

**Dualsterische Liganden, allosterische Agonisten und ein  
allosterischer Förderer der Agonist-Bindung und -Funktion**  
Modellgestützte Analysen ihrer Rezeptorinteraktionen,  
Signalweg-Aktivierungen und -Selektivitäten an Wildtyp und  
punktmutierten  $hM_1$ -Rezeptoren in CHO-Zellen

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Janine Holze**

aus

Neuwied

Bonn 2017



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

1. Gutachter: PD. Dr. rer.nat. Christian Tränkle
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus Mohr

Tag der Promotion: 24.01.2018

Erscheinungsjahr: 2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2013 bis einschließlich Juli 2017 in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Institutes der Universität Bonn unter der Leitung von Herrn PD Dr. Christian Tränkle angefertigt.



*Meinen Eltern*



## Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>X</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>XXII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 MUSKARINISCHE ACETYLCHOLIN-REZEPTOREN .....	1
1.1.1 Allgemeine Grundlagen.....	1
1.1.2 Struktur.....	3
1.1.3 Signaltransduktion über heterotrimere G Proteine .....	6
1.1.4 Partialagonismus.....	9
1.2 DER MUSKARINISCHE M <sub>1</sub> -REZEPTOR .....	10
1.2.1 Allgemeine Informationen .....	10
1.2.2 Bindungsstellen des muskarinischen M <sub>1</sub> -Rezeptors.....	11
1.2.3 M <sub>1</sub> -Rezeptor-induzierte Signalwegaktivierung .....	12
1.3 ALLOSTERISCHE MODULATION .....	13
1.3.1 Arten Allosterischer Liganden.....	14
1.4 ALLOSTERISCH/ORTHOSTERISCHE HYBRIDLIGANDEN .....	18
1.5 SIGNALWEGSELEKTIVITÄT.....	20
1.6 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT .....	22
<b>2 MATERIALIEN</b> .....	<b>25</b>
2.1 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	25
2.2 GERÄTE UND APPARATUREN .....	27
2.3 REAGENZIEEN UND CHEMIKALIEN.....	30
2.4 LÖSUNGEN.....	33
2.5 TOXINE .....	36
2.6 ZELLEN.....	37
2.6.1 Zelllinien.....	37
2.6.2 Expressionssysteme .....	37
2.6.2.1 Expression im pcDNA3.1 Vektorsystem .....	37
2.6.2.2 Expression im FlpIn™ System .....	38
2.7 NÄHRMEDIEN .....	39
2.8 COMPUTERPROGRAMME .....	40
2.9 DATENBANKEN.....	41
2.10 BEZUGSQUELLEN .....	41
2.11 SUBSTANZEN .....	44
2.11.1 Radioliganden .....	44

2.11.2 Orthosterische Agonisten .....	45
2.11.3 Orthosterische Antagonisten/ Inverse Agonisten.....	46
2.11.4 Allosterische Modulatoren .....	46
2.11.5 Testsubstanzen.....	47
<b>3 METHODEN .....</b>	<b>55</b>
3.1 ZELLBIOLOGISCHE ARBEITEN.....	55
3.1.1 Kultivierung von Zellen.....	55
3.1.2 Zellzahlbestimmung.....	56
3.1.3 Kryokonservierung der Zellen.....	56
3.1.4 Auftauen der Zellen .....	57
3.1.5. Membranhomogenate.....	57
3.1.6. Proteinbestimmung.....	58
3.2 RADIOLIGAND-BINDUNGSSTUDIEN .....	59
3.2.1 Filtrationsmethode .....	59
3.2.2 Szintillationszählverfahren.....	59
3.2.2.1 Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie .....	60
3.2.2.2 Feststoffsintillationsspektrometrie .....	61
3.2.3 Theoretische Grundlagen der Rezeptortheorie .....	61
3.2.4 Experimente im Bindungsgleichgewicht.....	62
3.2.4.1 Homologe Konkurrenz.....	62
3.2.4.2 Heterologe Konkurrenz.....	65
3.2.4.2.1 Heterologe Konkurrenzexperimente mit Acetylcholin und [ <sup>3</sup> H]NMS in An- und Abwesenheit eines Allosters .....	83
3.2.5 Kinetische Experimente .....	84
3.2.5.1 Komplette Dissoziation.....	85
3.2.5.2 "Drei-Punkt"-Kinetik .....	87
3.3 FUNKTIONELLE UNTERSUCHUNGEN .....	91
3.3.1 [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindung .....	92
3.3.1.1 Theoretische Grundlagen, Prinzip der Messung .....	92
3.3.1.2 Durchführung.....	92
3.3.1.3 Auswertung.....	93
3.3.2 Inositol-1-phosphat (IP1) Bestimmung .....	94
3.3.2.1 Theoretische Grundlagen, Prinzip der Messung .....	94
3.3.2.2 Durchführung.....	95
3.3.2.3 Auswertung.....	97
3.3.3 Bestimmung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP).....	98
3.3.3.1 Theoretische Grundlagen, Prinzip der Messung .....	98
3.3.3.2 Durchführung.....	98
3.3.3.3 Auswertung.....	99
3.3.4 Messung der zellulären dynamischen Massenumverteilung (DMR-Messung).....	100

