Entkopplung der Rezeptoren durch den Nukleotid-Überschuss zurückzuführen war. Alle in Abb. 17 gezeigten Inhibitionskurven des Oxotremorin M wurden signifikant besser durch eine biphasische Kurvenanpassung als durch eine monophasische Kurvenanpassung mit konstantem Steilheitsmaß  $n_H = -1$  beschrieben (F-Test, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ).



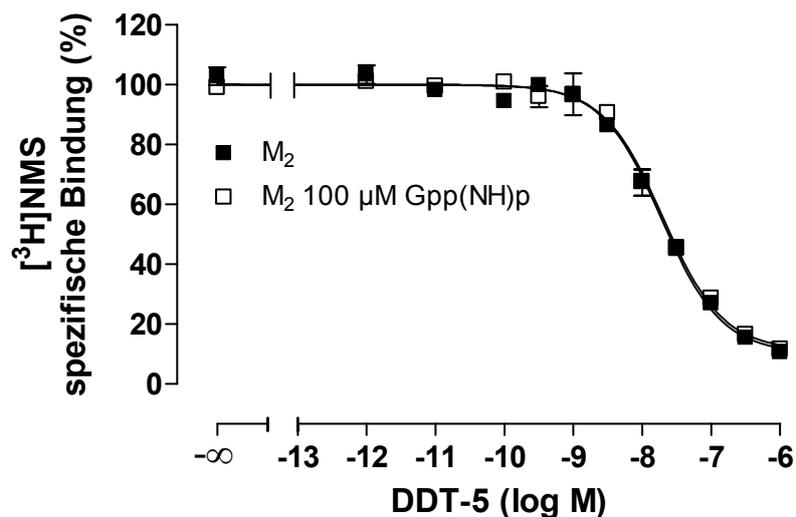
**Abb. 17:** Effekt von GTP bzw. Gpp(NH)p auf die Oxotremorin M-Affinität an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM. Ordinate: Spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren OxoM-Konzentration. Kurvenanpassung: Gleichung 18. **A:** Effekt von 100 μM GTP. Inkubationszeit: 2 h. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. **B:** Effekt von 100 μM Gpp(NH)p. Inkubationszeit 7,5 h. Dargestellt ist das Ergebnis eines Experiments in Dreifachbestimmung.

Neben Oxotremorin M wurde der Effekt eines Guanylnukleotid-Überschusses bei der allosterisch/orthosterischen Hybrids substanz DDT-5 untersucht (siehe Abb. 18).

**A**



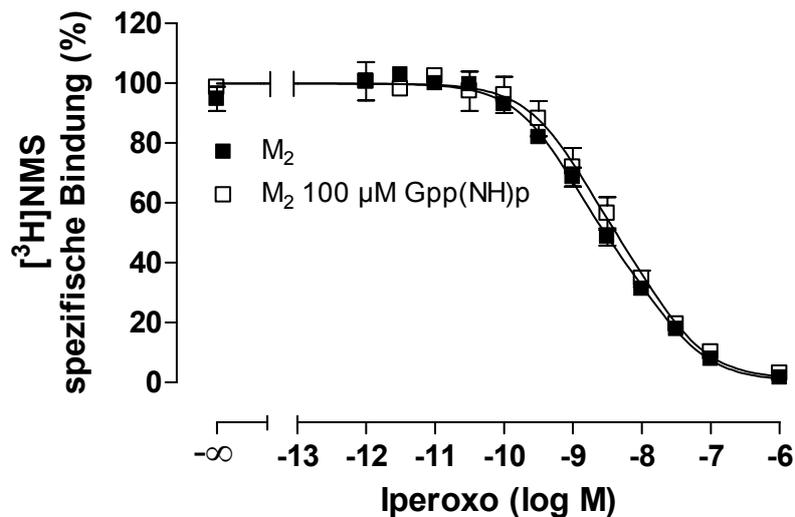
**B**



**Abb. 18:** Effekt von GTP bzw. Gpp(NH)p auf die DDT-5-Affinität an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM. Ordinate: Spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Inkubationszeit: 7,5 h. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren DDT-5-Konzentration. Kurvenanpassung: Gleichung 7. **A:** Effekt von 100 μM GTP. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. M<sub>2</sub>: Steilheitsmaß  $n_H = -0,69$ . M<sub>2</sub> 100 μM GTP: Steilheitsmaß  $n_H = -0,81$ . **B:** Effekt von 100 μM Gpp(NH)p. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 2 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. M<sub>2</sub>: Steilheitsmaß  $n_H = -0,90$ . M<sub>2</sub> 100 μM GTP: Steilheitsmaß  $n_H = -0,96$ .

Die in Abb. 18 A dargestellte Inhibitionskurve des DDT-5 ohne Nukleotid-Zusatz wurde signifikant besser durch eine biphasische Kurvenanpassung beschrieben, während die übrigen Inhibitionskurven in Abb. 18 ausreichend durch eine monophasische Kurvenanpassung mit  $n_H = -1$  beschrieben wurden (F-Test, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ). Da DDT-5 die [ $^3\text{H}$ ]NMS-Dissoziation deutlich verzögerte (siehe Kapitel 3.9.1, Abb. 28), war eine im Vergleich zu Konkurrenzexperimenten mit orthosterischen Agonisten deutlich verlängerte Inkubationsdauer von 7,5 h erforderlich. Zur Berechnung der Inkubationsdauer wurde Gleichung 23 von Lazareno und Birdsall verwendet (siehe Kapitel 2.3.4). Neben dem GTP wurde in Versuchen bei dieser verlängerten Inkubationsdauer das hydrolysestabile GTP-Analogon Guanylylimidodiphosphat (Gpp(NH)p) eingesetzt. Aus Abb. 18 wird ersichtlich, dass es bei einer Inkubationszeit von 7,5 h und Einsatz eines GTP- bzw. Gpp(NH)p-Überschusses nur zu einer geringen Verminderung der Affinität des DDT-5 kam.

Als Vergleich zu dem Gpp(NH)p-Effekt beim DDT-5 wurde der Effekt eines Gpp(NH)p-Überschusses auf die Affinität der Agonisten Oxotremorin M und Iperoxo bei einer Inkubationszeit von 7,5 h untersucht. Die Affinität des Oxotremorin M (siehe Abb. 17 B) bzw. Iperoxo (siehe Abb. 19), die in einer Dreifachbestimmung der Datenpunkte bestimmt wurde, wurde durch den Gpp(NH)p-Überschuss nicht signifikant vermindert. Die in Abb. 19 dargestellten Inhibitionskurven des Iperoxo wurden signifikant besser durch eine biphasische Kurvenanpassung als durch eine monophasische Kurvenanpassung mit konstantem Steilheitsmaß  $n_H = -1$  beschrieben (F-Test, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ).



**Abb. 19:** Effekt von 100 µM Gpp(NH)p auf die Iperoxo-Affinität an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 2 unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Inkubationszeit: 7,5 h. Ordinate: Spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Iperoxo-Konzentration. Kurvenanpassung: Gleichung 18.

In Tab. 11 und Tab. 12 sind die charakteristischen Bindungsparameter aus den Konkurrenzexperimenten zwischen [<sup>3</sup>H]NMS und den Muskarinrezeptoragonisten Oxotremorin M, DDT-5 und Iperoxo zusammengestellt. Neben den Bindungsparametern in Gegenwart des Nukleotid-Überschusses sind die Bindungsparameter aus den zum Vergleich durchgeführten Experimenten ohne Nukleotid-Zugabe angegeben. Bei den Experimenten wurde eine Analyse mit Gleichung 7 und freilaufendem Steilheitsmaß  $n_H$  durchgeführt, bei der die IC<sub>50</sub>-Werte nach Cheng und Prusoff in apparente Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten umgewandelt wurden (Tab. 11), und eine biphasische Analyse, aus der sich Inhibitionskonstanten für das hochaffine und niedrigaffine Kompartiment sowie Kompartimentgrößen ergaben (Tab. 12). Bei den in Tab. 11 und Tab. 12 zusammengefassten Experimenten wurde jeweils mittels eines F-Tests geprüft, ob die Daten signifikant besser durch eine Kurvenanpassung mit einem variablen Steilheitsmaß  $n_H$  (Gleichung 7) im Vergleich zu einer biphasischen Kurvenanpassung (Gleichung 18) beschrieben wurden. Der Vergleich der Kurvenanpassung mit Gleichung 7 gegenüber einer Kurvenanpassung mit Gleichung 18 diente nicht zu einer Entscheidung zwischen einem Modell mit einer oder zwei

## Ergebnisse

Bindungsstellen, da ein von  $n_H = -1$  signifikant abweichendes Steilheitsmaß in Gleichung 7 keine Aussage über die Anzahl der Bindungsstellen zulässt. Von den 22 in Tab. 11 und Tab. 12 zusammengefassten Experimenten wurden 18 besser durch Gleichung 7 mit variablem Steilheitsmaß  $n_H$  beschrieben, 4 besser durch eine biphasische Analyse mit Gleichung 18 (F-Test, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ).

<b>Kurvenanpassung mit Gleichung 7</b>			
<b>Testsubstanz</b>	<b>Nukleotid</b>	<b>pK<sub>app</sub></b>	<b>n<sub>H</sub></b>
Oxotremorin M	-	7,74 ± 0,09	-0,40 ± 0,02
	GTP 10 <sup>-4</sup> M	6,56 ± 0,03	-0,67 ± 0,09
Oxotremorin M	-	7,21	-0,58
	Gpp(NH)p 10 <sup>-4</sup> M	6,93	-0,66
DDT-5	-	8,34 (8,34; 8,35)	-0,65 (-0,61; -0,69)
	GTP 10 <sup>-4</sup> M	8,21 ± 0,04	-0,81 ± 0,02
DDT-5	-	8,18 (8,12; 8,23)	-0,88 (-0,76; -1,00)
	Gpp(NH)p 10 <sup>-4</sup> M	8,18 (8,13; 8,22)	-0,96 (-0,92; -1,00)
Iperoxo	-	9,01 (8,95; 9,06)	-0,70 (-0,70; -0,70)
Iperoxo	Gpp(NH)p 10 <sup>-4</sup> M	8,89 (8,76; 9,02)	-0,73 (-0,63; -0,83)

**Tab. 11:** Kurvenparameter-Werte der muskarinischen Agonisten Oxotremorin M, DDT-5 und Iperoxo aus Konkurrenzexperimenten mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung ohne Nukleotid-Zusatz bzw. in Gegenwart von 10<sup>-4</sup> M des Nukleotids. Oxotremorin M und + 10<sup>-4</sup> M GTP: n = 3-4. Oxotremorin M und + 10<sup>-4</sup> M Gpp(NH)p: n = 1. DDT-5 und + 10<sup>-4</sup> M GTP: n = 2-3. DDT-5 und + 10<sup>-4</sup> M Gpp(NH)p: n = 2. Iperoxo und + 10<sup>-4</sup> M Gpp(NH)p: n = 2. pK<sub>app</sub>: Negativer dekadischer Logarithmus der apparenten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K<sub>app</sub> aus der Analyse der Inhibitionskurven mit Gleichung 7 und freilaufendem Steilheitsmaß. n<sub>H</sub>: Steilheitsmaß.

Wie aus Tab. 11 hervorgeht, bewirkte der Nukleotid-Zusatz ein Steilerwerden der Inhibitionskurven der Agonisten. Eine deutliche Affinitätsabnahme des Agonisten

## Ergebnisse

bei Zugabe eines Nukleotid-Überschusses ergab sich ausschließlich beim Oxotremorin M und Verwendung von GTP als Nukleotid.

<b>Biphasische Kurvenanpassung mit Gleichung 18</b>						
<b>Test-substanz</b>	<b>Nukleotid</b>	<b>pK<sub>i</sub> hochaffin</b>	<b>Anteil (%)</b>	<b>pK<sub>i</sub> niedrigaffin</b>	<b>Anteil (%)</b>	<b>ΔpK<sub>i</sub> hochaffin - niedrigaffin</b>
Oxo- tremorin M	-	9,04 ± 0,10	49 ± 2	6,55 ± 0,11	51 ± 2	2,49
	GTP 10 <sup>-4</sup> M	7,58 ± 0,41	45 ± 14	5,86 ± 0,29	55 ± 14	1,72
Oxo- tremorin M	-	8,61	32	6,73	68	1,88
	Gpp(NH)p 10 <sup>-4</sup> M	8,62	20	6,69	80	1,93
DDT-5	-	10,06 (9,48; 10,63)	22 (18; 27)	8,16 (8,06; 8,25)	78 (73; 82)	1,90
	GTP 10 <sup>-4</sup> M	8,78 ± 0,27	52 ± 16	7,65 ± 0,19	48 ± 16	1,13
DDT-5	-	10,00 (8,15; 11,85)	53 (12; 94)	7,53 (6,85; 8,21)	47 (88; 6)	2,47
	Gpp(NH)p 10 <sup>-4</sup> M	8,25 (8,19; 8,30)	88 (88; 89)	6,94 (6,76; 7,11)	12 (12; 11)	1,31
Iperoxo	-	9,61 (9,51; 9,71)	54 (43; 65)	8,26 (8,10; 8,42)	46 (57; 35)	1,35
Iperoxo	Gpp(NH)p 10 <sup>-4</sup> M	9,44 (8,97; 9,90)	61 (41; 81)	8,04 (7,66; 8,42)	39 (59; 19)	1,40

**Tab. 12:** Kurvenparameter-Werte der muskarinischen Agonisten Oxotremorin M, DDT-5 und Iperoxo aus Konkurrenzexperimenten mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung ohne Nukleotid-Zusatz bzw. in Gegenwart von 10<sup>-4</sup> M des Nukleotids. Oxotremorin M und + 10<sup>-4</sup> M GTP: n = 3-4. Oxotremorin M und + 10<sup>-4</sup> M Gpp(NH)p: n = 1. DDT-5 und + 10<sup>-4</sup> M GTP: n = 2-3. DDT-5 und + 10<sup>-4</sup> M Gpp(NH)p: n = 2. Iperoxo und + 10<sup>-4</sup> M Gpp(NH)p: n = 2. pK<sub>i</sub> hochaffin / pK<sub>i</sub> niedrigaffin: Negativer dekadischer Logarithmus der Inhibitionskonstanten K<sub>i</sub> aus der biphasischen Analyse und auf n<sub>H</sub> = -1 festgesetztem Steilheitsmaß. Anteil (%): Anteil des hochaffinen bzw. niedrigaffinen Kompartiments an der spezifischen Radioligand-Bindung in Prozent.

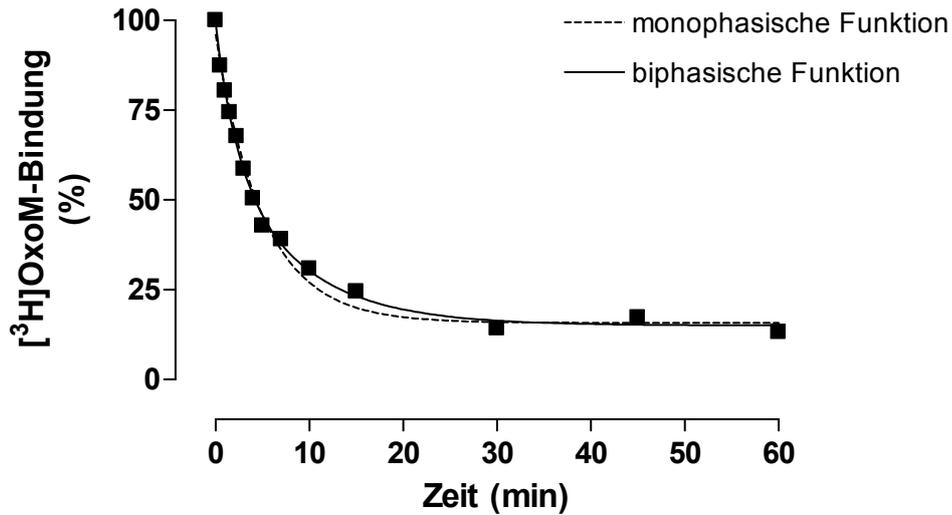
Wie aus Tab. 12 ersichtlich wird, betraf der Affinitätsverlust beim Oxotremorin M vor allem das hochaffine Kompartiment (Affinitätsverlust bei GTP-Überschuss 1,5 Dekaden im Vergleich zu Experimenten ohne GTP-Zugabe), während der Affinitätsverlust des niedrigaffinen Kompartiments deutlich geringer ausgeprägt

war (0,7 Dekaden). Die Kompartimentgrößen wurden durch die GTP-Zugabe kaum verändert.

Bei den übrigen Konkurrenzexperimenten unter Nukleotid-Zugabe, bei denen DDT-5 oder Iperoxo als Agonisten eingesetzt wurden bzw. Oxotremorin M als Agonist und Gpp(NH)p als Nukleotid, waren die Inhibitionskurven der Agonisten in ihrer Gestalt weniger biphasisch und außerdem der Affinitätsverlust bei Nukleotid-Zugabe gering ausgeprägt. Die Inhibitionskurven mit DDT-5 und Iperoxo konnten zwar biphasisch analysiert werden, jedoch ergaben sich zwischen den einzelnen Experimenten teilweise große Unterschiede in den beiden Inhibitionskonstanten und den Kompartimentgrößen, sodass eine biphasische Analyse nicht sinnvoll erscheint. Eine biphasische Analyse bietet sich an bei Inhibitionskurven, aus deren Gestalt deutlich das Vorhandensein von zwei Bindungsstellen erkennbar wird (siehe Abb. 17 A: [<sup>3</sup>H]NMS versus Oxotremorin M).

### **3.4 Untersuchungen zur Kinetik der [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren**

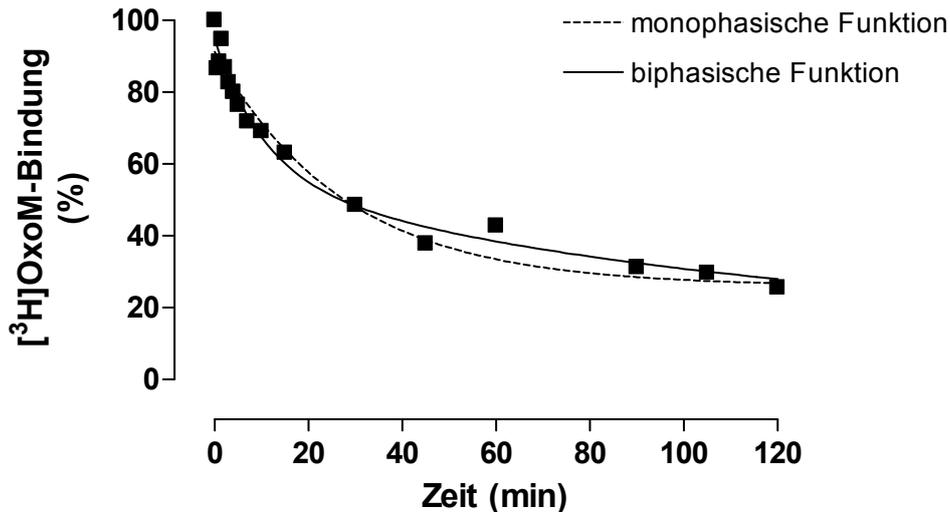
Oxotremorin M ist ein nicht Subtyp-selektiver Agonist an Muskarinrezeptoren (Jakubík et al., 1997; Christopoulos et al., 2001). Die Substanz ist in tritiiert Form ([<sup>3</sup>H]OxoM) als Radioligand erhältlich. Für den Radioliganden [<sup>3</sup>H]Oxotremorin M ist an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren ein biphasisches Dissoziationsverhalten beschrieben worden (Hirschberg und Schimerlik, 1994; Maaß, Dissertation 1995; Großmüller, Dissertation 2003), d.h. eine signifikant bessere Beschreibung des Dissoziationsverlaufs durch eine biphasische als durch eine monophasische Funktion. In Dissoziationsexperimenten mit [<sup>3</sup>H]OxoM an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren sollte unter verschiedenen Versuchsbedingungen die Dissoziationskinetik des Radioliganden untersucht werden, um die Kinetik eindeutig einem mono- oder biphasischen Typ zuordnen zu können. Abb. 20 zeigt den Verlauf der [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation eines repräsentativen Experiments unter Kontrollbedingungen, d.h. ohne Zusatz einer dissoziationsverzögernd wirksamen Substanz, bei 23°C.



**Abb. 20:** Dissoziationskinetik des Radioliganden [<sup>3</sup>H]OxoM an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren unter Kontrollbedingungen. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 1 nM. Temperatur: 23°C. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments. Die Datenpunkte wurden signifikant besser durch einen biphasischen Dissoziationsverlauf beschrieben (F-Test,  $p < 0,05$ ). Ordinate: [<sup>3</sup>H]OxoM-Gesamtbindung in Prozent des Ausgangswertes bei Start der Dissoziationsmessung. Abszisse: Dissoziationsmaß. Fraktionelle Rezeptorbesetzung  $B_f = 57,0\%$ . Monophasische Funktion: Plateau = 15,8 %. Biphasische Funktion: Plateau = 15,1 %.

Der Dissoziationsverlauf des Radioliganden wurde bei diesem Experiment signifikant besser durch eine biphasische Funktion mit einem schnell und einem langsamer dissoziierenden Kompartiment als durch eine monophasische Funktion beschrieben (F-Test, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ). Bei der Anpassung der biphasischen Regressionskurve an die Datenpunkte berechnete die Computersoftware neben den Dissoziations-Halbwertszeiten Kompartimentgrößen, d.h. jeweils den Anteil an der [<sup>3</sup>H]OxoM-Bindung, der mit einer schnellen bzw. langsameren Halbwertszeit dissoziierte. Das Plateau der Radioligand-Bindung bei einer monophasischen bzw. biphasischen Analyse des Dissoziationsexperiments aus Abb. 20 war niedriger als der Anteil der unspezifischen Bindung an der [<sup>3</sup>H]OxoM-Gesamtbindung bei homologen Konkurrenzexperimenten, also Gleichgewichts-Bindungsexperimenten (Anteil der unspezifischen Bindung an der [<sup>3</sup>H]OxoM-Gesamtbindung =  $25,1 \pm 4,1\%$ ).

Um die Dissoziationskinetik des Radioliganden zu verlangsamen und damit ein schnell dissoziierendes Kompartiment besser erfassen zu können, wurden Experimente bei einer um 10°C auf 13°C verminderten Temperatur durchgeführt.



**Abb. 21:** Dissoziationskinetik des Radioliganden [<sup>3</sup>H]OxoM an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren unter Kontrollbedingungen. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 1 nM. Temperatur: 13°C. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments. Die Datenpunkte wurden signifikant besser durch einen biphasischen Dissoziationsverlauf beschrieben (F-Test,  $p < 0,05$ ). Ordinate: [<sup>3</sup>H]OxoM-Gesamtbindung in Prozent des Ausgangswertes bei Start der Dissoziationsmessung. Abszisse: Dissoziationsmaß. Fraktionelle Rezeptorbesetzung  $B_f = 57,5\%$ . Monophasische Funktion: Plateau = 25,9 %. Biphasische Funktion: Plateau = 14,6 %.

Abb. 21 zeigt das Ergebnis eines repräsentativen Dissoziationsexperiments bei 13°C, bei dem der Dissoziationsverlauf signifikant besser durch eine biphasische Funktion beschrieben wurde. Neben der Temperatur wurde als weitere Versuchsbedingung die Radioligandkonzentration variiert und die [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziationskinetik unter einer im Vergleich zur Standard-[<sup>3</sup>H]OxoM-Konzentration von 1 nM reduzierten und einer erhöhten Radioligandkonzentration betrachtet. Eine Erhöhung der Radioligandkonzentration sollte eine bessere Erfassung eines schnell dissoziierenden [<sup>3</sup>H]OxoM-Kompartiments ermöglichen. Um den Verbrauch an Radioligand zu begrenzen, wurde in den Experimenten bei einer erhöhten Radioligandkonzentration neben 1,5 nM [<sup>3</sup>H]OxoM 1,5 nM nicht markiertes OxoM eingesetzt, sodass eine Gesamtkonzentration von 3 nM OxoM im Versuchsansatz erreicht wurde. Tab. 13 gibt einen Überblick über die mit porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren durchgeführten [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziationsexperimente unter Kontrollbedingungen.

## Ergebnisse

Temperatur (°C)	Radioligandkonzentration (nM)	n	monophasische Dissoziationsverläufe	biphasische Dissoziationsverläufe	$t_{0,5diss}$ (min) <sup>†</sup>
23	1	13	6	7	4,07 ± 0,19
13	1	17	8	9	20,48 ± 1,41
13	0,5	10	3	7	19,13 ± 0,45
13	1,5 <sup>††</sup>	15	11	4	11,14 ± 1,00

**Tab. 13:** Dissoziationsverläufe des Radioliganden [<sup>3</sup>H]OxoM unter verschiedenen Versuchsbedingungen in Na,K,P<sub>i</sub>-Puffer. Angegeben sind die Anzahl der monophasischen bzw. biphasischen Dissoziationsverläufe bei Vergleich einer monophasischen gegen eine biphasische Funktion (F-Test, p < 0,05).  $t_{0,5diss}$ : Halbwertszeit der [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation in Minuten. †: Mittelwert ± Standardfehler der monophasischen Analyse von n Dissoziationsverläufen. ††: Neben 1,5 nM [<sup>3</sup>H]OxoM war 1,5 nM nicht markiertes OxoM im Versuchsansatz vorhanden.

Der Faktor der Dissoziationsverlangsamung durch Temperatursenkung um 10°C betrug bei einer Radioligandkonzentration von 0,5 nM oder 1 nM etwa 5 (Verlangsamung der Dissoziations-Halbwertszeit von ca. 4 min auf ca. 20 min), während die Dissoziations-Halbwertszeit bei einer Radioligandkonzentration von 1,5 nM durch die Temperatursenkung um weniger als den Faktor 3 verlangsamt wurde (Verlangsamung der Dissoziations-Halbwertszeit auf ca. 11 min). Evtl. kam es durch die Erhöhung der Radioligandkonzentration zu einer wesentlich stärkeren Erfassung eines im Bezug auf die [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation schnellen Kompartiments, sodass die Gesamt-Dissoziations-Halbwertszeit bei der erhöhten Radioligandkonzentration kürzer war als bei einer Radioligandkonzentration von 0,5 bzw. 1 nM. Aus Tab. 13 geht hervor, dass bei den Experimenten bei 13°C und einer erniedrigten Radioligandkonzentration von 0,5 nM biphasische Dissoziationsverläufe überwogen und bei einer erhöhten Radioligandkonzentration von 1,5 nM monophasische Dissoziationsverläufe. Dieser Befund könnte Folge einer besseren Erfassung des im Bezug auf die [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation schnellen und des langsamen Kompartiments bei der niedrigeren Radioligandkonzentration und eines Dominierens des im Bezug auf die [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation schnellen Kompartiments bei der höheren Radioligandkonzentration gewesen sein. In Tab. 14 sind die Ergebnisse der Analyse der durch eine biphasische Funktion signifikant besser beschriebenen Dissoziationsverläufe zusammengestellt.

## Ergebnisse

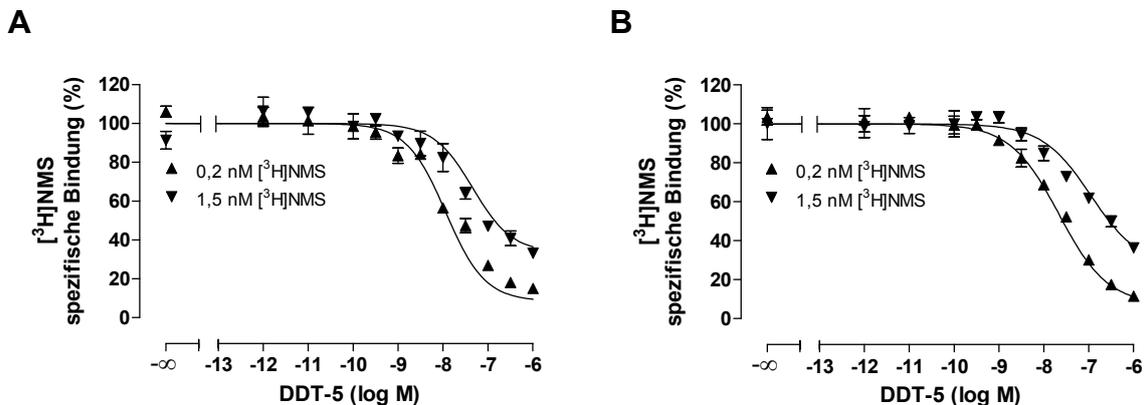
Temperatur (°C)	Radioligand- konzentration (nM)	n	schnelles Kompartiment		langsameres Kompartiment	
			$t_{0,5diss}$ (min)	Anteil (%)	$t_{0,5diss}$ (min)	Anteil (%)
23	1	7	0,81 ± 0,24	32 ± 4	6,09 ± 0,53	68 ± 4
13	1	9	4,41 ± 1,07	37 ± 5	37,91 ± 5,46	63 ± 5
13	0,5	7	4,39 ± 1,00	36 ± 4	36,63 ± 3,91	64 ± 4
13	1,5 <sup>††</sup>	4	0,76 ± 0,32	35 ± 7	21,20 ± 2,58	65 ± 7

**Tab. 14:** Biphasische Dissoziationsverläufe des Radioliganden [<sup>3</sup>H]OxoM unter verschiedenen Versuchsbedingungen in Na,K,P<sub>i</sub>-Puffer.  $t_{0,5diss}$ : Halbwertszeit der [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation des jeweiligen Kompartiments in Minuten. <sup>††</sup>: Neben 1,5 nM [<sup>3</sup>H]OxoM war 1,5 nM nicht markiertes OxoM im Versuchsansatz vorhanden.

Durch die Verminderung der Temperatur kam es bei einer Radioligandkonzentration von 1 nM zu einer deutlichen Verlangsamung der Dissoziations-Halbwertszeit des schnellen und des langsamen Kompartiments. Die Dissoziations-Halbwertszeit des schnellen Kompartiments war bei einer Radioligandkonzentration von 1,5 nM nicht signifikant im Vergleich zu Experimenten bei 23°C verändert. Evtl. war die scheinbar unveränderte Dissoziations-Halbwertszeit Folge einer stärkeren Erfassung des schnellen Kompartiments bei der erhöhten Radioligandkonzentration und einer Temperatur von 13°C im Vergleich zu den Experimenten bei 23°C und einer Radioligandkonzentration von 1 nM. Die Dissoziations-Halbwertszeit des langsamen Kompartiments wurde durch die Senkung der Temperatur bei den untersuchten Radioligandkonzentrationen deutlich verlängert. Die Verminderung der Temperatur bzw. Variation der Radioligandkonzentration bewirkte im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen (23°C, 1 nM [<sup>3</sup>H]OxoM) keine signifikante Veränderung der Kompartimentgrößen: Der Anteil des schnellen Kompartiments an der [<sup>3</sup>H]OxoM-Bindung betrug jeweils ca. 1/3. Unter den verschiedenen Versuchsbedingungen kam es nicht zu einem ausschließlichen Vorliegen von monophasischen bzw. biphasischen Dissoziationsverläufen des [<sup>3</sup>H]OxoM.

### 3.5 Interaktion von DDT-5 mit [<sup>3</sup>H]NMS an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren

In Gleichgewichts-Bindungsexperimenten wurde die Interaktion der allosterisch/orthosterischen Hybrids substanz DDT-5 mit [<sup>3</sup>H]NMS an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren untersucht. Diese Experimente dienen einer ersten Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_A$  und des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$  des DDT-5 an M<sub>2</sub>-Rezeptoren vor dem Einsatz von humanen und punktmutierten M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Durch die simultane Analyse eines Gleichgewichts-Bindungsexperiments bei zwei unterschiedlichen Radioligandkonzentrationen ist eine besonders genaue Bestimmung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_A$  und des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$  einer allosterisch wirksamen Substanz möglich. Abb. 22 zeigt das Ergebnis von zwei Interaktionsexperimenten der allosterisch/orthosterischen Hybrids substanz DDT-5 mit [<sup>3</sup>H]NMS bei zwei unterschiedlichen Radioligandkonzentrationen.



**Abb. 22:** Simultane Analyse eines Gleichgewichts-Bindungsexperiments mit DDT-5 an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren bei einer [<sup>3</sup>H]NMS-Konzentration von 0,2 nM bzw. 1,5 nM. Ordinate: Spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit von DDT-5. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren DDT-5-Konzentration. Kurvenanpassung: Gleichung 22. Es wurde mittels eines F-Tests geprüft, ob die Datenpunkte signifikant besser durch ein auf  $n_H = -1$  festgesetztes Steilheitsmaß oder ein freilaufendes Steilheitsmaß beschrieben wurden. **A:** Versuch vom 26.10.04.  $n_H = -1$ . **B:** Versuch vom 05.01.05.  $n_H = -0,80$ .

Bei der größeren Radioligandkonzentration ergab sich jeweils ein höheres Plateau der Radioligandbindung, da hier ein größerer Anteil der Rezeptoren mit [<sup>3</sup>H]NMS besetzt war und sich somit der dissoziationsverzögernde Effekt des DDT-5 stärker bemerkbar machte. In Tab. 15 sind die aus den Interaktionskurven gewonnenen charakteristischen Bindungsparameter zusammengestellt.

$pK_A$	$p\alpha$	$p(\alpha \cdot K_A)$	$n_H$
8,24 (8,09; 8,38)	-1,51 (-1,49; -1,52)	6,73	-0,90 (-0,80; -1,00)

**Tab. 15:** Bindungsparameter der Interaktion von DDT-5 mit [<sup>3</sup>H]NMS an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten.  $pK_A$ : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_A$  des allosterischen Liganden.  $p\alpha$ : Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$ .  $n_H$ : Steilheitsmaß.

Durch die Experimente konnte die Affinität des DDT-5 zu M<sub>2</sub>-Rezeptoren in Form des  $pK_A$ -Werts bestimmt werden und das Produkt  $p(\alpha \cdot K_A)$ , das einen Anhaltspunkt für die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit des DDT-5 an M<sub>2</sub>-Rezeptoren liefert, da dieses Produkt nach dem Kooperativitätsmodell der allosterischen Interaktion der Affinität des DDT-5 zu [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren ( $pEC_{0,5diss}$ ) entspricht.

### 3.6 Inhibitionsexperimente mit dem Radioagonisten [<sup>3</sup>H]OxoM und dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren

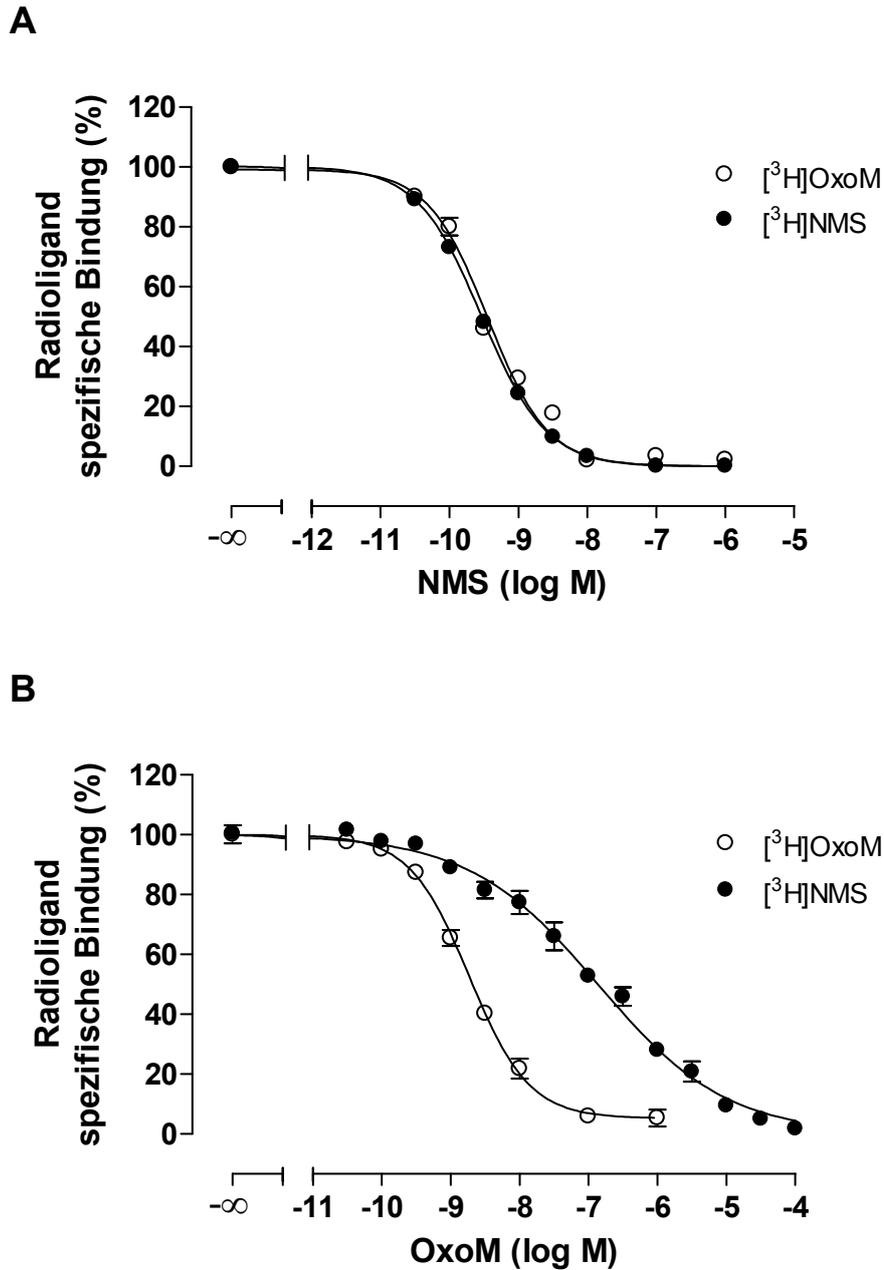
Mit Hilfe des Radioagonisten [<sup>3</sup>H]OxoM und des Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS wurde das Bindungsverhalten der Muskarinrezeptor-Agonisten Oxotremorin M, Iperoxo und DDT-5 im Vergleich zu dem Antagonisten N-Methylscopolamin an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren betrachtet. Die allosterisch/orthosterische Hybridsubstanz DDT-5 hatte sich in Organbadexperimenten als Vollagonist an Muskarinrezeptoren erwiesen. In Inhibitionsexperimenten mit dem Radioagonisten [<sup>3</sup>H]OxoM und dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS sollte geprüft werden, ob sich beim DDT-5 ein für Agonisten typisches Bindungsverhalten zeigte.

Durch die Verwendung eines Radioagonisten bzw. eines Radioantagonisten in den üblichen nanomolaren Konzentrationen sollte es zur Markierung von

unterschiedlichen Rezeptorpopulationen kommen (siehe Kapitel 2.3.3.1): Während der Radioagonist den für Agonisten hochaffinen, G-Protein-gekoppelten Rezeptorzustand markiert, wird durch einen Radioantagonisten sowohl der G-Protein-gekoppelte als auch der G-Protein-entkoppelte Zustand markiert, da der Antagonist an beide Rezeptorzustände mit gleicher Affinität bindet. In einem Kompetitionsexperiment, bei dem ein Radioagonist zur Markierung der Rezeptoren eingesetzt wurde, sollte sich daher für einen als Kompetitor eingesetzten Agonisten eine höhere Affinität, berechnet als Inhibitionskonstante  $K_i$ , ergeben als bei einem Kompetitionsexperiment, bei dem die Rezeptoren durch einen Radioantagonisten markiert wurden. Bei einem als Kompetitor eingesetzten Antagonisten dagegen sollte die Rezeptoraffinität, berechnet als Inhibitionskonstante  $K_i$ , gleich sein bei Einsatz eines Radioagonisten oder Radioantagonisten zur Markierung der Rezeptoren, da der Antagonist in seiner Affinität nicht zwischen dem G-Protein-gekoppelten und -entkoppelten Rezeptorzustand differenziert.

Abb. 23 A zeigt die Inhibitionskurven des Antagonisten N-Methylscopolamin bei Verwendung von [ $^3\text{H}$ ]NMS als Radioligand, also homologen Kompetitionsexperimenten, und heterologen Kompetitionsexperimenten mit [ $^3\text{H}$ ]OxoM. Die Inhibitionskurven konnten durch ein Steilheitsmaß von -1 beschrieben werden und es ergab sich für N-Methylscopolamin eine ähnliche Affinität bei Verwendung von [ $^3\text{H}$ ]NMS bzw. [ $^3\text{H}$ ]OxoM (siehe Tab. 16).

Abb. 23 B zeigt die Inhibitionskurven des Muskarinrezeptor-Agonisten Oxotremorin M. Erkennbar ist die deutlich höhere Affinität für die Inhibition der [ $^3\text{H}$ ]OxoM-Bindung im Vergleich zur Inhibition der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung und die deutlich flachere Kurvensteilheit der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Inhibitionskurve (siehe Tab. 16). Die Inhibitionskurven des Oxotremorin M mit [ $^3\text{H}$ ]NMS wiesen ein signifikant von -1 verschiedenes Steilheitsmaß  $n_H$  auf (F-Test, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ), was auf das Vorhandensein von zwei Rezeptorzuständen, nämlich dem G-Protein-gekoppelten und -entkoppelten Rezeptor, zurückzuführen war. Die bei der Kompetition des Oxotremorin M mit dem Radioantagonisten [ $^3\text{H}$ ]NMS beobachteten flachen Kurvensteilheiten sind typisch für das Bindungsverhalten von Agonisten.

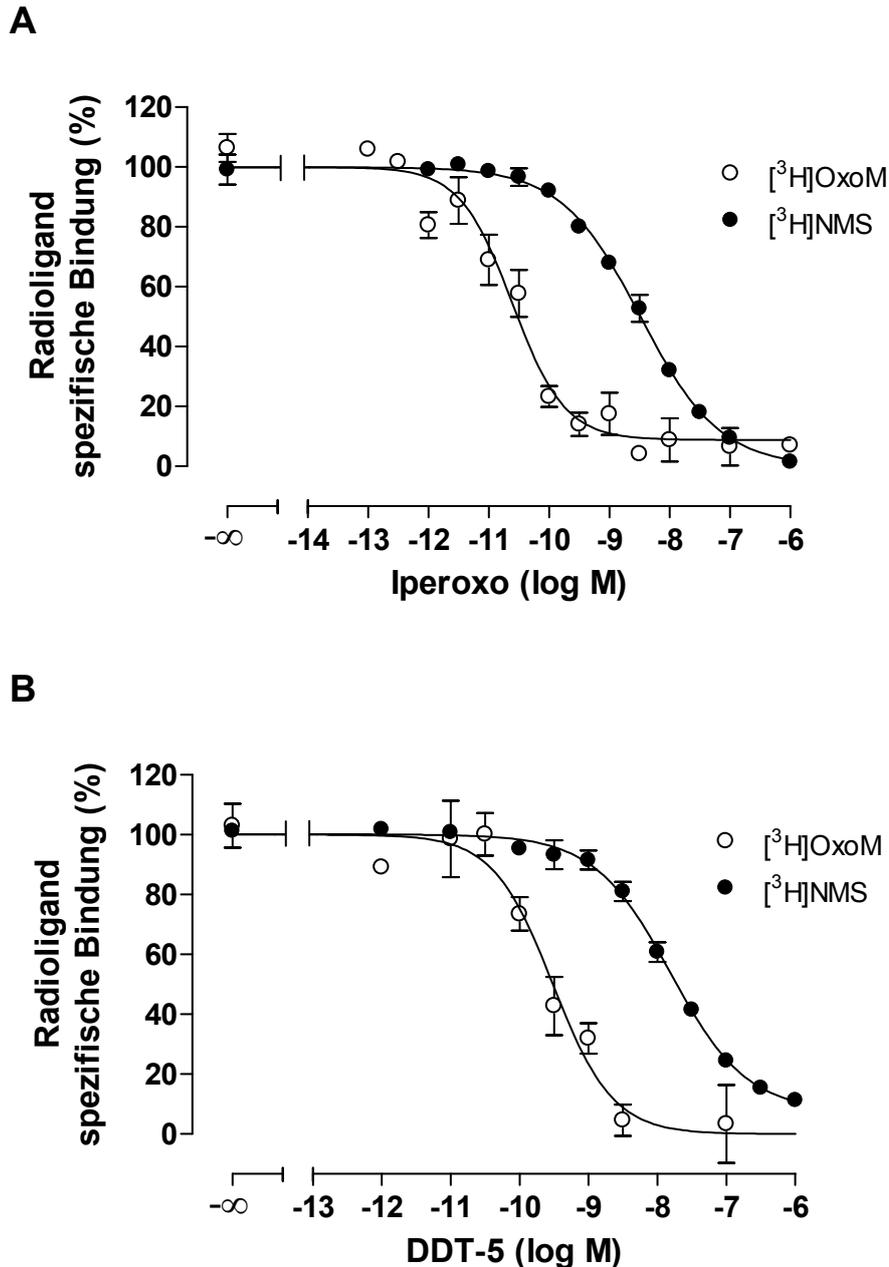


**Abb. 23:** Inhibition der spezifischen  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ - bzw. der spezifischen  $[^3\text{H}]\text{OxoM}$ -Bindung an porcine  $\text{M}_2$ -Rezeptoren durch nicht markiertes NMS bzw. nicht markiertes OxoM. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 1 nM  $[^3\text{H}]\text{OxoM}$  bzw. 0,2 nM  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ . Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 2-9 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische Radioligand-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7. **A:** Inhibition der Radioligand-Bindung durch den Antagonisten N-Methylscopolamin. **B:** Inhibition der Radioligand-Bindung durch den Agonisten Oxotremorin M.

Die in Abb. 23 B dargestellte [<sup>3</sup>H]OxoM-Oxotremorin M-Inhibitionskurve wies ein Plateau der spezifischen Bindung auf, das sich signifikant von 0 % unterschied (Plateau = 5,2 %, F-Test, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ). Diesem geringen Unterschied zu einer vollständigen Inhibition der spezifischen Radioligand-Bindung wurde jedoch keine biologische Bedeutung beigemessen.

In Abb. 24 A sind die Inhibitionskurven des in seiner chemischen Struktur vom Oxotremorin M abgeleiteten Agonisten Iperoxo dargestellt. Iperoxo zeigte ein für Agonisten typisches Bindungsverhalten mit einer höheren Affinität zum Radioagonist-markierten als zum Radioantagonist-markierten Rezeptor (siehe Tab. 16). Die in Abb. 24 A dargestellte [<sup>3</sup>H]OxoM-Iperoxo-Inhibitionskurve wies ein Plateau der spezifischen Bindung auf, das sich signifikant von 0 % unterschied (Plateau = 8,9 %, F-Test, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ).

Aus Abb. 24 B wird ersichtlich, dass auch die allosterisch/orthosterische Hybridsubstanz DDT-5, die aus einem Teil des allosterischen Modulators W84 und einem vom Iperoxo abgeleiteten Molekülteil aufgebaut ist, ein für Agonisten typisches Bindungsverhalten aufwies.



**Abb. 24:** Inhibition der spezifischen [<sup>3</sup>H]NMS- bzw. der spezifischen [<sup>3</sup>H]OxoM-Bindung an porcine M<sub>2</sub>-Rezeptoren durch Iperoxo bzw. DDT-5. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 1 nM [<sup>3</sup>H]OxoM bzw. 0,2 nM [<sup>3</sup>H]NMS. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische Radioligand-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7. **A:** Inhibition der Radioligand-Bindung durch Iperoxo. **B:** Inhibition der Radioligand-Bindung durch DDT-5.

Die Interaktionsexperimente des DDT-5 mit [<sup>3</sup>H]NMS bzw. [<sup>3</sup>H]OxoM an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren zeigten eine ausgeprägte Inhibition der Radioligandbindung, die

auf eine stark negative Kooperativität, also eine allosterische Interaktion, bzw. auf eine kompetitive Interaktion des DDT-5 mit dem Radioliganden an der orthosterischen Bindungsstelle oder eine Mischform der beiden Interaktionsarten zurückzuführen sein konnte. Da die Bindungstopografie des DDT-5 an M<sub>2</sub>-Rezeptoren erst in späteren Experimenten mit punktmutierten M<sub>2</sub>-Rezeptoren untersucht wurde, wurden die Interaktionsexperimente des DDT-5 mit [<sup>3</sup>H]NMS bzw. [<sup>3</sup>H]OxoM an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren deskriptiv nach Cheng und Prusoff analysiert. In Tab. 16 sind die aus den Konkurrenzexperimenten mit [<sup>3</sup>H]NMS bzw. [<sup>3</sup>H]OxoM erhaltenen Affinitätskonstanten und Steilheitsmaße n<sub>H</sub> zusammengefasst. Die Konkurrenzexperimente mit [<sup>3</sup>H]OxoM und die homologen Konkurrenzexperimente des N-Methylscopolamin ließen sich durch ein Steilheitsmaß von -1 beschreiben, während sich bei Konkurrenzexperimenten von Agonisten mit [<sup>3</sup>H]NMS flache Inhibitionskurven ergaben (n<sub>H</sub> > -1). Die allosterisch/orthosterische Hybridsubstanz DDT-5 zeigte ein für Agonisten typisches Bindungsverhalten mit einer höheren Affinität zu Radioagonist-markierten Rezeptoren.

Testsubstanz	[ <sup>3</sup> H]NMS		[ <sup>3</sup> H]OxoM	
	pK <sub>I</sub> / pK <sub>app</sub>	n <sub>H</sub>	pK <sub>I</sub>	n <sub>H</sub>
NMS	10,07 ± 0,08	-0,94 ± 0,04	9,81 (9,79; 9,83)	-0,92 (-0,89; -0,96)
Oxotremorin M	7,48 ± 0,13	-0,47 ± 0,03	9,04 ± 0,10	-1,03 ± 0,07
Iperoxo	9,01 ± 0,05	-0,65 ± 0,05	10,76 ± 0,09	-1,01 ± 0,31
DDT-5	8,26 ± 0,05	-0,76 ± 0,08	9,70 ± 0,06	-1,06 ± 0,11

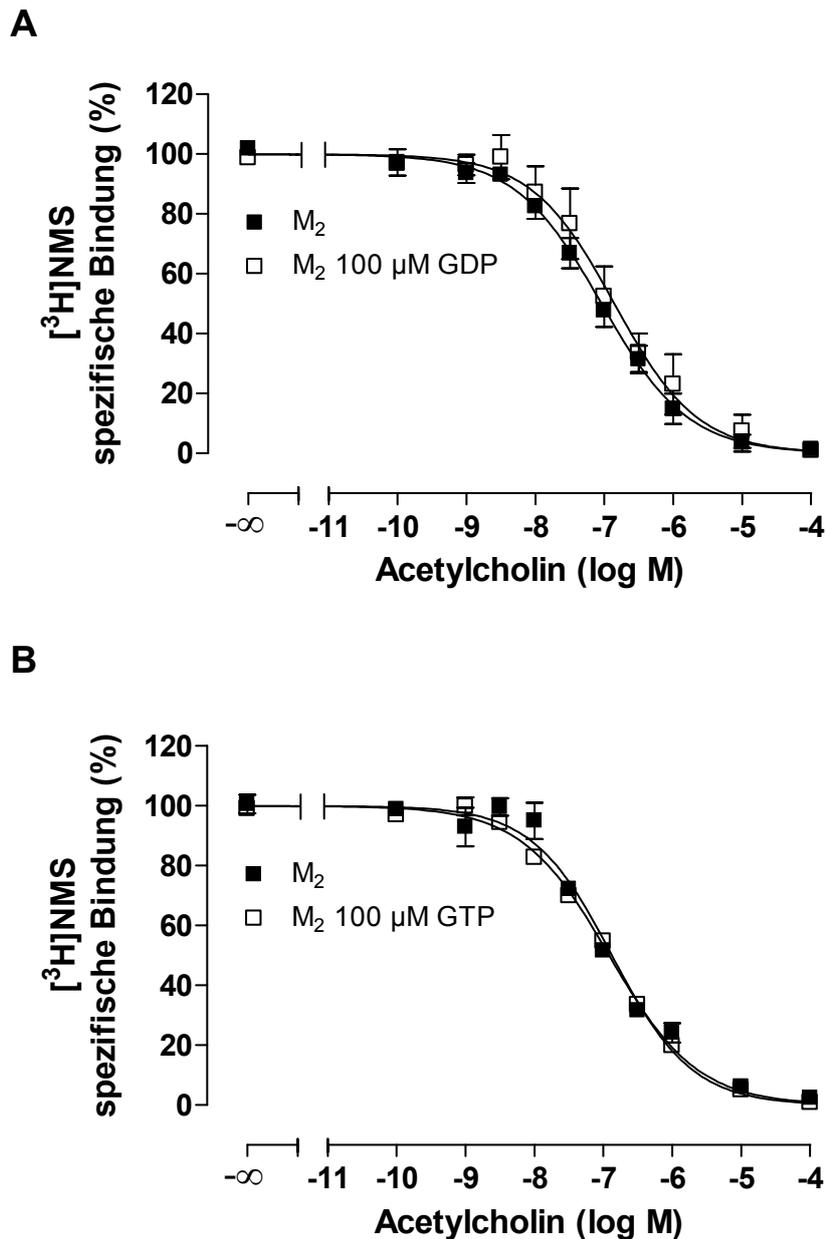
**Tab. 16:** Affinitätskonstanten des muskarinischen Antagonisten N-Methylscopolamin sowie der Agonisten Oxotremorin M, Iperoxo und DDT-5 aus heterologen Konkurrenzexperimenten mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS bzw. dem Radioagonisten [<sup>3</sup>H]OxoM an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 2-9 unabhängigen Experimenten. Kurvenanpassung: Gleichung 7. Es wurde mittels eines F-Tests geprüft, ob die Einzelexperimente signifikant besser durch ein auf n<sub>H</sub> = -1 festgesetztes Steilheitsmaß oder ein freilaufendes Steilheitsmaß beschrieben wurden. pK<sub>I</sub> / pK<sub>app</sub>: Negativer dekadischer Logarithmus der Inhibitionskonstanten K<sub>I</sub> bzw. der apparenten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K<sub>app</sub>. n<sub>H</sub>: freilaufendes Steilheitsmaß.

Tab. 16 zeigt, dass es durch die Abwandlung der Oxotremorin M-Struktur zum Iperoxo gelungen ist, die Rezeptoraffinität zu erhöhen. Durch die Hybridbildung im DDT-5, in dem ein vom Iperoxo abgeleiteter Molekülteil mit einem W84-artigen Molekülteil verbunden wurde, verminderte sich die Rezeptoraffinität zwar im Vergleich zum Iperoxo, war jedoch deutlich höher als die des klassischen Agonisten Oxotremorin M. Für Iperoxo und DDT-5 ergaben sich in den Konkurrenzexperimenten mit [<sup>3</sup>H]OxoM sehr hohe Rezeptoraffinitäten im subnanomolaren Bereich.

### **3.7 Abhängigkeit der Ligand-Bindung von der G-Protein-Kopplung in COS7-Zellen exprimierter humaner M<sub>2</sub>-Rezeptoren**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen Muskarinrezeptoren wurden nach einer transienten Transfektion in COS7-Zellen exprimiert. Wie bereits bei den porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren durchgeführt, wurden die humanen M<sub>2</sub>-Rezeptoren aus COS7-Zellen in „GTP-Shift“-Experimenten mit einem Agonisten und einem Nukleotid-Überschuss untersucht. Es sollte geprüft werden, inwieweit eine G-Protein-Kopplung der in COS7-Zellen exprimierten Rezeptoren vorlag und damit für Agonisten unterschiedlich affine Rezeptorzustände vorhanden waren. Bei diesen Experimenten wurde der endogene Agonist an Muskarinrezeptoren Acetylcholin und ein Überschuss Guanosindiphosphat (GDP) bzw. Guanosin-triphosphat (GTP) eingesetzt. Auch ein GDP-Überschuss ist in der Lage, eine Entkopplung der Rezeptoren von G-Proteinen herbeizuführen (Berrie et al., 1979).

Abb. 25 zeigt die parallel durchgeführten Konkurrenzexperimente zwischen [<sup>3</sup>H]NMS und Acetylcholin ohne Nukleotid-Zugabe bzw. in Gegenwart eines Nukleotid-Überschusses.



**Abb. 25:** Effekt von GDP bzw. GTP auf die Acetylcholin-Affinität an humanen  $M_2$ -Rezeptoren. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus jeweils 2 unabhängigen Experimenten. Inkubationszeit: 2 h. Ordinate: Spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Acetylcholin-Konzentration. Kurvenanpassung: Gleichung 7. **A:** Effekt von 100  $\mu\text{M}$  GDP. **B:** Effekt von 100  $\mu\text{M}$  GTP.

Weder durch den GDP-Überschuss noch durch den GTP-Überschuss kam es zu einer deutlichen Affinitätsabnahme des Acetylcholins, wie es bei einer

vollständigen Aufhebung des für Agonisten hochaffinen Rezeptorzustandes zu erwarten gewesen wäre.

Aus Tab. 17 geht hervor, dass sich für Acetylcholin apparente Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von ca. 40 nM ergaben (Entlogarithmieren von  $pK_{app} = 7,4$ ). Diese im Vergleich zu Literaturangaben, die Experimente mit Acetylcholin in einem anderen Puffersystem betreffen, hohe Acetylcholin-Affinität deutete darauf hin, dass ein für Agonisten hochaffines Kompartiment bei den in COS7-Zellen exprimierten  $M_2$ -Rezeptoren vorhanden war.

Nukleotid	$pK_{app}$	$n_H$
-	7,50 (7,47; 7,53)	-0,69 (-0,59; -0,79)
GDP $10^{-4}$ M	7,40 (7,18; 7,61)	-0,77 (-0,68; -0,86)
-	7,41 (7,39; 7,42)	-0,81 (-0,79; -0,84)
GTP $10^{-4}$ M	7,35 (7,29; 7,40)	-0,68 (-0,68; 0,69)

**Tab. 17:** Affinitätskonstanten des Acetylcholins aus heterologen Kompetitionsexperimenten mit dem Radioantagonisten [ $^3$ H]NMS an humanen  $M_2$ -Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten ohne Nukleotid-Zusatz bzw. in Gegenwart von  $10^{-4}$  M GDP oder  $10^{-4}$  M GTP. Es wurde jeweils ein Experiment ohne Nukleotid-Zusatz und ein Experiment in Gegenwart des Nukleotid-Überschusses parallel durchgeführt.  $pK_{app}$ : Negativer dekadischer Logarithmus der apparenten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_{app}$ .  $n_H$ : freilaufendes Steilheitsmaß.

Die Bindung des Agonisten Acetylcholin an die untersuchten Muskarinrezeptoren wurde jedoch durch einen GDP- bzw. GTP-Überschuss kaum beeinflusst.

### 3.8 Kinetik der [ $^3$ H]NMS-Dissoziation an $M_2^{104}$ Tyrosin-Mutanten

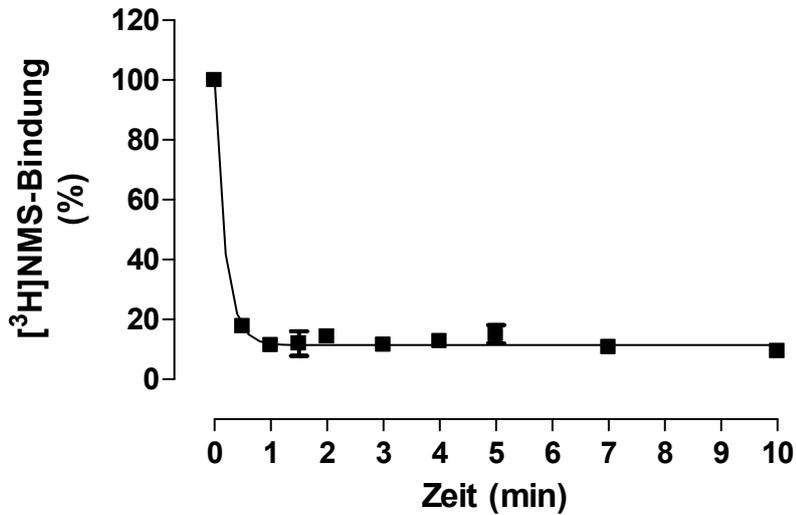
Die Aminosäure  $M_2^{104}$ Tyrosin befindet sich im Bereich der dritten transmembranären Domäne des  $M_2$ -Rezeptorproteins. Sie ist benachbart zu dem konservierten Epitop  $M_2^{103}$ Aspartat, das auch in anderen Rezeptoren für biogene Amine, u.a. dem  $\beta_2$ -Rezeptor, vorhanden ist (Wess, 1993). Die negative Ladung

von  $M_2^{103}$ Aspartat ist entscheidend für die Bindung der positiv geladenen Aminogruppe, die in beinahe allen muskarinischen Liganden vorhanden ist. Die Mutation  $M_2^{103}\text{Asp}\rightarrow\text{Ala}$  führte zu einem vollständigen Verlust der spezifischen Bindung der Antagonisten [ $^3\text{H}$ ]N-Methylscopolamin und [ $^3\text{H}$ ]Quinuclidinylbenzilat, sodass Bindungsstudien mit dieser Mutante nicht möglich waren (Heitz et al., 1999). Nach Molecular Modelling-Untersuchungen des Arbeitskreises von Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje (Pharmazeutisches Institut, Universität Düsseldorf) sollte sich  $M_2^{104}$ Tyrosin ebenfalls im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle befinden und daher eine Mutation dieser Aminosäure zu einem Affinitätsverlust orthosterischer Liganden führen.

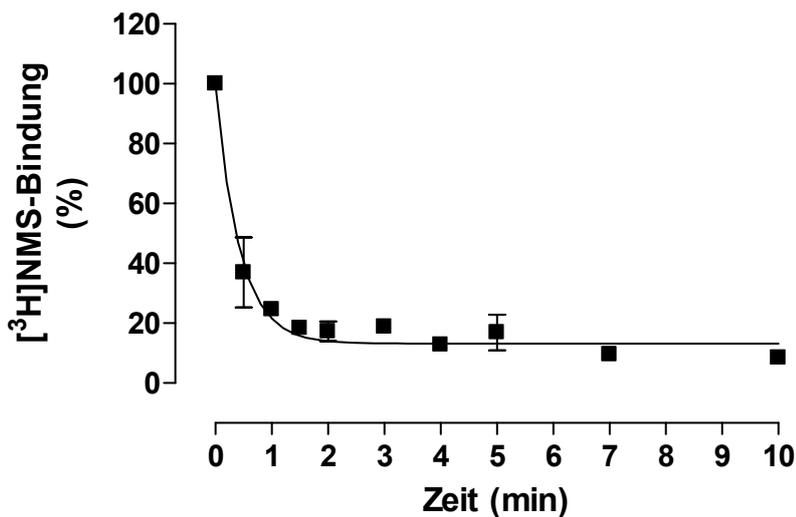
Aufgrund der Untersuchungen des Arbeitskreises Höltje war im eigenen Arbeitskreis eine Mutagenese mit Austausch des  $M_2^{104}$ Tyrosin gegen Alanin, Phenylalanin bzw. Serin durchgeführt worden (M. Mohr-Andrä, S. Prilla). Abb. 15 (Kapitel 3.2) zeigt, dass eine Mutation des Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin zu einem deutlichen Affinitätsverlust des Radioorthosters [ $^3\text{H}$ ]NMS führte. Neben der Affinität sollte die Dissoziations-Halbwertszeit des [ $^3\text{H}$ ]NMS an den in dem Epitop  $M_2^{104}$ Tyrosin punktmultierten Rezeptoren bestimmt werden. Hierzu wurden Experimente durchgeführt, bei denen der komplette Dissoziationsverlauf des [ $^3\text{H}$ ]NMS an den  $M_2^{104}$ Tyrosin-Mutanten beobachtet wurde.

Aus Abb. 26 A wird die sehr schnelle Dissoziationskinetik des [ $^3\text{H}$ ]NMS an der Rezeptormutante  $M_2^{104}$ Tyrosin $\rightarrow$ Alanin bei einer Temperatur von 23°C ersichtlich. Um die Dissoziationskinetik zu verlangsamen, wurden daraufhin Experimente bei einer um 10°C auf 13°C verminderten Temperatur durchgeführt (Abb. 26 B). Die Temperaturerniedrigung führte zwar zu einer deutlichen Verlängerung der Dissoziations-Halbwertszeit, jedoch war die Dissoziationskinetik im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren weiterhin sehr schnell.

**A**



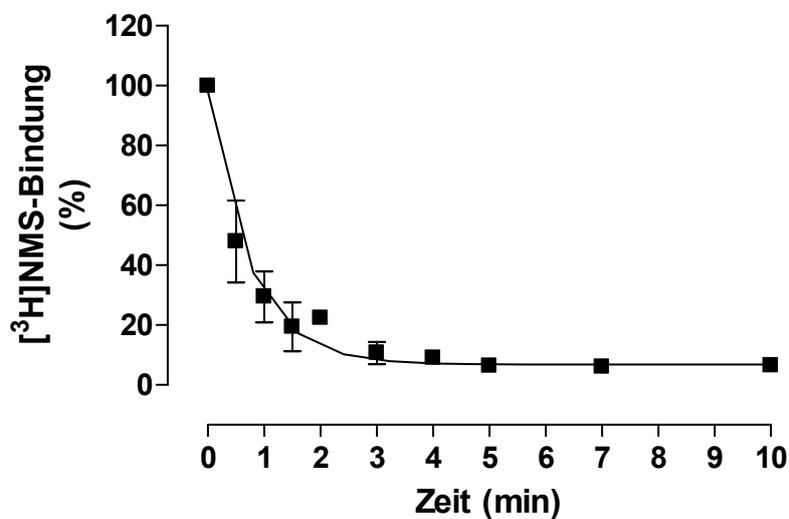
**B**



**Abb. 26:** Dissoziationskinetik des Radioliganden [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin an der Rezeptormutante M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin→Alanin unter Kontrollbedingungen. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 1 nM. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus jeweils 2 unabhängigen Experimenten. Ordinate: [<sup>3</sup>H]NMS-Gesamtbindung in Prozent des Ausgangswertes bei Start der Dissoziationsreaktion. Abszisse: Dissoziationsmaß. Kurvenanpassung: monophasische Funktion. **A:** Kinetik bei 23°C. **B:** Kinetik bei 13°C.

Der NMS-pK<sub>D</sub>-Wert hatte sich durch die Mutation M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala im Vergleich zu M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren um rund 1,0 Dekaden auf 9,01 ± 0,08 vermindert, d.h. die NMS-Affinität wurde durch die Mutation etwa um den Faktor 10 kleiner. Wie aus Tab. 18 hervorgeht, betrug die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante k<sub>-1</sub> = 5,35

$\text{min}^{-1}$  an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  bei  $23^\circ\text{C}$ . Dies entsprach einer Beschleunigung gegenüber  $M_2$ -Wildtyprezeptoren ( $k_{-1} = 0,101 \text{ min}^{-1}$ ) um etwa den Faktor 53. Aus der Bestimmung des  $\text{pK}_D$ -Werts und der Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten  $k_{-1}$  an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  geht hervor, dass die NMS-Assoziation an  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren gegenüber  $M_2$ -Wildtyprezeptoren beschleunigt sein muss, da die NMS-Affinität weniger stark vermindert war als bei einer alleinigen Beschleunigung der Dissoziation ohne Veränderung der Assoziation. Abb. 27 zeigt die schnelle Dissoziationskinetik an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$ .



**Abb. 27:** Dissoziationskinetik des Radioliganden [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin an der Rezeptormutante  $M_2^{104}\text{Tyrosin}\rightarrow\text{Phenylalanin}$  unter Kontrollbedingungen. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 1 nM. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 2 unabhängigen Experimenten. Ordinate: [<sup>3</sup>H]NMS-Gesamtbindung in Prozent des Ausgangswertes bei Start der Dissoziationsreaktion. Abszisse: Dissoziationsmaß. Kurvenanpassung: monophasische Funktion.

Tab. 18 gibt einen Überblick über die Parameter der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation an  $M_2^{104}\text{Tyrosin}$ -Punktmutanten.

Die Entfernung des Phenylrings und der Hydroxylgruppe des Epitops  $M_2^{104}\text{Tyrosin}$  in der Mutation  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  führte zu der stärksten Beschleunigung der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation während die Kinetik bei Entfernung der Hydroxylgruppe alleine (Mutation  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$ ) weniger stark beschleunigt wurde.

## Ergebnisse

Rezeptor	Temperatur (°C)	$k_{-1}$ (min <sup>-1</sup> )	$t_{0,5diss}$ (min)
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Ala	23	5,35 (5,13; 5,58)	0,13 (0,12; 0,14)
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Ala	13	2,65 (1,77; 3,54)	0,29 (0,20; 0,39)
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Phe	23	1,40 (1,01; 1,78)	0,53 (0,39; 0,68)
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Ser	23	3,56	0,19

**Tab. 18:** Parameter der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation an M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin-Punktmutanten unter Kontrollbedingungen. Angegeben sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten bzw. das Ergebnis eines Experiments (M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ser).  $k_{-1}$ : Geschwindigkeitskonstante der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation (min<sup>-1</sup>).  $t_{0,5diss}$ : Halbwertszeit der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation in Minuten.

Der Austausch des M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin gegen Serin, bei dem der Phenylring des Tyrosin-Restes bei einer weiterhin vorhandenen Hydroxylgruppe entfernt wurde, führte zu einer in ihrer Schnelligkeit zwischen den Mutationen M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala und M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Phe liegenden Dissoziationskinetik.

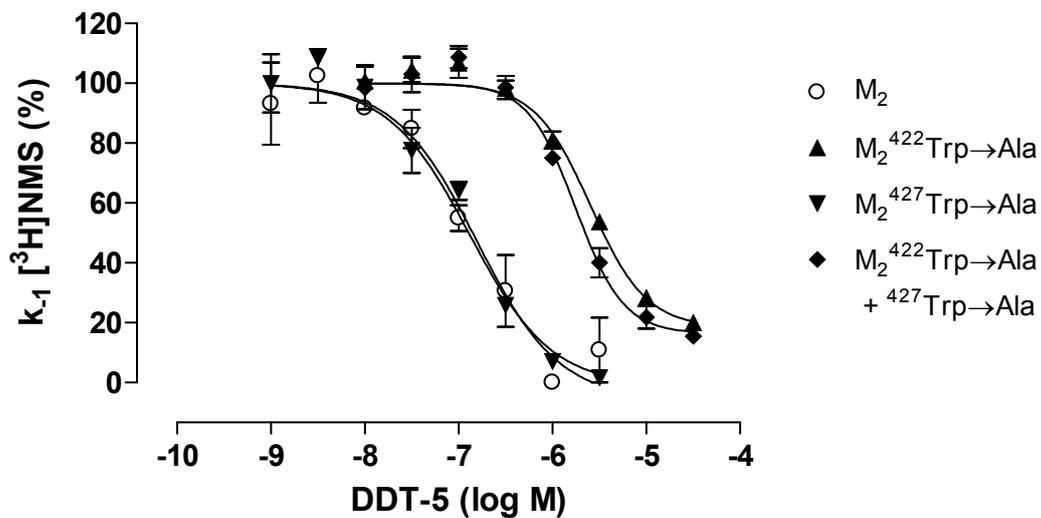
### 3.9 Verzögerung der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation durch allosterisch/orthosterische Hybridsubstanzen

Die allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 wurden in Experimenten an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren im Hinblick auf ihre M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität untersucht. Durch die in Dissoziationsexperimenten herrschenden Bedingungen mit alleiniger Dissoziation des Radioliganden konnte untersucht werden, ob die Hybridsubstanzen in der Lage waren, an Muskarinrezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle durch [<sup>3</sup>H]NMS besetzt war, zu binden. Außerdem wurde die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit der Hybridsubstanzen an punktmutierten M<sub>2</sub>-Rezeptoren untersucht, in denen im M<sub>2</sub>- und im M<sub>5</sub>-Rezeptor konservierte Tryptophane gegen Alanin ausgetauscht worden waren. Als Maß für die Affinität der Hybridsubstanzen zu [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren wurden in Zweipunkt-Kinetik-Dissoziationsexperimenten pEC<sub>0,5diss</sub>-Werte bestimmt.

Von Buller et al. (2002) und Voigtländer et al. (2003) waren die Aminosäuren M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin als Epitope identifiziert worden, die die deutlich

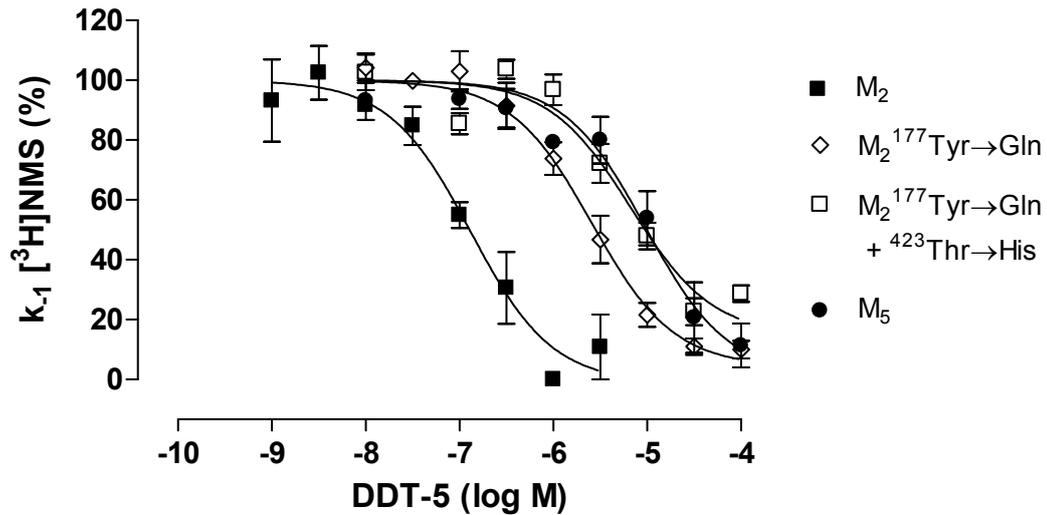
höhere Affinität von klassischen allosterischen Modulatoren wie W84 und Diallylcaracurin V zu [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten M<sub>2</sub>-Rezeptoren im Vergleich zu M<sub>5</sub>-Rezeptoren erklären. Prilla et al. (2006) zeigten, dass es bei Mutation des dem M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin benachbarten M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan zu Alanin zu einem deutlichen Affinitätsverlust allosterischer Modulatoren an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren kam. Während es sich bei den Epitopen M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin um nicht konservierte Aminosäuren handelt, die für die M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität der Bindung allosterischer Modulatoren wichtig sind, ist das Epitop M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan eine konservierte Aminosäure, die auch im M<sub>5</sub>-Rezeptor vorhanden ist. Es sollte untersucht werden, inwieweit die allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren eine ähnliche Epitopabhängigkeit aufwiesen wie typische allosterische Modulatoren. Aufgrund der sehr schnellen [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziationskinetik (siehe Kapitel 3.8) wurden keine Dissoziationsverzögerungsexperimente mit innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle punktmultierten M<sub>2</sub>-Rezeptoren, also M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin-Mutanten, durchgeführt: Die im Bereich von Sekunden liegende Dissoziations-Halbwertszeit des [<sup>3</sup>H]NMS an M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin-Mutanten verhinderte die präzise Messung des dissoziationsverzögernden Effekts einer Konzentrationsreihe einer allosterisch wirksamen Substanz.

## 3.9.1 DDT-5



**Abb. 28:** Bedeutung der Aminosäuren M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan und M<sub>2</sub><sup>427</sup>Tryptophan für die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit von DDT-5. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitskonstante der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation in Prozent des Kontrollwerts. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Abb. 28 zeigt, dass die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit des DDT-5 bei Austausch des M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan gegen Alanin deutlich vermindert wurde, während ein Austausch des M<sub>2</sub><sup>427</sup>Tryptophan gegen Alanin zu keiner signifikanten Änderung führte. Bei der Doppelmutation M<sub>2</sub><sup>422</sup>Trp→Ala + <sup>427</sup>Trp→Ala ergab sich für DDT-5 eine dissoziationsverzögernde Wirksamkeit, die sich nicht signifikant von der bei der Einzelmutation M<sub>2</sub><sup>422</sup>Trp→Ala unterschied. Die Aminosäure M<sub>2</sub><sup>427</sup>Tryptophan leistete demnach keinen Beitrag zur Affinität des DDT-5 zu [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren. Aus Abb. 29 wird die ausgeprägte M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität des DDT-5 an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren ersichtlich.



**Abb. 29:** Bedeutung der Aminosäuren M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin für die M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität von DDT-5 an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitskonstante der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation in Prozent des Kontrollwerts. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Die höhere Affinität zu M<sub>2</sub>-Rezeptoren war wie bei typischen allosterischen Modulatoren auf die Epitope M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin zurückzuführen: Die Doppelmutation der allosterischen Epitope M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin in die korrespondierenden M<sub>5</sub>-Rezeptor-Aminosäuren führte zu einem deutlichen Affinitätsverlust. Der Beitrag des M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin zur M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität des DDT-5 an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren war größer als der des M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin, denn der überwiegende Teil des Affinitätsverlusts an der Doppelmutante M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln + <sup>423</sup>Thr→His war auf die Mutation M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln zurückzuführen. Die Einzelmutation M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→His wurde in Dissoziationsexperimenten nicht untersucht, da der Gesamtbeitrag der Epitope M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin zur M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität durch die Doppelmutation M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln + <sup>423</sup>Thr→His bestimmt worden war. Tab. 19 zeigt die Bedeutung der Aminosäuren M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin, M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin und des konservierten M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan für die Affinität des DDT-5 zu [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten M<sub>2</sub>-Rezeptoren.

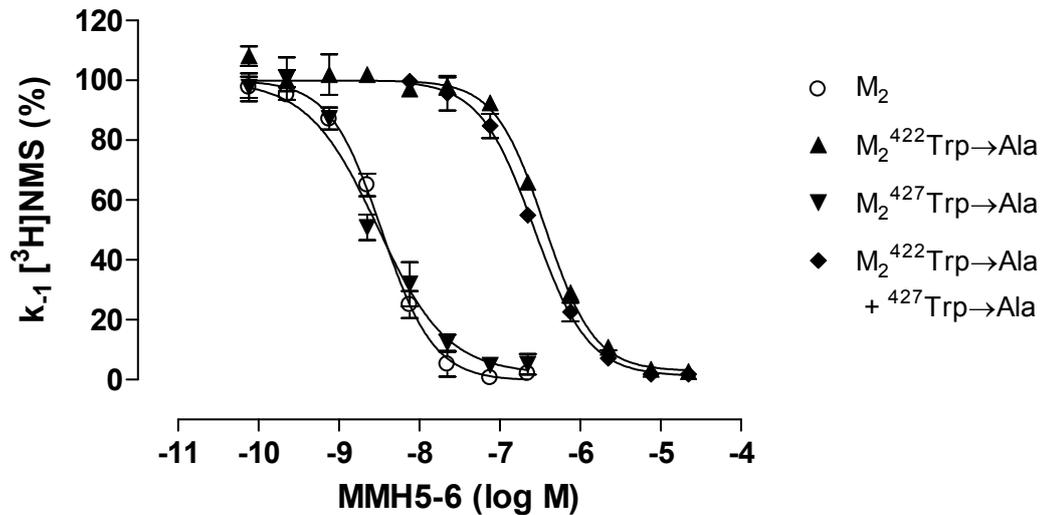
## Ergebnisse

Rezeptor	$pEC_{0,5diss}$	$n_H$	$\Delta pEC_{0,5diss}$ ( $M_{mut}-M_{2wt}$ )
$M_{2wt}$	$6,96 \pm 0,07$	$-1,01 \pm 0,14$	-
$M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln$	$5,68 \pm 0,07$	$-1,03 \pm 0,10$	-1,28
$M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln + ^{423}Thr \rightarrow His$	$5,15 \pm 0,07$	$-1,77 \pm 0,44$	-1,81
$M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$	$5,57 \pm 0,04$	$-1,30^s \pm 0,03$	-1,39
$M_2^{427}Trp \rightarrow Ala$	$6,86 \pm 0,08$	$-1,24 \pm 0,15$	n.s.
$M_2^{422}Trp \rightarrow Ala + ^{427}Trp \rightarrow Ala$	$5,69 \pm 0,06$	$-1,64 \pm 0,33$	-1,27
$M_5wt$	$4,86 \pm 0,24$	$-1,25 \pm 0,06$	-

**Tab. 19:** Bindungsparameter der Interaktion von DDT-5 mit [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten  $M_2$ - und  $M_5$ -Wildtyprezeptoren sowie punktmutierten  $M_2$ -Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten.  $pEC_{0,5diss}$ : Negativer dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation führt.  $n_H$ : Steilheitsmaß.  $\Delta pEC_{0,5diss}$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $pEC_{0,5diss}$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante ( $M_{mut}$ ) und dem  $pEC_{0,5diss}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_{2wt}$ ). n.s.: Der Unterschied zwischen dem  $pEC_{0,5diss}$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem  $pEC_{0,5diss}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ). <sup>s</sup>: Der Mittelwert des Steilheitsmaßes  $n_H$  unterschied sich signifikant von  $n_H = -1$  (t-Test,  $p < 0,05$ ).

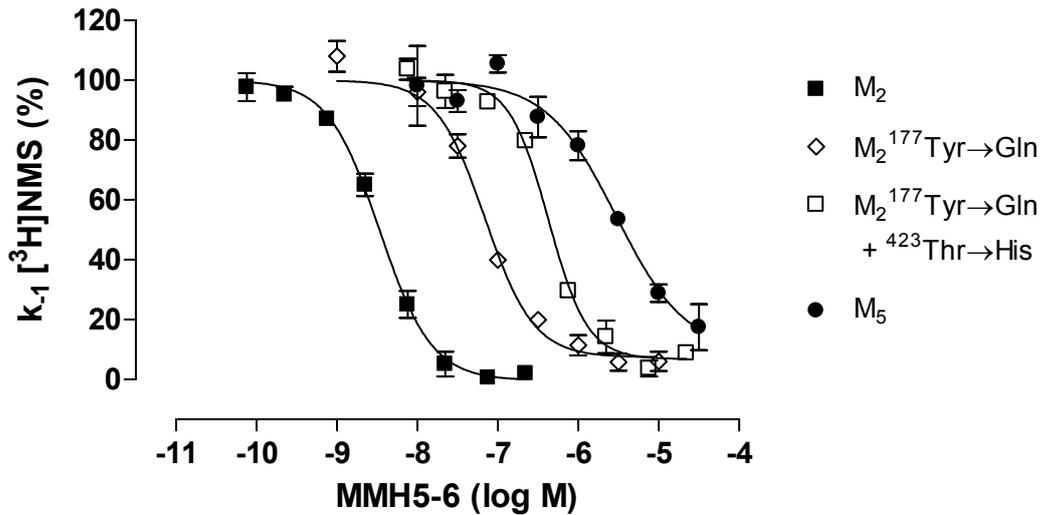
Die konservierte Aminosäure  $M_2^{427}$ Tryptophan dagegen ist kein für die Bindung des DDT-5 an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzte Rezeptoren wichtiges Epitop. Der  $pEC_{0,5diss}$ -Wert an der Doppelmutante  $M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln + ^{423}Thr \rightarrow His$  unterschied sich nicht signifikant von dem  $pEC_{0,5diss}$ -Wert an  $M_5$ -Wildtyprezeptoren, sodass die  $M_2/M_5$ -Selektivität des DDT-5 vollständig durch die beiden Aminosäuren  $M_2^{177}$ Tyrosin und  $M_2^{423}$ Threonin erklärt werden konnte. Durch die Hybridbildung im DDT-5, bei der im Vergleich zu der symmetrischen Struktur des allosterischen Modulators W84 an einer Seite des Moleküls ein Phthalimid-Ring gegen eine Iperoxo-Struktur ausgetauscht worden war, kam es zu einer relativ geringen Verminderung der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit (Prilla et al., 2006: W84,  $M_2$ -Rezeptor,  $pEC_{0,5diss} = 7,40 \pm 0,03$ ).