3.3.4.1	Theoretische Grundlagen, Prinzip der Messung .....	100
3.3.4.2	Durchführung.....	102
3.3.4.3	Auswertung.....	103
3.4	OPERATIONAL MODEL.....	105
3.5	BIAS BERECHNUNG.....	106
3.6	STATISTIK.....	108
3.6.1	<i>Deskriptive Statistik</i> .....	108
3.6.1.1	Berechnung des arithmetischen Mittelwertes x.....	108
3.6.1.2	Berechnungen der Streuung .....	108
3.6.2	<i>Statistische Prüfverfahren</i> .....	109
3.6.2.1	t-Test.....	109
3.6.2.2	F-Test.....	111
3.6.2.3	Nichtlineare globale Kurvenanalyse .....	112
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>113</b>
4.1	CHARAKTERISIERUNG DUALSTERISCHER IPEROXO/BQCAD HYBRIDLIGANDEN HINSICHTLICH IHRER BINDUNGSEIGENSCHAFTEN UND SIGNALWEGAKTIVIERUNG AN MUSKARINISCHEN $hM_1$ -REZEPTOREN .....	113
4.1.1	<i>Einfluss unterschiedlicher Halogensubstitution im allosterischen Baustein sowie unterschiedlicher Zwischenkettenlängen auf das Bindungsverhalten dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden am muskarinischen <math>hM_1</math>-Rezeptor</i> .....	113
4.1.1.1	Bindungseigenschaften muskarinischer $hM_1$ -Rezeptoren in stabil transfizierten CHO-Zellen.....	114
4.1.1.1.1	<i>Charakterisierung der Bindungseigenschaften von [<math>^3H</math>]NMS nach drei und acht Stunden Inkubationszeit an <math>hM_1</math>-wt-Rezeptoren in stabil transfizierten, intakten CHO-Zellen</i> .....	115
4.1.1.1.2	<i>Charakterisierung der Bindungseigenschaften von [<math>^3H</math>]NMS in Membranhomogenaten aus stabil transfizierten CHO-<math>hM_1</math>-wt-Zellen</i> .....	116
4.1.1.1.3	<i>Charakterisierung der [<math>^3H</math>]NMS-Dissoziation von <math>hM_1</math>-wt-Rezeptoren in intakten, lebenden CHO-Zellen</i> .....	118
4.1.2	<i>Charakterisierung möglicher allosterischer Effekte dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden und ihrer Einzelkomponenten auf die [<math>^3H</math>]NMS-Dissoziation von <math>hM_1</math>-wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen</i> .....	119
4.1.2.1	Einfluss dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden und ihrer allosterischen Fragmente auf die [ $^3H$ ]NMS Dissoziation von $hM_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen .....	120
4.1.2.2	Einfluss des orthosterischen Bausteins Iperoxo auf die [ $^3H$ ]NMS-Dissoziation von $hM_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.....	124
4.1.3	<i>Bindungseigenschaften dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden an intakten CHO-<math>hM_1</math>-wt-Zellen</i> .....	125
4.1.3.1	Bestimmung der Bindungseigenschaften dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden an intakten CHO- $hM_1$ -wt-Zellen mit Hilfe zweier Einzelanalysen.....	125
4.1.3.2	Bestimmung der Bindungseigenschaften dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden an $hM_1$ -Rezeptoren in intakten CHO-Zellen mit Hilfe einer globalen Analyse basierend auf Bindungsdaten .....	136
4.1.4	<i>Dualsterische Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden induzieren Voll- bzw. Partialagonismus</i> .....	141

4.1.4.1 Charakterisierung der durch dualsterische Iperoxo/BQCAAd-Hybridliganden induzierten G <sub>q</sub> -Signalwegaktivierung .....	143
4.1.4.1.1 Einfluss unterschiedlicher Agonisten auf die IPI-Akkumulation in intakten CHO-hM <sub>1</sub> -wt- Zellen .....	143
4.1.4.1.2 Einfluss dualsterischer Iperoxo/BQCAAd-Hybridliganden auf die IPI-Akkumulation in CHO-hM <sub>1</sub> -wt-Zellen .....	145
4.1.4.2 Charakterisierung der durch dualsterische Iperoxo/BQCAAd-Hybridliganden induzierten G <sub>s</sub> -Signalwegaktivierung .....	148
4.1.4.2.1 Einfluss unterschiedlicher Agonisten auf die cAMP-Akkumulation in CHO-hM <sub>1</sub> -wt-Zellen.....	148
4.1.4.2.2 Einfluss dualsterischer Iperoxo/BQCAAd-Hybridliganden auf die cAMP-Akkumulation in CHO-hM <sub>1</sub> -wt-Zellen .....	149
4.1.4.3 Charakterisierung der durch dualsterische Iperoxo/BQCAAd-Hybridliganden induzierten G <sub>i</sub> -Signalwegaktivierung .....	153
4.1.4.3.1 Einfluss von ACh und Iperoxo auf die [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindung an hM <sub>1</sub> -Rezeptoren in Membransuspensionen aus CHO-Zellen.....	153
4.1.4.3.2 Einfluss dualsterischer Iperoxo/BQCAAd-Hybridliganden auf die [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindung an hM <sub>1</sub> -Rezeptoren in Membransuspensionen aus CHO-Zellen.....	154
4.1.5 Funktionelle Affinität und Kopplungseffizienz dualsterischer Iperoxo/BQCAAd-Hybridliganden auf unterschiedlichen Signalwegen .....	157
4.1.6 Quantifizierung eines durch dualsterische Hybridliganden induzierten „Ligand-Bias“ .....	163
4.1.7 Charakterisierung der allosterischen Fragmente der dualsterischen Iperoxo/BQCAAd-Hybride hinsichtlich möglicher agonistische Effekte an hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptoren .....	175
4.1.8 Charakterisierung eines möglichen PAM-Effektes der allosterischen Bausteine (BQCAAd) auf die Bindung orthosterischer Agonisten an hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptoren .....	176
4.1.8.1 Allosterische Hybridbausteine induzieren keine Bindungsförderung des endogenen Liganden ACh an hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptoren.....	177
4.1.8.2 Inhibitionsexperimente mit dem Radioagonisten [ <sup>3</sup> H]Iperoxo an hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptoren.....	179
4.1.8.2.1 Charakterisierung der Bindungseigenschaften von [ <sup>3</sup> H]Iperoxo in Membranhomogenaten aus stabil transfizierten CHO-hM <sub>1</sub> -wt-Zellen.....	179
4.1.8.2.2 Der allosterische Modulator BQCA führt zu einer Affinitätssteigerung des Radioagonisten [ <sup>3</sup> H]Iperoxo am hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptor .....	180
4.1.8.2.3 Die allosterischen Fragmente der Iperoxo/BQCAAd-Hybride (Substanzserie 1) zeigen keine positive Beeinflussung der [ <sup>3</sup> H]Iperoxo-Bindung an hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptoren.....	182
4.1.9 Globale Analyse der [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungs- sowie der Funktionsdaten dualsterischer Iperoxo/BQCAAd-Hybridliganden zur Identifizierung ihres Orientierungsverhältnisses R <sub>pose</sub> , der maximalen fraktionellen Rezeptorbesetzung in der aktiven und inaktiven Rezeptorbindungsorientierung sowie der systemunabhängigen maximalen Wirksamkeit E <sub>max</sub> für unterschiedliche Rezeptorsignalwege.....	185
4.1.9.1 Neue Globale Analyse der [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungs- sowie der Funktionsdaten unterschiedlicher Signalwege von JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ) belegen einen durch Verlängerung der Zwischenkette induzierten Wechsel der Rezeptorbindungsorientierung mit einer Bevorzugung der aktiven Bindungspose .....	187
4.1.9.2 Die intrinsische Rezeptoraktivität in der dualsterischen aktiven Rezeptorbindungspose in Verbindung mit der Fraktionsgröße der aktiven Pose regelt den ausgelösten Maximaleffekt E <sub>max</sub> der dualsterischen Hybridliganden JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ).....	193