## 3.9.2 MMH5-6



**Abb. 30:** Bedeutung der Aminosäuren  $M_2^{422}$ Tryptophan und  $M_2^{427}$ Tryptophan für die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit von MMH5-6. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitskonstante der  $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation in Prozent des Kontrollwerts. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Aus Abb. 30 geht hervor, dass es bei Austausch von  $M_2^{422}$ Tryptophan gegen Alanin zu einer signifikanten Verminderung der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit des MMH5-6 kam, während der Austausch des  $M_2^{427}$ Tryptophan gegen Alanin zu keiner signifikanten Veränderung führte. Die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit des MMH5-6 an der Doppelmutante  $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala} + ^{427}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$  entsprach etwa der Wirksamkeit an der Einzelmutante  $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ , was die Bedeutung des Epitops  $M_2^{422}$ Tryptophan belegt. Abb. 31 zeigt die ausgeprägte  $M_2/M_5$ -Selektivität des MMH5-6 an  $[^3\text{H}]$ NMS-besetzten Rezeptoren.



**Abb. 31:** Bedeutung der Aminosäuren M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin für die M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität von MMH5-6 an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitskonstante der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation in Prozent des Kontrollwerts. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Bei Mutation der für die Bindung von typischen allosterischen Modulatoren an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzte Rezeptoren wichtigen Epitope M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin in die korrespondierenden M<sub>5</sub>-Rezeptor-Aminosäuren ergab sich ein deutlicher Affinitätsverlust. Die M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität des MMH5-6 konnte jedoch nicht vollständig durch diese beiden Epitope erklärt werden, da die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit des MMH5-6 an der Doppelmutante M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln + <sup>423</sup>Thr→His signifikant höher war als die Wirksamkeit am M<sub>5</sub>-Rezeptor. Die Einzelmutation M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→His wurde in Dissoziationsexperimenten mit MMH5-6 nicht untersucht, da der Gesamtbeitrag der Epitope M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin zur M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität durch die Doppelmutation M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln + <sup>423</sup>Thr→His bestimmt worden war. Tab. 20 gibt einen Überblick über die Affinitäten des MMH5-6 zu verschiedenen [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Muskarinrezeptoren.

## Ergebnisse

Rezeptor	pEC <sub>0,5diss</sub>	n <sub>H</sub>	ΔpEC <sub>0,5diss</sub> (M <sub>mut</sub> -M <sub>2wt</sub> )
M <sub>2</sub> wt	8,50 ± 0,05	-1,53 ± 0,31	-
M <sub>2</sub> <sup>177</sup> Tyr→Gln	7,23 ± 0,05	-1,19 ± 0,12	-1,27
M <sub>2</sub> <sup>177</sup> Tyr→Gln + <sup>423</sup> Thr→His	6,38 ± 0,01	-1,67 ± 0,23	-2,12
M <sub>2</sub> <sup>422</sup> Trp→Ala	6,42 (6,41; 6,43)	-1,34 (-1,28; -1,39)	-2,08
M <sub>2</sub> <sup>427</sup> Trp→Ala	8,55 ± 0,13	-1,26 ± 0,14	n.s.
M <sub>2</sub> <sup>422</sup> Trp→Ala + <sup>427</sup> Trp→Ala	6,59 ± 0,03	-1,30 ± 0,08	-1,91
M <sub>5</sub> wt	5,55 ± 0,07	2,00 ± 0,65	-

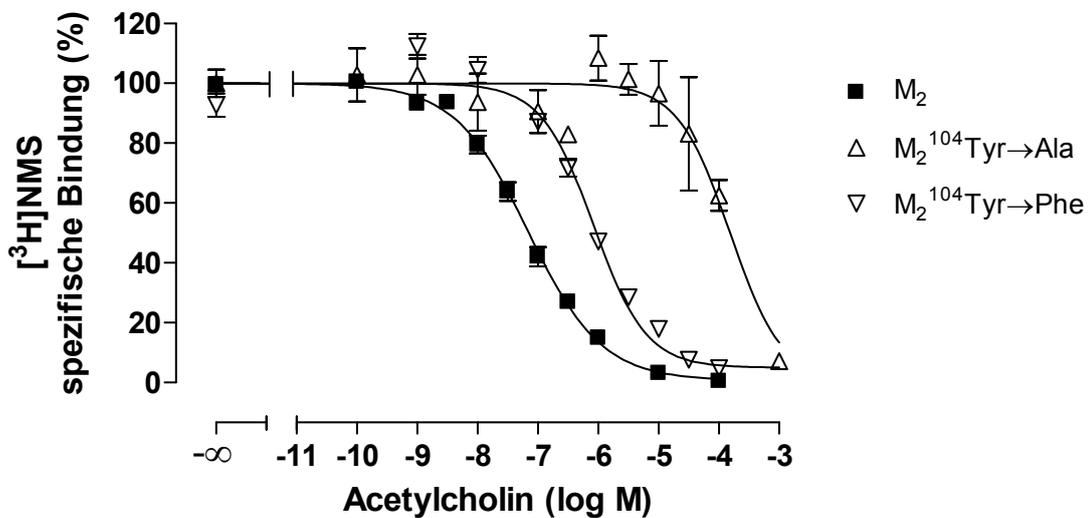
**Tab. 20:** Bindungsparameter der Interaktion von MMH5-6 mit [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten M<sub>2</sub>- und M<sub>5</sub>-Wildtyprezeptoren sowie punktmutierten M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 2-5 unabhängigen Experimenten. pEC<sub>0,5diss</sub>: Negativer dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation führt. n<sub>H</sub>: Steilheitsmaß. ΔpEC<sub>0,5diss</sub>: Differenz in log-Einheiten zwischen dem pEC<sub>0,5diss</sub>-Wert an der jeweiligen Rezeptormutante (M<sub>mut</sub>) und dem pEC<sub>0,5diss</sub>-Wert am M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptor (M<sub>2</sub>wt). n.s.: Der Unterschied zwischen dem pEC<sub>0,5diss</sub>-Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem pEC<sub>0,5diss</sub>-Wert am M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test, p > 0,05).

Die Differenz in log-Einheiten zwischen dem pEC<sub>0,5diss</sub>-Wert am M<sub>2</sub>-Rezeptor und dem am M<sub>5</sub>-Rezeptor betrug 2,95 Dekaden. Dies entsprach einer um beinahe den Faktor 900 höheren Affinität zu M<sub>2</sub>- im Vergleich zu M<sub>5</sub>-Rezeptoren. Die M<sub>2</sub>-Selektivität des Naphmethonium-artigen Hybrids MMH5-6 an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren war also deutlich größer als die des W84-artigen Hybrids DDT-5. Dieser Befund deckt sich mit der größeren M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität des Naphmethoniums im Vergleich zum W84 (Prilla, Dissertation 2006). Ähnlich wie beim DDT-5 kam es durch die Hybridbildung im MMH5-6, bei der im Vergleich zu der Struktur des allosterischen Modulators Naphmethonium der Phthalimid-Ring gegen eine Iperoxo-Struktur ausgetauscht worden war, zu einer relativ geringen Verminderung der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit (Prilla et al., 2006: Naphmethonium, M<sub>2</sub>-Rezeptor, pEC<sub>0,5diss</sub> = 9,04 ± 0,04).

### **3.10 Beeinflussung der Affinität orthosterischer Agonisten durch M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin und allosterische Epitope**

In Konkurrenzexperimenten mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS, die unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt wurden, wurde die Epitopabhängigkeit der Affinität klassischer Agonisten an M<sub>2</sub>-Rezeptoren untersucht. Als muskarinische Agonisten wurden eingesetzt der endogene Agonist Acetylcholin, der nicht Subtyp-selektive Agonist Oxotremorin M, das Oxotremorin M-Derivat Iperoxo sowie der Partialagonist Pilocarpin. Es wurde geprüft, wie sich eine Mutation von M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle bzw. von Epitopen der allosterischen Bindungsstelle auf die Affinität dieser Agonisten auswirkte. Das bei diesen Agonisten ermittelte Muster wichtiger Bindungsepitope beschrieb eine orthosterische Bindungstopografie und diente als Vergleich zu der Bindungstopografie der allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6. Darüber hinaus wurde die Affinität des Acetylcholins und Iperoxo an M<sub>2</sub>- und M<sub>5</sub>-Wildtyprezeptoren als Vergleich zu der M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität von DDT-5 und MMH5-6 bestimmt.

## 3.10.1 Acetylcholin

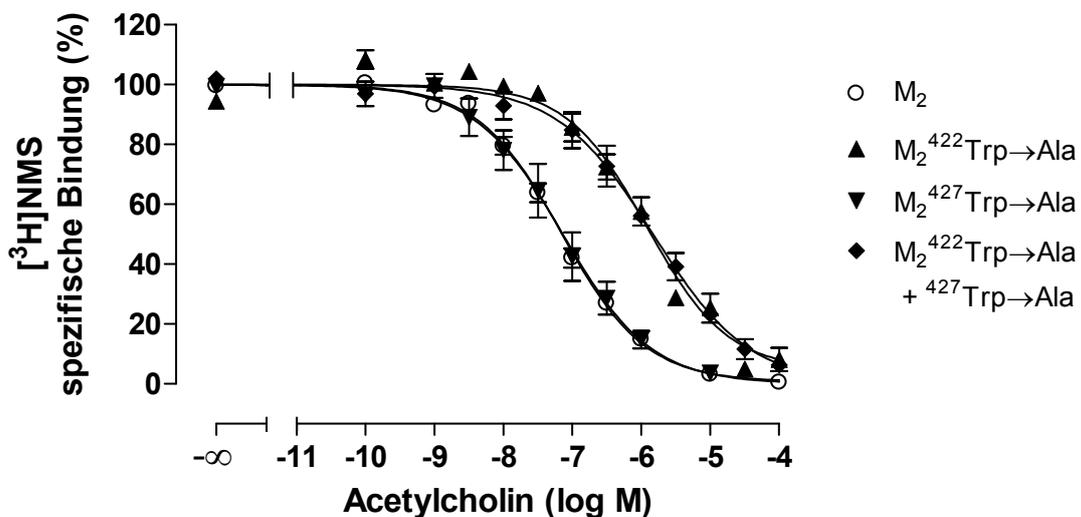


**Abb. 32:** Bedeutung des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin für die Acetylcholin-Affinität. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM bei Experimenten mit  $M_2$ -Wildtyp-rezeptoren bzw.  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$ -Rezeptoren und 1 nM bei Experimenten mit  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-13 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Abb. 32 zeigt den starken Affinitätsverlust des Acetylcholins, der bei Austausch des  $M_2^{104}$ Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle gegen Phenylalanin bzw. Alanin eintrat. Dieser Affinitätsverlust beim Acetylcholin war wesentlich stärker ausgeprägt als bei dem Antagonisten N-Methylscopolamin (siehe Kapitel 3.2, Abb. 15). Aus den Inhibitionskurven des Acetylcholins in Abb. 32 geht hervor, dass sowohl die Hydroxylgruppe als auch der Phenylring des Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin zur Acetylcholin-Affinität beitragen, wobei die Entfernung von Hydroxylgruppe und Phenylring in der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  zu einem wesentlich größeren Affinitätsverlust führte als die alleinige Entfernung der Hydroxylgruppe in der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$ . Bei den Inhibitionskurven an der Rezeptormutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  zeigte sich eine deutlich größere Streuung der einzelnen Messwerte, die auf die deutlich verminderte Radioligand-Affinität und ein deshalb geändertes Versuchsprotokoll mit einmaligem statt zweimaligem Spülen der Filtermatte zurückzuführen war. Wegen der stark verminderten  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Affinität wurde der Radioligand bei

Experimenten mit der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  in einer Konzentration von 1 nM eingesetzt, während bei den übrigen Inhibitionsexperimenten mit Acetylcholin eine  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Konzentration von 0,2 nM verwendet wurde.

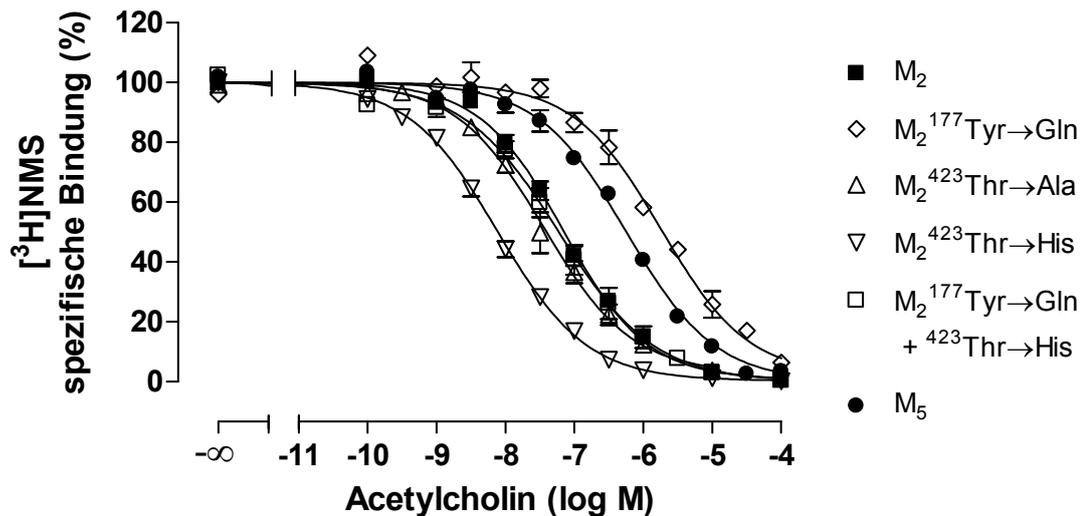
Prilla et al. (2006) identifizierten  $M_2^{422}$ Tryptophan als Epitop, das für die Bindung allosterischer Modulatoren wie W84 und Gallamin an freie und  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzte Rezeptoren wichtig ist. Aus Abb. 33 geht hervor, dass es bei Austausch von  $M_2^{422}$ Tryptophan gegen Alanin zu einem deutlichen Affinitätsverlust des orthosterischen Agonisten Acetylcholin kam.



**Abb. 33:** Bedeutung der Aminosäuren  $M_2^{422}$ Tryptophan und  $M_2^{427}$ Tryptophan für die Acetylcholin-Affinität. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 2-13 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Die Aminosäure  $M_2^{422}$ Tryptophan hatte also nicht nur eine Bedeutung für die Bindung allosterischer Modulatoren, sondern auch für die Bindung des orthosterischen Liganden Acetylcholin. Bei Austausch des  $M_2^{427}$ Tryptophan gegen Alanin kam es dagegen zu keiner signifikanten Veränderung der Acetylcholin-Affinität im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Abb. 33 zeigt, dass die Inhibitionskurve des Acetylcholins an der Doppelmutante  $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala} + ^{427}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$  nahezu deckungsgleich zur Inhibitionskurve an der Einzelmutante  $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$  war. Dies belegt die Bedeutung des Epitops  $M_2^{422}$ Tryptophan für die Acetylcholin-Affinität und die fehlende Bedeutung der Aminosäure  $M_2^{427}$ Tryptophan.

In Abb. 34 sind die Inhibitionskurven des Acetylcholins an  $M_2$ - und  $M_5$ -Wildtyprezeptoren sowie an punktmutierten  $M_2$ -Rezeptoren dargestellt, bei denen bekannte Epitope der allosterischen Bindungsstelle mutiert worden sind: Die allosterischen Epitope  $M_2^{177}$ Tyrosin und  $M_2^{423}$ Threonin wurden gegen die korrespondierenden Aminosäuren im  $M_5$ -Rezeptor ausgetauscht sowie  $M_2^{423}$ Threonin gegen Alanin.



**Abb. 34:** Bedeutung der Aminosäuren  $M_2^{177}$ Tyrosin und  $M_2^{423}$ Threonin für die Acetylcholin-Affinität an  $M_2$ -Rezeptoren und Affinität an  $M_5$ -Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-13 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische [ $^3$ H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Die Abbildung zeigt, dass die Affinität des physiologischen Agonisten Acetylcholin zu  $M_2$ -Rezeptoren höher war als zu  $M_5$ -Rezeptoren. Bei Austausch der allosterischen Epitope  $M_2^{177}$ Tyrosin bzw.  $M_2^{423}$ Threonin gegen die korrespondierenden Aminosäuren im  $M_5$ -Rezeptor ergab sich nicht wie erwartet eine unveränderte Affinität des orthosterischen Liganden Acetylcholin: Die Affinität an der Rezeptormutante  $M_2^{423}$ Thr $\rightarrow$ His war signifikant höher als an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren und die Affinität an der Rezeptormutante  $M_2^{177}$ Tyr $\rightarrow$ Gln signifikant niedriger. Die Affinität an der Doppelmutante  $M_2^{177}$ Tyr $\rightarrow$ Gln +  $^{423}$ Thr $\rightarrow$ His war nicht signifikant verschieden von der Acetylcholin-Affinität an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Der Austausch des allosterischen Epitops  $M_2^{423}$ Threonin gegen Alanin führte zu einer geringfügig höheren Affinität im Vergleich zu  $M_2$ -

## Ergebnisse

Wildtyprezeptoren, jedoch war der Affinitätsgewinn deutlich geringer als bei der Mutation  $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ . Aus Tab. 21 wird ersichtlich, dass die große Mehrheit der Konkurrenzexperimente zwischen [ $^3\text{H}$ ]NMS und Acetylcholin ein von -1 signifikant abweichendes Steilheitsmaß  $n_H$  aufwies (F-Test, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ).

Rezeptor	$n_H \neq -1$	$n_H$	$pK_{app}$	$\Delta pK_{app}$ ( $M_{mut}-M_2wt$ )
$M_2wt$	11/13	$-0,73 \pm 0,02$	$7,59 \pm 0,07$	-
$M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$	0/3	$-1,19 \pm 0,31$	$4,02 \pm 0,22$	-3,57
$M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$	0/3	$-0,80 \pm 0,04$	$6,18 \pm 0,01$	-1,41
$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$	1/3	$-0,71 \pm 0,11$	$6,14 \pm 0,06$	-1,45
$M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	3/3	$-0,71 \pm 0,06$	$6,13 \pm 0,15$	-1,46
$M_2^{427}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	3/3	$-0,73 \pm 0,03$	$7,53 \pm 0,22$	n.s.
$M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ + $^{427}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	2/2	-0,62 (-0,55; -0,69)	6,38 (6,26; 6,49)	-1,21
$M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$	3/3	$-0,67 \pm 0,03$	$7,97 \pm 0,13$	+0,38
$M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$	3/3	$-0,70 \pm 0,02$	$8,67 \pm 0,05$	+1,08
$M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$ + $^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$	4/4	$-0,65 \pm 0,05$	$7,72 \pm 0,14$	n.s.
$M_5wt$	2/3	$-0,65 \pm 0,06$	$6,57 \pm 0,03$	-

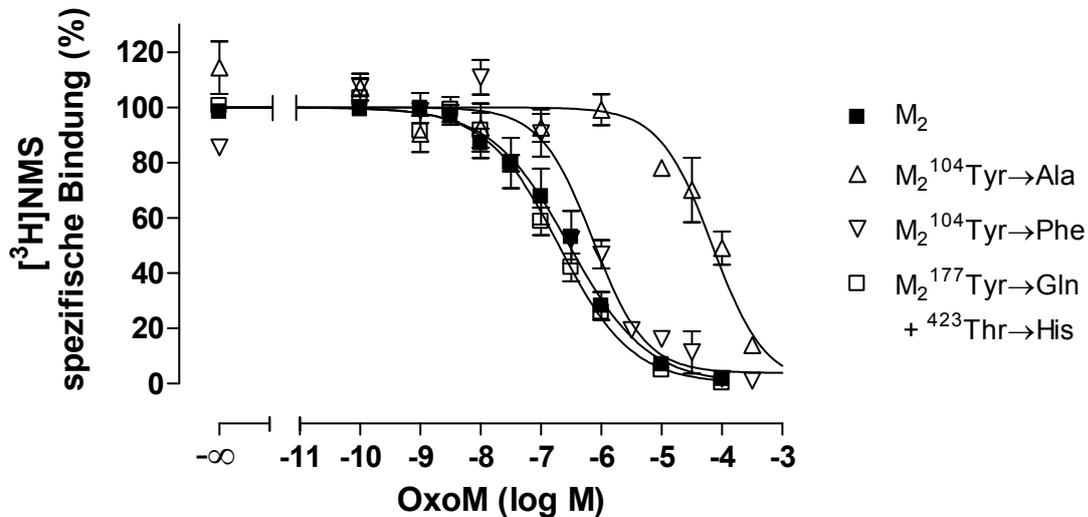
**Tab. 21:** Affinitätskonstanten des Acetylcholins aus heterologen Konkurrenzexperimenten mit dem Radioantagonisten [ $^3\text{H}$ ]NMS. Die  $IC_{50}$ -Werte der Einzelerperimente wurden mit der Cheng/Prusoff-Korrektur in apparente Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_{app}$  umgewandelt.  $n_H \neq -1$ : Anteil der Experimente mit einem von -1 abweichenden Steilheitsmaß an der Gesamtzahl der Experimente.  $n_H$ : Steilheitsmaß.  $pK_{app}$ : Negativer dekadischer Logarithmus der apparenten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_{app}$ .  $\Delta pK_{app}$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $pK_{app}$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante ( $M_{mut}$ ) und dem  $pK_{app}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_2wt$ ). n.s.: Der Unterschied zwischen dem  $pK_{app}$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem  $pK_{app}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ).

Die Inhibitionskurven waren flach, wie es bei Experimenten mit einem Radioantagonisten und einem Agonisten zu erwarten war. Eine Ausnahme bildeten die Inhibitionskurven an punktmultierten Rezeptoren, bei denen das orthosterische  $M_2^{104}$ -Tyrosin mutiert worden war, mit einem nicht signifikant von -1 abweichenden

Steilheitsmaß. Aufgrund des bei der Mehrheit der übrigen Experimente signifikant von -1 abweichenden Steilheitsmaßes  $n_H$  handelt es sich bei den nach Cheng und Prusoff (1973) berechneten Affinitätskonstanten um apparente Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_{app}$  und nicht um Inhibitionskonstanten  $K_i$ . Die apparenten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten können als Näherung einer Inhibitionskonstanten  $K_i$  betrachtet werden.

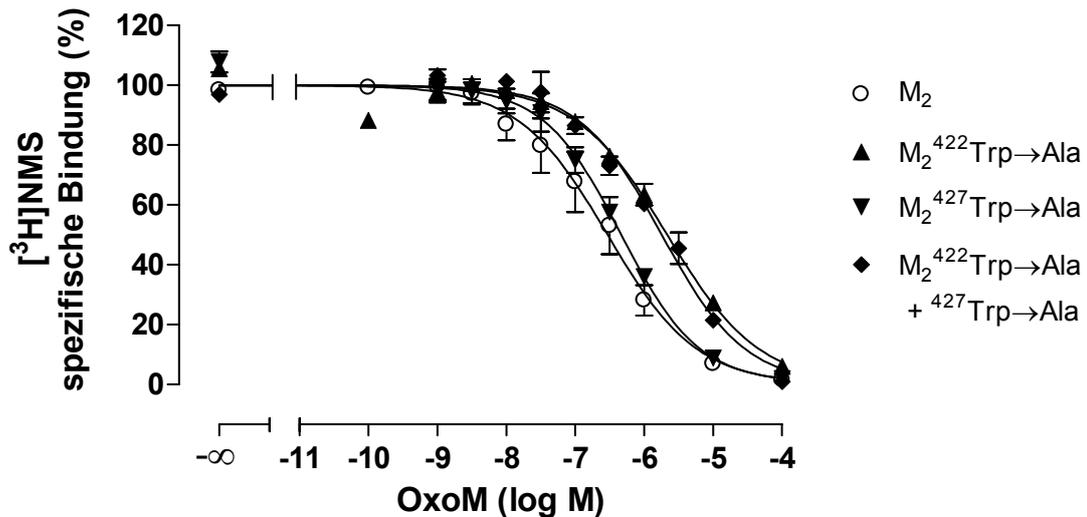
Tab. 21 zeigt einen Affinitätsgewinn des Acetylcholins bei Mutation des allosterischen Epitops  $M_2^{423}$ Threonin zu Histidin im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren (Affinität um etwa 1,0 log-Einheiten erhöht). Der Affinitätsgewinn war deutlich geringer ausgeprägt bei der Mutation  $M_2^{423}$ Thr→Ala (Affinität um etwa 0,4 log-Einheiten erhöht). Dies deutete darauf hin, dass dieser Effekt im Wesentlichen auf die Einführung der  $M_5$ -Rezeptor-Aminosäure Histidin an dieser Position des  $M_2$ -Rezeptorproteins zurückzuführen war. Eine Bedeutung des  $M_2^{423}$ Threonin selbst für die Acetylcholin-Bindung ist somit unwahrscheinlich im Gegensatz zu  $M_2^{422}$ Tryptophan, dessen Mutation zu Alanin zu einem deutlichen Abfall der Acetylcholin-Affinität führte. Die Mutation des allosterischen Epitops  $M_2^{177}$ Tyrosin in die korrespondierende  $M_5$ -Rezeptor-Aminosäure Glutamin führte zu einem starken Acetylcholin-Affinitätsverlust. Die Rezeptormutante  $M_2^{177}$ Tyr→Ala stand noch nicht zur Verfügung, sodass nicht überprüft werden konnte, ob ein Affinitätsverlust auch bei Einführung eines Alanin statt  $M_2^{177}$ Tyrosin auftritt oder die Affinität unverändert bleibt und der beobachtete Affinitätsverlust an der Rezeptormutante  $M_2^{177}$ Tyr→Gln somit ein indirekter Effekt wäre, der auf die Einführung des Glutamins zurückzuführen war.

## 3.10.2 Oxotremorin M



**Abb. 35:** Bedeutung des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin für die Oxotremorin M-Affinität und Affinität an der Doppelmutante  $M_2^{177}$ Tyrosin→Glutamin +  $^{423}$ Threonin→Histidin. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM bei Experimenten mit  $M_2$ -Wildtyprezeptoren,  $M_2^{104}$ Tyr→Phe-Rezeptoren und  $M_2^{177}$ Tyr→Gln +  $^{423}$ Thr→His-Rezeptoren sowie 1 nM bei Experimenten mit  $M_2^{104}$ Tyr→Ala-Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische [ $^3$ H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Aus Abb. 35 wird ersichtlich, dass die Entfernung der Hydroxylgruppe des  $M_2^{104}$ Tyrosin in der Mutation  $M_2^{104}$ Tyr→Phe zu einer verminderten Oxotremorin M-Affinität führte. Die Entfernung von Hydroxylgruppe und Phenylring und Ersatz durch eine Methylgruppe in der Mutation  $M_2^{104}$ Tyr→Ala bewirkte einen deutlich stärker ausgeprägten Affinitätsverlust. Die Affinität des Oxotremorin M an der Doppelmutante, in der die beiden allosterischen Epitope  $M_2^{177}$ Tyrosin und  $M_2^{423}$ Threonin gegen die korrespondierenden  $M_5$ -Rezeptor-Aminosäuren ausgetauscht worden waren, war nicht signifikant verändert im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Die Einzelmutanten  $M_2^{177}$ Tyr→Gln und  $M_2^{423}$ Thr→His wurden beim Oxotremorin M nicht untersucht. Abb. 36 zeigt, dass die Aminosäure  $M_2^{422}$ Tryptophan zur Bindungsaffinität des Oxotremorin M beiträgt.



**Abb. 36:** Bedeutung der Aminosäuren M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan und M<sub>2</sub><sup>427</sup>Tryptophan für die Oxotremorin M-Affinität. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 2-5 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

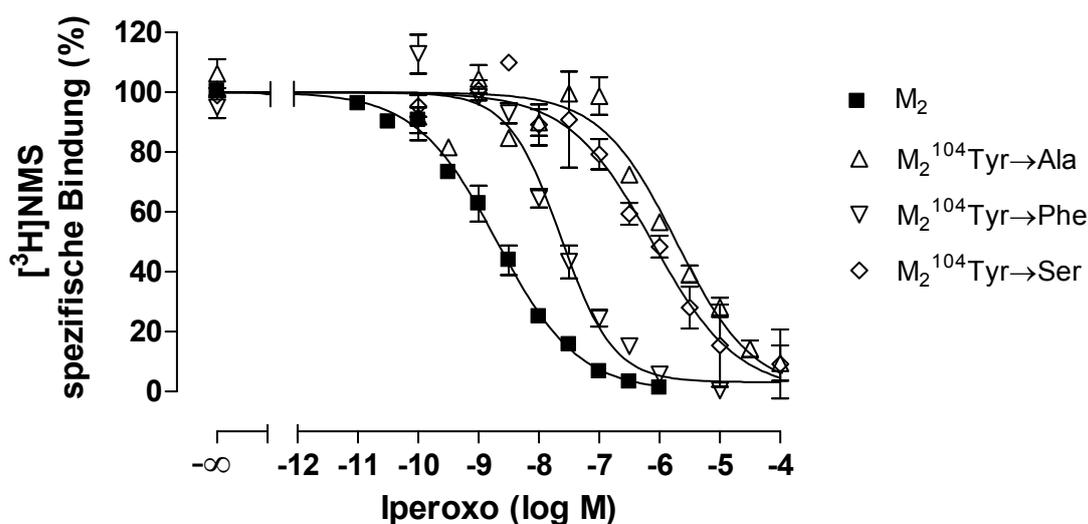
Der Austausch des M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan gegen Alanin führte zu einem signifikanten Affinitätsverlust während der Austausch von M<sub>2</sub><sup>427</sup>Tryptophan gegen Alanin zu keiner signifikanten Affinitätsänderung führte. Die in Tab. 22 zusammengefassten Bindungsparameter des Oxotremorin M zeigen, dass die Mehrheit der Inhibitionskurven mit [<sup>3</sup>H]NMS, abgesehen von den Inhibitionskurven an M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin-Mutanten, flache Kurvensteilheiten mit  $n_H > -1$  aufwiesen und sich für diesen orthosterischen Agonisten ein ähnliches Affinitätsmuster ergab wie beim Acetylcholin: Mutation von M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin bzw. M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan führte zu einem Affinitätsverlust, während die Affinität bei der Mutation M<sub>2</sub><sup>427</sup>Trp→Ala unverändert blieb.

## Ergebnisse

Rezeptor	$n_H \neq -1$	$n_H$	$pK_{app}$	$\Delta pK_{app}$ ( $M_{mut}-M_2wt$ )
$M_2wt$	2/5	$-0,84 \pm 0,13$	$7,09 \pm 0,24$	-
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Ala$	0/3	$-1,10 \pm 0,27$	$4,40 \pm 0,11$	-2,69
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Phe$	1/3	$-0,86 \pm 0,06$	$6,20 \pm 0,15$	-0,89
$M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$	3/3	$-0,65 \pm 0,03$	$6,00 \pm 0,03$	-1,09
$M_2^{427}Trp \rightarrow Ala$	2/3	$-0,74 \pm 0,14$	$6,78 \pm 0,05$	n.s.
$M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$ + $^{427}Trp \rightarrow Ala$	2/2	$-0,69$ (-0,67; -0,71)	$6,26$ (6,19; 6,33)	n.s.
$M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln$ + $^{423}Thr \rightarrow His$	1/3	$-0,71 \pm 0,05$	$7,25 \pm 0,06$	n.s.

**Tab. 22:** Affinitätskonstanten des Oxotremorin M aus heterologen Konkurrenzexperimenten mit dem Radioantagonisten [ $^3H$ ]NMS. Die  $IC_{50}$ -Werte der Einzelexperimente wurden mit der Cheng/Prusoff-Korrektur in apparente Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_{app}$  umgewandelt.  $n_H \neq -1$ : Anteil der Experimente mit einem von -1 abweichenden Steilheitsmaß an der Gesamtzahl der Experimente.  $n_H$ : Steilheitsmaß.  $pK_{app}$ : Negativer dekadischer Logarithmus der apparenten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_{app}$ .  $\Delta pK_{app}$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $pK_{app}$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante ( $M_{mut}$ ) und dem  $pK_{app}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_2wt$ ). n.s.: Der Unterschied zwischen dem  $pK_{app}$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem  $pK_{app}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ).

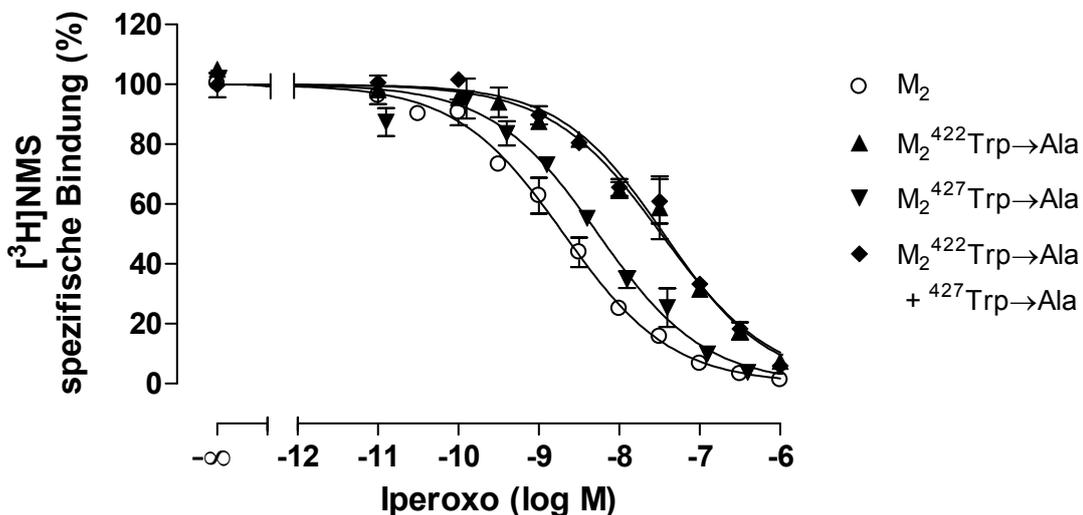
### 3.10.3 Iperoxo



**Abb. 37:** Bedeutung des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin für die Affinität von Iperoxo. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM bei Experimenten mit  $M_2$ -Wildtyp-

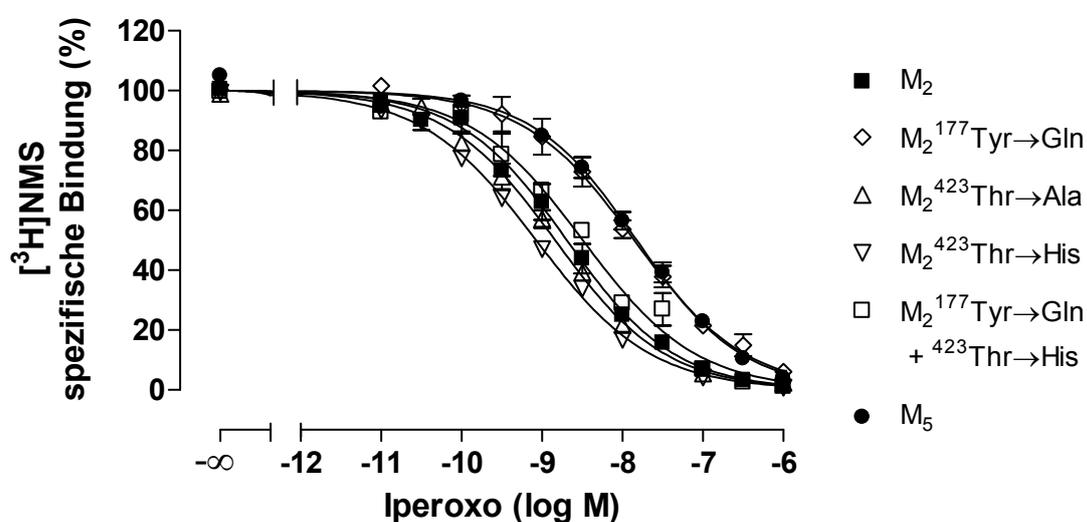
rezeptoren bzw.  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$ -Rezeptoren und 1 nM bei Experimenten mit  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren bzw.  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ser}$ -Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-9 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Aus Abb. 37 wird ersichtlich, dass Iperoxo an den  $M_2^{104}$ Tyrosin-Mutanten das typische Bindungsverhalten eines orthosterischen Agonisten aufwies: Mutation des  $M_2^{104}$ Tyrosin zu Alanin führte zu einem starken Affinitätsverlust, während der Austausch des  $M_2^{104}$ Tyrosin gegen Phenylalanin, also die Entfernung der Hydroxylgruppe des  $M_2^{104}$ Tyrosin, zu einem deutlich geringeren Effekt führte. Die Entfernung des Phenylrings von  $M_2^{104}$ Tyrosin bei einer weiterhin vorhandenen Hydroxylgruppe, also die Mutation  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ser}$ , führte zu einem Affinitätsverlust, der deutlich größer war als bei der Mutation  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$ , aber etwas geringer als bei der Mutation  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ . Wegen der stark verminderten [ $^3\text{H}$ ]NMS-Affinität wurde bei den Experimenten mit den Mutanten  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  bzw.  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ser}$  eine erhöhte Radioligandkonzentration von 1 nM eingesetzt. Wie aus Abb. 38 hervorgeht, zeigte sich beim Iperoxo, wie schon von anderen Agonisten bekannt, ein Affinitätsverlust bei der Mutation  $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ .



**Abb. 38:** Bedeutung der Aminosäuren  $M_2^{422}$ Tryptophan und  $M_2^{427}$ Tryptophan für die Affinität von Iperoxo. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 2-9 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Die Inhibitionskurve an der Doppelmutante  $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala} + ^{427}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$  entsprach in ihrem Verlauf sehr gut der Inhibitionskurve an der Einzelmutante  $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ , was die Bedeutung des Epitops  $M_2^{422}$  Tryptophan für die Iperoxo-Affinität belegte. Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Agonisten war die Inhibitionskurve an der Mutante  $M_2^{427}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$  im Vergleich zu der Inhibitionskurve an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren nach rechts verschoben und damit die Affinität an dieser Mutante etwas kleiner, der Affinitätsunterschied war jedoch gering. Abb. 39 zeigt, dass Iperoxo ähnlich wie der physiologische Agonist Acetylcholin eine höhere Affinität zu  $M_2$ - im Vergleich zu  $M_5$ -Wildtyprezeptoren hatte.



**Abb. 39:** Bedeutung der Aminosäuren  $M_2^{177}$  Tyrosin und  $M_2^{423}$  Threonin für die Affinität von Iperoxo an  $M_2$ -Rezeptoren und Affinität an  $M_5$ -Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-9 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Die Affinität des Iperoxo war nicht signifikant verändert an der Doppelmutante der allosterischen Bindungsstelle,  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ , im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Ähnlich wie beim Acetylcholin konnte diese unveränderte Affinität differenziert werden in einen Affinitätsverlust bei der Mutation  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$  und einen Affinitätsgewinn bei der Mutation  $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ . Die Mutante  $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$  wurde eingesetzt um zu untersuchen, inwieweit der Affinitätsgewinn bei der Mutante  $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  auf die Einführung des Histidins an dieser Stelle des Rezeptorproteins zurückzuführen war bzw. ob der Affinitäts-

## Ergebnisse

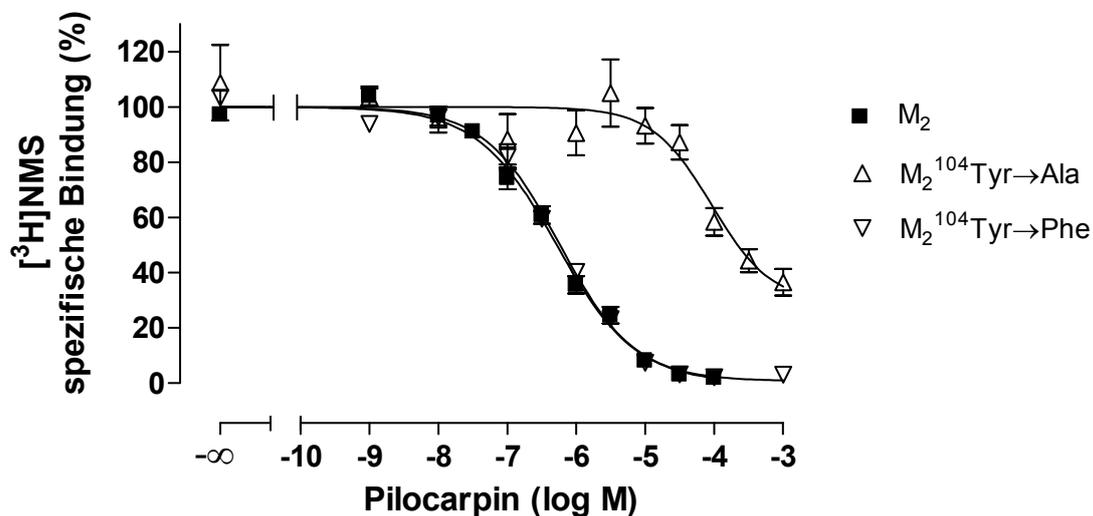
gewinn auch bei Austausch des M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin gegen Alanin auftrat, was für einen ungünstigen Effekt des M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin bezüglich einer optimalen Bindung des Iperoxo sprechen würde. Die Iperoxo-Affinität an der Mutante M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→Ala war nicht signifikant verändert im Vergleich zu M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren, sodass ein Affinitätsgewinn an die Mutation dieses Epitops zu Histidin gebunden war. Aus den in Tab. 23 zusammengefassten Bindungsparametern geht hervor, dass Iperoxo ein für Agonisten typisches Bindungsverhalten mit überwiegend flachen Inhibitionskurven in der Konkurrenz mit einem Radioantagonisten zeigte.