4.1.9.3 Die globale Analyse der [ <sup>3</sup> H]NMS-Bindungs- und Funktionsdaten von JK 549 (C <sub>4</sub> ) und JK 491 (C <sub>6</sub> ) unter Einbeziehung unterschiedlicher Signalwege belegen keine Veränderung hinsichtlich der Bindungsorientierung durch Verlängerung der Zwischenkette .....	196
4.1.9.4 Die intrinsische Rezeptoraktivität in der dualsterischen aktiven Rezeptorbindungspose in Verbindung mit der Fraktionsgröße der aktiven Pose regelt den ausgelösten Maximaleffekt E <sub>max</sub> der dualsterischen Hybridliganden JK 549 (C <sub>4</sub> ) und JK 491 (C <sub>6</sub> ).....	197
4.1.9.5 Die globale Analyse der [ <sup>3</sup> H]NMS-Bindungs- und Funktionsdaten der Hybridliganden JK 596 (C <sub>4</sub> ) und JK 559 (C <sub>6</sub> ) unter Einbeziehung unterschiedlicher Signalwege belegen einen geringen Einfluss der Zwischenkettenlänge auf die Rezeptorbindungsorientierung .....	199
4.1.9.6 Die intrinsische Rezeptoraktivität in der dualsterischen aktiven Rezeptorbindungspose in Verbindung mit der Fraktionsgröße der aktiven Pose hat Einfluss auf den ausgelösten Maximaleffekt E <sub>max</sub> der dualsterischen Hybridliganden JK 596 (C <sub>4</sub> ) und JK 559( C <sub>6</sub> ).....	201
4.2. EINFLUSS PUTATIV ALLOSTERISCHER MUTATIONEN DES HUMANEN M <sub>1</sub> -REZEPTORS AUF DIE BINDUNGSEIGENSCHAFTEN UND DIE SIGNALWEGAKTIVIERUNG DUALSTERISCHER HYBRIDLIGANDEN .....	204
4.2.1 <i>Charakterisierung der [<sup>3</sup>H]NMS-Bindungseigenschaften und der Rezeptorexpression unterschiedlicher CHO-Flp-hM<sub>1</sub>-Rezeptormutationen.....</i>	205
4.2.1.1 Vergleich der zwei stabilen CHO-hM <sub>1</sub> -Expressionszelllinien CHO-hM <sub>1</sub> -wt und CHO-Flp-hM <sub>1</sub> -wt .....	205
4.2.1.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften und der Rezeptorexpression unterschiedlicher CHO-Flp-hM <sub>1</sub> -Rezeptormutationen .....	207
4.2.2 <i>Charakterisierung der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation von stabil transfizierten muskarinischen hM<sub>1</sub>-Rezeptoren in CHO- und CHO-Flp-Zellen.....</i>	208
4.2.2.1 Vergleich der [ <sup>3</sup> H]NMS-Dissoziation von CHO-M <sub>1</sub> -Zellen und CHO-Flp-M <sub>1</sub> -Zellen.....	208
4.2.2.2 Beeinflussung der [ <sup>3</sup> H]NMS-Dissoziation durch Mutation unterschiedlicher Epitope im allosterischen Bindungsareal des hM <sub>1</sub> -Rezeptors .....	209
4.2.3 <i>Einfluss von Rezeptormutationen im putativ allosterischen Bindungsareal des hM<sub>1</sub>-Rezeptors auf die Eigenschaften dualsterischer Hybridliganden und ihrer allosterischen Bausteine die [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation zu verzögern .....</i>	211
4.2.4 <i>Einfluss putativer allosterischer Punktmutationen auf die [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindung dualsterischer Hybridliganden am muskarinischen hM<sub>1</sub>-Rezeptor .....</i>	215
4.2.4.1 Einfluss putativ allosterischer Punktmutationen auf das Bindungsverhalten muskarinischer Agonisten am muskarinischen hM <sub>1</sub> -Rezeptor.....	215
4.2.4.2 Einfluss putativ allosterischer Punktmutationen auf die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Agonisten Iperoxo am muskarinischen hM <sub>1</sub> -Rezeptor.....	217
4.2.4.3 Einfluss putativer allosterischer Punktmutationen auf die Gleichgewichtsbindung der dualsterischen Hybridliganden JK 550 (C <sub>4</sub> ), JK 537 (C <sub>6</sub> ) und ihrer allosterischer Fragmente JK 533 (C <sub>4</sub> ), JK 532 (C <sub>6</sub> ).....	219
4.2.4.4 Einfluss putativ allosterischer Punktmutationen auf die fraktionelle Rezeptorbesetzung der dualsterischen Hybridliganden JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ).....	224
4.2.5 <i>Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen des hM<sub>1</sub>-Rezeptors auf die Produktion unterschiedlicher sekundärer Botenstoffe .....</i>	230
4.2.5.1 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im allosterischen Bereich des hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf die durch Acetylcholin-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp-M <sub>1</sub> -Zellen .....	231
4.2.5.2 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im allosterischen Bereich des hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf die durch Iperoxo-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp-M <sub>1</sub> -Zellen.....	232