Rezeptor	n <sub>H</sub> ≠ -1	n <sub>H</sub>	pK <sub>app</sub>	ΔpK <sub>app</sub> (M <sub>mut</sub> -M <sub>2wt</sub> )
M <sub>2</sub> wt	7/9	-0,70 ± 0,04	9,15 ± 0,10	-
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Ala	1/3	-0,59 ± 0,02	5,96 ± 0,12	-3,19
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Phe	0/5	-0,87 ± 0,03	7,71 ± 0,08	-1,44
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Ser	1/3	-0,66 ± 0,21	6,39 ± 0,13	-2,76
M <sub>2</sub> <sup>177</sup> Tyr→Gln	3/3	-0,54 ± 0,06	8,38 ± 0,06	-0,77
M <sub>2</sub> <sup>422</sup> Trp→Ala	2/3	-0,61 ± 0,03	7,84 ± 0,10	-1,31
M <sub>2</sub> <sup>427</sup> Trp→Ala	3/3	-0,66 ± 0,04	8,73 ± 0,08	-0,42
M <sub>2</sub> <sup>422</sup> Trp→Ala + <sup>427</sup> Trp→Ala	2/2	-0,65 (-0,64; -0,66)	7,96 (7,89; 8,03)	-1,19
M <sub>2</sub> <sup>423</sup> Thr→Ala	4/4	-0,64 ± 0,01	9,42 ± 0,07	n.s.
M <sub>2</sub> <sup>423</sup> Thr→His	3/3	-0,61 ± 0,02	9,59 ± 0,02	+0,44
M <sub>2</sub> <sup>177</sup> Tyr→Gln + <sup>423</sup> Thr→His	3/3	-0,59 ± 0,06	8,96 ± 0,08	n.s.
M <sub>5</sub> wt	4/4	-0,66 ± 0,02	8,13 ± 0,08	-

**Tab. 23:** Affinitätskonstanten des Iperoxo aus heterologen Konkurrenzexperimenten mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS. Die IC<sub>50</sub>-Werte der Einzelexperimente wurden mit der Cheng/Prusoff-Korrektur in apparente Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K<sub>app</sub> umgewandelt. n<sub>H</sub> ≠ -1: Anteil der Experimente mit einem von -1 abweichenden Steilheitsmaß an der Gesamtzahl der Experimente. n<sub>H</sub>: Steilheitsmaß. pK<sub>app</sub>: Negativer dekadischer Logarithmus der apparenten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K<sub>app</sub>. ΔpK<sub>app</sub>: Differenz in log-Einheiten zwischen dem pK<sub>app</sub>-Wert an der jeweiligen Rezeptormutante (M<sub>mut</sub>) und dem pK<sub>app</sub>-Wert am M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptor (M<sub>2</sub>wt). n.s.: Der Unterschied zwischen dem pK<sub>app</sub>-Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem pK<sub>app</sub>-Wert am M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test, p > 0,05).

Das im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. De Amici (Universität Mailand) synthetisierte Derivat des Oxotremorin M wies insgesamt eine Epitopabhängigkeit der Bindung auf, wie sie für orthosterische Agonisten typisch ist: Bedeutung der Epitope  $M_2^{104}$ Tyrosin und  $M_2^{422}$ Tryptophan für die Affinität sowie entgegengesetzte Veränderung der Affinität bei Mutation der allosterischen Epitope  $M_2^{177}$ Tyrosin und  $M_2^{423}$ Threonin in die korrespondierenden  $M_5$ -Rezeptor-Aminosäuren. Eine Ausnahme im Vergleich zu den anderen untersuchten orthosterischen Agonisten war die gering, aber signifikant verminderte Affinität bei der Mutation  $M_2^{427}$ Trp→Ala im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren.

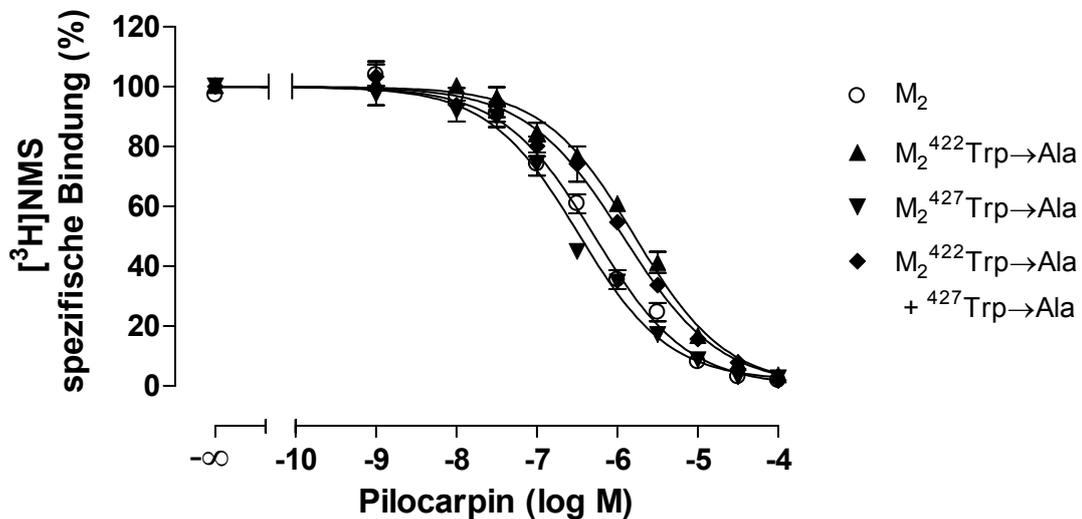
### 3.10.4 Pilocarpin



**Abb. 40:** Bedeutung des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin für die Pilocarpin-Affinität. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM bei Experimenten mit  $M_2$ -Wildtyprezeptoren bzw.  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$ -Rezeptoren und 1 nM bei Experimenten mit  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-7 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Ähnlich wie bei den Vollagonisten ergab sich bei dem Partialagonisten Pilocarpin (Tota und Schimerlik, 1990; McKinney et al., 1991) ein deutlicher Affinitätsverlust bei Mutation von  $M_2^{104}$ Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle zu Alanin (siehe Abb. 40). Die Inhibitionskurve an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  war zwar beinahe deckungsgleich zur Inhibitionskurve an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren,

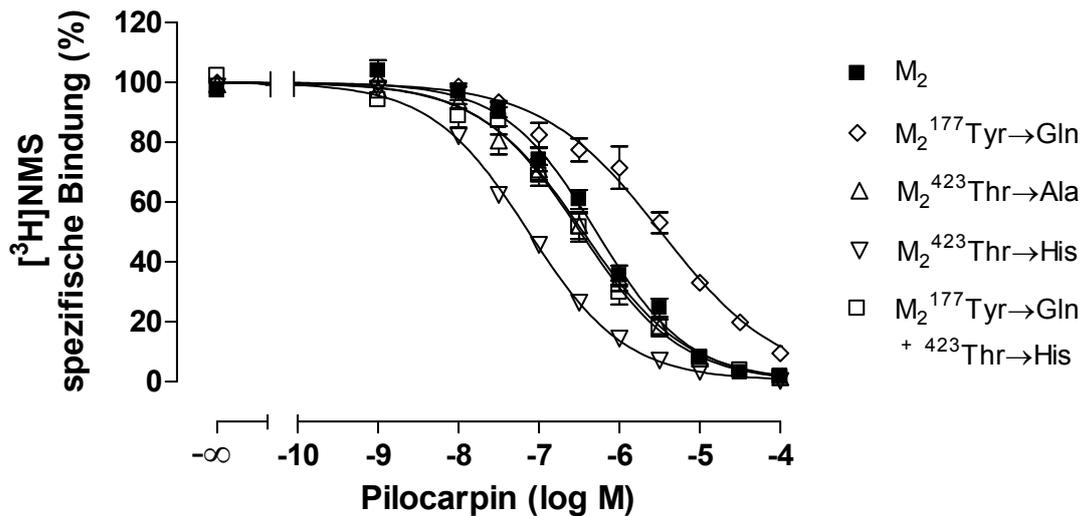
jedoch muss für einen Vergleich der Pilocarpin-Affinitäten die verminderte Affinität des Radioliganden an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  berücksichtigt werden (siehe Kapitel 3.2, Abb. 15). Bei Vergleich der mit der Cheng/Prusoff-Korrektur berechneten apparenten Affinitätskonstanten ergab sich beim Pilocarpin eine signifikant niedrigere Affinität an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Der durch die Entfernung der Hydroxylgruppe in der Mutation  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  ausgelöste Affinitätsverlust war jedoch geringer als bei den Vollagonisten. Die in Abb. 41 dargestellten Inhibitionskurven des Pilocarpins zeigen, dass es auch bei diesem Agonisten zu einem Affinitätsabfall bei Austausch der Aminosäure  $M_2^{422}\text{Tryptophan}$  gegen Alanin kam.



**Abb. 41:** Bedeutung der Aminosäuren  $M_2^{422}\text{Tryptophan}$  und  $M_2^{427}\text{Tryptophan}$  für die Pilocarpin-Affinität. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 2-7 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Dieser Affinitätsabfall beim Pilocarpin war deutlich geringer ausgeprägt als bei den vorher gezeigten Vollagonisten. Der Austausch der Aminosäure  $M_2^{427}\text{Tryptophan}$  gegen Alanin führte zu keiner signifikanten Veränderung der Pilocarpin-Affinität im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Die Affinität des Pilocarpins an der Doppelmutante  $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala} + ^{427}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$  war signifikant geringer als an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren.

Wie aus Abb. 42 hervorgeht, zeigte sich beim Pilocarpin wie bei den Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo ein entgegengesetzter Effekt der Mutation von Epitopen der allosterischen Bindungsstelle in die korrespondierenden  $M_5$ -Rezeptor-Aminosäuren auf die Agonist-Affinität: Die Mutation  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$  führte zu einer deutlich erniedrigten Pilocarpin-Affinität im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren, während die Affinität bei der Mutation  $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  signifikant erhöht war.



**Abb. 42:** Bedeutung der Aminosäuren  $M_2^{177}$ Tyrosin und  $M_2^{423}$ Threonin für die Pilocarpin-Affinität. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 2-7 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Die Affinität des Pilocarpins an der Doppelmutante  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + 423\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  war leicht erhöht, ebenso bei der Mutation  $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$ . Die Unterschiede zum  $M_2$ -Wildtyprezeptor waren mit weniger als 0,3 log-Einheiten jedoch sehr gering. Der beim Pilocarpin beobachtete Affinitätsgewinn bei der Mutation  $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  war deutlich größer als bei der Mutation  $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$ . Diese Befunde legen nahe, dass das als Epitop der allosterischen Bindungsstelle bekannte  $M_2^{423}$ Threonin keine biologische Bedeutung für die Bindung des Pilocarpins hat und der Affinitätsgewinn bei der Mutation  $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  auf die Einführung des Histidins zurückzuführen war. Die Affinität des Pilocarpins an  $M_5$ -Wildtyprezeptoren wurde nicht bestimmt. Tab. 24 gibt einen Überblick über die charak-

## Ergebnisse

teristischen Bindungsparameter des Pilocarpins, die in Konkurrenzexperimenten mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS bestimmt wurden.

Rezeptor	$n_H \neq -1$	$n_H$	$pK_{app}$	$\Delta pK_{app}$ ( $M_{mut}-M_2wt$ )
$M_2wt$	5/7	$-0,78 \pm 0,06$	$6,73 \pm 0,05$	-
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Ala$	0/3	$-1,12 \pm 0,61$	$4,27 \pm 0,18$	-2,46
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Phe$	1/3	$-0,81 \pm 0,04$	$6,39 \pm 0,03$	-0,34
$M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln$	2/3	$-0,62 \pm 0,09$	$5,86 \pm 0,10$	-0,87
$M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$	2/3	$-0,74 \pm 0,02$	$6,11 \pm 0,04$	-0,62
$M_2^{427}Trp \rightarrow Ala$	2/3	$-0,76 \pm 0,07$	$6,86 \pm 0,04$	n.s.
$M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$ + $^{427}Trp \rightarrow Ala$	2/2	-0,72 (-0,69; -0,76)	6,46 (6,44; 6,48)	-0,27
$M_2^{423}Thr \rightarrow Ala$	3/3	$-0,68 \pm 0,03$	$7,01 \pm 0,12$	+0,28
$M_2^{423}Thr \rightarrow His$	2/2	-0,72 (-0,70; -0,73)	7,65 (7,62; 7,68)	+0,92
$M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln$ + $^{423}Thr \rightarrow His$	3/4	$-0,73 \pm 0,03$	$7,01 \pm 0,12$	+0,28

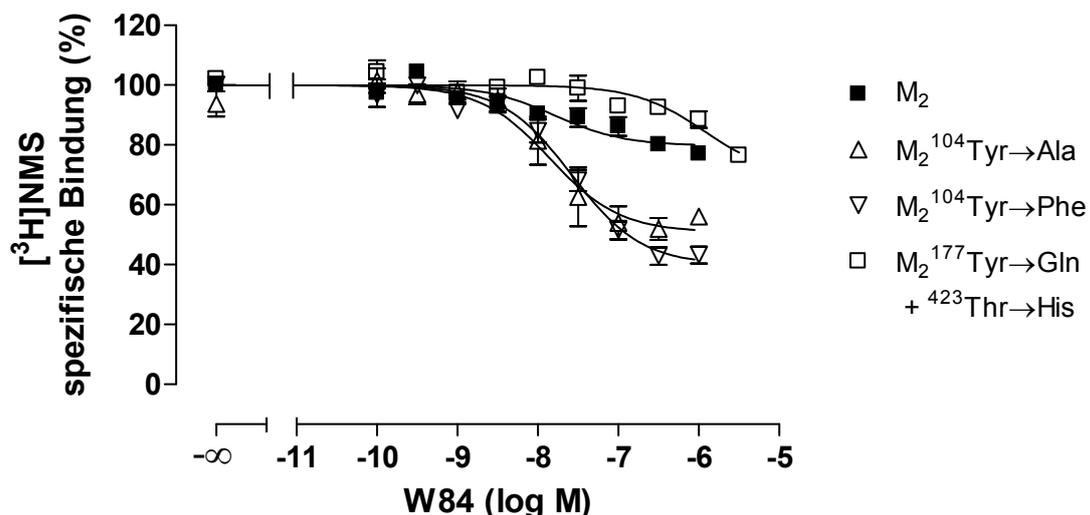
**Tab. 24:** Affinitätskonstanten des Pilocarpins aus heterologen Konkurrenzexperimenten mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS. Die  $IC_{50}$ -Werte der Einzelerperimente wurden mit der Cheng/Prusoff-Korrektur in apparente Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_{app}$  umgewandelt.  $n_H \neq -1$ : Anteil der Experimente mit einem von -1 abweichenden Steilheitsmaß an der Gesamtzahl der Experimente.  $n_H$ : Steilheitsmaß.  $pK_{app}$ : Negativer dekadischer Logarithmus der apparenten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_{app}$ .  $\Delta pK_{app}$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $pK_{app}$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante ( $M_{mut}$ ) und dem  $pK_{app}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_2wt$ ). n.s.: Der Unterschied zwischen dem  $pK_{app}$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem  $pK_{app}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ).

Wie bei den bereits beschriebenen Vollagonisten ergaben sich bei Verwendung von Pilocarpin als Kompetitor überwiegend flache Inhibitionskurven mit einem signifikant von -1 abweichenden Steilheitsmaß  $n_H$ . Die Experimente mit innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle mutierten Rezeptoren, also  $M_2^{104}$ Tyrosin-Mutanten, konnten überwiegend durch ein Steilheitsmaß  $n_H$  von -1 beschrieben werden.

### 3.11 Beeinflussung der Affinität allosterischer Modulatoren durch M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin

In Gleichgewichts-Bindungsexperimenten mit typischen allosterischen Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ wie W84 und Naphmethonium sollte deren Bindungsverhalten an innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle punktmutierten Rezeptoren, also M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr-Mutanten, im Vergleich zu M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren untersucht werden. Es sollte geprüft werden, ob Mutationen von M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin, das sich im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle befindet, die Affinität allosterischer Modulatoren beeinflussten. Als allosterische Modulatoren wurden für die Untersuchung W84 und sein verkürztes Derivat SH30 sowie Naphmethonium und sein verkürztes Derivat EHW477 ausgewählt, da in der Hybridsubstanz DDT-5 ein W84-artiger allosterischer Molekülteil und in der Hybridsubstanz MMH5-6 ein Naphmethonium-artiger allosterischer Molekülteil enthalten ist. Die Affinität der allosterischen Modulatoren zu freien, nicht Orthosterbesetzten Rezeptoren wurde als Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_A$  bestimmt (siehe Kapitel 2.3.4, Abb. 2, Gleichung 19).

#### 3.11.1 W84



**Abb. 43:** Bedeutung des orthosterischen Epitops M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin und der Mutation M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin→Glutamin + <sup>423</sup>Threonin→Histidin für die Interaktion von W84 mit dem orthosterischen Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM bei Experimenten mit M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren, M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Phe-Rezeptoren und M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln + <sup>423</sup>Thr→His-Rezeptoren sowie 1 nM bei Experimenten mit M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala-Rezeptoren. Dargestellt

sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Ordinate: Spezifische [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators. Kurvenanpassung: Gleichung 19.

In Abb. 43 sind die Interaktionskurven von W84 mit [ $^3\text{H}$ ]NMS an innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle punktmultierten  $\text{M}_2$ -Rezeptoren sowie an der Doppelmutante der allosterischen Bindungsstelle,  $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ , im Vergleich zu der Interaktionskurve an  $\text{M}_2$ -Wildtyprezeptoren dargestellt. Die Doppelmutante  $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  wurde eingesetzt, da diese Mutation bei einer Substanz, die ein allosterisches Bindungsverhalten zeigt, zu einem Affinitätsverlust führen sollte. Wie aus Abb. 43 hervorgeht, kam es durch Mutation der allosterischen Epitope  $\text{M}_2^{177}$ Tyrosin und  $\text{M}_2^{423}$ Threonin in die korrespondierenden  $\text{M}_5$ -Rezeptor-Aminosäuren zu einem Affinitätsverlust im Vergleich zu  $\text{M}_2$ -Wildtyprezeptoren. Dieser Affinitätsverlust zeigte eine Interaktion des W84 mit der allosterischen Bindungsstelle. Im Gegensatz zu Befunden mit orthosterischen Liganden blieben die Wendepunkte der Interaktionskurven des W84 bei Austausch des  $\text{M}_2^{104}$ Tyrosin gegen Alanin bzw. Phenylalanin quasi unverändert. Die Affinität des allosterischen Modulators W84 wurde somit durch Mutation von  $\text{M}_2^{104}$ Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle nicht verändert. An den Rezeptormutanten  $\text{M}_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  und  $\text{M}_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  zeigte W84 eine stärker ausgeprägte negative Kooperativität als an  $\text{M}_2$ -Wildtyprezeptoren. Tab. 25 gibt einen Überblick über die Bindungsparameter des allosterischen Modulators W84.

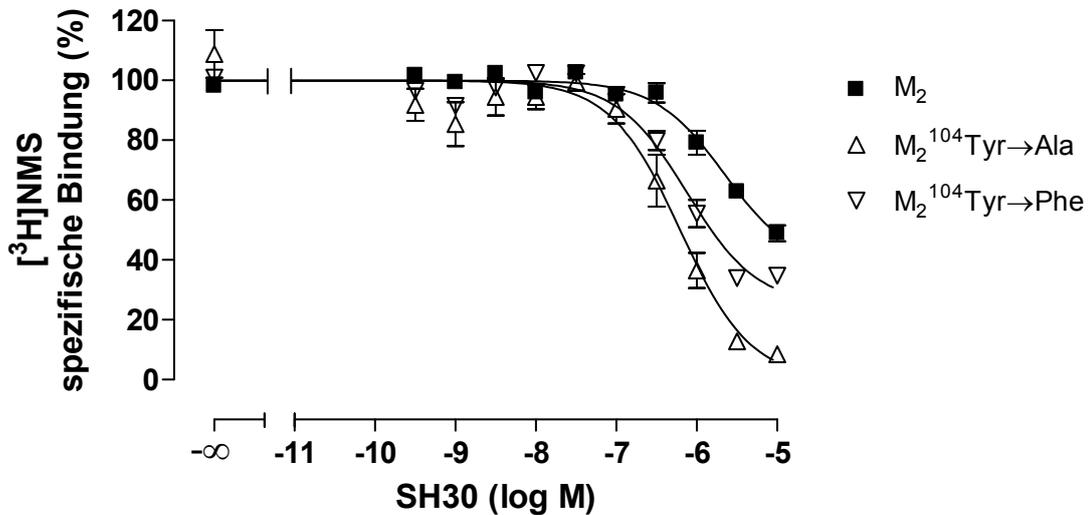
## Ergebnisse

Rezeptor	$pK_A$	$p\alpha$	$p(\alpha \cdot K_A)$	$\Delta pK_A$ ( $M_{mut} - M_{2wt}$ )
$M_{2wt}$	$7,65 \pm 0,31$	$-0,27 \pm 0,02$	7,38	-
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Ala$	$7,91 \pm 0,25$	$-0,44 \pm 0,02$	7,47	n.s.
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Phe$	$7,75 \pm 0,08$	$-0,57 \pm 0,05$	7,18	n.s.
$M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln$ + $^{423}Thr \rightarrow His$	$6,24 \pm 0,36$	$-0,51 \pm 0,17$	5,73	-1,41

**Tab. 25:** Bindungsparameter der Interaktion von W84 mit [ $^3H$ ]NMS an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren und punktmutierten  $M_2$ -Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.  $pK_A$ : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_A$ .  $p\alpha$ : Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$ .  $\Delta pK_A$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $pK_A$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante ( $M_{mut}$ ) und dem  $pK_A$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_{2wt}$ ). n.s.: Der Unterschied zwischen dem  $pK_A$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem  $pK_A$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ).

Die in Kapitel 3.11 vorgestellten allosterischen Modulatoren wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht in Dissoziationsexperimenten untersucht, da für einen Vergleich mit der Bindungstopografie der allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 in erster Linie die Interaktion der Modulatoren mit freien Rezeptoren wichtig war. Der Parameter  $p(\alpha \cdot K_A)$  kann bei den untersuchten allosterischen Modulatoren als Näherung der Affinität zu [ $^3H$ ]NMS-besetzten Rezeptoren aufgefasst werden.

## 3.11.2 SH30



**Abb. 44:** Bedeutung des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin für die Interaktion von SH30 mit dem orthosterischen Radioliganden  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ . Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM bei Experimenten mit  $M_2$ -Wildtyprezeptoren bzw.  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$ -Rezeptoren und 1 nM bei Experimenten mit  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4-7 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Ordinate: Spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators. Kurvenanpassung: Gleichung 19.

Da in der Hybrids substanz DDT-5 ein SH30-artiger allosterischer Molekülteil vorhanden ist, sollte untersucht werden, ob die Affinität des allosterischen Modulators SH30 durch das orthosterische Epitop  $M_2^{104}$ Tyrosin beeinflusst wurde. Die in Abb. 44 gezeigten Interaktionskurven von SH30 mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  an den Mutanten  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  und  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  waren im Vergleich zu der Interaktionskurve an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren nach links verschoben und die negative Kooperativität war stärker ausgeprägt. Wie aus Tab. 26 ersichtlich wird, war die Affinität des SH30 an den Mutanten  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  bzw.  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  gegenüber  $M_2$ -Wildtyprezeptoren gering, aber signifikant erhöht.

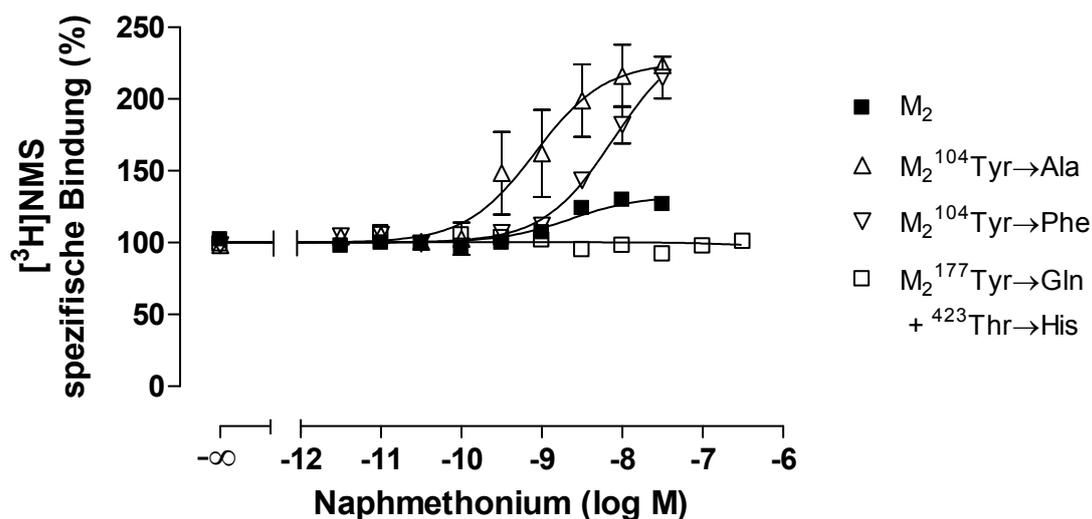
## Ergebnisse

Rezeptor	pK <sub>A</sub>	pα	p(α·K <sub>A</sub> )	ΔpK <sub>A</sub> (M <sub>mut</sub> -M <sub>2wt</sub> )
M <sub>2</sub> wt	6,01 ± 0,08	-0,81 ± 0,07	5,20	-
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Ala	6,54 ± 0,11	-*	-	+0,53
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Phe	6,31 ± 0,09	-0,84 ± 0,04	5,47	+0,30

**Tab. 26:** Bindungsparameter der Interaktion von SH30 mit [<sup>3</sup>H]NMS an M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren und punktmutierten M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4-7 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. pK<sub>A</sub>: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K<sub>A</sub>. pα: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α. ΔpK<sub>A</sub>: Differenz in log-Einheiten zwischen dem pK<sub>A</sub>-Wert an der jeweiligen Rezeptormutante (M<sub>mut</sub>) und dem pK<sub>A</sub>-Wert am M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptor (M<sub>2</sub>wt). \*: Ein Kooperativitätsfaktor α war nicht bestimmbar, da das untere Plateau der Regressionskurven aller Einzelexperimente nicht signifikant verschieden von 0 war.

Die erhöhte Affinität könnte Folge einer Beeinflussung der allosterischen Bindungsstelle durch Mutation von M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin gewesen sein. Evtl. wurde die Ausrichtung für die SH30-Bindung wichtiger allosterischer Epitope durch die Mutation von M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin verändert.

### 3.11.3 Naphmethonium



**Abb. 45:** Bedeutung des orthosterischen Epitops M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin und der Mutation M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin→Glutamin + <sup>423</sup>Threonin→Histidin für die Interaktion von Naphmethonium mit dem orthosterischen Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM bei Experimenten mit M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren, M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Phe-Rezeptoren und M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln

+  $^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ -Rezeptoren sowie 1 nM bei Experimenten mit  $\text{M}_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Ordinate: Spezifische [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators. Kurvenanpassung: Gleichung 19 bzw. Gleichung 20 ( $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ ).

Da in der Hybrids substanz MMH5-6 ein Naphmethonium-artiger allosterischer Molekülteil enthalten ist, sollte geprüft werden, ob Naphmethonium selbst ein typisch allosterisches Bindungsverhalten zeigte und ob die Affinität von dem orthosterischen Epitop  $\text{M}_2^{104}\text{Tyrosin}$  beeinflusst wurde. Aus Abb. 45 geht hervor, dass Naphmethonium, das im Vergleich zu W84 eine erhöhte Affinität zu  $\text{M}_2$ -Rezeptoren aufweist (Muth et al., 2003), ein allosterischer Förderer der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung an  $\text{M}_2$ -Rezeptoren ist. Bei Austausch von  $\text{M}_2^{104}\text{Tyrosin}$  im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle gegen Alanin bzw. Phenylalanin kam es zu einer deutlichen Verstärkung des bindungsfördernden Effekts, also der positiven Kooperativität, im Vergleich zu  $\text{M}_2$ -Wildtyprezeptoren. An der Doppelmutante  $\text{M}_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  zeigte Naphmethonium annähernd neutrale Kooperativität mit [ $^3\text{H}$ ]NMS. Aufgrund der neutralen Kooperativität wurde zur Analyse dieser Interaktionskurve eine modifizierte Ehlert-Gleichung unter Ersatz des Parameters  $K_A$  durch  $\text{EC}_{0,5\text{diss}}/\alpha$  angewendet. Tab. 27 zeigt, dass die Affinität des Naphmethoniums bei Mutation der typischen Epitope der allosterischen Bindungsstelle  $\text{M}_2^{177}\text{Tyrosin}$  und  $\text{M}_2^{423}\text{Threonin}$  in die korrespondierenden  $\text{M}_5$ -Rezeptor-Aminosäuren deutlich vermindert war. Wie bei allen Experimenten am Brandel-Harvester wurde jeweils eine Doppelbestimmung der Datenpunkte durchgeführt.

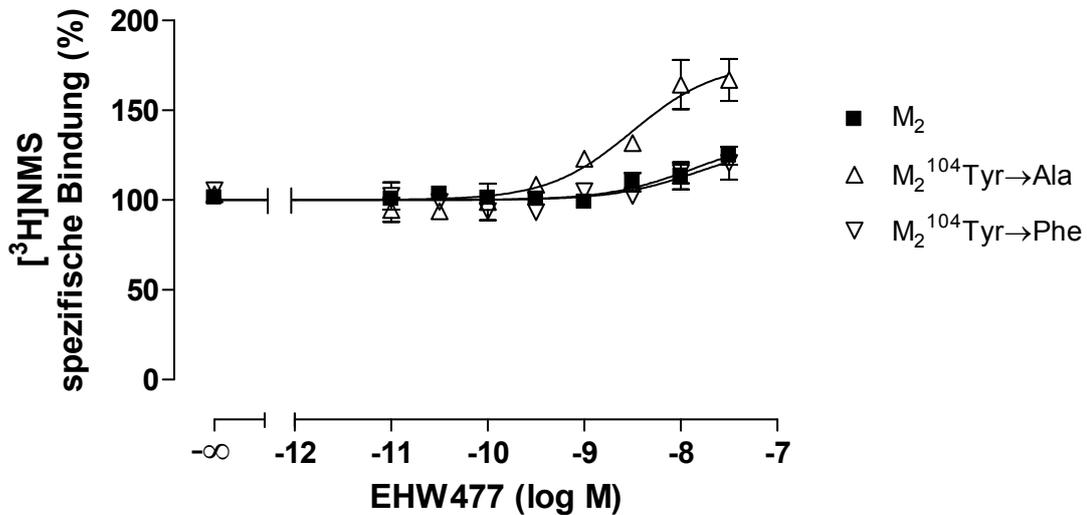
## Ergebnisse

Rezeptor	$pK_A$	$p\alpha$	$p(\alpha \cdot K_A)$	$\Delta pK_A$ ( $M_{mut} - M_{2wt}$ )
$M_2^{wt}$	$8,05 \pm 0,21$	$0,73 \pm 0,09$	8,78	-
$M_2^{104Tyr \rightarrow Ala}$	8,23 (8,19; 8,27)	1,13 (0,83; 1,43)	9,36	n.s.
$M_2^{104Tyr \rightarrow Phe}$	7,73 (7,69; 7,78)	0,76 (0,66; 0,86)	8,49	n.s.
$M_2^{177Tyr \rightarrow Gln}$ + $^{423}Thr \rightarrow His$	$6,39^* \pm 0,12$	$-0,02 \pm 0,12$	-	-1,66

**Tab. 27:** Bindungsparameter der Interaktion von Naphmethonium mit [ $^3H$ ]NMS an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren und punktmutierten  $M_2$ -Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.  $pK_A$ : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_A$ .  $p\alpha$ : Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$ .  $\Delta pK_A$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $pK_A$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante ( $M_{mut}$ ) und dem  $pK_A$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_2^{wt}$ ). n.s.: Der Unterschied zwischen dem  $pK_A$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem  $pK_A$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ). \*: Die Auswertung erfolgte mittels Gleichung 20 (Kapitel 2.3.4) unter Ersatz des Parameters  $K_A$  durch  $EC_{0,5diss}/\alpha$ . Es wurde der  $pEC_{0,5diss}$ -Wert aus der Dissertationsschrift Prilla (2006) verwendet: Naphmethonium,  $M_2^{177Tyr \rightarrow Gln} + ^{423}Thr \rightarrow His$ ,  $pEC_{0,5diss} = 6,37 \pm 0,04$ .

Der Austausch des orthosterischen  $M_2^{104}$ Tyrosin gegen Alanin bzw. Phenylalanin führte dagegen zu keiner signifikanten Affinitätsänderung. Naphmethonium wies damit die für einen allosterischen Modulator zu erwartende Epitopabhängigkeit der Bindung auf. Die deutlich stärker ausgeprägte positive Kooperativität an den  $M_2^{104}$ Tyrosin-Mutanten könnte auf eine veränderte Affinität des Naphmethoniums zu [ $^3H$ ]NMS-besetzten Rezeptoren zurückzuführen sein.

## 3.11.4 EHW477



**Abb. 46:** Bedeutung des orthosterischen Epitops M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin für die Interaktion von EHW477 mit dem orthosterischen Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM bei Experimenten mit M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren bzw. M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Phe-Rezeptoren und 1 nM bei Experimenten mit M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala-Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 2-5 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Ordinate: Spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators. Kurvenanpassung: Gleichung 19.

Es sollte geprüft werden, ob die Affinität des allosterischen Modulators EHW477 durch das orthosterische Epitop M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin beeinflusst wurde. Die in Abb. 46 dargestellten Interaktionskurven zeigen, ähnlich wie beim Naphmethonium, eine positive Kooperativität des EHW477 mit [<sup>3</sup>H]NMS an M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren sowie innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle punktmutierten M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Deutlich verstärkt war der bindungsfördernde Effekt bei der Mutation M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala im Vergleich zu M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren. Aus Tab. 28 wird ersichtlich, dass die Affinität des EHW477 an den Mutanten M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala und M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Phe im Vergleich zu M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren nicht signifikant verändert war und somit das orthosterische Epitop M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin keinen Beitrag zur Bindungsaffinität des EHW477 an Orthoster-freien Rezeptoren leistete.

## Ergebnisse

Rezeptor	pK <sub>A</sub>	pα	p(α·K <sub>A</sub> )	ΔpK <sub>A</sub> (M <sub>mut</sub> -M <sub>2wt</sub> )
M <sub>2</sub> wt	7,72 ± 0,06	0,54 ± 0,19	8,26	-
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Ala	7,06 ± 0,65	1,75 ± 0,60	8,81	n.s.
M <sub>2</sub> <sup>104</sup> Tyr→Phe	7,67 (7,64; 7,71)	0,25 (0,14; 0,36)	7,92	n.s.

**Tab. 28:** Bindungsparameter der Interaktion von EHW477 mit [<sup>3</sup>H]NMS an M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren und punktmultierten M<sub>2</sub>-Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 2-5 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. pK<sub>A</sub>: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K<sub>A</sub>. pα: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α. ΔpK<sub>A</sub>: Differenz in log-Einheiten zwischen dem pK<sub>A</sub>-Wert an der jeweiligen Rezeptormutante (M<sub>mut</sub>) und dem pK<sub>A</sub>-Wert am M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptor (M<sub>2</sub>wt). n.s.: Der Unterschied zwischen dem pK<sub>A</sub>-Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem pK<sub>A</sub>-Wert am M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test, p > 0,05).

Der pK<sub>A</sub>-Wert an der Mutante M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala, also die Affinität des EHW477 zu diesem Rezeptor, war mit einem großen Standardfehler verbunden. Die Experimente mit der Mutante M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala wiesen aufgrund der verminderten NMS-Affinität eine größere Streuung der einzelnen Messwerte auf und es zeigte sich bei positiv kooperativen allosterischen Modulatoren teilweise keine deutliche Bildung eines oberen Plateaus der Radioligandbindung bei hohen Allosterkonzentrationen. Bei einem Experiment mit EHW477 an der Mutante M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Phe (log K<sub>A</sub> = -6,60, 95 %-KI: -18,21 – 4,89) und drei Experimenten an der Mutante M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala (log K<sub>A</sub> = -4,86, 95 %-KI: -134,6 – 124,9; log K<sub>A</sub> = -6,16, 95 %-KI: -141,0 – 128,7; log K<sub>A</sub> = -4,99, 95 %-KI: -63,83 – 53,84) erstreckte sich das 95 %-Konfidenzintervall der logarithmierten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K<sub>A</sub> von negativen bis hin zu sehr großen Werten, d.h. bei diesen Experimenten war pK<sub>A</sub> quasi unbestimmt. Diese Experimente wurden nicht in die in Tab. 28 gezeigte Gesamtauswertung miteinbezogen. Außer der im Rahmen dieser Arbeit praktizierten Mittelwertbildung aus den bei den einzelnen Experimenten erhaltenen Parametern kann auch auf die zusammengefassten normalisierten Bindungsdaten aus den gesamten Experimenten eine Regressionsanalyse angewendet werden und die Parameter aus dieser Gesamt-Regressionskurve abgelesen werden. Tab. 29 gibt einen Überblick über die auf diese Weise erhaltenen Bindungsparameter aus allen Experimenten mit EHW477.

## Ergebnisse

Rezeptor	$pK_A$	$p\alpha$	$p(\alpha \cdot K_A)$	$\Delta pK_A$ ( $M_{mut} - M_{2wt}$ )
$M_{2wt}$	$7,39 \pm 0,68$	$0,63 \pm 0,70$	8,02	-
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Ala$	$7,80 \pm 0,52$	$0,83 \pm 0,99$	8,63	n.s.
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Phe$	$7,43 \pm 0,67$	$0,31 \pm 0,62$	7,74	n.s.

**Tab. 29:** Bindungsparameter der Interaktion von EHW477 mit [<sup>3</sup>H]NMS an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren und punktmutierten  $M_2$ -Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Gesamt-Regressionskurve aus 3-6 zusammengefassten unabhängigen Experimenten.  $pK_A$ : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_A$ .  $p\alpha$ : Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$ .  $\Delta pK_A$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $pK_A$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante ( $M_{mut}$ ) und dem  $pK_A$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_{2wt}$ ). n.s.: Der Unterschied zwischen dem  $pK_A$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem  $pK_A$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ).

Die durch Regressionsanalyse der zusammengefassten Bindungsdaten erhaltenen Parameter wiesen relativ große Standardfehler auf. Die Affinität des EHW477 an den Mutanten  $M_2^{104}Tyr \rightarrow Ala$  und  $M_2^{104}Tyr \rightarrow Phe$  schien etwas höher zu sein als an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren, die Erhöhung war jedoch statistisch nicht signifikant.

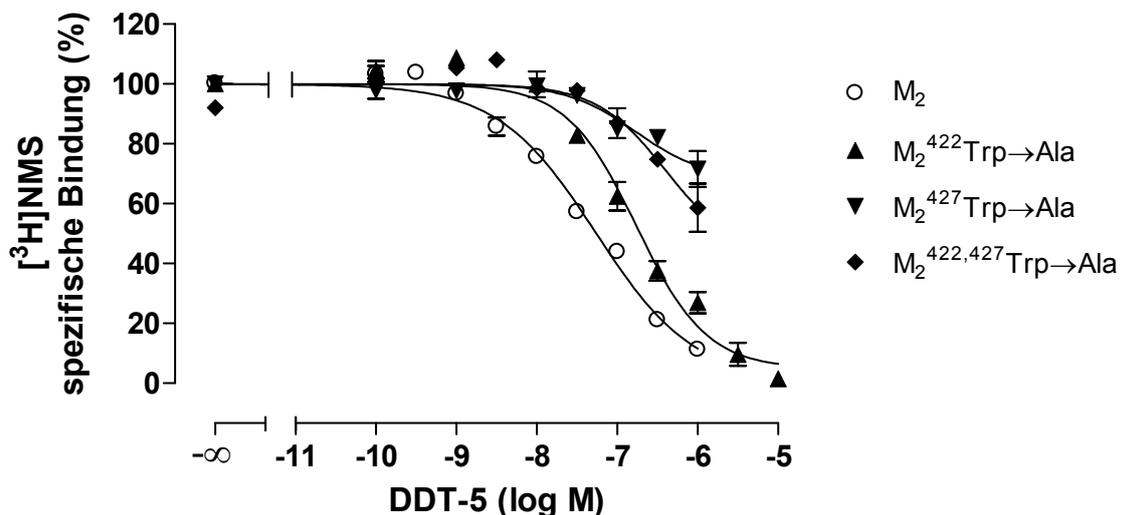
### 3.12 Bindungstopografie der allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen an $M_2$ -Rezeptoren

Hauptziel der Gleichgewichts-Bindungsexperimente war die Untersuchung der Bindungstopografie der Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 an  $M_2$ -Rezeptoren. Mittels punktmutierter Rezeptoren sollte geklärt werden, inwieweit es bei der Bindung der Hybridsubstanzen an freie, nicht Orthoster-besetzte  $M_2$ -Rezeptoren zu einer Interaktion mit der allosterischen und der orthosterischen Bindungsstelle kommt. Als Epitop der orthosterischen Bindungsstelle wurden Mutationen von  $M_2^{104}$ Tyrosin untersucht. Außerdem wurde die  $M_2/M_5$ -Selektivität der Bindung der Hybridsubstanzen an freie Rezeptoren untersucht.