4.2.5.3 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen auf die durch die Hybridliganden JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ) induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp-hM <sub>1</sub> -Zellen .....	234
4.2.5.4 Charakterisierung der allosterischen Bausteine hinsichtlich eines möglichen agonistischen Effektes durch Punktmutationen im allosterischen Haftareals des muskarinischen hM <sub>1</sub> -Rezeptors.....	237
4.2.5.5 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im allosterischen Bereich des hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf die durch Acetylcholin induzierte cAMP-Akkumulation in CHO-Flp-M <sub>1</sub> -Zellen.....	238
4.2.5.6 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im allosterischen Bereich des hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf die durch Iperoxo-induzierte cAMP Akkumulation in CHO-Flp-M <sub>1</sub> -Zellen.....	239
4.2.5.7 Einfluss unterschiedlicher Rezeptorpunktmutationen auf die durch JK 550 und JK 537 induzierte cAMP Akkumulation in CHO-Flp-M <sub>1</sub> -Zellen.....	241
4.2.6 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im putativ allosterischen Bindungsareal des hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf die Hybrid induzierte funktionelle Affinität sowie seine Kopplungseffizienz.....	244
4.2.7 Identifizierung des Bindungsverhältnisses, des dynamischen Transduktionskoeffizienten sowie der systemabhängigen maximalen Wirksamkeit der dualsterischen Hybridliganden an hM <sub>1</sub> -Rezeptoren mit Punktmutationen allosterischer Epitope .....	250
4.2.7.1 hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptor zeigt nur geringen Einfluss auf die Bindungsorientierung der dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537.....	250
4.2.7.2 Mutation M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala führt zu einem Wechsel in der Bindungsorientierung des dualsterischen Hybrides JK 550 (C <sub>4</sub> ).....	254
4.2.7.3 Mutation M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala zeigt keinen Einfluss auf die Bindungsorientierung der dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537.....	257
4.2.7.4 Mutation M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala führt zu einer fast 99-prozentigen Bindung beider dualsterischen Hybridsubstanzen in der dualsterischen Pose.....	261
4.2.8 Einfluss von Rezeptormutationen innerhalb des putativ allosterischen Bindungsareales auf die Signalwegselektivität dualsterischer Hybridliganden.....	264
4.3 CHARAKTERISIERUNG VON DUALSTERISCHEN AF292/BQCAD-HYBRIDLIGANDEN SOWIE ALLOSTERISCHEN FRAGMENTEN VOM TYP BQCAD UND TBPBD AN MUSKARINISCHEN hM <sub>1</sub> -REZEPTOREN .....	281
4.3.1 Charakterisierung der Bindung und Signalwegaktivierung dualsterischer AF292/BQCAd-Hybridliganden an muskarinischen hM <sub>1</sub> -Rezeptoren.....	281
4.3.1.1 Charakterisierung möglicher allosterischer Effekte dualsterischer AF292/BQCAd-Hybridliganden sowie ihrer Einzelkomponenten auf die [ <sup>3</sup> H]NMS-Dissoziation von hM <sub>1</sub> -Rezeptoren intakter CHO-Zellen.....	282
4.3.1.1.1 Einfluss dualsterischer AF292/BQCAd-Hybridliganden sowie ihrer allosterischen Fragmente auf die [ <sup>3</sup> H]NMS-Dissoziation von hM <sub>1</sub> -Rezeptoren intakter CHO-Zellen.....	283
4.3.1.1.2 Einfluss des orthosterischen Bausteins AF 292 auf die [ <sup>3</sup> H]NMS-Dissoziation.....	284
4.3.1.2 Bindungseigenschaften der dualsterischen AF292/TBPbd-Hybridliganden (Substanzserie 2) an orthosterisch unbesetzten CHO-hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptoren .....	286
4.3.1.3 Charakterisierung der allosterischen Fragmente UR-MD-5 und UR-MD-6 mit Hilfe des Radioagonisten [ <sup>3</sup> H]Iperoxo an hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptoren in Membransuspensionen aus CHO-Zellen .....	290
4.3.1.4 Charakterisierung der dualsterischen AF292/TBPbd-Hybridliganden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Signalwegaktivierung .....	292
4.3.1.4.1 Charakterisierung der dualsterischen Hybridliganden sowie ihrer Einzelkomponenten an CHO-M <sub>1</sub> -wt Zellen in DMR Experimenten nach G <sub>q</sub> - und G <sub>i</sub> -Inhibition .....	293



4.3.1.5 Einfluss von Rezeptormutationen im putativen allosterischen Bindungsareal auf die Bindungseigenschaften und die Signalwegaktivierung des allosterischen Bausteins UR-MD-5.....	296
4.3.1.5.1 Einfluss von Rezeptormutationen im putativ allosterischen Bindungsareal auf die dissoziationsverzögernden Eigenschaften des allosterischen Fragmentes UR-MD-5.....	297
4.3.1.5.2 Einfluss von Rezeptormutationen im putativ allosterischen Bindungsareal auf die Bindung von UR-MD-5 an orthosterisch unbesetzten muskarinischen hM <sub>1</sub> -Rezeptoren.....	298
4.3.1.6 Einfluss unterschiedlicher Rezeptorpunktmutationen auf die durch UR-MD-5-induzierte IP1- und cAMP-Akkumulation in CHO-Flp-M <sub>1</sub> -Zellen.....	300
4.3.2 Charakterisierung der Bindung und Signalwegaktivierung des allosterischen Fragmentes UR-MD-2 (TBPBd) an muskarinischen hM <sub>1</sub> -Rezeptoren.....	302
4.3.2.1 Charakterisierung der Bindungseigenschaften von UR-MD-2 an muskarinischen hM <sub>1</sub> -Rezeptoren.....	303
4.3.2.1.1 Beeinflussung der [ <sup>3</sup> H]NMS-Dissoziation durch Mutation unterschiedlicher Epitope im putativ allosterischen Bereich des hM <sub>1</sub> -Rezeptors.....	303
4.3.2.1.2 Einfluss putativer allosterischer Punktmutationen auf die Bindung von UR-MD-2 an orthosterisch unbesetzten muskarinischen hM <sub>1</sub> -Rezeptoren.....	305
4.3.2.1.3 Effekt der allosterischen Fragmente UR-MD-1 und UR-MD-2 auf die Gleichgewichtsbindung des Radioagonisten [ <sup>3</sup> H]Iperoxo an hM <sub>1</sub> -wt Rezeptoren.....	306
4.3.2.2 Charakterisierung des allosterischen Fragmentes UR-MD-2 hinsichtlich seiner Fähigkeit zur G <sub>q</sub> - und G <sub>s</sub> -Signalwegaktivierung.....	308
4.3.2.2.1 UR-MD-2 besitzt auf dem G <sub>q</sub> -Signalweg ein partialagonistisches Verhalten mit gleicher Wirksamkeit wie Pilocarpin.....	308
4.3.2.2.2 UR-MD-2 besitzt auf dem G <sub>s</sub> -Signalweg eine schwächere intrinsische Aktivität, aber eine höhere Wirksamkeit als der Partialagonist Pilocarpin.....	309
4.3.2.3 Quantifizierung einer durch UR-MD-2 induzierten bevorzugten Signalwegaktivierung („Ligand-Bias“) ..	311
4.3.2.4 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen des hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf durch UR-MD-2 induzierte sekundäre Botenstoffe.....	312
4.3.2.4.1 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im allosterischen Bereich des hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf die durch UR-MD-2-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp-Zellen.....	312
4.3.2.4.2 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im allosterischen Bereich des hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf die durch UR-MD-2-induzierte cAMP-Akkumulation in CHO-Flp-Zellen.....	314
4.3.2.5 Einfluss von Punktmutationen des muskarinischen hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf die Signalwegelektivität („Ligand-Bias“) des allosterischen Fragmentes UR-MD-2.....	315
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>318</b>
5.1 DER DYNAMISCHE WECHSEL ZWISCHEN DER AKTIVEN UND DER INAKTIVEN BINDUNGSORIENTIERUNG DUALSTERISCHER HYBRIDLIGANDEN ERLAUBT EIN RATIONALES DESIGN VON PARTIALAGONISMUS AM MUSKARINISCHEN hM <sub>1</sub> -REZEPTOR.....	318
5.1.1 Charakterisierung der Bindungseigenschaften dualsterischer Iperoxo/BQCA-d-Hybridliganden am muskarinischen hM <sub>1</sub> -Rezeptor.....	318
5.1.1.1 Die dualsterischen Iperoxo/BQCA-d-Hybridliganden weisen eine schwächere Bindungsneigung auf als ihr orthosterischer Baustein Iperoxo .....	323
5.1.2 Der Parameter R <sub>pose</sub> als Maß für das Verhältnis zwischen aktiver und inaktiver Bindungspose bestätigt den dynamischen Wechsel der Orientierung zwischen JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ) .....	325