Bei der Interaktion des Agonisten DDT-5 bzw. MMH5-6 mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS wäre es möglich, dass sich Interaktionskurven mit einem signifikant von -1 abweichenden Steilheitsmaß  $n_H$  ergeben, wie sie bei Inhibitionsexperimenten mit [<sup>3</sup>H]NMS und orthosterischen Agonisten typisch sind (siehe

Kapitel 2.3.3.1). Daher wurde bei der Analyse der Gleichgewichts-Bindungs-experimente der Hybridsubstanzen eine modifizierte Ehlert-Gleichung nach Tränkle et al. (2003) mit einem eingefügten Steilheitsmaß verwendet (siehe Kapitel 2.3.4, Gleichung 22). Bei den einzelnen Experimenten wurde mittels eines F-Tests geprüft, ob die Daten besser durch ein Steilheitsmaß  $n_H = -1$  oder ein davon abweichendes Steilheitsmaß beschrieben wurden. Von den mit der Gleichung nach Tränkle et al. (2003) bestimmten Kooperativitätsfaktoren  $\alpha$  wurde der Kehrwert gebildet, da die mit dieser Gleichung bestimmten Kooperativitätsfaktoren invers zu jenen bei Anwendung der Gleichung nach Ehlert (1988; siehe Kapitel 2.3.4, Gleichung 19) sind. Durch Bildung des Kehrwerts ergaben sich miteinander vergleichbare Kooperativitätsfaktoren. Die Gleichung nach Ehlert (1988) war bei den in Kapitel 3.11 vorgestellten typischen allosterischen Modulatoren angewendet worden. Bei dem mit der Gleichung nach Tränkle et al. (2003) berechneten Affinitätsparameter  $K_x$  handelte es sich um eine Gleichgewichts-Assoziationskonstante. Durch Multiplikation mit  $-1$  wurden die Assoziationskonstanten  $K_x$  in Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_A$ , wie sie aus der herkömmlichen Ehlert-Gleichung bekannt sind, umgewandelt.

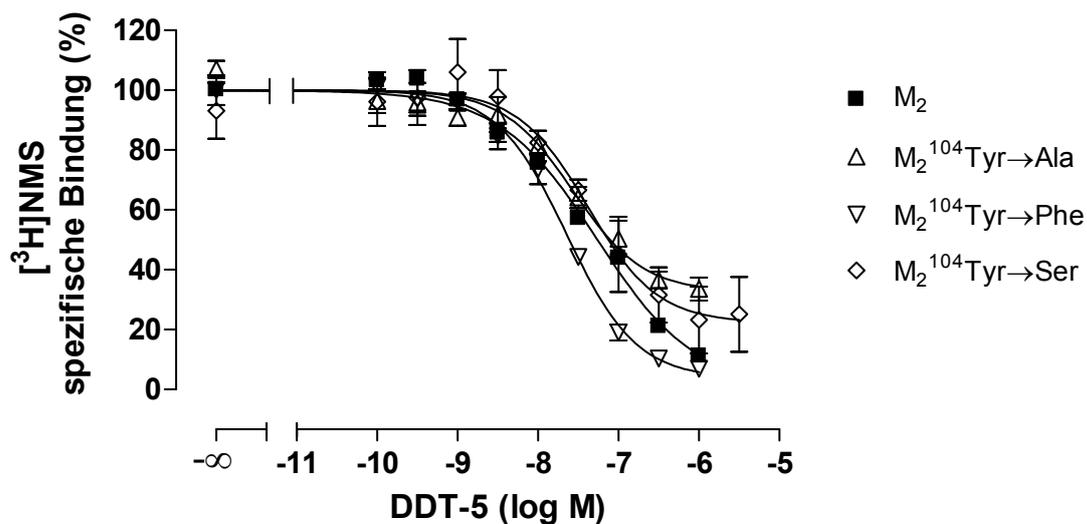
### 3.12.1 DDT-5



**Abb. 47:** Bedeutung der Aminosäuren M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan und M<sub>2</sub><sup>427</sup>Tryptophan für die Interaktion von DDT-5 mit dem orthosterischen Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz.

Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 22.

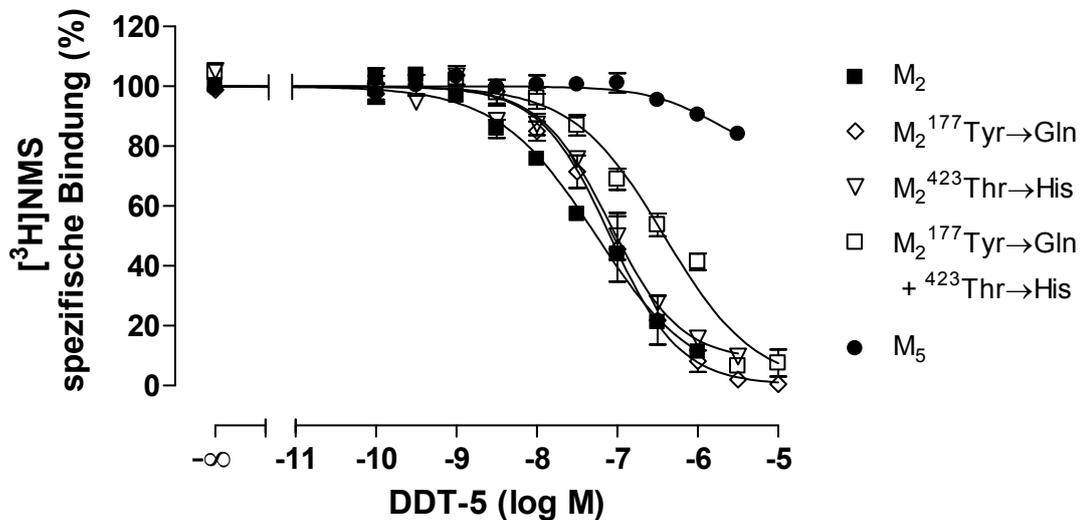
Abb. 47 zeigt, dass DDT-5 an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren eine starke Inhibition der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung bewirkte. Dies konnte Folge einer kompetitiven Interaktion an der orthosterischen Bindungsstelle, einer allosterischen Interaktion mit ausgeprägter negativer Kooperativität oder einer Mischung der beiden Interaktionsformen sein. Durch den Einsatz von Punktmutanten der allosterischen und der orthosterischen Bindungsstelle sollte auf molekularer Ebene untersucht werden, welche Art der Interaktion beim DDT-5 und  $M_2$ -Rezeptoren vorlag. Bei Mutation des für allosterische Modulatoren und orthosterische Agonisten bedeutsamen Epitops  $M_2^{422}$ Tryptophan zu Alanin verlor DDT-5 deutlich an Affinität bei einer weiterhin starken Inhibition der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung. Bei Austausch von  $M_2^{427}$ Tryptophan gegen Alanin war die Inhibition der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung durch DDT-5 weniger stark ausgeprägt und die Affinität geringer als an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Im Gegensatz zu orthosterischen Agonisten war das Epitop  $M_2^{427}$ Tryptophan also wichtig für die Interaktion des DDT-5 mit  $M_2$ -Rezeptoren. In Abb. 48 sind die Interaktionskurven des DDT-5 mit [ $^3\text{H}$ ]NMS an innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle punktmutierten  $M_2$ -Rezeptoren im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren dargestellt.



**Abb. 48:** Bedeutung des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin für die Interaktion von DDT-5 mit dem orthosterischen Radioliganden  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ . Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM bei Experimenten mit  $M_2$ -Wildtyprezeptoren bzw.  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$ -Rezeptoren und 1 nM bei Experimenten mit  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren bzw.  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ser}$ -Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-8 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 22.

Im Gegensatz zu klassischen orthosterischen Agonisten (siehe Kapitel 3.10) ergaben sich keine ausgeprägten Affinitätsänderungen bei Mutation des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin. Die Affinitätsänderungen waren jedoch teilweise signifikant: Die Entfernung der Hydroxylgruppe des  $M_2^{104}$ Tyrosin in der Mutation  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  führte zu keiner signifikanten Veränderung der Affinität des DDT-5. Durch Entfernung der Hydroxylgruppe und des Phenylrings des  $M_2^{104}$ Tyrosin und Ersatz durch eine Methylgruppe in der Mutation  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  wurde die Affinität des DDT-5 im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren vermindert, jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Die Affinität des DDT-5 an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ser}$ , in der der Phenylring des  $M_2^{104}$ Tyrosin bei einer weiterhin vorhandenen Hydroxylgruppe entfernt wurde, war signifikant niedriger als an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Dies zeigte eine Bedeutung des Phenylrings von  $M_2^{104}$ Tyrosin für die Bindung des DDT-5, während die Hydroxylgruppe von  $M_2^{104}$ Tyrosin keine Bedeutung hatte. Die Befunde legen nahe, dass der Muskarinrezeptoragonist DDT-5 mit der orthosterischen Bindungsstelle des  $M_2$ -Rezeptors interagiert. Aus

Abb. 49 geht hervor, dass DDT-5 eine ausgeprägte  $M_2/M_5$ -Selektivität der Bindung aufweist:



**Abb. 49:** Bedeutung der Aminosäuren  $M_2^{177}$ Tyrosin und  $M_2^{423}$ Threonin für die  $M_2/M_5$ -Selektivität der Interaktion von DDT-5 mit dem orthosterischen Radioliganden  $[^3H]NMS$ . Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-5 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische  $[^3H]NMS$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 22.

Die Affinität zu  $M_2$ -Rezeptoren war um mehr als 2,0 Dekaden höher als die zu  $M_5$ -Rezeptoren. Die  $M_2/M_5$ -Selektivität der Hybrids substanz DDT-5 war damit wesentlich stärker ausgeprägt als die des als Molekülteil im DDT-5 vorhandenen orthosterischen Agonisten Iperoxo, dessen Affinität zu  $M_2$ -Rezeptoren um 1,0 Dekaden höher war als die zu  $M_5$ -Rezeptoren (siehe Kapitel 3.10.3, Abb. 39). Die in Abb. 49 dargestellten Interaktionskurven des DDT-5 mit  $[^3H]NMS$  an den innerhalb der allosterischen Bindungsstelle punktmutierten Rezeptoren  $M_2^{177Tyr \rightarrow Gln}$  und  $M_2^{423Thr \rightarrow His}$  zeigen einen Affinitätsverlust. Die  $M_2/M_5$ -Selektivität des DDT-5 konnte jedoch nicht vollständig durch die beiden Epitope  $M_2^{177}$ Tyrosin und  $M_2^{423}$ Threonin erklärt werden, da die Affinität an der Doppelmutante  $M_2^{177Tyr \rightarrow Gln} + ^{423Thr \rightarrow His}$  signifikant höher war als an  $M_5$ -Wildtyprezeptoren. Die Befunde zeigen aber deutlich die Bedeutung von Epitopen der allosterischen Bindungsstelle für die Bindung der Hybrids substanz DDT-5 an  $M_2$ -Rezeptoren. In Tab. 30 sind die charakteristischen Bindungsparameter des DDT-5 bei der Interaktion mit  $[^3H]NMS$  an freien Rezeptoren zusammengestellt.

## Ergebnisse

Rezeptor	$n_H \neq -1$	$n_H$	$pK_A$	$p\alpha$	$\Delta pK_A$ ( $M_{mut}-M_{2wt}$ )
$M_{2wt}$	3/3	$-0,67 \pm 0,01$	$8,02 \pm 0,01$	-*	-
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Ala$	1/8	$-0,70 \pm 0,13$	$7,66 \pm 0,16$	$-0,79 \pm 0,07$	n.s.
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Phe$	2/3	$-1,04 \pm 0,22$	$7,97 \pm 0,14$	$-1,61^*$ (-1,39; -1,82)	n.s.
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Ser$	0/3	$-1,16 \pm 0,05$	$7,49 \pm 0,05$	$-0,58^*$ (-0,57; -0,59)	-0,53
$M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln$	0/3	$-1,02 \pm 0,03$	$7,45 \pm 0,18$	-*	n.s.
$M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$	0/3	$-0,95 \pm 0,04$	$7,12 \pm 0,09$	$-1,57^*$ (-1,28; -1,86)	-0,90
$M_2^{427}Trp \rightarrow Ala$	0/3	$-2,06 \pm 0,69$	$7,19 \pm 0,01$	$-0,28 \pm 0,03$	-0,83
$M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$ + $^{427}Trp \rightarrow Ala$	0/4	$-2,64 \pm 0,52$	$6,78 \pm 0,12$	$-0,39^*$ (-0,35; -0,43)	-1,24
$M_2^{423}Thr \rightarrow His$	0/3	$-0,84 \pm 0,09$	$7,71 \pm 0,09$	$-1,73 \pm 0,07$	n.s.
$M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln$ + $^{423}Thr \rightarrow His$	0/3	$-0,77 \pm 0,02$	$7,04 \pm 0,10$	$-2,09 \pm 0,29$	-0,98
$M_{5wt}$	0/5	$-17,78$ $\pm 9,25$	$5,89 \pm 0,31$	$-0,29 \pm 0,09$	-

**Tab. 30:** Bindungsparameter der Interaktion von DDT-5 mit [ $^3H$ ]NMS an freien, nicht Orthoster-besetzten  $M_2$ - und  $M_5$ -Wildtyprezeptoren sowie punktmutierten  $M_2$ -Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-8 unabhängigen Experimenten. Die einzelnen Experimente wurden mittels Gleichung 22 (siehe Kapitel 2.3.4) analysiert und es wurde mit einem F-Test geprüft, ob das Steilheitsmaß  $n_H$  der Kurve signifikant von -1 abwich.  $n_H \neq -1$ : Anteil der Experimente mit einem von -1 abweichenden Steilheitsmaß an der Gesamtzahl der Experimente.  $n_H$ : Mittelwert des Steilheitsmaßes  $n_H$  bei Analyse der einzelnen Experimente mit freilaufendem Steilheitsmaß.  $pK_A$ : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_A$ .  $p\alpha$ : Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$ .  $\Delta pK_A$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $pK_A$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante ( $M_{mut}$ ) und dem  $pK_A$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_{2wt}$ ). n.s.: Der Unterschied zwischen dem  $pK_A$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem  $pK_A$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ). \*: Ein Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  war bei einem oder mehreren Experimenten nicht bestimmbar, da das untere Plateau der jeweiligen Regressionskurve nicht signifikant verschieden von 0 war.

In den Gleichgewichts-Bindungsexperimenten, in denen die Affinität zu nicht Orthoster-besetzten Rezeptoren bestimmt wird, ergab sich bei Mutation des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ -Tyrosin mit Entfernung der Phenylgruppe dieser

Aminosäure ein Affinitätsverlust ( $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ser}$ ). Bei den Einzelmutationen von Epitopen der allosterischen Bindungsstelle,  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$  und  $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ , war eine Verminderung der Affinität im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren vorhanden, jedoch nicht signifikant. Die Verminderungen der Affinität durch die Mutationen  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$  und  $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  waren additiv, denn die Affinität des DDT-5 an der Doppelmutante  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  war stärker vermindert als an den Einzelmutanten und signifikant niedriger im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Neben den beiden für die  $M_2/M_5$ -Selektivität allosterischer Modulatoren wichtigen Epitopen  $M_2^{177}$ Tyrosin und  $M_2^{423}$ Threonin wurde die Bindungsaffinität der Hybrids substanz DDT-5 auch durch das in  $M_2$ - und  $M_5$ -Rezeptoren konservierte  $M_2^{422}$ Tryptophan beeinflusst, das sowohl eine Bedeutung für die Bindung allosterischer Modulatoren als auch orthosterischer Agonisten hat. Die Befunde mit innerhalb der orthosterischen und innerhalb der allosterischen Bindungsstelle mutierten  $M_2$ -Rezeptoren zeigen, dass es neben den vier aus dem Ehlert-Modell (siehe Kapitel 2.3.4, Abb. 2) bekannten Rezeptorbesetzungszuständen einen fünften Zustand, in dem die Hybrids substanz an die allosterische und die orthosterische Bindungsstelle gleichzeitig gebunden hat (siehe Kapitel 2.3.4, Abb. 3), gibt. In Tab. 30 fällt auf, dass sich bei einer Analyse mit freilaufendem Steilheitsmaß  $n_H$  an  $M_5$ -Wildtyprezeptoren sehr steile Kurven ergaben. Die Experimente an  $M_5$ -Wildtyprezeptoren wurden jedoch statistisch signifikant besser durch ein Steilheitsmaß  $n_H = -1$  beschrieben und bei der Interpretation des Steilheitsmaßes  $n_H$  muss berücksichtigt werden, dass die Experimente an  $M_5$ -Wildtyprezeptoren ein Plateau der spezifischen Radioligand-Bindung von ca. 80 % aufwiesen, d.h. ein im Vergleich zu Experimenten mit Verminderung der spezifischen Radioligand-Bindung auf 0 % deutlich geringeres „Fenster“ für das Steilheitsmaß  $n_H$ . Tab. 31 gibt einen Überblick über die Parameter  $p(\alpha \cdot K_A)$ , die sich aus Gleichgewichts-Bindungsexperimenten ergaben, und die in Dissoziations-experimenten bestimmten  $pEC_{0,5\text{diss}}$ -Werte des DDT-5 (siehe Kapitel 3.9.1).

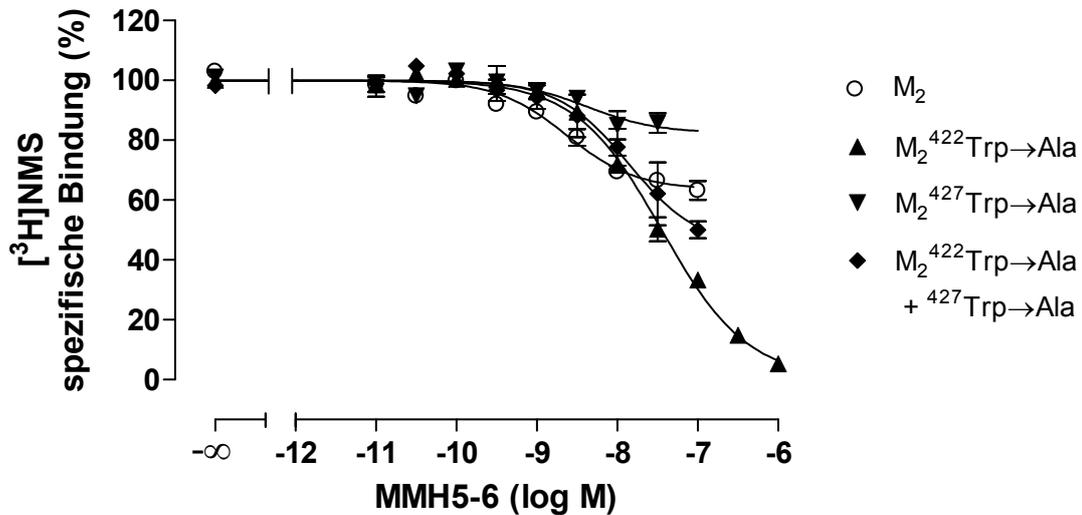
## Ergebnisse

Rezeptor	$p(\alpha \cdot K_A)$	$pEC_{0,5diss}$	$\Delta pEC_{0,5diss}$ ( $M_{mut} - M_{2wt}$ )
$M_2$ wt	-	$6,96 \pm 0,07$	-
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Ala$	6,87	n.b.	-
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Phe$	6,36	n.b.	-
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Ser$	6,91	n.b.	-
$M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln$	-	$5,68 \pm 0,07$	-1,28
$M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$	5,55	$5,57 \pm 0,04$	-1,39
$M_2^{427}Trp \rightarrow Ala$	6,91	$6,86 \pm 0,08$	n.s.
$M_2^{422}Trp \rightarrow Ala + ^{427}Trp \rightarrow Ala$	6,39	$5,69 \pm 0,06$	-1,27
$M_2^{423}Thr \rightarrow His$	5,98	n.b.	-
$M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln + ^{423}Thr \rightarrow His$	4,95	$5,15 \pm 0,07$	-1,81
$M_5$ wt	5,60	$4,86 \pm 0,24$	-

**Tab. 31:** Bindungsparameter der Interaktion von DDT-5 mit freien und [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten  $M_2$ - und  $M_5$ -Wildtyprezeptoren sowie punktmultierten  $M_2$ -Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-8 unabhängigen Experimenten (Gleichgewichts-Bindungsexperimente) bzw. 3-5 unabhängigen Experimenten (Dissoziationsexperimente).  $p(\alpha \cdot K_A)$ : Negativer dekadischer Logarithmus des Produkts aus Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  und Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_A$ .  $pEC_{0,5diss}$ : Negativer dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation führt.  $\Delta pEC_{0,5diss}$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $pEC_{0,5diss}$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante ( $M_{mut}$ ) und dem  $pEC_{0,5diss}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_2$ wt). n.s.: Der Unterschied zwischen dem  $pEC_{0,5diss}$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem  $pEC_{0,5diss}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ). n.b.: nicht bestimmt.

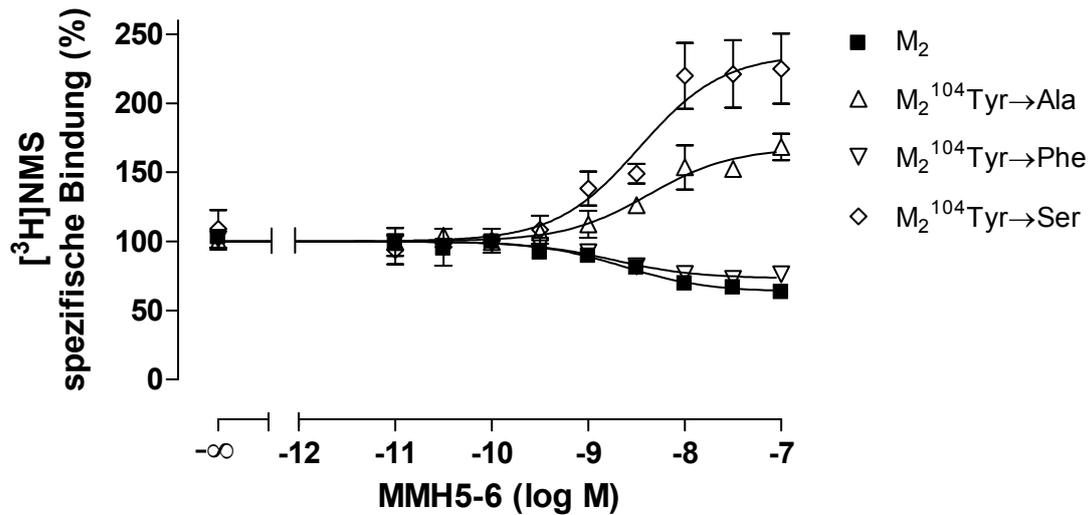
Um zu überprüfen, inwieweit das Kooperativitätsmodell (Ehlert, 1988) bei der allosterisch/orthosterischen Hybrids substanz DDT-5 zu übereinstimmenden Parametern  $p(\alpha \cdot K_A)$  und  $pEC_{0,5diss}$  führt, können die  $p(\alpha \cdot K_A)$ -Werte mit den  $pEC_{0,5diss}$ -Werten verglichen werden. Mit Ausnahme des  $M_5$ -Wildtyprezeptors und der  $M_2^{422}Trp \rightarrow Ala + ^{427}Trp \rightarrow Ala$ -Mutante ergab sich eine gute Übereinstimmung der beiden Parameter.

## 3.12.2 MMH5-6



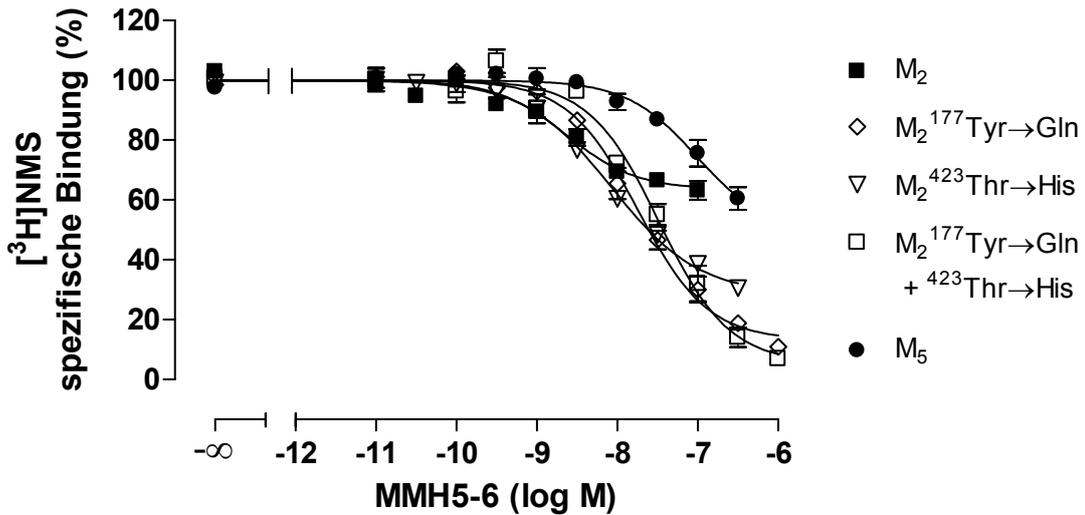
**Abb. 50:** Bedeutung der Aminosäuren  $M_2^{422}$ Tryptophan und  $M_2^{427}$ Tryptophan für die Interaktion von MMH5-6 mit dem orthosterischen Radioliganden  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ . Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 22.

Aus Abb. 50 geht hervor, dass MMH5-6 an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren ähnlich einem schwach negativ kooperativen allosterischen Modulator zu einer submaximalen Inhibition der spezifischen  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung führte. Der Austausch von  $M_2^{422}$ Tryptophan gegen Alanin führte zu einer verstärkten Inhibition der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung und einer im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren signifikant verminderten Affinität. Durch Austausch von  $M_2^{427}$ Tryptophan gegen Alanin wurde die Affinität des MMH5-6 nicht signifikant verändert bei einer geringer ausgeprägten Inhibition der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung. Abb. 51 zeigt, dass die Interaktionskurve des MMH5-6 mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  nahezu deckungsgleich mit der Interaktionskurve an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren war.



**Abb. 51:** Bedeutung des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin für die Interaktion von MMH5-6 mit dem orthosterischen Radioliganden  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ . Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM bei Experimenten mit  $M_2$ -Wildtyprezeptoren bzw.  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$ -Rezeptoren und 1 nM bei Experimenten mit  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren bzw.  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ser}$ -Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 22.

Die Hydroxylgruppe des Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle leistete demnach keinen Beitrag zur Bindungsaffinität des MMH5-6. Bei Entfernung des Phenylrings des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin in den Mutanten  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  bzw.  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ser}$  kam es zu einem signifikanten Affinitätsverlust des MMH5-6 im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren und einer Umkehrung der Kooperativität mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  hin zu einer starken Bindungsförderung. Die Erschwerung der Interaktion mit der orthosterischen Bindungsstelle durch die Mutation  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  bzw.  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ser}$  führte dazu, dass der über die allosterische Bindungsstelle vermittelte bindungsfördernde Effekt des im MMH5-6 enthaltenen allosterischen Molekülteils sichtbar wurde. Der Affinitätsverlust und die in ihrer Richtung von negativ nach positiv veränderte Kooperativität mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  zeigten eine Interaktion des MMH5-6 mit der orthosterischen Bindungsstelle. Aus Abb. 52 geht hervor, dass MMH5-6 eine deutliche  $M_2/M_5$ -Selektivität der Bindung aufwies, die im Vergleich mit dem orthosterischen Agonisten Iperoxo stärker ausgeprägt war.



**Abb. 52:** Bedeutung der Aminosäuren  $M_2^{177}\text{Tyr}$  und  $M_2^{423}\text{Thr}$  für die  $M_2/M_5$ -Selektivität der Interaktion von MMH5-6 mit dem orthosterischen Radioliganden  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ . Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 22.

Der Austausch des allosterischen Epitops  $M_2^{177}\text{Tyr}$  gegen die korrespondierende Aminosäure im  $M_5$ -Rezeptor Glutamin führte zu einem signifikanten Affinitätsverlust im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren, während die Affinität an der Mutante  $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  unverändert war. An diesen beiden Mutanten der allosterischen Bindungsstelle sowie an der Doppelmutante  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  war die Inhibition der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung stärker ausgeprägt als an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Durch diese Mutationen wurde eine Interaktion des MMH5-6 mit der allosterischen Bindungsstelle erschwert und es zeigte sich stärker der bindungshemmende Effekt des im MMH5-6 enthaltenen Iperoxo-artigen Molekülteils, der über eine kompetitive Interaktion an der orthosterischen Bindungsstelle vermittelt wurde. Beim MMH5-6 konnte, ähnlich wie beim DDT-5, die  $M_2/M_5$ -Selektivität nicht vollständig durch die Epitope  $M_2^{177}\text{Tyr}$  und  $M_2^{423}\text{Thr}$  erklärt werden, da die Affinität an der Doppelmutante  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  signifikant höher war als an  $M_5$ -Wildtyprezeptoren. Die in Tab. 32 zusammengefassten Bindungsparameter zeigen, dass MMH5-6 bei der Interaktion mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  an freien Rezeptoren eine ähnliche Epitopabhängigkeit aufwies wie die zweite als Vollagonist wirksame Hybridsubstanz, das DDT-5.

## Ergebnisse

Rezeptor	$n_H \neq -1$	$n_H$	$pK_A$	$p\alpha$	$\Delta pK_A$ ( $M_{mut}-M_{2wt}$ )
$M_{2wt}$	1/6	$-0,92 \pm 0,25$	$8,82 \pm 0,12$	$-0,50 \pm 0,05$	-
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Ala$	0/3	$5,51 \pm 4,52$	$7,94 \pm 0,10$	$0,61 \pm 0,10$	-0,88
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Phe$	1/3	$-1,87 \pm 0,61$	$8,79 \pm 0,07$	$-0,19 \pm 0,01$	n.s.
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Ser$	0/5	$2,42 \pm 1,58$	$7,91 \pm 0,22$	$0,91 \pm 0,22$	-0,91
$M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln$	0/3	$-0,86 \pm 0,07$	$8,08 \pm 0,09$	$-1,23 \pm 0,07$	-0,74
$M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$	2/3	$-0,84 \pm 0,13$	$8,00 \pm 0,07$	-*	-0,82
$M_2^{427}Trp \rightarrow Ala$	0/3	$-5,59 \pm 2,54$	$8,57 \pm 0,16$	$-0,20 \pm 0,05$	n.s.
$M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$ + $^{427}Trp \rightarrow Ala$	0/3	$-0,80 \pm 0,10$	$7,92 \pm 0,14$	$-0,98 \pm 0,15$	-0,90
$M_2^{423}Thr \rightarrow His$	1/3	$-0,80 \pm 0,10$	$8,74 \pm 0,04$	$-1,10 \pm 0,09$	n.s.
$M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln$ + $^{423}Thr \rightarrow His$	0/3	$-0,87 \pm 0,11$	$8,03 \pm 0,06$	$-1,94 \pm 0,21$	-0,79
$M_{5wt}$	0/5	$-0,81 \pm 0,10$	$7,18 \pm 0,20$	$-0,64 \pm 0,19$	-

**Tab. 32:** Bindungsparameter der Interaktion von MMH5-6 mit [ $^3H$ ]NMS an freien, nicht Orthoster-besetzten  $M_2$ - und  $M_5$ -Wildtyprezeptoren sowie punktmutierten  $M_2$ -Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten. Die einzelnen Experimente wurden mittels Gleichung 22 (siehe Kapitel 2.3.4) analysiert und es wurde mit einem F-Test geprüft, ob das Steilheitsmaß  $n_H$  der Kurve signifikant von -1 abwich.  $n_H \neq -1$ : Anteil der Experimente mit einem von -1 abweichenden Steilheitsmaß an der Gesamtzahl der Experimente.  $n_H$ : Mittelwert des Steilheitsmaßes  $n_H$  bei Analyse der einzelnen Experimente mit freilaufendem Steilheitsmaß.  $pK_A$ : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_A$ .  $p\alpha$ : Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$ .  $\Delta pK_A$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $pK_A$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante ( $M_{mut}$ ) und dem  $pK_A$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_{2wt}$ ). n.s.: Der Unterschied zwischen dem  $pK_A$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem  $pK_A$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ). \*: Ein Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  war nicht bestimmbar, da das untere Plateau der Regressionskurven aller Einzelexperimente nicht signifikant verschieden von 0 war.

Für die Affinität zu freien, nicht Orthoster-besetzten Rezeptoren leistete der Phenylring des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin einen Beitrag, während die Hydroxylgruppe dieses Epitops keine Bedeutung hatte. Die Doppelmutation der allosterischen Bindungsstelle  $M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln + ^{423}Thr \rightarrow His$  sowie die Mutation des konservierten  $M_2^{422}$ Tryptophan führte zu einem Affinitätsverlust. Die im Vergleich zum orthosterischen Liganden Iperoxo erhöhte Selektivität der Bindung für  $M_2$ - im

Vergleich zu M<sub>5</sub>-Rezeptoren kann mit der Einführung eines M<sub>2</sub>-prävalenten allosterischen Molekülteils in der Hybrids substanz MMH5-6 erklärt werden. Die beim MMH5-6 gefundene Abhängigkeit der Affinität von allosterischen Epitopen und dem orthosterischen Epitop M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin zeigte, ähnlich wie beim DDT-5, eine Hybrid-Bindungstopografie mit einer möglichen gleichzeitigen Bindung an allosterische und orthosterische Bindungsstelle. Wie aus Tab. 32 hervorgeht, zeigten sich an den Mutanten M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala und M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ser (Bindungsförderung durch MMH5-6) sowie M<sub>2</sub><sup>427</sup>Trp→Ala (Plateau der spezifischen Radioligand-Bindung ca. 80 %) steile Kurven. Die Experimente an diesen Mutanten wurden jedoch statistisch ausreichend durch ein Steilheitsmaß  $n_H = 1$  bzw.  $n_H = -1$  beschrieben.

Tab. 33 gibt einen Überblick über die Parameter  $p(\alpha \cdot K_A)$ , die sich aus Gleichgewichts-Bindungsexperimenten ergaben, und die in Dissoziationsexperimenten bestimmten  $pEC_{0,5diss}$ -Werte des MMH5-6 (siehe Kapitel 3.9.2).

## Ergebnisse

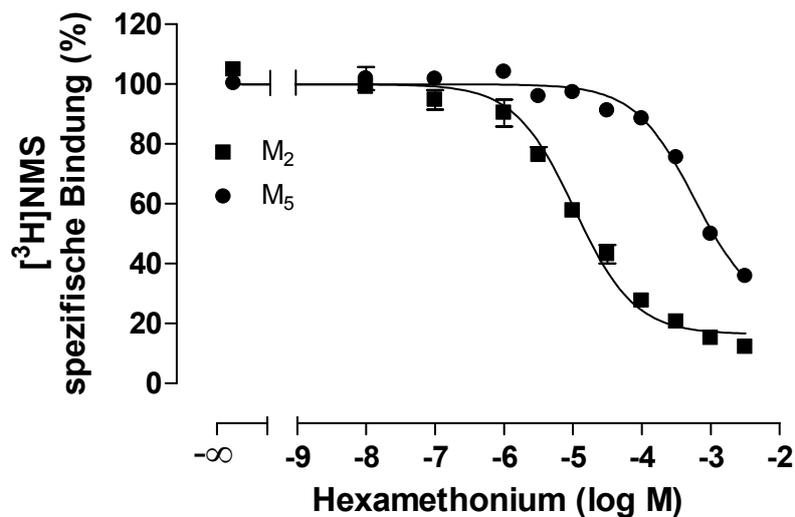
Rezeptor	$p(\alpha \cdot K_A)$	$pEC_{0,5diss}$	$\Delta pEC_{0,5diss}$ ( $M_{mut} - M_{2wt}$ )
$M_2wt$	8,32	$8,50 \pm 0,05$	-
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Ala$	8,55	n.b.	-
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Phe$	8,60	n.b.	-
$M_2^{104}Tyr \rightarrow Ser$	8,82	n.b.	-
$M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln$	6,85	$7,23 \pm 0,05$	-1,27
$M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$	-	6,42 (6,41; 6,43)	-2,08
$M_2^{427}Trp \rightarrow Ala$	8,37	$8,55 \pm 0,13$	n.s.
$M_2^{422}Trp \rightarrow Ala + ^{427}Trp \rightarrow Ala$	6,94	$6,59 \pm 0,03$	-1,91
$M_2^{423}Thr \rightarrow His$	7,64	n.b.	-
$M_2^{177}Tyr \rightarrow Gln + ^{423}Thr \rightarrow His$	6,09	$6,38 \pm 0,01$	-2,12
$M_5wt$	6,54	$5,55 \pm 0,07$	-

**Tab. 33:** Bindungsparameter der Interaktion von MMH5-6 mit freien und [ $^3H$ ]NMS-besetzten  $M_2$ - und  $M_5$ -Wildtyprezeptoren sowie punktmutierten  $M_2$ -Rezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten (Gleichgewichts-Bindungsexperimente) bzw. 2-5 unabhängigen Experimenten (Dissoziationsexperimente).  $p(\alpha \cdot K_A)$ : Negativer dekadischer Logarithmus des Produkts aus Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  und Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_A$ .  $pEC_{0,5diss}$ : Negativer dekadischer Logarithmus der Testsubstanz-Konzentration, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [ $^3H$ ]NMS-Dissoziation führt.  $\Delta pEC_{0,5diss}$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $pEC_{0,5diss}$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante ( $M_{mut}$ ) und dem  $pEC_{0,5diss}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_2wt$ ). n.s.: Der Unterschied zwischen dem  $pEC_{0,5diss}$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem  $pEC_{0,5diss}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ). n.b.: nicht bestimmt.

Mit Ausnahme des  $M_5$ -Wildtyprezeptors ergab sich eine gute Übereinstimmung der  $p(\alpha \cdot K_A)$ -Werte aus den Gleichgewichts-Bindungsexperimenten mit den  $pEC_{0,5diss}$ -Werten aus Dissoziationsexperimenten.

### 3.13 M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität von Hexamethonium

In Gleichgewichts-Bindungsexperimenten wurde die M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität der Bindung des allosterischen Modulators Hexamethonium an freie Rezeptoren untersucht. Hexamethonium kann als beidseitig verkürztes Derivat der Modulatoren W84 bzw. Naphmethonium aufgefasst werden, in dem die lateralen Phthalimid- bzw. Naphthalimid-Gruppen entfernt wurden und nur noch die Zwischenkette mit zwei quartären Stickstoffen erhalten ist. Ziel der Experimente mit Hexamethonium war es zu untersuchen, ob die Struktur des Hexamethoniums mit zwei positiv geladenen Stickstoffatomen in einem bestimmten Abstand voneinander für eine M<sub>2</sub>-Präferenz der Bindung an freie Rezeptoren gegenüber M<sub>5</sub>-Rezeptoren ausreicht. Abb. 53 zeigt die Interaktionskurven des Hexamethoniums mit [<sup>3</sup>H]NMS an M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>5</sub>-Wildtyprezeptoren.



**Abb. 53:** M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität der Interaktion von Hexamethonium mit dem orthosterischen Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration des Modulators. Kurvenanpassung: Gleichung 19.

Erkennbar ist die deutlich höhere Affinität zu M<sub>2</sub>- im Vergleich zu M<sub>5</sub>-Wildtyprezeptoren und die stark ausgeprägte negative Kooperativität des Hexamethoniums mit [<sup>3</sup>H]NMS. Aus Tab. 34 geht hervor, dass die Differenz in log-

## Ergebnisse

Einheiten zwischen der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_A$  am  $M_2$ -Rezeptor und der am  $M_5$ -Rezeptor 2,0 Dekaden betrug.

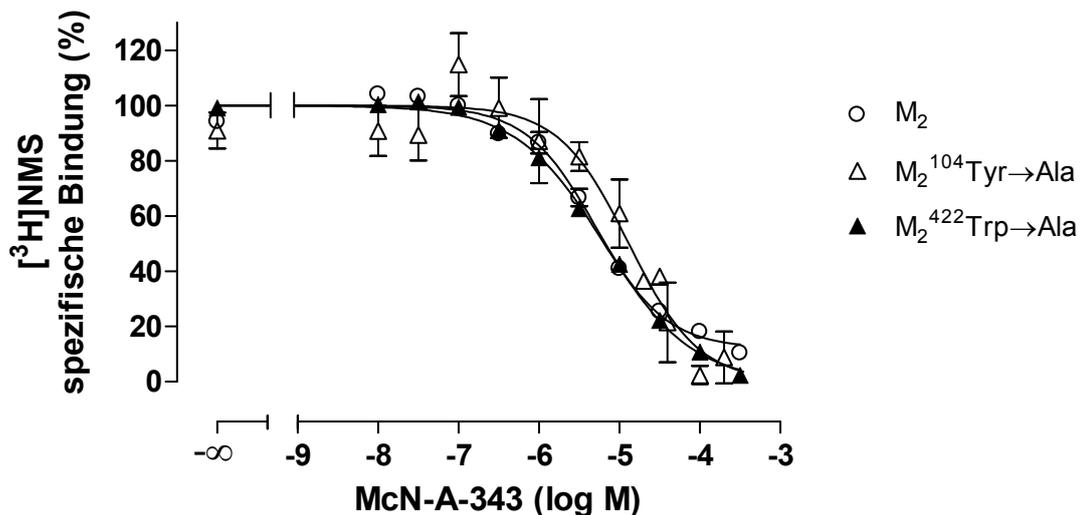
Rezeptor	$pK_A$	$p\alpha$	$p(\alpha \cdot K_A)$	$\Delta pK_A$ ( $M_2\text{wt}-M_5\text{wt}$ )
$M_2\text{wt}$	$5,50 \pm 0,04$	$-1,31 \pm 0,02$	4,19	-
$M_5\text{wt}$	$3,50 \pm 0,06$	$-0,91 \pm 0,07$	2,59	2,00

**Tab. 34:** Bindungsparameter der Interaktion von Hexamethonium mit [ $^3\text{H}$ ]NMS an  $M_2$ - und  $M_5$ -Wildtyprezeptoren. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.  $pK_A$ : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_A$ .  $p\alpha$ : Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$ .  $\Delta pK_A$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $pK_A$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_2\text{wt}$ ) und dem  $pK_A$ -Wert am  $M_5$ -Wildtyprezeptor ( $M_5\text{wt}$ ).

Somit war die Affinität des Hexamethoniums zu  $M_2$ -Rezeptoren um den Faktor 100 größer als zu  $M_5$ -Rezeptoren und entsprach etwa der  $M_2/M_5$ -Selektivität der Bindung des Hexamethoniums an [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzte Rezeptoren, die in Dissoziationsexperimenten bestimmt worden war (Prilla, Dissertation 2006:  $M_2$ -Rezeptor,  $pEC_{0,5\text{diss}} = 4,09 \pm 0,05$ ;  $M_5$ -Rezeptor,  $pEC_{0,5\text{diss}} = 2,05 \pm 0,16$ ). Der in Tab. 34 aufgeführte Parameter  $p(\alpha \cdot K_A)$  war, wie nach dem Kooperativitätsmodell (Ehlert, 1988) der allosterischen Interaktion zu erwarten, in recht guter Übereinstimmung mit der Affinität des Hexamethoniums zu [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten Rezeptoren ( $pEC_{0,5\text{diss}}$ ). Die mit Hexamethonium durchgeführten Experimente bedeuten, dass dessen einfache chemische Struktur für eine  $M_2/M_5$ -Selektivität der Bindung an freie Rezeptoren ausreicht und nicht zwingend die in vielen allosterischen Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ vorhandenen lateralen Phthalimid- bzw. Naphthalimid-Gruppen für eine  $M_2/M_5$ -Selektivität erforderlich sind. Dieser Befund ist interessant im Hinblick auf die Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6, die eine Hexamethonium-Struktur beinhalten und in denen ausgehend von den allosterischen Modulatoren W84 bzw. Naphmethonium an einer Seite des Moleküls die Phthalimid-Gruppe entfernt und durch einen Rest des orthosterischen Liganden Iperoxo ersetzt wurde.

### 3.14 Beeinflussung der McN-A-343-Affinität durch $M_2^{104}$ Tyrosin und $M_2^{422}$ Tryptophan

McN-A-343 ist wie Pilocarpin ein Partialagonist an Muskarinrezeptoren. Für McN-A-343 ist postuliert worden, dass es Muskarinrezeptoren über die allosterische Bindungsstelle aktiviert (Langmead und Christopoulos, 2006; May et al., 2007b). Die Substanz wird daher von den Autoren als allosterischer Agonist bezeichnet. Es sollte untersucht werden, ob die Affinität von McN-A-343 durch das orthosterische Epitop  $M_2^{104}$ Tyrosin bzw. das allosterische Epitop  $M_2^{422}$ Tryptophan beeinflusst wurde. Abb. 54 zeigt, dass McN-A-343 an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren und den untersuchten punktmutierten Rezeptoren eine starke Inhibition der [ $^3$ H]NMS-Bindung bewirkte.



**Abb. 54:** Bedeutung des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin und des Epitops  $M_2^{422}$ Tryptophan für die Affinität von McN-A-343. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM bei Experimenten mit  $M_2$ -Wildtyprezeptoren bzw.  $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren und 1 nM bei Experimenten mit  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4-8 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische [ $^3$ H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Dies konnte Folge einer kompetitiven Interaktion oder einer allosterischen Interaktion mit stark ausgeprägter negativer Kooperativität sein. Zur Analyse der Bindungsdaten des McN-A-343 mit [ $^3$ H]NMS wurde deskriptiv die Cheng/Prusoff-Korrektur bei den erhaltenen  $IC_{50}$ -Werten angewendet. Die Affinität an der

Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  scheint etwas geringer als an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren zu sein, jedoch war der Unterschied statistisch nicht signifikant. McN-A-343 unterschied sich hier also deutlich von den in Kapitel 3.10 besprochenen orthosterischen Agonisten, bei denen sich starke Affinitätsverluste bei Austausch des  $M_2^{104}$ Tyrosin gegen Alanin ergeben hatten. Die fehlende Abhängigkeit der Affinität von dem orthosterischen Epitop  $M_2^{104}$ Tyrosin spricht für einen veränderten Bindungsmodus des McN-A-343 im Vergleich zu klassischen Agonisten. Ebenfalls nicht verändert im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren war die Affinität des McN-A-343 bei Austausch von  $M_2^{422}$ Tryptophan gegen Alanin. Bei dieser Mutation hatten sich bei den untersuchten orthosterischen Agonisten Affinitätsverluste ergeben. Die Affinität des McN-A-343 an innerhalb der allosterischen Bindungsstelle punktmutierten Rezeptoren, z.B.  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln}$  oder  $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ , wurde nicht untersucht. Die in Tab. 35 zusammengestellten Bindungsparameter zeigen, dass im Gegensatz zu den in Kapitel 3.10 besprochenen orthosterischen Agonisten die Mehrzahl der Experimente mit McN-A-343 durch ein Steilheitsmaß von -1 beschrieben werden konnte.

Rezeptor	$n_H \neq -1$	$n_H$	$pK_{app}$	$\Delta pK_{app}$ ( $M_{mut}-M_2wt$ )
$M_2wt$	1/8	$-0,94 \pm 0,07$	$5,70 \pm 0,09$	-
$M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$	0/4	$-1,63 \pm 0,44$	$5,33 \pm 0,17$	n.s.
$M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	1/4	$-0,81 \pm 0,04$	$5,60 \pm 0,06$	n.s.

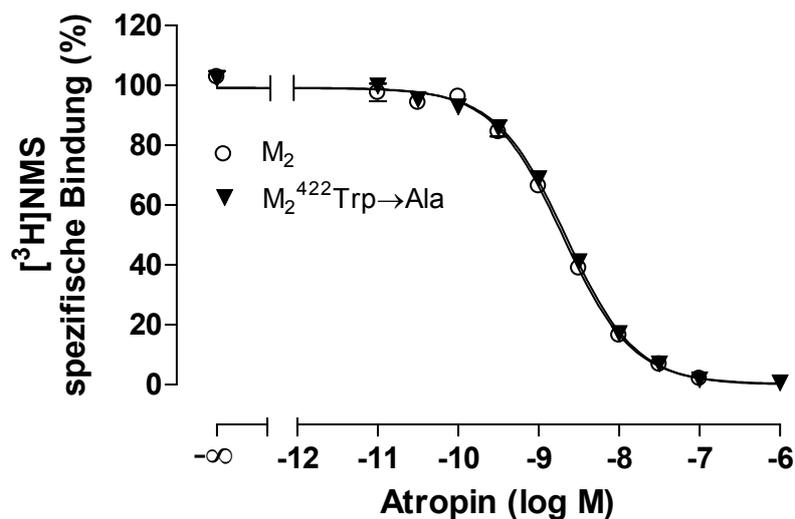
**Tab. 35:** Affinitätskonstanten von McN-A-343 aus Interaktionsexperimenten mit dem Radioantagonisten [ $^3\text{H}$ ]NMS. Die  $IC_{50}$ -Werte der Einzelerperimente wurden mit der Cheng/Prusoff-Korrektur in apparente Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_{app}$  umgewandelt.  $n_H \neq -1$ : Anteil der Experimente mit einem von -1 abweichenden Steilheitsmaß an der Gesamtzahl der Experimente.  $n_H$ : Steilheitsmaß.  $pK_{app}$ : Negativer dekadischer Logarithmus der apparenten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_{app}$ .  $\Delta pK_{app}$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $pK_{app}$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante ( $M_{mut}$ ) und dem  $pK_{app}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_2wt$ ). n.s.: Der Unterschied zwischen dem  $pK_{app}$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem  $pK_{app}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ).

Das für Inhibitionsexperimente mit einem Agonisten untypische Steilheitsmaß von -1 deutete auf einen veränderten Bindungsmodus des McN-A-343 im Vergleich zu orthosterischen Agonisten hin. Die Experimente an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ , bei

der die Radioligand-Affinität deutlich vermindert ist, wiesen eine starke Streuung des Steilheitsmaßes  $n_H$  auf.

### 3.15 Beeinflussung der Atropin-Affinität durch $M_2^{422}$ Tryptophan

Atropin ähnelt in seiner chemischen Struktur dem N-Methylscopolamin. Wie NMS gehört es zur Gruppe der Tropan-Alkaloide. Es wurde untersucht, ob die Affinität dieses Antagonisten durch Mutation der Aminosäure  $M_2^{422}$ Tryptophan beeinflusst wurde, da sich eine Bedeutung dieses Epitops für die Affinität orthosterischer Agonisten gezeigt hatte (siehe Kapitel 3.10). Wie aus Abb. 55 ersichtlich wird, waren die Inhibitionskurven des Atropins an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren und an der Mutante  $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$  nahezu deckungsgleich.



**Abb. 55:** Bedeutung der Aminosäure  $M_2^{422}$ Tryptophan für die Atropin-Affinität. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Die Inhibitionskonstanten  $K_i$  an diesen beiden Rezeptoren unterschieden sich nicht signifikant. Der Antagonist Atropin zeigte hier eine andere Epitop-abhängigkeit der Bindung als die klassischen Agonisten, bei denen sich Affinitätsverluste bei Austausch des  $M_2^{422}$ Tryptophan gegen Alanin ergeben hatten. Die Konkurrenzexperimente zwischen [ $^3\text{H}$ ]NMS und Atropin konnten in der Mehrzahl

durch ein Steilheitsmaß  $n_H$  von -1 beschrieben werden, sodass nach Cheng und Prusoff Inhibitionskonstanten  $K_i$  berechnet werden konnten (siehe Tab. 36).

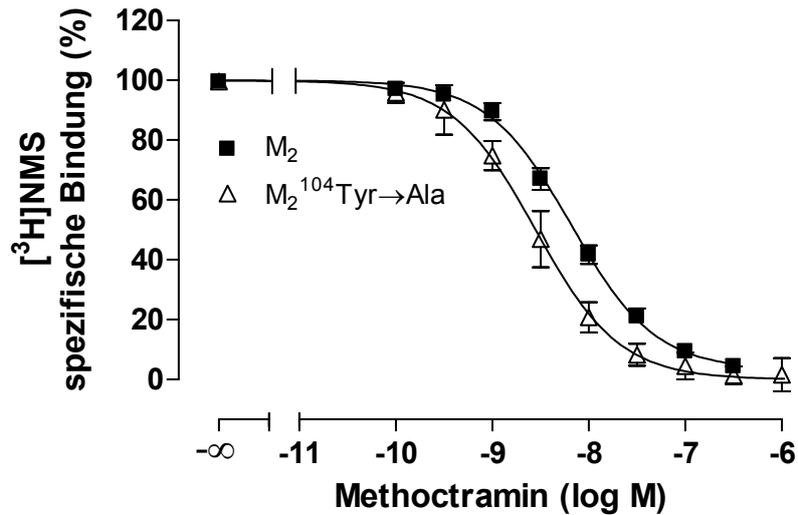
Rezeptor	$n_H \neq -1$	$n_H$	$pK_i$	$\Delta pK_i$ ( $M_{mut}-M_{2wt}$ )
$M_2wt$	0/4	$-0,94 \pm 0,03$	$9,18 \pm 0,01$	-
$M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$	2/4	$-0,95 \pm 0,09$	$9,21 \pm 0,01$	n.s.

**Tab. 36:** Inhibitionskonstanten des Atropins aus heterologen Konkurrenzexperimenten mit dem Radioantagonisten [ $^3H$ ]NMS. Die  $IC_{50}$ -Werte der Einzelexperimente wurden mit der Cheng/Prusoff-Korrektur in Inhibitionskonstanten  $K_i$  umgewandelt.  $n_H \neq -1$ : Anteil der Experimente mit einem von -1 abweichenden Steilheitsmaß an der Gesamtzahl der Experimente.  $n_H$ : Steilheitsmaß.  $pK_i$ : Negativer dekadischer Logarithmus der Inhibitionskonstanten  $K_i$ .  $\Delta pK_i$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $pK_i$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante ( $M_{mut}$ ) und dem  $pK_i$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_{2wt}$ ). n.s.: Der Unterschied zwischen dem  $pK_i$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem  $pK_i$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ).

### 3.16 Beeinflussung der Methoctramin-Affinität durch

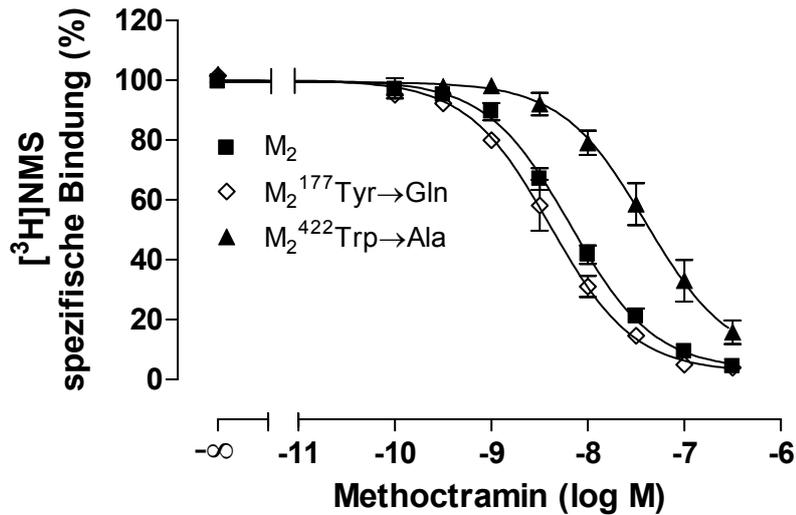
#### $M_2^{104}$ Tyrosin, $M_2^{177}$ Tyrosin und $M_2^{422}$ Tryptophan

Beim Methoctramin handelt es sich um einen Muskarinrezeptorantagonisten, der im Vergleich zu den anderen Subtypen die höchste Affinität zum  $M_2$ -Rezeptor aufweist. Für Methoctramin ist neben einer kompetitiven Interaktion an der orthosterischen Bindungsstelle ein allosterisches Bindungsverhalten am  $M_2$ -Rezeptor postuliert worden (Melchiorre et al., 1987; Giraldo et al., 1988). Es sollte untersucht werden, ob die Affinität des Methoctramins durch das orthosterische Epitop  $M_2^{104}$ Tyrosin bzw. die allosterischen Epitope  $M_2^{177}$ Tyrosin und  $M_2^{422}$ Tryptophan beeinflusst wurde. Wie in Abb. 56 gezeigt, schien die Affinität des Methoctramins an der Mutante der orthosterischen Bindungsstelle  $M_2^{104}Tyr \rightarrow Ala$  etwas höher als an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren zu sein, jedoch war der Unterschied statistisch nicht signifikant.



**Abb. 56:** Bedeutung des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin für die Affinität von Methoctramin. Die Radioligandkonzentration im Versuchsansatz betrug 0,2 nM bei Experimenten mit  $M_2$ -Wildtyp-rezeptoren und 1 nM bei Experimenten mit  $M_2^{104}$ Tyr→Ala-Rezeptoren. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 4-6 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische [ $^3$ H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Methoctramin unterschied sich hier also deutlich von typischen orthosterischen Liganden, bei denen durch Austausch von  $M_2^{104}$ Tyrosin gegen Alanin ein Affinitätsverlust ausgelöst wurde. Abb. 57 zeigt, dass der Austausch des allosterischen Epitops  $M_2^{177}$ Tyrosin gegen die korrespondierende Aminosäure im  $M_5$ -Rezeptor Glutamin zu keiner signifikanten Veränderung der Methoctramin-Affinität führte.



**Abb. 57:** Bedeutung der Aminosäure M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan und der Mutation M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin→Glutamin für die Affinität von Methoctramin. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4-6 unabhängigen Experimenten. Ordinate: Spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: Gleichung 7.

Das bei allosterischen Modulatoren für die M<sub>2</sub>-Subtyp-Selektivität wichtige M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin trug demnach nicht zur M<sub>2</sub>-Selektivität des Methoctramins bei. Das Epitop M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan, das ebenfalls als Teil der allosterischen Bindungsstelle des M<sub>2</sub>-Rezeptors angesehen wird, leistete dagegen einen Beitrag zur Affinität des Methoctramins, denn ein Ersetzen dieses Epitops durch Alanin führte zu einem Affinitätsverlust. Aus Tab. 37 geht hervor, dass die Inhibitionskurven des Methoctramins mit [<sup>3</sup>H]NMS, wie für einen Antagonisten zu erwarten, ein Steilheitsmaß  $n_H$  von -1 aufwiesen.

## Ergebnisse

Rezeptor	$n_H \neq -1$	$n_H$	$pK_i$	$\Delta pK_i$ ( $M_{mut}-M_{2wt}$ )
$M_2^{wt}$	0/6	$-1,02 \pm 0,08$	$8,65 \pm 0,04$	-
$M_2^{104Tyr \rightarrow Ala}$	0/4	$-1,14 \pm 0,10$	$8,91 \pm 0,14$	n.s.
$M_2^{177Tyr \rightarrow Gln}$	0/4	$-1,00 \pm 0,04$	$8,72 \pm 0,10$	n.s.
$M_2^{422Trp \rightarrow Ala}$	0/4	$-0,92 \pm 0,07$	$7,92 \pm 0,11$	-0,73

**Tab. 37:** Inhibitionskonstanten des Methoctramins aus Interaktionsexperimenten mit dem Radioantagonisten [ $^3$ H]NMS. Die  $IC_{50}$ -Werte der Einzelexperimente wurden mit der Cheng/Prusoff-Korrektur in Inhibitionskonstanten  $K_i$  umgewandelt.  $n_H \neq -1$ : Anteil der Experimente mit einem von -1 abweichenden Steilheitsmaß an der Gesamtzahl der Experimente.  $n_H$ : Steilheitsmaß.  $pK_i$ : Negativer dekadischer Logarithmus der Inhibitionskonstanten  $K_i$ .  $\Delta pK_i$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $pK_i$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante ( $M_{mut}$ ) und dem  $pK_i$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_2^{wt}$ ). n.s.: Der Unterschied zwischen dem  $pK_i$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante und dem  $pK_i$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor war nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ).



## 4 Diskussion

### 4.1 G-Protein-Kopplung der porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren

Bei den porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren wurde eine Beeinflussung der [<sup>3</sup>H]OxoM-Bindung und eine Beeinflussung der Agonist-Bindung in Konkurrenzexperimenten mit [<sup>3</sup>H]NMS durch Guanylnukleotide untersucht.

Die Inhibitionsversuche mit dem Radioagonisten [<sup>3</sup>H]OxoM und steigenden GDP-Konzentrationen zeigten eine konzentrationsabhängige Verminderung der spezifischen [<sup>3</sup>H]OxoM-Bindung. Der Radioagonist [<sup>3</sup>H]OxoM wurde in einer Konzentration von 1 nM eingesetzt, sodass nur der für Agonisten hochaffine, G-Protein-gekoppelte Rezeptor durch den Radioliganden markiert werden sollte (siehe Kapitel 2.3.3.1). Die beobachtete Verminderung der spezifischen [<sup>3</sup>H]OxoM-Bindung durch steigende GDP-Konzentrationen, d.h. Affinitätsabnahme eines Agonisten, zeigte eine G-Protein-Kopplung der untersuchten porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren an.

In den „GTP-Shift“-Experimenten mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS und Agonisten zeigte sich bei Verwendung von Oxotremorin M und einem GTP-Überschuss eine deutliche Beeinflussung der Agonist-Bindung, d.h. eine Affinitätsabnahme und ein Steilerwerden der Inhibitionskurven im Vergleich zu den Experimenten ohne Nukleotid-Zugabe. Bei den Konkurrenzexperimenten mit [<sup>3</sup>H]NMS und den muskarinischen Agonisten DDT-5 und Iperoxo sowie bei den Experimenten mit Oxotremorin M und Gpp(NH)p als Nukleotid war die Beeinflussung der Agonist-Bindung durch den Nukleotid-Überschuss deutlich geringer ausgeprägt. Der Effekt des Guanylnukleotid-Überschusses war bei diesen Experimenten so gering, dass nicht von einer vollständigen Entkopplung der Rezeptoren von G-Proteinen ausgegangen werden kann bzw. die untersuchten Rezeptoren nur in geringem Ausmaß an G-Proteine gekoppelt waren. Bei diesen Experimenten waren zwei Parameter im Vergleich zu den Experimenten mit Oxotremorin M und GTP variiert worden: Die Inkubationszeit war auf 7,5 h verlängert worden und es handelte sich um ein anderes Hausschwein-Herzventrikelhomogenat. Die äußerst geringe Beeinflussung der Agonist-Bindung bei der verlängerten Inkubationszeit könnte eventuell auf eine Instabilität des

eingesetzten Guanylnukleotids zurückzuführen sein. Diese Möglichkeit kommt jedoch nur beim GTP in Betracht und kaum bei dem eingesetzten Nukleotid-Analogon Gpp(NH)p, da dieses eine erhöhte Hydrolysestabilität aufweist. Es erscheint eher wahrscheinlich, dass das Ausmaß des Effekts einer G-Protein-Entkopplung der Rezeptoren von dem jeweiligen Homogenat abhängt. Der äußerst geringe Guanylnukleotid-Effekt auf die Bindung der muskarinischen Agonisten DDT-5 und Iperoxo könnte Folge einer gering ausgeprägten G-Protein-Kopplung der in dem verwendeten Hausschwein-Herzventrikelhomogenat enthaltenen M<sub>2</sub>-Rezeptoren gewesen sein im Vergleich zu dem Homogenat, das bei den Experimenten mit Oxotremorin M eingesetzt wurde.

## **4.2 G-Protein-Kopplung der in COS7-Zellen exprimierten Muskarinrezeptoren**

Zur Untersuchung des Guanylnukleotid-Effekts auf die Agonist-Bindung von in COS7-Zellen exprimierten Muskarinrezeptoren wurde der endogene Agonist Acetylcholin eingesetzt sowie die Nukleotide GDP und GTP. An M<sub>2</sub>-Rezeptoren verminderte sich die Acetylcholin-Affinität durch einen GDP- bzw. GTP-Überschuss um nicht mehr als 0,1 log-Einheiten. Die Inhibitionskurven in Gegenwart des Guanylnukleotid-Überschusses wiesen überwiegend weiterhin ein flaches, von -1 signifikant abweichendes Steilheitsmaß  $n_H$  auf. Der geringe Effekt auf die Acetylcholin-Bindung war keine Besonderheit des humanen M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptors, sondern zeigte sich auch an der Mutante M<sub>2</sub><sup>422</sup>Trp→Ala, bei der sich für Acetylcholin in Abwesenheit von GDP und in Gegenwart eines GDP-Überschusses eine identische Affinität ergab. Die Beeinflussung der Agonist-Bindung durch Guanylnukleotide bei den in COS7-Zellen exprimierten Muskarinrezeptoren war also gering ausgeprägt im Vergleich zu in der Literatur berichteten Guanylnukleotid-Effekten auf die Bindung von muskarinischen Agonisten mit anderen Expressionssystemen für die Rezeptoren (Tota et al., 1987; van Giersbergen und Leppik, 1995). Ebenfalls aus der Literatur bekannt sind den eigenen Ergebnissen entsprechende Befunde mit transfizierten COS7-Zellen, nämlich die fehlende Beeinflussung der Bindung eines muskarinischen Agonisten durch das GTP-Analogon Gpp(NH)p (Wess et al., 1990; Wess et al., 1991). Waelbroeck et al. (1997) zeigten, dass in Bindungsstudien mit funktionell

wirksamen Agonisten nicht zwangsläufig ein Guanylnukleotid-Effekt vorhanden sein muss.

Bei den Konkurrenzexperimenten zwischen [<sup>3</sup>H]NMS und Acetylcholin an in COS7-Zellen exprimierten humanen M<sub>2</sub>-Rezeptoren, die als Vergleich zu den Experimenten mit Nukleotid-Zugabe durchgeführt wurden, ergaben sich für Acetylcholin apparente Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von ca. 40 nM (Entlogarithmieren von pK<sub>app</sub> = 7,4). Im Vergleich zu Konkurrenzexperimenten zwischen [<sup>3</sup>H]NMS und Acetylcholin unter Verwendung von M<sub>2</sub>-Rezeptoren aus CHO-Zellen in einem anderen Puffersystem bedeutete dies eine höhere Acetylcholin-Affinität (Lazareno und Birdsall, 1995: Acetylcholin, M<sub>2</sub>-Rezeptor, pK<sub>i</sub> = 5,95 ± 0,04; Schmalenbach, Dissertation 2006: Acetylcholin, M<sub>2</sub>-Rezeptor, pK<sub>i</sub> = 6,8; Prilla et al., 2007: Acetylcholin, M<sub>2</sub>-Rezeptor, pK<sub>app</sub> = 6,36 ± 0,11). Die bei den eigenen Experimenten beobachtete hohe Acetylcholin-Affinität deutet darauf hin, dass trotz des fehlenden Nukleotid-Effekts auf die Acetylcholin-Affinität ein für Agonisten hochaffines Kompartiment bei den in COS7-Zellen exprimierten Muskarinrezeptoren vorhanden war.

### **4.3 Kurvenanpassung bei [<sup>3</sup>H]NMS-Agonist-Konkurrenzexperimenten**

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten heterologen Konkurrenzexperimenten zwischen dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS und orthosterischen Agonisten resultierten in großer Mehrzahl Inhibitionskurven mit einem signifikant von -1 verschiedenen Steilheitsmaß n<sub>H</sub>. Damit war eine Bedingung für die Berechnung von Inhibitionskonstanten K<sub>i</sub> nach Cheng und Prusoff nicht erfüllt. Inhibitionskurven mit n<sub>H</sub> ≠ -1 können mit einem Modell, das zwei Bindungsstellen enthält, analysiert werden. Es wird eine Inhibitionskonstante K<sub>i hochaffin</sub> für die hochaffine Bindung des Agonisten an den Rezeptor berechnet sowie eine Inhibitionskonstante K<sub>i niedrigaffin</sub> für die niedrigaffine Bindung. K<sub>i hochaffin</sub> spiegelt die Bindung des Agonisten an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor wider und K<sub>i niedrigaffin</sub> die Bindung des Agonisten an den G-Protein-entkoppelten Rezeptor (Kenakin, 1997). Die Konkurrenzexperimente zwischen [<sup>3</sup>H]NMS und orthosterischen Agonisten an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren wurden biphasisch mit der Berechnung von zwei Inhibitionskonstanten analysiert (siehe Kapitel 3.3.2, Tab.

12). Zwischen den einzelnen Experimenten mit dem gleichen Agonisten ergaben sich dabei teilweise große Unterschiede in den Inhibitionskonstanten und den Kompartimentgrößen. Bei der Anpassung einer Regressionskurve an die Bindungsdaten mit einem Modell, das zwei Bindungsstellen beinhaltet, mussten von der Computersoftware zwei Inhibitionskonstanten und das Verhältnis von hochaffinem zu niedrigaffinem Kompartiment berechnet werden. Diese Anpassung führte bei Inhibitionskurven, die von ihrer Gestalt her nicht biphasisch waren, also keine zwei unterschiedlichen Bindungsstellen anzeigten, wahrscheinlich zu den von Experiment zu Experiment großen Schwankungen der Werte der Inhibitionskonstanten bzw. Kompartimentgrößen. Der ohne die Absicht einer Entscheidung zwischen einem Modell mit einer oder zwei Bindungsstellen durchgeführte Vergleich, ob die in Kapitel 3.3.2 dargestellten Inhibitionsexperimente mit [<sup>3</sup>H]NMS und Agonisten besser durch eine Kurvenanpassung mit der „4-Parameter-logistischen Gleichung“ mit variablem Steilheitsmaß  $n_H$  (Gleichung 7) oder durch eine biphasische Kurvenanpassung (Gleichung 18) beschrieben wurden, ergab in der großen Mehrzahl eine bessere Anpassung durch Gleichung 7 (F-Test, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ). Die Berechnung von zwei Inhibitionskonstanten sowie Kompartimentgrößen erschien sinnvoll bei Inhibitionskurven, die von ihrer Gestalt her biphasisch waren und somit zwei unterschiedliche Bindungsstellen anzeigten (siehe Kapitel 3.3.2, Abb. 17). Die Inhibitionskurven des Oxotremorin M mit [<sup>3</sup>H]NMS an porcinen  $M_2$ -Rezeptoren waren von ihrer Gestalt her biphasisch, während bei den übrigen Konkurrenzexperimenten mit Agonisten an porcinen  $M_2$ -Rezeptoren sowie bei den gesamten Konkurrenzexperimenten mit Agonisten an in COS7-Zellen exprimierten Muskarinrezeptoren aus dem Verlauf der Inhibitionskurven nicht das Vorliegen von zwei unterschiedlichen Bindungsstellen deutlich wurde. Daher wurde bei den Bindungsdaten der Konkurrenzexperimente zwischen [<sup>3</sup>H]NMS und orthosterischen Agonisten an in COS7-Zellen exprimierten Muskarinrezeptoren auf eine biphasische Analyse verzichtet. Bei diesen Daten wurde die Cheng/Prusoff-Korrektur auf die  $IC_{50}$ -Werte angewendet und es wurden aufgrund des signifikant von -1 abweichenden Steilheitsmaßes  $n_H$  apparente Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_{app}$  berechnet. Der Vergleich der apparenten Affinitätskonstanten  $pK_{app}$  zeigte, wie sich die Affinität von Agonisten bei der Mutation von einzelnen Aminosäuren im Vergleich zu Wildtyprezeptoren veränderte. Für eine präzise biphasische Analyse der Inhibitionskurven der

Agonisten an klonierten Muskarinrezeptoren wäre wahrscheinlich eine genauere Beschreibung des Kurvenverlaufs erforderlich gewesen, d.h. ein geringerer Abstand zwischen den Konzentrationen des jeweiligen Agonisten im Kompetitions-experiment und damit ein wesentlich größerer experimenteller Aufwand. In den Konkurrenzexperimenten mit [<sup>3</sup>H]NMS waren die Agonisten in 0,5-Dekaden-Konzentrationsschritten eingesetzt worden. Das zur Analyse dieser Experimente eingesetzte Verfahren der Berechnung von apparenten Affinitätskonstanten  $pK_{app}$  ist aus der Literatur bekannt (Mei et al., 1991; Wess et al., 1991; Heitz et al., 1999; Ford et al., 2002).

#### **4.4 Befunde zur Kinetik der [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Dissoziationskinetik des Radioliganden [<sup>3</sup>H]OxoM an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren unter verschiedenen Versuchsbedingungen im Hinblick auf eine Mono- oder Biphazizität untersucht. Mittels eines F-Tests wurde bei den einzelnen Experimenten geprüft, ob der Dissoziationsverlauf besser durch eine mono- oder biexponentielle Funktion beschrieben wurde.

Hirschberg und Schimerlik (1994) fanden bei in CHO-Zellen exprimierten porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren in Abhängigkeit von der Expressionsrate der Rezeptoren und der fraktionellen Rezeptorbesetzung für [<sup>3</sup>H]OxoM monophasische und biphasische Dissoziationsverläufe. Maaß (Dissertation 1995) und Großmüller (Dissertation 2003) fanden bei aus Hausschwein-Herzventrikelhomogenat gewonnenen M<sub>2</sub>-Rezeptoren überwiegend, jedoch nicht ausschließlich, biphasische Dissoziationsverläufe. Die [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziationsexperimente von Maaß wurden in Mg,P<sub>i</sub>,Tris-Puffer (3,6 mM MgHPO<sub>4</sub>, 50 mM Tris/HCl, pH = 7,3, 23°C) durchgeführt, während bei der Mehrzahl der Dissoziationsexperimente von Großmüller in Na,K,P<sub>i</sub>-Puffer (4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 7,4, 23°C) gearbeitet wurde. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zur [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziationskinetik an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren in Na,K,P<sub>i</sub>-Puffer konnte weder durch eine Erniedrigung der Temperatur auf 13°C noch durch eine Variation der Radioligandkonzentration erreicht werden, dass nur noch mono- bzw. biphasische Dissoziationsverläufe des Radioliganden vorgelegen hätten. Durch die bei einer Erniedrigung der Inkubationstemperatur auf 13°C eintretende Verlangsamung der

Dissoziationskinetik sollten Bedingungen hergestellt werden, unter denen eine schnelle Phase der [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation besser erfasst werden konnte und somit eine Biphasizität des Dissoziationsverlaufs besser sichtbar geworden wäre. Ein Großteil der Dissoziationsverläufe des [<sup>3</sup>H]OxoM bei 13°C wurde jedoch durch eine monophasische Funktion ausreichend beschrieben. Bei Betrachtung aller [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziationsexperimente an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren unter Kontrollbedingungen, d.h. in Abwesenheit einer dissoziationsverzögernd wirksamen Testsubstanz, ergab sich ungefähr ein Anteil von 50 % monophasischen und 50 % biphasischen Dissoziationsverläufen (28 monophasische Dissoziationsverläufe, 27 biphasische Dissoziationsverläufe). Bei den Experimenten, die im Vergleich zu anderen Experimenten einen geringeren Unterschied zwischen [<sup>3</sup>H]OxoM-Gesamtbindung beim Dissoziationsstart und unspezifischer Bindung des Radioliganden aufwiesen, zeigte sich ein Überwiegen von monophasischen Dissoziationsverläufen. Biphasische Dissoziationsverläufe wurden also eher bei einem größeren Messfenster, d.h. größeren Unterschied zwischen Gesamtbindung des Radioliganden beim Dissoziationsstart und unspezifischer Bindung, gesehen.

Als Ursache der biphasischen [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation käme eine Dissoziation von unterschiedlichen Rezeptorzuständen in Betracht: Das schnelle Kompartiment der [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation könnte der Dissoziation von für Agonisten niedrigaffinen, G-Protein-entkoppelten Rezeptoren entsprechen und das langsame Kompartiment der Dissoziation von für Agonisten hochaffinen, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Durch Zugabe eines GTP-Überschusses sollte es in diesem Fall möglich sein, durch eine quantitative Entkopplung der Rezeptoren von G-Proteinen wiederum eine Monophasizität des Dissoziationsverlaufs herbeizuführen. Entsprechende Experimente wurden von Maaß (Dissertation 1995) durchgeführt, jedoch war die [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation in Gegenwart eines GTP-Überschusses weiterhin biphasisch. Gillard et al. (1987) fanden bei Muskarinrezeptoren aus Rattencortex in Abwesenheit von GTP und in Gegenwart eines GTP-Überschusses biphasische [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziationsverläufe. Diese Befunde sprechen gegen die Hypothese, dass eine unterschiedliche G-Protein-Kopplung der Rezeptoren Ursache der teilweise biphasischen [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation war. Hirschberg und Schimerlik (1994) erklärten die beiden Phasen der [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation an porcinen M<sub>2</sub>-Rezeptoren mit Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen:

Nach Bildung von Rezeptordimeren kann eine Dissoziation des Radioliganden sowohl von diesen Dimeren als auch von monomeren Rezeptoren stattfinden, d.h. durch die Dimerbildung kommt es zur Entstehung von unterschiedlichen [<sup>3</sup>H]OxoM-Bindungsstellen. Die biologische Bedeutung einer biphasischen [<sup>3</sup>H]OxoM-Dissoziation bleibt somit weiterhin unklar.

#### **4.5 Epitopabhängigkeit der Bindung der allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzte Rezeptoren**

Die beiden allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 wurden in Zweipunkt-Kinetik-Experimenten mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS auf ihre dissoziationsverzögernde Wirksamkeit untersucht. Es wurde die M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität der Bindung an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzte Rezeptoren ermittelt und inwieweit diese Selektivität auf die von Experimenten mit allosterischen Modulatoren her bekannten Epitope M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin zurückzuführen war: Der Austausch dieser beiden Aminosäuren durch die korrespondierenden Aminosäuren im M<sub>5</sub>-Rezeptor, also die Mutationen M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→His, hatten zu einer deutlichen Abnahme der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit typischer allosterischer Modulatoren geführt (Voigtländer et al., 2003). Außerdem wurden die Hybridsubstanzen in Dissoziationsexperimenten an den Mutanten M<sub>2</sub><sup>422</sup>Trp→Ala und M<sub>2</sub><sup>427</sup>Trp→Ala untersucht. Die beiden Aminosäuren M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan und M<sub>2</sub><sup>427</sup>Tryptophan sind im M<sub>2</sub>- und M<sub>5</sub>-Rezeptor konserviert. Prilla et al. (2006) hatten eine Abnahme der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von typischen allosterischen Modulatoren bei der Mutation M<sub>2</sub><sup>422</sup>Trp→Ala gefunden, nicht aber bei der Mutation M<sub>2</sub><sup>427</sup>Trp→Ala.

Die Hybridsubstanzen zeigten eine ausgeprägte M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität der Bindung an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzte Rezeptoren. Die M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität des Naphmethonium-artigen Hybrids MMH5-6 war dabei deutlich größer als die des W84-artigen Hybrids DDT-5: Die Affinität des MMH5-6 zu [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten M<sub>2</sub>-Rezeptoren, berechnet als pEC<sub>0,5diss</sub>-Wert, war um 2,95 log-Einheiten größer als die Affinität zu M<sub>5</sub>-Rezeptoren. Dieser Affinitätsunterschied in der Bindung an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzte M<sub>2</sub>- bzw. M<sub>5</sub>-Rezeptoren betrug beim DDT-5 2,10 log-Einheiten. Die vom Naphmethonium bzw. EHW477 bekannte größere M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität der Bindung an

[<sup>3</sup>H]NMS-besetzte Rezeptoren im Vergleich zu W84 bzw. SH30 (Prilla, Dissertation 2006) blieb also in den Hybridsubstanzen erhalten.

Die Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 zeigten eine verminderte dissoziationsverzögernde Wirksamkeit bei Mutation der für die M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität von typischen allosterischen Modulatoren wichtigen Epitope M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin. Die M<sub>2</sub>-präferente Bindung des DDT-5 an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzte Rezeptoren konnte vollständig durch die Epitope M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin erklärt werden, denn der pEC<sub>0,5diss</sub>-Wert an der Doppelmutante M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln + <sup>423</sup>Thr→His unterschied sich nicht signifikant von dem pEC<sub>0,5diss</sub>-Wert an M<sub>5</sub>-Wildtyprezeptoren. Die Hybridsubstanz DDT-5 verhielt sich ähnlich wie der allosterische Modulator W84, dessen M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität der Bindung an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzte Rezeptoren ebenfalls vollständig durch die beiden genannten Epitope erklärt werden konnte (Prilla, Dissertation 2006). Beim MMH5-6 konnte die M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität nicht vollständig durch diese beiden Epitope erklärt werden, denn die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit an der Doppelmutante M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln + <sup>423</sup>Thr→His war signifikant höher als die Wirksamkeit an M<sub>5</sub>-Wildtyprezeptoren. MMH5-6 verhielt sich an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren ähnlich dem verkürzten Naphmethonium-Derivat EHW477, dessen M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität ebenfalls nicht ausschließlich durch die beiden Epitope M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin erklärt werden konnte (Prilla, Dissertation 2006).

Sowohl beim DDT-5 als auch beim MMH5-6 führte der Austausch von M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan gegen Alanin in Experimenten an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren zu einer deutlichen Verminderung der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit. Demgegenüber wurde die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit der Hybridsubstanzen bei Austausch von M<sub>2</sub><sup>427</sup>Tryptophan gegen Alanin nicht signifikant verändert. Die Befunde zeigen, dass M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan ein für die Bindung der Hybridsubstanzen an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzte Rezeptoren wichtiges Epitop war, während M<sub>2</sub><sup>427</sup>Tryptophan keine Bedeutung hatte. Im Bezug auf die konservierten Aminosäuren M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan und M<sub>2</sub><sup>427</sup>Tryptophan zeigte sich somit ein Bindungsverhalten, das von Alkan-Bisammonium-Typ-Modulatoren her bekannt war (Prilla et al., 2006).