5.2.2 Der Wechsel der Bindungsorientierung zwischen JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ) zeigt keinen Effekt auf den induzierten Maximaleffekt .....	328
5.2 EINFÜHRUNG UND VALIDIERUNG VON DREI AUF EINANDER AUFBAUENDEN DATENANALYSEMETHODEN (ANALYSEN A, B UND C) ZUR ERMITTLUNG VON BINDUNGS- UND FUNKTIONSPARAMETERN DUALSTERISCHER HYBRIDLIGANDEN .....	338
5.2.1 Besonderheiten der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Analysemethoden.....	338
5.2.2 Vergleich der mit Hilfe der drei Modelle analysierten Parameterwerte .....	342
5.2.3 Einfluss steiler Inhibitionskurven in Gegenwart allosterischer Bausteine auf die mit Hilfe der globalen Analyse c) ermittelten Parameterwerte .....	345
5.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR hM <sub>1</sub> -REZEPTOR-VERMITTELTEN SIGNALWEGSELEKTIVITÄT VON IPEROXO/BQCAD-HYBRIDLIGANDEN IN CHO-ZELLEN .....	347
5.3.1 Möglichkeiten der Ermittlung einer durch Liganden induzierte Signalwegselektivität („Ligand-Bias“) .....	347
5.3.2 Dualsterische Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden zeigen Hinweise auf eine G <sub>s</sub> -oder G <sub>i</sub> -Signalwegselektivität.....	354
5.4 PUNKTMUTATIONEN IM BEREICH DER PUTATIV ALLOSTERISCHEN BINDUNGSSTELLE DES hM <sub>1</sub> -REZEPTORS BELEUCHTEN DIE BINDUNGSTOPOGRAPHIE DER DUALSTERISCHEN IPEROXO/BQCAD HYBRIDE UND DER DARAUS RESULTIERENDEN REZEPTORAKTIVIERUNG .....	357
5.4.1 Einfluss putativ allosterischer Punktmutationen auf die [ <sup>3</sup> H]NMS Gleichgewichtsbindung dualsterischer Hybridliganden am muskarinischen hM <sub>1</sub> -Rezeptor .....	359
5.4.2 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen des hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf die Produktion sekundärer Botenstoffe.....	365
5.4.3 Punktmutationen im putativ allosterischen Bereich des hM <sub>1</sub> -Rezeptors induzieren Signalwegselektivität von Vollagonisten sowie von dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden .....	368
5.5 CHARAKTERISIERUNG PUTATIV DUALSTERISCHER AF292/BQCAD-HYBRIDLIGANDEN.....	373
5.5.1 Putativ dualsterische AF292/BQCAD-Hybridliganden weisen eine nicht eindeutig definierbare Bindungsorientierung am muskarinischen hM <sub>1</sub> -Rezeptor auf.....	373
5.5.2 Die dualsterischen Hybride UR-MD-13 und -14 sind in der Lage den hM <sub>1</sub> -Rezeptor zu aktivieren. 377	
5.6 DAS ALLOSTERISCHE FRAGMENT UR-MD-5 VERFÜGT ÜBER POSITIV ALLOSTERISCHE EIGENSCHAFTEN HINSICHTLICH DER BINDUNGSNEIGUNG DES AGONISTEN IPEROXO AM MUSKARINISCHEN hM <sub>1</sub> -REZEPTOR ....	380
5.6.1 Das allosterische Fragment UR-MD-5 verfügt über positiv allosterische Eigenschaften hinsichtlich der Bindungsneigung des Agonisten Iperoxo am muskarinischen hM <sub>1</sub> -Rezeptor .....	381
5.6.2 Das allosterische Fragment UR-MD-5 verfügt nicht über positiv allosterische Eigenschaften hinsichtlich der Bindungsneigung des orthosterischen Agonisten Iperoxo am muskarinischen hM <sub>2</sub> -Rezeptor .....	384
5.6.3 Das allosterische Fragment UR-MD-5 zeigt in ersten Pilotexperimenten PAM-Eigenschaften hinsichtlich der Iperoxo-induzierten G <sub>s</sub> -Signalwegaktivierung am muskarinischen hM <sub>1</sub> -Rezeptor.....	385
5.7 DAS ALLOSTERISCHE FRAGMENT UR-MD-2 (TBPBD); EIN ALLOSTERISCHER ODER “BITOPISCHER“ AGONIST?.....	388
5.7.1 UR-MD-2: Ein rein allosterischer oder ein „bitopischer“ Agonist am hM <sub>1</sub> -Rezeptor? .....	389