Mit der Bedeutung der Epitope M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin für die M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Subtyp-Selektivität sowie der Bedeutung des konservierten M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan für die Subtyp-unabhängige Affinität wiesen DDT-5 und MMH5-6 an [<sup>3</sup>H]NMS-

besetzten Rezeptoren eine Epitopabhängigkeit der Bindung auf, die zuvor bereits bei typischen allosterischen Modulatoren gefunden worden war.

## 4.6 Epitopabhängigkeit der Bindung orthosterischer Agonisten an M<sub>2</sub>-Rezeptoren

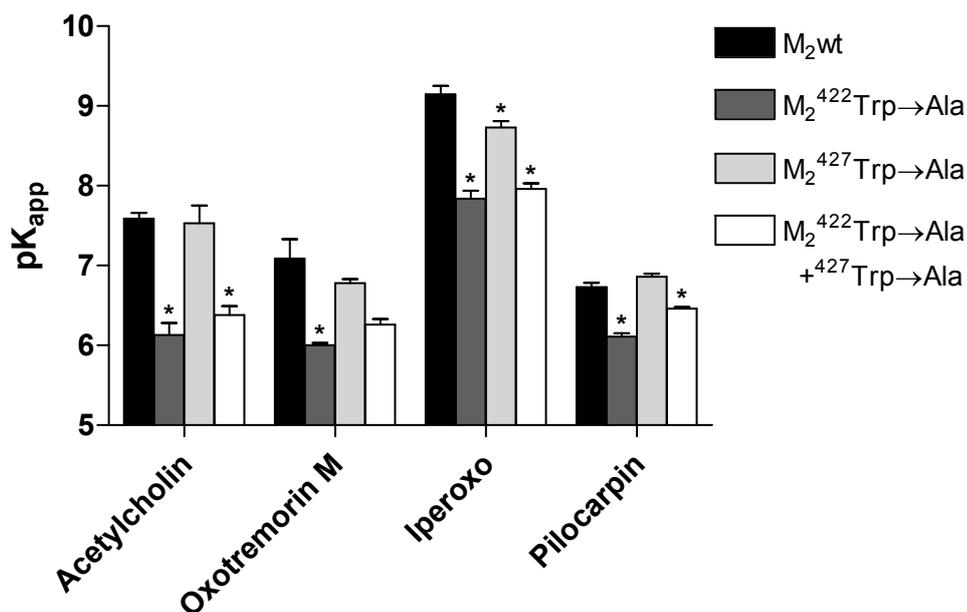
Als Vergleich zu der Epitopabhängigkeit der allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen wurde das Bindungsverhalten orthosterischer Agonisten in Gleichgewichts-Bindungsexperimenten mit [<sup>3</sup>H]NMS untersucht. Es wurden punktmutierte Rezeptoren eingesetzt, bei denen bekannte Epitope der allosterischen Bindungsstelle des M<sub>2</sub>-Rezeptors (M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin, M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin) bzw. M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle mutiert worden waren. Die M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin-Mutanten dienten als Modellrezeptoren zur Detektion einer Interaktion mit der orthosterischen Bindungsstelle bzw. der N-Methylscopolamin-Bindungsstelle. Als klassische Agonisten an Muskarinrezeptoren wurden der endogene Agonist Acetylcholin, Oxotremorin M, das vom Oxotremorin M abgeleitete Derivat Iperoxo und der Partialagonist Pilocarpin eingesetzt. Bei diesen Agonisten zeigte sich ein massiver Affinitätsverlust bei Austausch von M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin gegen Alanin. Die Abnahme der apparenten Affinitätskonstanten pK<sub>app</sub> an der Mutante M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala im Vergleich zu M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren betrug zwischen 2,46 log-Einheiten beim Pilocarpin und 3,57 log-Einheiten beim Acetylcholin. Diese Mutation des M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle hatte also einen wesentlich größeren Effekt auf die Agonist-Bindung im Vergleich zum Effekt auf die Affinität des Antagonisten [<sup>3</sup>H]NMS ( $\Delta pK_D$  M<sub>2</sub>wt - M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala = 1,02). Um eine ausreichende spezifische Radioligandbindung zu erreichen und wegen der stark beschleunigten [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation wurde bei den Experimenten an den Mutanten M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala und M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ser eine erhöhte Radioligandkonzentration von 1 nM eingesetzt und die Filtermatte nur einmal statt wie bei den übrigen Experimenten zweimal mit Puffer gespült. Daraus ergab sich eine größere Streuung der einzelnen Messwerte (siehe Kapitel 3.10, Abb. 32; Abb. 37), sodass die Inhibitionskurven nicht so harmonisch wie bei Untersuchung von Muskarinrezeptoren aussahen, die nicht innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle verändert worden waren. Die Kompetitionsexperimente zwischen [<sup>3</sup>H]NMS und den klassischen Agonisten Acetylcholin,

Oxotremorin M, Iperoxo und Pilocarpin an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  ließen sich im Gegensatz zu der großen Mehrzahl der Experimente mit nicht innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle veränderten Muskarinrezeptoren fast alle durch ein Steilheitsmaß  $n_H$  von -1 beschreiben. Im Hinblick auf das Steilheitsmaß  $n_H$  verhielten sich die Agonisten an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  also wie Antagonisten. Diese Abweichung von dem für Agonisten typischen Bindungsverhalten könnte auf die wesentlich größere Streuung der einzelnen Messwerte bei Untersuchung dieser Mutante zurückzuführen gewesen sein. Die in den Radioligand-Bindungsstudien eingesetzten Agonisten wurden jedoch noch nicht in funktionellen Experimenten an  $M_2^{104}$ Tyrosin-Mutanten untersucht, sodass der Grund der untypischen Kurvensteilheit auch eine verminderte oder sogar aufgehobene intrinsische Aktivität der Agonisten an  $M_2^{104}$ Tyrosin-Mutanten sein könnte. Bei Mutation der korrespondierenden Aminosäure im  $M_1$ -Rezeptor,  $M_1^{106}$ Tyrosin zu Alanin, hatte sich ein Verlust der agonistischen Wirksamkeit von Carbachol gezeigt (Spalding et al., 2006).

Bei den untersuchten Agonisten zeigte sich an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  ein Affinitätsverlust im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren, der deutlich geringer ausgeprägt war als an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ : Die Abnahme der apparenten Affinitätskonstanten  $pK_{app}$  an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  betrug zwischen 0,34 log-Einheiten beim Pilocarpin und 1,44 log-Einheiten beim Iperoxo. Sowohl die Hydroxylgruppe als auch der Phenylring des Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin leisteten also einen Beitrag zur Affinität dieser Agonisten, wobei der Beitrag der Hydroxylgruppe geringer war als der des Phenylrings. Das Steilheitsmaß  $n_H$  der Inhibitionskurven der Agonisten an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  war bei der großen Mehrzahl der Experimente nicht signifikant verschieden von -1. Auch bei dieser Mutante zeigte sich eine Abweichung von dem für Agonisten typischen Bindungsverhalten. An der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ser}$  wurde von den orthosterischen Agonisten nur Iperoxo untersucht: Der Affinitätsverlust im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren war deutlich größer als an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$ , aber etwas geringer als an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ . Dies belegte die größere Bedeutung des Phenylrings im Vergleich zu der Hydroxylgruppe des Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin für die Agonist-Affinität. Wie bei den übrigen  $M_2^{104}$ Tyrosin-Mutanten ließen sich die Inhibitionskurven des Iperoxo an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ser}$  überwiegend durch ein Steilheitsmaß  $n_H$  von -1 beschreiben. Das für Inhibitionsexperimente mit Agonisten untypische

Steilheitsmaß könnte ein Hinweis auf eine Veränderung der intrinsischen Aktivität des Agonisten sein.

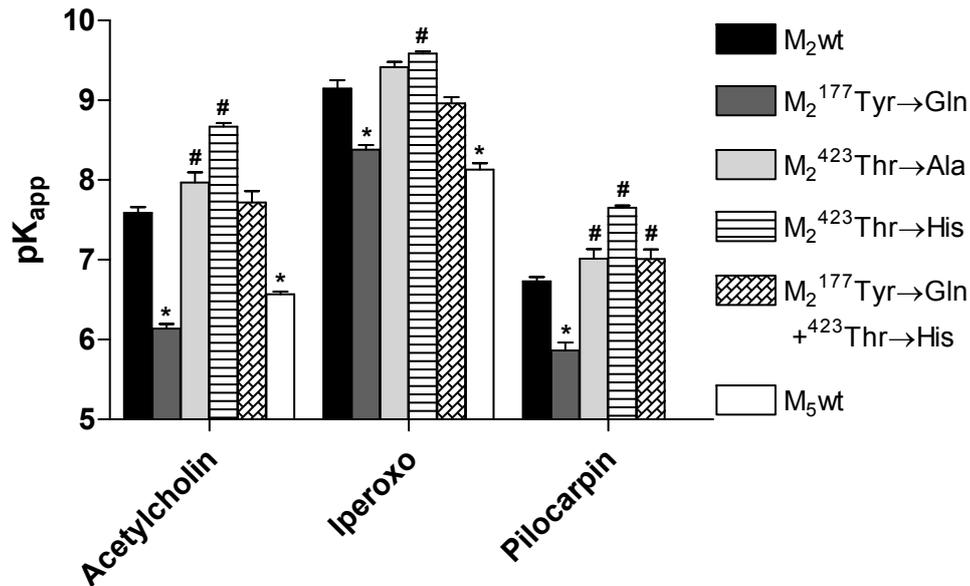
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Affinität orthosterischer Agonisten an Punktmutanten der im  $M_2$ - und im  $M_5$ -Rezeptor konservierten Aminosäuren  $M_2^{422}$ -Tryptophan und  $M_2^{427}$ -Tryptophan ermittelt. Prilla et al. (2006) hatten diese Aminosäuren im Hinblick auf das Bindungsverhalten allosterischer Modulatoren untersucht und dabei eine wichtige Bedeutung von  $M_2^{422}$ -Tryptophan für die Bindung der Modulatoren an freie und  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzte Rezeptoren gefunden. Matsui et al. (1995) hatten in Untersuchungen mit punktmutierten  $M_1$ -Rezeptoren bei Mutation des zu  $M_2^{422}$ -Tryptophan korrespondierenden  $M_1^{400}$ -Tryptophan zu Alanin einen Affinitätsverlust des allosterischen Modulators Gallamin, aber auch des orthosterischen Agonisten Acetylcholin gefunden. Wie in Abb. 58 gezeigt, führte der Austausch von  $M_2^{422}$ -Tryptophan gegen Alanin bei allen untersuchten orthosterischen Agonisten zu einem signifikanten Affinitätsverlust.



**Abb. 58:** Affinitätskonstanten orthosterischer Agonisten aus heterologen Kompetitions-experimenten mit dem Radioantagonisten  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren und Punktmutanten der konservierten Tryptophane  $M_2^{422}$ -Tryptophan und  $M_2^{427}$ -Tryptophan. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 2-13 unabhängigen Experimenten.  $\text{pK}_{\text{app}}$ : Negativer dekadischer Logarithmus der apparenten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten  $K_{\text{app}}$ . \*: Der  $\text{pK}_{\text{app}}$ -Wert an der jeweiligen Rezeptormutante war signifikant niedriger als der  $\text{pK}_{\text{app}}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor (t-Test,  $p < 0,05$ ).

Bei der Aminosäure  $M_2^{422}$ Tryptophan handelte es sich also nicht um ein rein allosterisches Epitop, das nur für die Bindung allosterischer Modulatoren wichtig ist, sondern um ein bifunktionelles Epitop, das auch die Bindung von orthosterischen Agonisten beeinflusst. Mit diesem Affinitätsverlust bei Mutation des Epitops  $M_2^{422}$ Tryptophan zeigte sich ein deutlicher Unterschied des Bindungsverhaltens der Agonisten im Vergleich zu Antagonisten: Sowohl beim N-Methylscopolamin ( $pK_D$ -Wert) als auch beim Atropin ( $pK_I$ -Wert) führte der Austausch von  $M_2^{422}$ Tryptophan gegen Alanin zu keiner signifikanten Veränderung der Affinität im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Dies deutet darauf hin, dass die untersuchten orthosterischen Agonisten andersartig an  $M_2$ -Rezeptoren binden als Antagonisten. An der Mutante  $M_2^{427}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$  war die Affinität der orthosterischen Agonisten mit Ausnahme des Iperoxo, bei dem sich ein geringer Affinitätsverlust zeigte, nicht signifikant verändert im Vergleich zum  $M_2$ -Wildtyprezeptor. Der Affinitätsverlust an der Doppelmutante  $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala} + ^{427}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$  entsprach gut dem Affinitätsverlust, der durch den alleinigen Austausch des  $M_2^{422}$ Tryptophan gegen Alanin ausgelöst worden war. Die an der Doppelmutante erhobenen Befunde bestätigten die Bedeutung des Epitops  $M_2^{422}$ Tryptophan für die Agonist-Bindung und die fehlende Bedeutung der Aminosäure  $M_2^{427}$ Tryptophan.

Wie aus Abb. 59 hervorgeht, war sowohl die Affinität des endogenen Agonisten Acetylcholin als auch die Affinität des Iperoxo zu  $M_2$ -Rezeptoren signifikant höher als zu  $M_5$ -Rezeptoren. Für beide Agonisten ergab sich aus der Differenz der apparenten Affinitätskonstanten eine  $M_2/M_5$ -Selektivität der Bindung von gerundet 1,0 log-Einheiten.



**Abb. 59:** Affinitätskonstanten orthosterischer Agonisten aus heterologen Kompetitions-experimenten mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS an M<sub>2</sub>- und M<sub>5</sub>-Wildtyprezeptoren sowie Punktmutanten der allosterischen Epitope M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 2-13 unabhängigen Experimenten. pK<sub>app</sub>: Negativer dekadischer Logarithmus der apparenten Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K<sub>app</sub>. \*: Der pK<sub>app</sub>-Wert an der jeweiligen Rezeptormutante war signifikant niedriger als der pK<sub>app</sub>-Wert am M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptor (t-Test, p < 0,05). #: Der pK<sub>app</sub>-Wert an der jeweiligen Rezeptormutante war signifikant höher als der pK<sub>app</sub>-Wert am M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptor (t-Test, p < 0,05).

Die Agonisten Acetylcholin, Oxotremorin M und Iperoxo zeigten an der Doppelmutante der allosterischen Bindungsstelle M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln + M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→His im Vergleich zu M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren eine unveränderte Affinität, die Affinität des Pilocarpins war um weniger als 0,3 log-Einheiten erhöht. Zunächst deuteten diese Befunde darauf hin, dass die Bindung dieser orthosterischen Agonisten nicht durch Mutationen in der allosterischen Bindungsstelle beeinflusst wurde.

Beim Acetylcholin, Iperoxo und Pilocarpin wurden nach Untersuchung der Doppelmutante auch die Einzelmutanten M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→His untersucht. Hierbei zeigten sich bei diesen Agonisten jedoch deutliche Affinitätsänderungen im Vergleich zu M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren: Der Austausch von M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin gegen die korrespondierende Aminosäure im M<sub>5</sub>-Rezeptor, Glutamin, führte zu einem Affinitätsverlust, der Austausch von M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin gegen Histidin zu einem Affinitätsgewinn (siehe Abb. 59). Der Affinitätsverlust durch die Mutation M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln und der Affinitätsgewinn durch die Mutation M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→His

verhielten sich dabei annähernd additiv, d.h. durch Addition der beiden Differenzen im Vergleich zu M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren ergab sich etwa die unveränderte Affinität bei der Doppelmutation M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln + <sup>423</sup>Thr→His. Die beobachteten Affinitätsänderungen der orthosterischen Agonisten ergaben sich bei Austausch der allosterischen Epitope M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin gegen die korrespondierenden Aminosäuren im M<sub>5</sub>-Rezeptor. Die veränderte Affinität konnte somit Folge einer direkten Interaktion der Agonisten mit dem mutierten Epitop sein oder Folge der Einführung einer M<sub>5</sub>-Rezeptor-Aminosäure an der Position M<sub>2</sub><sup>177</sup> bzw. M<sub>2</sub><sup>423</sup> des M<sub>2</sub>-Rezeptors. Um diese Frage zu untersuchen, wurden Bindungsstudien mit der Mutante M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→Ala durchgeführt. Die Mutante M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Ala stand noch nicht zur Verfügung. Beim Acetylcholin und Pilocarpin war der Affinitätsgewinn durch die Mutation M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→Ala wesentlich geringer als bei der Mutation M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→His, beim Iperoxo war die Affinität an der Mutante M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→Ala nicht signifikant verändert im Vergleich zu M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren. Die geringen Affinitätsänderungen an der Mutante M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→Ala sprechen dafür, dass die deutlich erhöhte Affinität der Agonisten an der Mutante M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→His ein indirekter Effekt durch die Einführung der Aminosäure Histidin war. Die Befunde legen nahe, dass M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin selbst kein Interaktionspartner bei der Bindung der untersuchten orthosterischen Agonisten war. Dennoch könnte M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin in Analogie zum M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan wegen seiner Bedeutung für die Bindung von sowohl allosterischen Modulatoren als auch orthosterischen Agonisten als allosterisch/orthosterisches Epitop angesehen werden. Als Ursache der erhöhten Affinität an der Mutante M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→His kommt eine Veränderung der Dissoziationskinetik der Agonisten durch die Einführung des Histidin-Restes in Betracht: Im Vergleich zum Threonin handelt es sich beim Histidin um eine sperrige Aminosäure. Die allosterische Bindungsstelle des M<sub>2</sub>-Rezeptors befindet sich im Bereich der extrazellulären Schleifen des Rezeptorproteins oberhalb der orthosterischen Bindungsstelle, die im Bereich der transmembranären Domänen lokalisiert ist (Tränkle und Mohr, 1997; Gnagey et al., 1999; Ellis und Seidenberg, 2000; Jensen und Spalding, 2004). Das durch Mutation eingeführte Histidin an der Position M<sub>2</sub><sup>423</sup> könnte sich im Verlauf des Dissoziationsweges von Agonisten aus der orthosterischen Bindungsstelle befinden. Eine Erschwerung der Dissoziation aus der orthosterischen Bindungsstelle würde zu einer erhöhten Affinität des Agonisten führen. Denkbar wäre auch eine Beeinflussung des benachbarten

M<sub>2</sub><sup>422</sup>Tryptophan durch Histidin in der Position M<sub>2</sub><sup>423</sup>, sodass eine verbesserte Bindung der Agonisten ermöglicht würde oder hierdurch die Dissoziationskinetik von Agonisten verändert würde.

An der Mutante M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln zeigten die Agonisten einen Affinitätsverlust im Vergleich zu M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Agonisten bei der Bindung direkt mit M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin interagieren. In diesem Fall wäre M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin kein rein allosterisches Epitop mehr. Der Affinitätsverlust könnte jedoch auch Folge eines störenden Einflusses der eingeführten Aminosäure Glutamin auf die Agonist-Bindung gewesen sein. Die Bedeutung von M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin sollte durch Herstellung der Punktmutante M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Ala in Zukunft weiter untersucht werden. Bei den untersuchten orthosterischen Agonisten zeigten sich relativ große Veränderungen der Affinität bei Mutation von Epitopen, die auch für die Bindung allosterischer Modulatoren wichtig waren, u.a. bei den Mutationen M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln, M<sub>2</sub><sup>422</sup>Trp→Ala und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→His. Demgegenüber wurde die Affinität des Antagonisten NMS, also der pK<sub>D</sub>-Wert von [<sup>3</sup>H]NMS, durch diese Mutationen kaum verändert: Die [<sup>3</sup>H]NMS-pK<sub>D</sub>-Werte aller Membranpräparationen der genannten punktmutierten Rezeptoren und M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren lagen zwischen 9,80 (M<sub>2</sub><sup>422</sup>Trp→Ala, 08.04.05) und 10,24 (M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→His, 18.09.03). Die größere Beeinflussung der Affinität von Agonisten durch Mutationen im Bereich der allosterischen Bindungsstelle spricht dafür, dass diese andersartig als Antagonisten an M<sub>2</sub>-Rezeptoren binden.

## 4.7 Epitopabhängigkeit der Bindung allosterischer Modulatoren an M<sub>2</sub>-Rezeptoren

In Gleichgewichts-Bindungsexperimenten wurde die Interaktion des Prototyp-Modulators W84 und dessen verkürzten Derivats SH30 sowie des Prototyp-Modulators Naphmethonium und dessen verkürzten Derivats EHW477 mit [<sup>3</sup>H]NMS untersucht. Der Modulator SH30 entsprach dem in der Hybridsubstanz DDT-5 enthaltenen allosterischen Molekülteil, EHW477 dem in der Hybridsubstanz MMH5-6 enthaltenen allosterischen Molekülteil. Die Untersuchung des Bindungsverhaltens der allosterischen Modulatoren an den Mutanten M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala und M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Phe, also innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle punktmutierten M<sub>2</sub>-Rezeptoren, diente als Vergleich zu dem Bindungsverhalten der allosterisch/

orthosterischen Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 an diesen Mutanten. Die Hypothese bezüglich der allosterischen Modulatoren war, dass diese auch wenn die orthosterische Bindungsstelle zugänglich ist, also bei der Interaktion mit freien, nicht Orthoster-besetzten Rezeptoren, an die allosterische Bindungsstelle binden und somit das Bindungsverhalten durch Mutation von  $M_2^{104}$ Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle nicht verändert würde. Bei den allosterischen Modulatoren W84, Naphmethonium und EHW477 war die Affinität, ausgedrückt als Gleichgewichts-Dissoziationskonstante  $K_A$ , an den Mutanten  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  und  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  nicht signifikant verändert im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Beim SH30 zeigte sich dagegen an den Mutanten  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  und  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  eine erhöhte Affinität im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Der Affinitätsgewinn durch Mutation von  $M_2^{104}$ Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle beim SH30 stand im Gegensatz zu den Befunden mit orthosterischen Liganden, die durch diese Mutation stark an Affinität verloren. Da es zu einem Affinitätsgewinn kam, kann dieser nicht damit erklärt werden, dass SH30  $M_2^{104}$ Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle als affinitätsgebendes Epitop nutzt. Der Affinitätsgewinn bei Mutation von  $M_2^{104}$ Tyrosin könnte Folge einer Beeinflussung für die SH30-Bindung wichtiger Epitope durch diese Mutation gewesen sein. Bei W84, der Muttersubstanz des SH30, sowie bei den weiteren Alkan-Bisammonium-Typ-Modulatoren Naphmethonium und EHW477 kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Modulator-Affinität durch Mutation von  $M_2^{104}$ Tyrosin. Vor diesem Hintergrund und aufgrund der bei Experimenten mit innerhalb der orthosterischen Bindungsstelle punktmutierten Rezeptoren erhöhten Streuung der Messwerte erscheint eine biologische Bedeutung der gering erhöhten Affinität des SH30 bei Mutation von  $M_2^{104}$ Tyrosin unwahrscheinlich. Das Ausmaß der negativen Kooperativität mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  der Modulatoren W84 und SH30 war an  $M_2^{104}$ Tyrosin-Mutanten größer als an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren. Die Kooperativität eines allosterischen Modulators mit einem orthosterischen Liganden ergibt sich aus dem Verhältnis der Affinität des Modulators zu freien Rezeptoren und der Affinität des Modulators zu Ligand-besetzten Rezeptoren (siehe Kapitel 2.3.4). Die Affinität der Modulatoren zu freien Rezeptoren wurde sowohl an den  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ - und  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$ -Mutanten als auch an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren bestimmt. Da die Affinität des W84 zu freien Rezeptoren bei Mutation von  $M_2^{104}$ Tyrosin nicht signifikant verändert wurde, könnte die veränderte

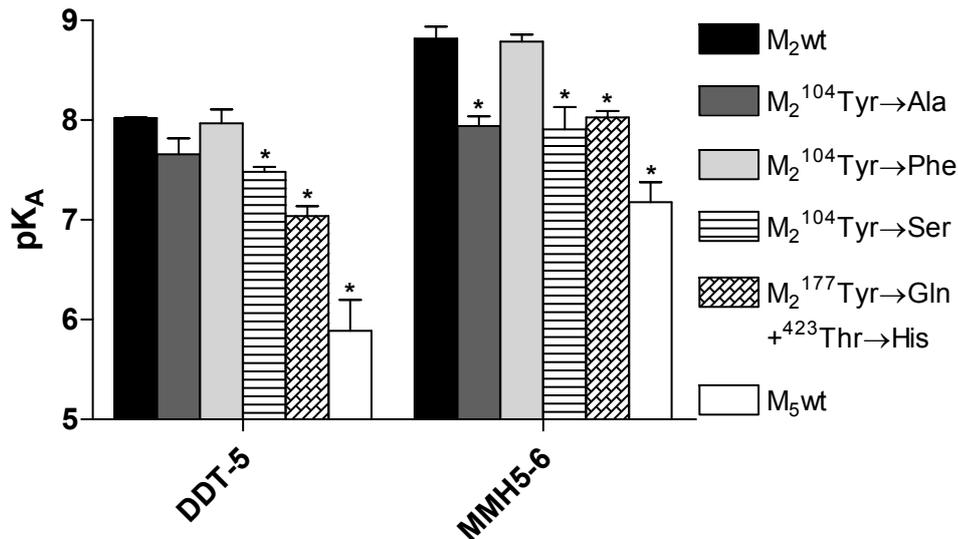
Kooperativität Folge einer veränderten Affinität zu [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren gewesen sein: Eventuell ist die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit des W84 an M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin-Mutanten herabgesetzt, was zu einer stärker negativen Kooperativität führen würde. Eine Bestimmung der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit allosterischer Modulatoren an M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin-Mutanten, also von pEC<sub>0,5diss</sub>-Werten, war aufgrund der extrem schnellen [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation nicht möglich (t<sub>0,5diss</sub> im Bereich von Sekunden, siehe Kapitel 3.8). Eine verminderte dissoziationsverzögernde Wirksamkeit des W84, also eine verminderte Affinität zu [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren, als Erklärung für die stärker negative Kooperativität an M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin-Mutanten stände im Gegensatz zu einer möglichen Erklärung für die verstärkte positive Kooperativität, die bei Naphmethonium an M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin-Mutanten und beim EHW477 an der Mutante M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala gesehen wurde: Die im Vergleich zum Bindungsverhalten an M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren verstärkte positive Kooperativität würde hier auf eine höhere Affinität zu [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren, also eine verstärkte dissoziationsverzögernde Wirksamkeit, hindeuten. Eine gegensätzliche Beeinflussung der dissoziationsverzögernden Wirksamkeit von strukturell ähnlichen, nämlich Alkan-Bisammonium-Typ-Modulatoren, durch Mutation von M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle erscheint jedoch unwahrscheinlich. Als Ursache für die veränderte Lage der Plateaus der spezifischen [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung bei hohen Alloster-Konzentrationen an den M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin-Mutanten, also die veränderte Kooperativität mit [<sup>3</sup>H]NMS, kommt die im Vergleich zu M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren stark beschleunigte [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation in Betracht: Die extrem schnelle [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation an den Mutanten M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Ala und M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyr→Phe könnte bei den Interaktionsexperimenten mit allosterischen Modulatoren zu einer größeren Streuung der Lage der Plateaus geführt haben, während die Wendepunkte der Interaktionskurven, die für die Affinität der Modulatoren ausschlaggebend sind, bei den untersuchten Modulatoren bis auf SH30 nicht wesentlich im Vergleich zu den Interaktionskurven an M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren verändert wurden. Beim W84 und Naphmethonium zeigte ein Affinitätsverlust an der Mutante M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln + <sup>423</sup>Thr→His, dass die Affinität dieser Modulatoren zu freien M<sub>2</sub>-Rezeptoren von Epitopen der allosterischen Bindungsstelle beeinflusst wurde. Die Befunde zum Bindungsverhalten allosterischer Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ legen nahe, dass es bei der Bindung an freie M<sub>2</sub>-Rezeptoren zu einer Interaktion

mit Epitopen der allosterischen Bindungsstelle, nicht aber zu einer Interaktion mit  $M_2^{104}$ Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle kommt.

## **4.8 Hybrid-Bindungstopografie der allosterisch/ orthosterischen Hybridsubstanzen**

Mittels innerhalb der allosterischen Bindungsstelle punktmutierten Rezeptoren sowie Punktmutanten der Aminosäure  $M_2^{104}$ Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle wurde die Bindungstopografie der Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 an  $M_2$ -Rezeptoren untersucht. Ein Affinitätsverlust bei Mutation von für die Bindung von allosterischen Modulatoren wichtigen Epitopen wie  $M_2^{177}$ Tyrosin,  $M_2^{422}$ Tryptophan oder  $M_2^{423}$ Threonin wies auf eine Interaktion mit der allosterischen Bindungsstelle hin. Die  $M_2^{104}$ Tyrosin-Mutanten wurden eingesetzt, um eine eventuelle Interaktion mit der orthosterischen Bindungsstelle zu untersuchen. Darüber hinaus wurde geprüft, wie groß die  $M_2/M_5$ -Selektivität der Bindung der Hybridsubstanzen im Vergleich zu klassischen Agonisten war.

Der Austausch von  $M_2^{422}$ Tryptophan, das sich am Übergang zwischen der dritten extrazellulären Schleife und der siebten transmembranären Domäne des Rezeptorproteins befindet, gegen Alanin führte bei beiden Hybridsubstanzen zu einem signifikanten Affinitätsverlust.  $M_2^{422}$ Tryptophan wurde zunächst als ein für allosterische Modulatoren affinitätsgebendes Epitop identifiziert (Prilla et al., 2006). Bei orthosterischen Agonisten wie Iperoxo hatte sich jedoch ebenfalls ein Affinitätsverlust bei Austausch von  $M_2^{422}$ Tryptophan gegen Alanin ergeben (siehe Kapitel 3.10). Dieser Affinitätsverlust deutete auf eine räumliche Nähe von  $M_2^{422}$ Tryptophan, das ein Epitop der allosterischen Bindungsstelle des  $M_2$ -Rezeptors ist, zur Bindungsstelle von orthosterischen Agonisten hin. Die Bedeutung von  $M_2^{422}$ Tryptophan für die Bindung der Hybridsubstanzen war unter der Annahme einer Hybrid-Bindungstopografie mit gleichzeitiger Besetzung der allosterischen und orthosterischen Bindungsstelle verständlich. Abb. 60 gibt einen Überblick über die Affinitätskonstanten des DDT-5 bzw. MMH5-6 an der allosterischen Doppelmutante  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  und an Punktmutanten des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin sowie über die  $M_2/M_5$ -Selektivität der Bindung.



**Abb. 60:** M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität und Abhängigkeit der Bindungsaffinität der Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 von dem orthosterischen Epitop M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin und den allosterischen Epitopen M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyrosin und M<sub>2</sub><sup>423</sup>Threonin. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-8 unabhängigen Experimenten. pK<sub>A</sub>: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K<sub>A</sub>. \*: Der pK<sub>A</sub>-Wert an der jeweiligen Rezeptormutante war signifikant niedriger als der pK<sub>A</sub>-Wert am M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptor (t-Test, p < 0,05).

Beide Hybridagonisten zeigten eine gegenüber dem orthosterischen Agonisten Iperoxo deutlich stärker ausgeprägte M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität. Die verbesserte M<sub>2</sub>/M<sub>5</sub>-Selektivität kann mit der Verbindung eines M<sub>2</sub>-prävalenten allosterischen Molekülteils mit einem Iperoxo-Rest zu den Hybridmolekülen erklärt werden. Bei beiden Hybridsubstanzen bewirkte die Doppelmutation M<sub>2</sub><sup>177</sup>Tyr→Gln + <sup>423</sup>Thr→His einen deutlichen Affinitätsverlust. Dieser Affinitätsverlust zeigte eine Interaktion des DDT-5 bzw. MMH5-6 mit der allosterischen Bindungsstelle bei der Bindung an M<sub>2</sub>-Rezeptoren. An der Einzelmutante M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→His war die Affinität beider Substanzen nicht signifikant verändert im Vergleich zu M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren. Mit der unveränderten Affinität an der Mutante M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→His stehen die Hybridsubstanzen in ihrem Bindungsverhalten zwischen typischen orthosterischen Agonisten, deren Affinität an dieser Mutante im Vergleich zu M<sub>2</sub>-Wildtyprezeptoren erhöht war (siehe Kapitel 3.10), und allosterischen Modulatoren, die durch die Mutation M<sub>2</sub><sup>423</sup>Thr→His an Affinität verloren (Prilla, Dissertation 2006).

Die Affinitätsänderungen bei Mutation von M<sub>2</sub><sup>104</sup>Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle waren bei den Hybridsubstanzen wesentlich geringer ausgeprägt als bei orthosterischen Agonisten. Auf Grundlage einer Hybrid-

Bindungstopografie, in der die Hybridsubstanzen mit ihrem von allosterischen Modulatoren abgeleiteten Molekülteil an die allosterische Bindungsstelle gebunden haben und in der der Iperoxo-Rest von dort in die orthosterische Bindungsstelle hineinragt, erscheint dies verständlich: Der in den Hybridsubstanzen enthaltene Iperoxo-Rest passt nicht so optimal in die orthosterische Bindungsstelle wie ein freies Iperoxo-Molekül und ist damit weniger von Mutationen orthosterischer Epitope betroffen als das freie Molekül. Auch im Bezug auf die Mutation  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  stehen die Hybridsubstanzen in ihrem Bindungsverhalten zwischen typischen orthosterischen Agonisten, die durch diese Mutation wesentlich stärker an Affinität verloren, und allosterischen Modulatoren, deren Affinität durch diese Mutation nicht signifikant verändert wurde. Sowohl beim DDT-5 als auch beim MMH5-6 war die Affinität an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  nicht signifikant verändert im Vergleich zu  $M_2$ -Wildtyprezeptoren, d.h. die Hydroxylgruppe von  $M_2^{104}$ Tyrosin leistete keinen Beitrag zur Bindungsaffinität der Hybridsubstanzen. Der Austausch von  $M_2^{104}$ Tyrosin gegen Alanin führte beim DDT-5 zu einer Verminderung der Affinität, die nicht signifikant war und beim MMH5-6 zu einem signifikanten Affinitätsverlust. Der Austausch von  $M_2^{104}$ Tyrosin gegen Serin führte sowohl beim DDT-5 als auch beim MMH5-6 zu einem signifikanten Affinitätsverlust. Die Befunde mit den Punktmutanten des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ Tyrosin zeigten eine Bedeutung des Phenylrings dieses Epitops für die Bindung von DDT-5 und MMH5-6. Aufgrund der Abhängigkeit der Affinität von sowohl allosterischen Epitopen als auch von dem orthosterischen Epitop  $M_2^{104}$ Tyrosin stellen DDT-5 und MMH5-6 nicht nur in ihrer chemischen Struktur, sondern auch in ihrer Bindungstopografie allosterisch/orthosterische Hybride dar. Beim MMH5-6 veranschaulichte die Art der Beeinflussung der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung an allosterischen bzw. orthosterischen Mutanten und  $M_2$ -Wildtyprezeptoren eine Hybrid-Bindungstopografie: An  $M_2$ -Wildtyprezeptoren zeigte sich, ähnlich dem Verhalten von schwach negativ kooperativen allosterischen Modulatoren, eine submaximale Inhibition der spezifischen [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung. Dieses Bindungsverhalten kann auf Grundlage einer Hybrid-Bindungstopografie erklärt werden als Mischung aus dem Effekt des orthosterischen Iperoxo-Molekülteils, der für sich genommen eine vollständige Inhibition der spezifischen [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung bewirkt, und dem Effekt des allosterischen Naphmethonium-artigen Molekülteils, der für sich genommen eine

[<sup>3</sup>H]NMS-Bindungsförderung bewirkt. An der allosterischen Doppelmutante  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + ^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  zeigte sich eine verstärkte Inhibition der [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung durch MMH5-6. Durch die Doppelmutation wurde eine Interaktion des Naphmethonium-artigen Molekülteils mit der allosterischen Bindungsstelle erschwert, sodass sich der bindungshemmende Effekt des im MMH5-6 enthaltenen orthosterischen Molekülteils, des Iperoxo-Restes, stärker bemerkbar machte. An den orthosterischen Mutanten  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  und  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ser}$  bewirkte MMH5-6 eine Förderung der [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung. Bei den beiden genannten  $M_2^{104}\text{Tyr}$ -Mutanten war die Interaktion des Iperoxo-Molekülteils mit der orthosterischen Bindungsstelle deutlich erschwert, sodass sich der bindungsfördernde Effekt des im MMH5-6 enthaltenen allosterischen Molekülteils bemerkbar machte. Dieser Effekt trat bei Interaktionsexperimenten an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren nicht auf, da er durch den ausgeprägt bindungshemmenden Effekt des im MMH5-6 enthaltenen orthosterischen Molekülteils, des Iperoxo-Restes, überdeckt wurde.

#### **4.9 Anwendung eines Bindungsmodells für allosterisch/orthosterische Hybridliganden**

Die Befunde zur Epitopabhängigkeit der Bindung von DDT-5 und MMH5-6 an  $M_2$ -Rezeptoren zeigen, dass diese beiden Substanzen nicht nur in ihrer chemischen Struktur, sondern auch in ihrer Bindungstopografie allosterisch/orthosterische Hybride sind. Zur Beschreibung des Bindungsverhaltens solcher Hybridliganden, die an die allosterische und orthosterische Bindungsstelle gleichzeitig binden können, ist von May et al. (2007a) ein in Kapitel 2.3.4.1 vorgestelltes Modell entwickelt worden. Dieses Modell berücksichtigt neben den vier aus dem Ehlert-Modell der allosterischen Interaktion bekannten Rezeptorbesetzungszuständen einen fünften Zustand, in dem ein Hybridligand an die allosterische und orthosterische Bindungsstelle gleichzeitig gebunden hat (siehe Kapitel 2.3.4.1, Abb. 3). Nach diesem Modell sollte die Affinität eines allosterisch/orthosterischen Hybridliganden zu freien Rezeptoren differenziert werden in eine Affinitätskonstante bei alleiniger Bindung an die allosterische Bindungsstelle,  $K_{B\text{ allo}}$ , und eine Affinitätskonstante bei gleichzeitiger Bindung an die allosterische und orthosterische Bindungsstelle,  $K_{B\text{ dual}}$ . Seniorautor der Publikation von May et al.

(2007a) war Prof. Dr. A. Christopoulos (Monash-Universität, Australien), der aufbauend auf dem Bindungsmodell eine Gleichung zur Analyse der Bindungsdaten von allosterisch/orthosterischen Hybridliganden entwickelt hat (siehe Kapitel 2.3.4.1, Gleichung 24). Mit dieser Gleichung, die dem Arbeitskreis Mohr von Prof. Dr. A. Christopoulos zur Verfügung gestellt worden war, sollte die Bestimmung der beiden Affinitätskonstanten  $K_{B\text{ allo}}$  und  $K_{B\text{ dual}}$  sowie des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$  möglich sein.

Eine nichtlineare Regressionsanalyse der Interaktionsexperimente von DDT-5 bzw. MMH5-6 mit [<sup>3</sup>H]NMS anhand von Gleichung 24 war möglich. Die erhaltenen Regressionskurven beschrieben die Datenpunkte gut und waren in ihrem Verlauf meist identisch mit den Regressionskurven bei Anwendung der Gleichung nach Ehlert (1988). Die berechneten Parameter  $K_{B\text{ allo}}$ ,  $K_{B\text{ dual}}$  und der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  wiesen jedoch ein sehr weites 95 %-Konfidenzintervall auf, das sich typischerweise von negativen Werten bis hin zu sehr hohen Werten erstreckte. Es stellte sich heraus, dass sich bei einer Veränderung der benötigten Startwerte  $K_{B\text{ allo}}$  und  $\alpha$  für die nichtlineare Regressionsanalyse unterschiedliche  $K_{B\text{ allo}}$ - und  $\alpha$ -Werte ergaben, d.h. die Regressionsanalyse führte nicht unabhängig von den Startwerten immer zu den gleichen Werten für  $K_{B\text{ allo}}$  bzw.  $\alpha$ . Der Parameter  $K_{B\text{ dual}}$  dagegen wurde nur in äußerst geringem Ausmaß durch den vorgegebenen Wert zum Start der Regressionsanalyse beeinflusst und stimmte gut mit dem bei Anwendung der Ehlert-Gleichung erhaltenen Parameter  $K_A$  überein. Um die Variabilität der berechneten Werte für  $K_{B\text{ allo}}$  bzw.  $\alpha$  bei Anwendung dieser Gleichung, die speziell das Bindungsverhalten allosterisch/orthosterischer Hybridliganden beschreibt, zu vermindern bzw. aufzuheben, wurde eine Umformung der Gleichung mit Elimination einer Variablen durchgeführt: Nach dem Bindungsmodell von May et al. (2007a; siehe Kapitel 2.3.4.1, Abb. 3) entspricht die Affinität eines Hybridliganden zu Orthoster-besetzten Rezeptoren  $K_{B\text{ allo}}/\alpha$ . Die Affinität des DDT-5 bzw. MMH5-6 zu [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren, also der  $pEC_{0,5\text{diss}}$ -Wert, war in Dissoziationsexperimenten an den auch in Gleichgewichts-Bindungsexperimenten untersuchten Muskarinrezeptoren außer den  $M_2^{104}$  Tyrosin-Mutanten bestimmt worden. Innerhalb Gleichung 24 (siehe Kapitel 2.3.4.1) wurde die Variable  $K_{B\text{ allo}}$  ersetzt gemäß folgender Beziehung:

$$K_{B\text{ allo}} = EC_{0,5\text{diss}} \cdot \alpha \quad \text{Gl. (35)}$$

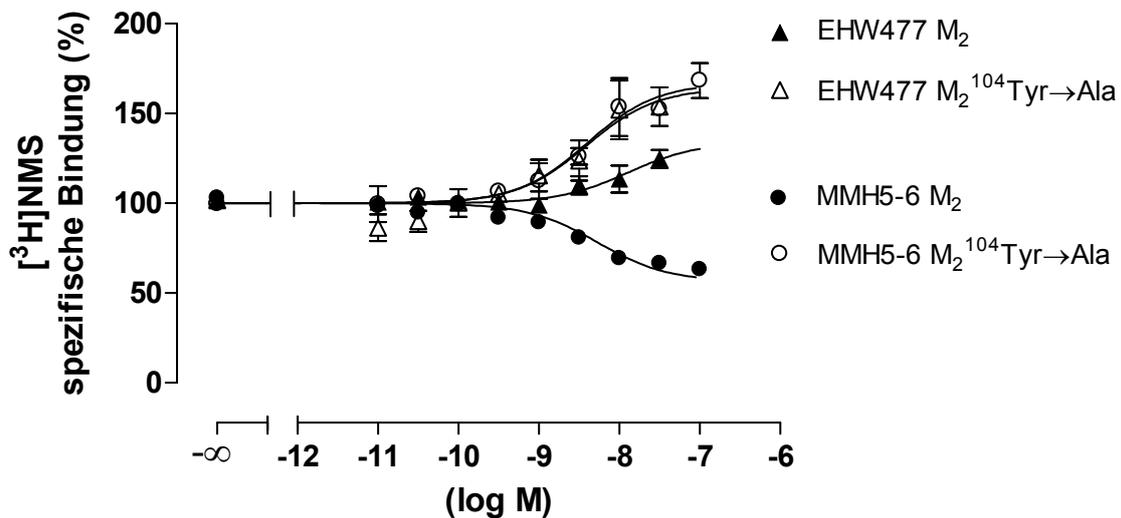
In einer weiteren Umformung wurde die Variable  $\alpha$  ersetzt gemäß folgender Beziehung:

$$\alpha = \frac{K_{B\text{ allo}}}{EC_{0,5\text{diss}}} \quad \text{Gl. (36)}$$

In der Gleichung, in der  $K_{B\text{ allo}}$  durch  $EC_{0,5\text{diss}} \cdot \alpha$  ersetzt worden war, zeigte sich jedoch weiterhin eine Abhängigkeit des in der Regressionsanalyse berechneten  $\alpha$ -Wertes von dem für den Start der Regressionsanalyse vorgegebenen  $\alpha$ -Wert. Auch bei Ersatz der Variablen  $\alpha$  durch den Ausdruck  $K_{B\text{ allo}} / EC_{0,5\text{diss}}$  ergaben sich abhängig von dem vorgegebenen Startwert der Regressionsanalyse unterschiedliche Werte für  $K_{B\text{ allo}}$ , d.h. auch hier führte die Regressionsanalyse nicht immer zu dem gleichen Ergebnis.

Da die Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 einen von einem allosterischen Modulator abgeleiteten Molekülteil beinhalten, der Affinität zur allosterischen Bindungsstelle besitzt, ist die Annahme nahe liegend, dass die Hybridsubstanzen mit diesem Molekülteil an die allosterische Bindungsstelle binden.  $K_{B\text{ allo}}$  und der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  der Hybridsubstanzen würden in diesem Fall von dem allosterischen Molekülteil bestimmt, der im DDT-5 dem allosterischen Modulator SH30 entspricht und im MMH5-6 dem Modulator EHW477. Die Affinität dieser Modulatoren zu freien  $M_2$ -Rezeptoren sowie den Mutanten  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  und  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Phe}$  war in Gleichgewichts-Bindungsexperimenten bestimmt worden. Um die Gleichgewichts-Bindungsdaten des DDT-5 und MMH5-6 mit der Gleichung für Hybridliganden (Gleichung 24) analysieren zu können wurde angenommen, dass  $K_{B\text{ allo}}$  und der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  von DDT-5 bzw. MMH5-6 dem  $K_A$ -Wert und Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  von SH30 bzw. EHW477 (siehe Kapitel 3.11, Tab. 29) entsprechen, d.h.  $K_{B\text{ allo}}$  und  $\alpha$  der Hybridsubstanzen wurden konstant gesetzt gleich den Werten dieser Modulatoren. Sowohl die Bindungsdaten des DDT-5 als auch die des MMH5-6 konnten bei den Rezeptoren, für die auch die Daten der allosterischen Modulatoren SH30 und EHW477 vorlagen, mit diesem Verfahren analysiert werden. Die in der Regressionsanalyse bestimmten Werte für die

Affinität des DDT-5 bzw. MMH5-6 im dualen Bindungsmodus,  $K_{B \text{ dual}}$ , wiesen, wie aus der herkömmlichen Ehlert-Analyse bekannt, ein relativ enges 95 %-Konfidenzintervall auf. Aus Abb. 61 geht hervor, dass MMH5-6 an der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  ein ähnliches Bindungsverhalten zeigte wie der allosterische Modulator EHW477.



**Abb. 61:** Interaktion von EHW477 und MMH5-6 mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren und der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ . Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus 3-6 unabhängigen Experimenten. Die Interaktionskurven des EHW477 wurden mit der Ehlert-Gleichung (Gleichung 19) analysiert. Die Interaktionskurven des MMH5-6 wurden mit einer Hybridligand-Gleichung (Gleichung 24) unter Konstantsetzen der Parameter  $K_{B \text{ allo}}$  und  $\alpha$  gleich den Werten des EHW477 analysiert (EHW 477,  $M_2$ :  $\text{p}K_A = 7,39$ ,  $\text{p}\alpha = 0,63$ ;  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ :  $\text{p}K_A = 7,80$ ,  $\text{p}\alpha = 0,83$ ). Ordinate: Spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Prozent bezogen auf die spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Modulators. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanz.

An der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ , bei der eine Interaktion des Hybridmoleküls mit der orthosterischen Bindungsstelle erschwert war, wurde der bindungsfördernde Effekt des im MMH5-6 enthaltenen allosterischen Molekülteils sichtbar. Das Konstantsetzen des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$  und der Affinität zur allosterischen Bindungsstelle  $K_{B \text{ allo}}$  gleich den Werten des EHW477 führte beim MMH5-6 zu Regressionskurven, die die Datenpunkte gut beschreiben. Aus Tab. 38 geht hervor, dass mit der Hybridligand-Gleichung (Gleichung 24) die Affinität des MMH5-6 im dualen Bindungsmodus an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren und der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  bestimmt werden konnte.

Rezeptor	$p\alpha$ (konstant)	$\log K_{B \text{ allo}}$ (konstant)	$\log K_{B \text{ dual}}$	$\Delta \log K_{B \text{ dual}}$ ( $M_{\text{mut}}-M_{2\text{wt}}$ )
$M_2\text{wt}$	0,63	-7,39	$-8,51 \pm 0,02$	-
$M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$	0,83	-7,80	$-7,86 \pm 0,07$	-0,65

**Tab. 38:** Anwendung einer Hybridligand-Gleichung (Gleichung 24) auf die Interaktion von MMH5-6 mit [<sup>3</sup>H]NMS an  $M_2$ -Wildtyprezeptoren und der Mutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$ .  $p\alpha$  und  $\log K_{B \text{ allo}}$  des MMH5-6 wurden konstant gesetzt gleich den Werten des allosterischen Modulators EHW477. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Gesamt-Regressionskurve aus 3-6 zusammengefassten, unabhängigen Experimenten.  $p\alpha$ : Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$ .  $\log K_{B \text{ allo}}$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten der Bindung des Hybridliganden an die allosterische Bindungsstelle.  $\log K_{B \text{ dual}}$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten des Hybridliganden im dualen Bindungsmodus.  $\Delta \log K_{B \text{ dual}}$ : Differenz in log-Einheiten zwischen dem  $\log K_{B \text{ dual}}$ -Wert an der Rezeptormutante  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  ( $M_{\text{mut}}$ ) und dem  $\log K_{B \text{ dual}}$ -Wert am  $M_2$ -Wildtyprezeptor ( $M_2\text{wt}$ ).

Dabei zeigte sich ein signifikanter Affinitätsverlust bei Austausch von  $M_2^{104}$ Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle gegen Alanin. Das Bindungsmodell für Hybridliganden nach May et al. (2007a) und die aus diesem Modell abgeleitete Gleichung 24 waren also auf das Bindungsverhalten der allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 anwendbar. Eine gleichzeitige Bestimmung der drei Parameter  $\alpha$ ,  $K_{B \text{ allo}}$  und  $K_{B \text{ dual}}$  der Hybridsubstanzen bei der Interaktion mit [<sup>3</sup>H]NMS war jedoch ohne ein näherungsweise Konstantsetzen von einzelnen Parametern nicht möglich. Aus grundsätzlichen Überlegungen heraus fraglich erscheint eine genaue Differenzierbarkeit der Affinitätsparameter  $K_{B \text{ allo}}$  und  $K_{B \text{ dual}}$  eines Hybridliganden unter Bedingungen, in denen sowohl eine Bindung des Hybridliganden an die allosterische Bindungsstelle als auch eine gleichzeitige Bindung an die allosterische und orthosterische Bindungsstelle vorhanden ist: In Gleichgewichts-Bindungsexperimenten mit [<sup>3</sup>H]NMS und den Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH-6 lag jedoch vermutlich neben den drei weiteren Rezeptorbesetzungszuständen (siehe Kapitel 2.3.4.1, Abb. 3) eine Mischung dieser beiden Bindungszustände vor. Zur exakten Bestimmung von  $K_{B \text{ allo}}$  bzw.  $K_{B \text{ dual}}$  eines Hybridliganden müssten Bedingungen herbeigeführt werden, unter denen dieser Ligand ausschließlich an die allosterische bzw. ausschließlich an die allosterische und orthosterische Bindungsstelle gleichzeitig bindet.

Die Epitopabhängigkeit der Bindung des DDT-5 und MMH5-6 an M<sub>2</sub>-Rezeptoren zeigt, dass das Ziel einer Hybrid-Bindungstopografie mit der Entwicklung der Hybridsubstanzen aus einem von einem allosterischen Modulator abgeleiteten Molekülteil und einem von einem orthosterischen Agonisten abgeleiteten Molekülteil erreicht wurde. Aufgrund der beiden quartären Stickstoffe und den daraus resultierenden ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften eignen sich DDT-5 und MMH5-6 kaum als Therapeutika, sie sind aber interessante Modellsubstanzen für die weitere Entwicklung von Subtyp-selektiven muskarinischen Agonisten. Allosterisch/orthosterische Hybridagonisten an Muskarinrezeptoren bieten aufgrund ihrer Interaktion mit der allosterischen Bindungsstelle ein größeres Potential für Subtypselektivität als klassische Agonisten, die ausschließlich mit der innerhalb der Subtypen hochkonservierten orthosterischen Bindungsstelle interagieren.

## 5 Zusammenfassung

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren besitzen neben der konventionellen, orthosterischen Bindungsstelle für Liganden wie den endogenen Agonisten Acetylcholin oder den Antagonisten N-Methylscopolamin ein weiteres spezifisches Haftareal, die allosterische Bindungsstelle. Allosterische Modulatoren vom Alkan-Bisammonium-Typ mit den Leitsubstanzen W84 [N,N'-Bis[3-(1,3-dihydro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)propyl]-N,N,N',N'-tetramethyl-1,6-hexan-diammoniumdibromid] und Naphmethonium [2-[3-[1-[6-[1,1-Dimethyl-1-[3-(1,3-dioxo-1,3-dihydroisoindol-2-yl)-propyl]ammonium]hexyl]-1,1-dimethylammonium]-2,2-dimethylpropyl]benzo[de]isoquinolin-1,3-dion] zeichnen sich in der Regel durch eine M<sub>2</sub>-Präferenz der Bindung aus. Ein neuer Ansatz, um zu Subtyp-selektiven Agonisten an Muskarinrezeptoren zu gelangen, besteht in der Entwicklung von allosterisch/orthosterischen Hybridliganden, die in der Lage sein könnten, gleichzeitig an die allosterische und orthosterische Bindungsstelle zu binden. Durch die Interaktion eines agonistisch wirksamen Hybridliganden mit der orthosterischen Bindungsstelle würde die Rezeptoraktivierung ausgelöst, während ein Hybridligand durch die Interaktion mit der allosterischen Bindungsstelle, die unter den 5 Muskarinrezeptor-Subtypen weniger konserviert ist als die orthosterische Bindungsstelle, Subtyp-Selektivität gewinnen könnte. Im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. De Amici (Universität Mailand) sind in Kooperation mit Prof. Dr. U. Holzgrabe (Universität Würzburg) Hybridsubstanzen aus den allosterischen Modulatoren W84 bzw. Naphmethonium und dem orthosterischen Agonisten Iperoxo [3-[4-(Trimethylammonium)-2-butynyl]oxy- $\Delta^2$ -isoxazolin] synthetisiert worden. Sowohl das W84-artige Hybrid DDT-5 [2-[3-[1-(6-{1,1-Dimethyl-1-[4-(4,5-dihydro-isoxazol-3-yloxy)but-2-ynyl]-ammonium}hexyl)-1,1-dimethylammonium]propyl]isoindolin-1,3-dion] als auch das Naphmethonium-artige Hybrid MMH5-6 [2-[3-[1-(6-{1,1-Dimethyl-1-[4-(4,5-dihydro-isoxazol-3-yloxy)but-2-ynyl]-ammonium}hexyl)-1,1-dimethylammonium]-2,2-dimethylpropyl]-benzo[de]isoquinolin-1,3-dion] hatten sich, wie auch Iperoxo, in funktionellen Experimenten als Vollagonisten an Muskarinrezeptoren erwiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bindungstopografie der Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6, die mit dem Ziel einer allosterisch/orthosterischen Bindungstopografie entwickelt worden waren, an  $M_2$ -Rezeptoren auf molekularer Ebene untersucht. In Radioligand-Bindungsstudien mit dem Radioantagonisten [ $^3$ H]N-Methylscopolamin ([ $^3$ H]NMS) wurde geprüft, ob DDT-5 und MMH5-6 bei der Bindung mit Epitopen der allosterischen Bindungsstelle und mit dem orthosterischen Epitop  $M_2^{104}$ Tyrosin interagieren. Als Epitope der allosterischen Bindungsstelle wurden die für die  $M_2$ -Selektivität allosterischer Modulatoren wichtigen Epitope  $M_2^{177}$ Tyrosin und  $M_2^{423}$ Threonin sowie das innerhalb der Muskarinrezeptor-Subtypen konservierte Epitop  $M_2^{422}$ Tryptophan betrachtet. Im Vergleich zu dem Bindungsverhalten der Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 wurde bei allosterischen Modulatoren geprüft, ob die Affinität durch das orthosterische Epitop  $M_2^{104}$ Tyrosin beeinflusst wurde und bei orthosterischen Agonisten, ob es einen Einfluss von Mutationen innerhalb der allosterischen Bindungsstelle auf die Affinität gab. Darüber hinaus wurde die  $M_2/M_5$ -Selektivität der Hybridagonisten DDT-5 und MMH5-6 im Vergleich zur  $M_2/M_5$ -Selektivität klassischer Agonisten bestimmt.

In kinetischen Experimenten verzögerten sowohl DDT-5 als auch MMH5-6 die Dissoziation des Radioorthosters [ $^3$ H]NMS konzentrationsabhängig und zeigten somit in diesem experimentellen Ansatz ein allosterisches Bindungsverhalten. Beide Hybridsubstanzen wiesen eine deutliche  $M_2/M_5$ -Selektivität der Bindung an [ $^3$ H]NMS-besetzte Rezeptoren auf, d.h. höhere Affinität zu  $M_2$ -Rezeptoren.

In Gleichgewichts-Bindungsexperimenten, in denen die Bindung von Testsubstanzen an freie, nicht [ $^3$ H]NMS-besetzte Rezeptoren betrachtet wird, wurden als allosterische Modulatoren W84 und Naphmethonium sowie verkürzte Derivate dieser Modulatoren eingesetzt, da in den Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 vom W84 bzw. Naphmethonium abgeleitete Molekülteile enthalten sind. Es zeigte sich, dass  $M_2^{104}$ Tyrosin kein affinitätsgebendes Epitop für allosterische Modulatoren ist.

Als orthosterische Agonisten wurden u.a. das in den Hybridsubstanzen als Molekülteil enthaltene Iperoxo und der physiologische Agonist Acetylcholin eingesetzt. Bei den untersuchten klassischen Agonisten ergab sich bei Austausch von  $M_2^{104}$ Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle gegen Alanin ein massiver Affinitätsverlust. Beim Iperoxo und Acetylcholin bewirkte die Doppel-

mutation  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + {}^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$ , in der Epitope der allosterischen Bindungsstelle gegen die korrespondierenden  $M_5$ -Rezeptor-Aminosäuren ausgetauscht sind, keine Affinitätsänderung. Die unveränderte Affinität durch die Doppelmutation  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + {}^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  und Befunde mit der Mutante  $M_2^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{Ala}$  zeigen, dass diese Epitope der allosterischen Bindungsstelle für orthosterische Agonisten nicht affinitätsgebend sind. Bei den untersuchten orthosterischen Agonisten bewirkte der Austausch von  $M_2^{422}$ -Tryptophan gegen Alanin einen Affinitätsverlust, sodass dieses Epitop, das als wichtig für die Bindung allosterischer Modulatoren identifiziert worden war (Prilla et al., 2006), nicht mehr als ausschließlich allosterisches Epitop angesehen werden kann.

Die allosterisch/orthosterischen Hybridsubstanzen DDT-5 und MMH5-6 zeigten bei der Bindung an freie, nicht [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzte Rezeptoren eine im Vergleich zu Iperoxo erhöhte  $M_2/M_5$ -Selektivität. Die Mutation  $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$  sowie die Doppelmutation  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + {}^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  führten zu einem deutlichen Affinitätsverlust, der Folge einer Interaktion der Hybridsubstanzen mit der allosterischen Bindungsstelle war. Befunde mit Punktmutanten des orthosterischen Epitops  $M_2^{104}$ -Tyrosin belegten eine Bedeutung des Phenylrings dieses Epitops für die Bindung von DDT-5 bzw. MMH5-6. Die Affinität der Hybridsubstanzen war somit abhängig von allosterischen Epitopen und von  $M_2^{104}$ -Tyrosin im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle. Neben der Epitopabhängigkeit veranschaulichte beim MMH5-6 die Art der Beeinflussung der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Gleichgewichtsbindung eine Hybrid-Bindungstopografie: An  $M_2$ -Wildtyprezeptoren zeigte sich eine submaximale Inhibition der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung. Bei Erschwerung einer Interaktion mit der allosterischen Bindungsstelle durch die Mutation  $M_2^{177}\text{Tyr}\rightarrow\text{Gln} + {}^{423}\text{Thr}\rightarrow\text{His}$  kam es zu einer verstärkten Inhibition der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung, die über die orthosterische Bindungsstelle vermittelt wurde. Durch die Mutationen  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ala}$  bzw.  $M_2^{104}\text{Tyr}\rightarrow\text{Ser}$  wurde eine Interaktion mit der orthosterischen Bindungsstelle erschwert. An diesen punktmutierten  $M_2$ -Rezeptoren bewirkte MMH5-6 eine Förderung der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung, die über die allosterische Bindungsstelle vermittelt wurde.

Die Befunde zur Bindungstopografie des DDT-5 bzw. MMH5-6 an  $M_2$ -Rezeptoren zeigen, dass es sich um Hybridliganden handelt, die an die allosterische und orthosterische Bindungsstelle gleichzeitig binden können.



## 6 Literaturverzeichnis

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

Barocelli E, Ballabeni V, Bertoni S, Dallanoce C, De Amici M, De Micheli C and Impicciatore M (2000) New analogues of oxotremorine and oxotremorine-M: Estimation of their in vitro affinity and efficacy at muscarinic receptor subtypes. *Life Sci* **67**: 717-723.

Barocelli E, Ballabeni V, Bertoni S, De Amici M and Impicciatore M (2001) Evidence for specific analgesic activity of a muscarinic agonist selected among a new series of acetylenic derivatives. *Life Sci* **68**: 1775-1785.

Bennet J and Yamamura H (1985) Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding methods. *Neurotransmitter Receptor Binding*, Raven Press, New York.

Berrie CP, Birdsall NJ, Burgen AS and Hulme EC (1979) Guanine nucleotides modulate muscarinic receptor binding in the heart. *Biochem Biophys Res Commun* **87**: 1000-1005.

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

Birdsall NJ and Lazareno S (2005) Allosterism at muscarinic receptors: Ligands and mechanisms. *Mini Rev Med Chem* **5**: 523-543.

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

Bonner TI, Young AC, Brann MR and Buckley NJ (1988) Cloning and expression of the human and rat M5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* **1**: 403-410.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.

Brodde OE and Michel MC (1999) Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* **51**: 651-690.

Buller S, Zlotos DP, Mohr K and Ellis J (2002) Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: A single amino acid in transmembrane region 7 is critical to the subtype selectivities of caracurine V derivatives and alkane-bisammonium ligands. *Mol Pharmacol* **61**: 160-168.

Caulfield MP (1993) Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* **58**: 319-379.

Caulfield MP and Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* **50**: 279-290.

Cheng Y and Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant ( $K_1$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**: 3099-3108.

Christopoulos A, Grant MK, Ayoubzadeh N, Kim ON, Sauerberg P, Jeppesen L and El Fakahany EE (2001) Synthesis and pharmacological evaluation of dimeric muscarinic acetylcholine receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther* **298**: 1260-1268.

- Christopoulos A (2002) Allosteric binding sites on cell-surface receptors: Novel targets for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **1**: 198-210.
- Christopoulos A and Kenakin T (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* **54**: 323-374.
- Clark AL and Mitchelson F (1976) The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. *Br J Pharmacol* **58**: 323-331.
- Dale HH (1914) The action of certain esters of choline, and their relation to muscarine. *J Pharmacol Exp Ther* **6**: 147-190.
- Dallanoce C, Conti P, De Amici M, De Micheli C, Barocelli E, Chiavarini M, Ballabeni V, Bertoni S and Impicciatore M (1999) Synthesis and functional characterization of novel derivatives related to oxotremorine and oxotremorine-M. *Bioorg Med Chem* **7**: 1539-1547.
- DeBlasi A, O'Reilly K and Motulsky HJ (1989) Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci* **10**: 227-229.
- Disingrini T, Muth M, Dallanoce C, Barocelli E, Bertoni S, Kellershohn K, Mohr K, De Amici M and Holzgrabe U (2006) Design, synthesis, and action of oxotremorine-related hybrid-type allosteric modulators of muscarinic acetylcholine receptors. *J Med Chem* **49**: 366-372.
- Eglen RM (2005) Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog Med Chem* **43**: 105-136.
- Ehlert FJ (1988) Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol* **33**: 187-194.
- Ehlert FJ (2005) Analysis of allosterism in functional assays. *J Pharmacol Exp Ther* **315**: 740-754.
- Ellis J, Huyler J and Brann MR (1991) Allosteric regulation of cloned M1-M5 muscarinic receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* **42**: 1927-1932.
- Ellis J and Seidenberg M (1992) Two allosteric modulators interact at a common site on cardiac muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **42**: 638-641.
- Ellis J and Seidenberg M (2000) Interactions of alcuronium, TMB-8, and other allosteric ligands with muscarinic acetylcholine receptors: Studies with chimeric receptors. *Mol Pharmacol* **58**: 1451-1460.
- Ford DJ, Essex A, Spalding TA, Burstein ES and Ellis J (2002) Homologous mutations near the junction of the sixth transmembrane domain and the third extracellular loop lead to constitutive activity and enhanced agonist affinity at all muscarinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* **300**: 810-817.
- Gao ZG and Ijzerman AP (2000) Allosteric modulation of A(2A) adenosine receptors by amiloride analogues and sodium ions. *Biochem Pharmacol* **60**: 669-676.
- Gao ZG, Muijlwijk-Koezen JE, Chen A, Müller CE, Ijzerman AP and Jacobson KA (2001) Allosteric modulation of A(3) adenosine receptors by a series of 3-(2-pyridinyl)isoquinoline derivatives. *Mol Pharmacol* **60**: 1057-1063.
- Gao ZG and Jacobson KA (2006) Keynote review: Allosterism in membrane receptors. *Drug Discov Today* **11**: 191-202.
- Gillard M, Waelbroeck M and Christophe J (1987) Muscarinic receptor heterogeneity in rat central nervous system. II. Brain receptors labeled by [<sup>3</sup>H]oxotremorine-M correspond to heterogeneous M2 receptors with very high affinity for agonists. *Mol Pharmacol* **32**: 100-108.

Giraldo E, Micheletti R, Montagna E, Giachetti A, Viganò M A, Ladinsky H and Melchiorre C (1988) Binding and functional characterization of the cardioselective muscarinic antagonist methoctramine. *J Pharmacol Exp Ther* **244**: 1016-1020.

Gnagay AL and Ellis J (1996) Allosteric regulation of the binding of [<sup>3</sup>H]acetylcholine to M2 muscarinic receptors. *Biochem Pharmacol* **52**: 1767-1775.

Gnagay AL, Seidenberg M and Ellis J (1999) Site-directed mutagenesis reveals two epitopes involved in the subtype selectivity of the allosteric interactions of gallamine at muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **56**: 1245-1253.

Green SA, Spasoff AP, Coleman RA, Johnson M and Liggett SB (1996) Sustained activation of a G protein-coupled receptor via "anchored" agonist binding. Molecular localization of the salmeterol exosite within the  $\beta$ 2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* **271**: 24029-24035.

Grossmüller M, Antony J, Tränkle C, Holzgrabe U and Mohr K (2006) Allosteric site in M2 acetylcholine receptors: Evidence for a major conformational change upon binding of an orthosteric agonist instead of an antagonist. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* **372**: 267-276.

Großmüller M (2003) Interaktion allosterischer Modulatoren mit dem Agonisten [<sup>3</sup>H]Oxotremorin M und dem Antagonisten [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin an muskarinischen M2-Rezeptoren. *Dissertations-schrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Haga K, Haga T and Ichiyama A (1986) Reconstitution of the muscarinic acetylcholine receptor. Guanine nucleotide-sensitive high affinity binding of agonists to purified muscarinic receptors reconstituted with GTP-binding proteins (Gi and Go). *J Biol Chem* **261**: 10133-10140.

Haga K, Uchiyama H, Haga T, Ichiyama A, Kangawa K and Matsuo H (1989) Cerebral muscarinic acetylcholine receptors interact with three kinds of GTP-binding proteins in a reconstitution system of purified components. *Mol Pharmacol* **35**: 286-294.

Hammer R, Berrie CP, Birdsall NJ, Burgen AS and Hulme EC (1980) Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. *Nature* **283**: 90-92.

Heitz F, Holzwarth JA, Gies JP, Pruss RM, Trumpp-Kallmeyer S, Hibert MF and Guenet C (1999) Site-directed mutagenesis of the putative human muscarinic M2 receptor binding site. *Eur J Pharmacol* **380**: 183-195.

Hirschberg BT and Schimerlik MI (1994) A kinetic model for oxotremorine M binding to recombinant porcine M2 muscarinic receptors expressed in chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **269**: 26127-26135.

Hoare SR and Strange PG (1996) Regulation of D2 dopamine receptors by amiloride and amiloride analogs. *Mol Pharmacol* **50**: 1295-1308.

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

Ijzerman A, Kourounakis A and van der Klein P (2001). Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Farmacology* **56**: 67-70

Jakubík J, Bačáková L, El Fakahany EE and Tuček S (1995) Subtype selectivity of the positive allosteric action of alcuronium at cloned M1-M5 muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **274**: 1077-1083.

Jakubík J, Bačáková L, El Fakahany EE and Tuček S (1997) Positive cooperativity of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **52**: 172-179.

- Jensen AA and Spalding TA (2004) Allosteric modulation of G-protein coupled receptors. *Eur J Pharm Sci* **21**: 407-420.
- Kenakin T (1997) Affinity, in *Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Kostenis E and Mohr K (1996) Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation. *Trends Pharmacol Sci* **17**: 280-283.
- Krušek J, Dittert I, Hendrych T, Hník P, Horák M, Petrovic M, Sedláček M, Sušánková K, Svobodová L, Toušová K, Ujec E, Vlachová V, Vyklický L, Vyskočil F and Vyklický L, Jr. (2004) Activation and modulation of ligand-gated ion channels. *Physiol Res* **53 Suppl 1**: 103-113.
- Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T and Numa S (1986a) Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **323**: 411-416.
- Kubo T, Maeda A, Sugimoto K, Akiba I, Mikami A, Takahashi H, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K, Matsuo H, Hirose T and Numa S (1986b) Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett* **209**: 367-372.
- Ladner CJ and Lee JM (1999) Reduced high-affinity agonist binding at the M(1) muscarinic receptor in Alzheimer's disease brain: Differential sensitivity to agonists and divalent cations. *Exp Neurol* **158**: 451-458.
- Langmead CJ and Christopoulos A (2006) Allosteric agonists of 7TM receptors: Expanding the pharmacological toolbox. *Trends Pharmacol Sci* **27**: 475-481.
- Langmead CJ, Fry VA, Forbes IT, Branch CL, Christopoulos A, Wood MD and Herdon HJ (2006) Probing the molecular mechanism of interaction between 4-n-butyl-1-[4-(2-methylphenyl)-4-oxo-1-butyl]-piperidine (AC-42) and the muscarinic M(1) receptor: Direct pharmacological evidence that AC-42 is an allosteric agonist. *Mol Pharmacol* **69**: 236-246.
- Lanzafame A, Christopoulos A and Mitchelson F (1997) Three allosteric modulators act at a common site, distinct from that of competitive antagonists, at muscarinic acetylcholine M2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **282**: 278-285.
- Lazareno S and Birdsall NJ (1995) Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors: Interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **48**: 362-378.
- Lazareno S, Gharagozloo P, Kuonen D, Popham A and Birdsall NJ (1998) Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogues and acetylcholine at muscarinic receptors: Radioligand binding studies. *Mol Pharmacol* **53**: 573-589.
- Leppik RA, Miller RC, Eck M and Paquet JL (1994) Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the M2 muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* **45**: 983-990.
- Leppik RA and Birdsall NJ (2000) Agonist binding and function at the human Alpha(2A)-adrenoceptor: Allosteric modulation by amilorides. *Mol Pharmacol* **58**: 1091-1099.
- Leppik RA, Mynett A, Lazareno S and Birdsall NJ (2000) Allosteric interactions between the antagonist prazosin and amiloride analogs at the human Alpha(1A)-adrenergic receptor. *Mol Pharmacol* **57**: 436-445.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.

Lüllmann H, Ohnesorge FK, Schauwecker GC and Wassermann O (1969) Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *Eur J Pharmacol* **6**: 241-247.

Maaß A (1995) Vergleich der allosterischen Beeinflussbarkeit der Agonist- und Antagonist-Bindung an Muscarinrezeptoren des Hausschwein-Myokards. *Dissertationsschrift*. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Matsui H, Lazareno S and Birdsall NJ (1995) Probing of the location of the allosteric site on M1 muscarinic receptors by site-directed mutagenesis. *Mol Pharmacol* **47**: 88-98.

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

May LT, Avlani VA, Langmead CJ, Herdon HJ, Wood MJ, Sexton PM and Christopoulos A (2007b) Structure-function studies of allosteric agonism at M2 muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **72**: 463-476.

McKinney M, Miller JH, Gibson VA, Nickelson L and Aksoy S (1991) Interactions of agonists with M2 and M4 muscarinic receptor subtypes mediating cyclic AMP inhibition. *Mol Pharmacol* **40**: 1014-1022.

Mei L, Lai J, Yamamura HI and Roeske WR (1991) Pharmacologic comparison of selected agonists for the M1 muscarinic receptor in transfected murine fibroblast cells (B82). *J Pharmacol Exp Ther* **256**: 689-694.

Melchiorre C, Angeli P, Lambrecht G, Mutschler E, Picchio MT and Wess J (1987) Antimuscarinic action of methoctramine, a new cardioselective M-2 muscarinic receptor antagonist, alone and in combination with atropine and gallamine. *Eur J Pharmacol* **144**: 117-124.

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

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

Muth M, Bender W, Scharfenstein O, Holzgrabe U, Balatkova E, Tränkle C and Mohr K (2003) Systematic development of high affinity bis(ammonio)alkane-type allosteric enhancers of muscarinic ligand binding. *J Med Chem* **46**: 1031-1040.

Nagano N and Nemeth EF (2005) Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca(2+) for drug development: The extracellular calcium receptor and an innovative medical approach to control secondary hyperparathyroidism by calcimimetics. *J Pharmacol Sci* **97**: 355-360.

Peralta EG, Ashkenazi A, Winslow JW, Smith DH, Ramachandran J and Capon DJ (1987) Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J* **6**: 3923-3929.

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

Prilla S, Schrobang J, Ellis J, Höltje HD and Mohr K (2006) Allosteric interactions with muscarinic acetylcholine receptors: Complex role of the conserved tryptophan M2<sup>422</sup>Trp in a critical cluster of amino acids for baseline affinity, subtype selectivity, and cooperativity. *Mol Pharmacol* **70**: 181-193.

Prilla S (2006) Muskarinische Acetylcholinrezeptoren: Identifizierung einer Kernregion für allosterisch-orthosterische Rezeptorinteraktionen. 2006. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Prilla S, Antony J, Tränkle C and Mohr K (2007) Muscarinic receptors: The allosteric/orthosteric epitope M2<sup>422</sup>Tryptophane mediates strong negative cooperativity between an allosteric antagonist and acetylcholine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **375** (Suppl 1): 49.

Proška J and Tuček S (1994) Mechanisms of steric and cooperative actions of alcuronium on cardiac muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **45**: 709-717.

Rajeswaran WG, Cao Y, Huang XP, Wroblewski ME, Colclough T, Lee S, Liu F, Nagy PI, Ellis J, Levine BA, Nocka KH, Messer WS (2001) Design, synthesis and biological characterization of bivalent 1-methyl-1,2,5,6-tetrahydropyridyl-1,2,5-thiadiazole derivatives as selective muscarinic agonists. *J Med Chem* **44**: 4563-4576.

Rosenberger LB, Roeske WR and Yamamura HI (1979) The regulation of muscarinic cholinergic receptors by guanine nucleotides in cardiac tissue. *Eur J Pharmacol* **56**: 179-180.

Rosenberger LB, Yamamura HI and Roeske WR (1980) Cardiac muscarinic cholinergic receptor binding is regulated by Na<sup>+</sup> and guanyl nucleotides. *J Biol Chem* **255**: 820-823.

Scatchard G (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. *Annals of the New York Academy of Sciences*: 660-672.

Schmalenbach C (2006) Allosterische Modulation der durch Acetylcholin und weitere Agonisten ausgelösten Aktivierung von muskarinischen M2-Rezeptoren. *Dissertationsschrift*, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Rheinische-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Spalding TA, Trotter C, Skjaerbaek N, Messier TL, Currier EA, Burstein ES, Li D, Hacksell U and Brann MR (2002) Discovery of an ectopic activation site on the M(1) muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* **61**: 1297-1302.

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

Steinfeld T, Mammen M, Smith JA, Wilson RD and Jasper JR (2007) A novel multivalent ligand that bridges the allosteric and orthosteric binding sites of the M2 muscarinic receptor. *Mol Pharmacol* **72**: 291-302.

Stockton JM, Birdsall NJ, Burgen AS and Hulme EC (1983) Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. *Mol Pharmacol* **23**: 551-557.

Sur C, Mallorga PJ, Wittmann M, Jacobson MA, Pascarella D, Williams JB, Brandish PE, Pettibone DJ, Scolnick EM and Conn PJ (2003) N-desmethylozapine, an allosteric agonist at muscarinic 1 receptor, potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13674-13679.

Tota MR, Kahler KR and Schimerlik MI (1987) Reconstitution of the purified porcine atrial muscarinic acetylcholine receptor with purified porcine atrial inhibitory guanine nucleotide binding protein. *Biochemistry* **26**: 8175-8182.

Tota MR and Schimerlik MI (1990) Partial agonist effects on the interaction between the atrial muscarinic receptor and the inhibitory guanine nucleotide-binding protein in a reconstituted system. *Mol Pharmacol* **37**: 996-1004.

Tränkle C and Mohr K (1997) Divergent modes of action among cationic allosteric modulators of muscarinic M2 receptors. *Mol Pharmacol* **51**: 674-682.

Tränkle C, Mies-Klomfass E, Cid MH, Holzgrave U and Mohr K (1998a) Identification of a [<sup>3</sup>H]ligand for the common allosteric site of muscarinic acetylcholine M2 receptors. *Mol Pharmacol* **54**: 139-145.

Tränkle C, Andresen I, Lambrecht G and Mohr K (1998b) M2 receptor binding of the selective antagonist AF-DX 384: Possible involvement of the common allosteric site. *Mol Pharmacol* **53**: 304-312.

Tränkle C, Weyand O, Schröter A and Mohr K (1999) Using a radioalloster to test predictions of the cooperativity model for gallamine binding to the allosteric site of muscarinic acetylcholine M(2) receptors. *Mol Pharmacol* **56**: 962-965.

Tränkle C, Weyand O, Voigtländer U, Mynett A, Lazareno S, Birdsall NJ and Mohr K (2003) Interactions of orthosteric and allosteric ligands with [<sup>3</sup>H]dimethyl-W84 at the common allosteric site of muscarinic M2 receptors. *Mol Pharmacol* **64**: 180-190.

Tränkle C, Dittmann A, Schulz U, Weyand O, Buller S, Jöhren K, Heller E, Birdsall NJ, Holzgrabe U, Ellis J, Höltje HD and Mohr K (2005) Atypical muscarinic allosteric modulation: Cooperativity between modulators and their atypical binding topology in muscarinic M2 and M2/M5 chimeric receptors. *Mol Pharmacol* **68**: 1597-1610.

Tuček S, Musílková J, Nedoma J, Proška J, Shelkovnikov S and Vorlíček J (1990) Positive cooperativity in the binding of alcuronium and N-methylscopolamine to muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **38**: 674-680.

van Giersbergen PL and Leppik R (1995) Modulation of agonist binding by guanine nucleotides in CHO cells expressing muscarinic M1-M5 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **352**: 166-172.

Voigtländer U, Jöhren K, Mohr M, Raasch A, Tränkle C, Buller S, Ellis J, Höltje HD and Mohr K (2003) Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: Identification of two amino acids in the muscarinic M2 receptor that account entirely for the M2/M5 subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in N-methylscopolamine-occupied receptors. *Mol Pharmacol* **64**: 21-31.

Waelbroeck M (1994) Identification of drugs competing with D-tubocurarine for an allosteric site on cardiac muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **46**: 685-692.

Waelbroeck M, Boufrahi L and Swillens S (1997) Seven helix receptors are enzymes catalysing G protein activation. What is the agonist Kact? *J Theor Biol* **187**: 15-37.

Wess J, Bonner TI and Brann MR (1990) Chimeric M2/M3 muscarinic receptors: Role of carboxyl terminal receptor domains in selectivity of ligand binding and coupling to phosphoinositide hydrolysis. *Mol Pharmacol* **38**: 872-877.

Wess J, Gdula D and Brann MR (1991) Site-directed mutagenesis of the M3 muscarinic receptor: Identification of a series of threonine and tyrosine residues involved in agonist but not antagonist binding. *EMBO J* **10**: 3729-3734.

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

Wess J, Duttaroy A, Zhang W, Gomeza J, Cui Y, Miyakawa T, Bymaster FP, McKinzie L, Felder C C, Lamping KG, Faraci FM, Deng C and Yamada M (2003) M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to study the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. *Receptors Channels* **9**: 279-290.

Wess J (2003) Novel insights into muscarinic acetylcholine receptor function using gene targeting technology. *Trends Pharmacol Sci* **24**: 414-420.

Wess J (2004) Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: Novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**: 423-450.

Wess J (2005) Allosteric binding sites on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **68**: 1506-1509.

Zahn K, Eckstein N, Tränkle C, Sadee W and Mohr K (2002) Allosteric modulation of muscarinic receptor signaling: Alcuronium-induced conversion of pilocarpine from an agonist into an antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* **301**: 720-728.

## 7 Veröffentlichungen

### 7.1 Wissenschaftliche Originalarbeiten

Großmüller M., Antony J., Tränkle C., Holzgrabe U., Mohr K. (2006) Allosteric site in M<sub>2</sub> acetylcholine receptors: evidence for a major conformational change upon binding of an orthosteric agonist instead of an antagonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **372**(4): 267-276.

### 7.2 Abstrakta/Kongressmitteilungen

Antony J., Tränkle C., Muth M., Holzgrabe U., De Amici M., Mohr K. (2005) Muscarinic allosteric/orthosteric hybrid compounds with agonistic binding properties. *DPhG-Jahrestagung 2005, Mainz, Abstractband*: P01.

Antony J., Muth M., Holzgrabe U., De Amici M., Mohr K. (2006) Change in receptor binding topology by introducing an allosteric moiety into an oxotremorine M-like agonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **372** (Suppl 1): 86.

Antony J., Mohr-Andrä M., Muth M., Holzgrabe U., De Amici M., Mohr K. (2006) Receptor binding topology of muscarinic allosteric/orthosteric hybrid compounds. *DPhG-Jahrestagung 2006, Marburg, Abstractband*: SL P01.

Prilla S., Antony J., Tränkle C., Mohr K. (2007) Muscarinic receptors: The allosteric/orthosteric epitope M<sub>2</sub><sup>422</sup>tryptophan mediates strong negative cooperativity between an allosteric antagonist and acetylcholine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **375** (Suppl 1): 49.