5.7.2 Die Punktmutationen $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$ in der zweiten extrazellulären Schleife sowie $M_1^{401}\text{Glu Ala}$ am Beginn der siebten Transmembrandomäne verhindern die durch UR-MD-2 induzierte $G_s$ -Protein-Kopplung .....	395
5.8 FAZIT BEZÜGLICH DER ENTWICKLUNG UND VERWENDUNG NEUER DUALSTERISCHER HYBRIDLIGANDEN DES $hM_1$ -REZEPTORS .....	398
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>401</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>407</b>
<b>8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>449</b>
<b>9 ANHANG .....</b>	<b>454</b>
9.1 BINDUNGSEIGENSCHAFTEN DER ORTHOSTERISCHEN VOLLAGONISTEN ACETYLCHOLIN UND IPEROXO AN INTAKTEN CHO- $hM_1$ -WT-ZELLEN .....	454
9.2 BINDUNGSEIGENSCHAFTEN DES ORTHOSTERISCHEN VOLLAGONISTEN ACETYLCHOLIN AN MEMBRANHOMOGENATEN AUS CHO- $hM_1$ -WT-ZELLEN .....	455
9.3 WEITERFÜHRENDE EXPERIMENTE ZUR CHARAKTERISIERUNG DES ALLOSTERISCHEN FRAGMENTES UR-MD-5 (BQCAD) .....	456
9.3.1 Das allosterische Fragment UR-MD-5 liefert in Pilotexperimenten Hinweise auf PAM-Eigenschaften hinsichtlich der Iperoxo-induzierten $G_s$ -Signalwegaktivierung.....	456
9.3.2 Bindungseigenschaften des allosterischen Fragmentes UR-MD-5 an Membranhomogenaten aus CHO- $hM_2$ -wt-Zellen in Pilotexperimenten.....	457
9.4 WEITERFÜHRENDE EXPERIMENTE ZUR CHARAKTERISIERUNG DES ALLOSTERISCHEN FRAGMENTES UR-MD-2 (TBPBD).....	458
9.4.1 Einfluss putativer allosterischer Punktmutationen auf die Bindung von UR-MD-2 an orthosterisch unbesetzte muskarinische $hM_1$ -Rezeptoren.....	458
9.4.2 Bindungseigenschaften des allosterischen Fragmentes UR-MD-2 (TBPBD) an Membranhomogenaten aus CHO- $hM_1$ - $hM_5$ -wt-Zellen in Pilotexperimenten.....	459
9.5 KONTROLLEXPERIMENTE ZUR WIRKUNG DES POSITIV ALLOSTERISCHEN MODULATORS BQCA AM MUSKARINISCHEN $hM_1$ -REZEPTOR.....	460
9.5.1 Untersuchung des allosterisch agonistischen Effektes von BQCA in IP1- und cAMP-Akkumulations- sowie DMR-Experimenten.....	460
9.6 QUANTIFIZIERUNG EINES „LIGAND-BIAS“ AUF DER GRUNDLAGE VON DMR-DATEN.....	461
9.7 GLOBALE ANALYSE DER [ $^3\text{H}$ ]NMS-GLEICHGEWICHTSBINDUNGS- SOWIE DER FUNKTIONSDATEN DER DUALSTERISCHEN IPEROXO/BQCAD-HYBRIDLIGANDEN JK 596, JK 559 SOWIE JK 549 UND JK 491 .....	465
<b>10 VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>	<b>473</b>
<b>11 DANKSAGUNG.....</b>	<b>474</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1. 1:</b> Modellhafte Abbildung des muskarinischen M <sub>1</sub> -, M <sub>2</sub> -, M <sub>3</sub> - und M <sub>4</sub> -Rezeptors mit dem orthosterischen Antagonisten Tiotropium. ....	4
<b>Abbildung 1. 2:</b> Schematische Übersicht über die intramolekularen Veränderungen des muskarinischen M <sub>2</sub> -Rezeptors nach Aktivierung durch den orthosterischen Liganden Iperoxo. Vergleich der inaktiven (blau) und aktiven (orange) Struktur des M <sub>2</sub> -Rezeptors. ....	6
<b>Abbildung 1. 3:</b> Schematische Darstellung der Aktivierung eines G Protein-gekoppelten Rezeptors durch Agonist-Stimulation. ....	8
<b>Abbildung 1. 4:</b> Dreidimensionale Darstellung der drei postulierten allosterischen Bindungsstellen des M <sub>1</sub> -Rezeptors nach Espinoza-Fonseca, L. M., und Trujillo-Ferrara, J. G. (2005), erstellt mit dem Programm AutoDock. ....	12
<b>Abbildung 1. 5:</b> Schematische Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten allosterischer Modulation. ....	15
<b>Abbildung 1. 6:</b> Beispielhaft schematische Darstellung des Bauprinzips und der Bindungsmöglichkeiten der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten dualsterischen agonistischen Hybridliganden an M <sub>1</sub> -Rezeptoren. ....	19
<b>Abbildung 1. 7:</b> Schematische Darstellung der durch unterschiedliche Liganden ausgelösten Signalwegbevorzugung. ....	21
<b>Abbildung 3. 1:</b> Schematische Darstellung des zweistufigen Bindungssystems nach Kenakin, 1997. ....	67
<b>Abbildung 3. 2:</b> Schematische Darstellung des ternären Modells allosterischer Interaktionen nach Ehlert (1988) und Piktogramm mit den unterschiedlichen Rezeptorbesetzungszuständen (modifiziert nach Mohr et al. 2003). ....	69
<b>Abbildung 3. 3:</b> Schematische Darstellung des Bindungsmodells für dualsterische Hybridliganden. Modifiziert nach May et al. 2007. ....	72
<b>Abbildung 3. 4:</b> Beispielhafte Darstellung der globalen Analyse basierend auf [ <sup>3</sup> H]NMS-Bindungsdaten und funktionellen Daten. ....	75
<b>Abbildung 3. 5:</b> Beispielhafte graphische Darstellung des Ergebnisses der Berechnung der maximalen fraktionellen Rezeptorbesetzung für die zwei möglichen Rezeptororientierungen der dualsterischen Hybridliganden auf Basis des zur Datenanalyse verwendeten Modells. ....	79
<b>Abbildung 3. 6:</b> Beispielhafte graphische Darstellung des Ergebnisses und der Auswertung zweier Experimente, die als „Drei-Punkt“-Kinetik an lebenden, intakten CHO-Zellen oder Membranhomogenaten durchgeführt wurde. ....	87
<b>Abbildung 3. 7:</b> Funktionsprinzip des Versuchsansatzes zur Bestimmung der IP1-Akkumulation. ....	94
<b>Abbildung 3. 8:</b> Schematische Darstellung des Funktionsprinzips einer Inositol-1-phosphat (IP-1) Bestimmung. ....	95
<b>Abbildung 3. 9:</b> Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung einer 2 Inositol-1-phosphat (IP-1) Bestimmung. ....	96
<b>Abbildung 3. 10:</b> Prinzip der DMR-Messung. ....	101
<b>Abbildung 3. 11:</b> Darstellung der Originalsignaturen, beispielhaft für die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung in hM <sub>1</sub> -CHO-Zellen. ....	104

<b>Abbildung 4. 1:</b> Schematische Übersicht des strukturellen Aufbaus der in diesem Kapitel untersuchten dualsterischen Hybridliganden (Substanzserie 1). .....	114
<b>Abbildung 4. 2:</b> Homologe Konkurrenz zwischen [ <sup>3</sup> H]NMS und NMS an <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren an lebenden CHO-Zellen nach drei- und achtstündiger Inkubationszeit.....	115
<b>Abbildung 4. 3:</b> Repräsentatives Ergebnis eines homologen Konkurrenzexperimentes mit [ <sup>3</sup> H]NMS und steigender Konzentrationen von NMS an Membranhomogenaten aus CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	117
<b>Abbildung 4. 4:</b> Kinetik der Dissoziation von [ <sup>3</sup> H]NMS von <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. ....	118
<b>Abbildung 4. 5:</b> Interaktion von JK 384, JK 550, JK 537 (dualsterische Hybride) und JK 372-1, JK 533, JK 532 (allosterische Fragmente) an [ <sup>3</sup> H]NMS-besetzten <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. ....	121
<b>Abbildung 4. 6:</b> Interaktion von JK 596, JK 559, JK 549, JK 491 (dualsterische Hybride) und JK 569, JK 551, JK 544, JK 469 (allosterischen Fragmente) an [ <sup>3</sup> H]NMS-besetzten <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. ....	123
<b>Abbildung 4. 7:</b> Einfluss des orthosterischen Bausteins Iperoxo auf die [ <sup>3</sup> H]NMS-Dissoziation von <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.....	124
<b>Abbildung 4. 8:</b> Heterologe Inhibitionsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der allosterischen Fragmente JK 372-1, JK 533 und JK 532 mit dem orthosterischen Radioantagonisten [ <sup>3</sup> H]NMS an <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.....	127
<b>Abbildung 4. 9:</b> Heterologe Inhibitionsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der allosterischen Fragmente JK 544 und JK 469 und JK 569, JK 551 mit dem orthosterischen Radioantagonisten [ <sup>3</sup> H]NMS an <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.....	129
<b>Abbildung 4. 10:</b> Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der dualsterischen Hybridliganden JK 384, JK 550 und JK 537 mit dem orthosterischen Radioantagonisten [ <sup>3</sup> H]NMS an <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.....	131
<b>Abbildung 4. 11:</b> Konzentrationsabhängige maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung der dynamischen Hybridliganden JK 384 ( <i>C<sub>6</sub></i> ) und dem Paar aus JK 550 ( <i>C<sub>4</sub></i> ) und JK 537 ( <i>C<sub>6</sub></i> ) in der aktiven und inaktiven Bindungspose am muskarinischen <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptor.....	132
<b>Abbildung 4. 12:</b> Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der dualsterischen Hybridliganden-Paare JK 596/JK 559 und JK 549/JK 491 mit dem orthosterischen Radioantagonisten [ <sup>3</sup> H]NMS an <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. ....	133
<b>Abbildung 4. 13:</b> Konzentrationsabhängige maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung der dynamischen Hybridliganden JK 596 ( <i>C<sub>4</sub></i> ), JK 559 ( <i>C<sub>6</sub></i> ) sowie JK 549 ( <i>C<sub>4</sub></i> ) und JK 491 ( <i>C<sub>6</sub></i> ) in der aktiven und inaktiven Bindungspose am muskarinischen <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptor.....	135
<b>Abbildung 4. 14:</b> Ergebnisse der globalen Analyse der [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten in Gegenwart der Fragmente JK 372-1, JK 533 und JK 532 und der Hybride JK 384, JK 550 und JK 537 basierend auf dem Bindungsmodell für dualsterische Hybridliganden und dem ternären Modell allosterischer Interaktionen an <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. ....	137
<b>Abbildung 4. 15:</b> Ergebnisse der globalen Analyse der [ <sup>3</sup> H]NMS Gleichgewichtsbindungsdaten in Gegenwart der Fragmente JK 569, JK 551, JK 544 und JK 469 sowie ihrer dualsterischen Hybride JK 596, JK 559, JK 549 und JK 491 basierend auf dem Bindungsmodell für dualsterische Hybridliganden und dem ternären Modell allosterischer Interaktionen an <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. ....	139
<b>Abbildung 4. 16:</b> Schematische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Messmethoden für die nach <i>M<sub>1</sub></i> -Rezeptoraktivierung durch unterschiedliche G Proteine induzierten Signalwege. ....	142

<b>Abbildung 4. 17:</b> Agonist-induzierte IP1-Akkumulation in CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	144
<b>Abbildung 4. 18:</b> Durch die Hybride JK 384, JK 550 und JK 537 induzierte IP1-Akkumulation in CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	146
<b>Abbildung 4. 19:</b> Durch die Hybride JK 596, JK 559, JK 549 und JK 491 induzierte IP1-Akkumulation in CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	147
<b>Abbildung 4. 20:</b> Agonist-induzierte cAMP-Akkumulation in CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	149
<b>Abbildung 4. 21:</b> Durch die Hybride JK 384, JK 550 und JK 537 induzierte cAMP-Akkumulation in CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	151
<b>Abbildung 4. 22:</b> Durch die Hybride JK 549, JK 491, JK 596 und JK 559 induzierte cAMP-Akkumulation in CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	152
<b>Abbildung 4. 23:</b> Agonist-induzierte [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindung an <i>hM<sub>1</sub></i> -wt Rezeptoren in Membransuspensionen aus CHO-Zellen. ....	154
<b>Abbildung 4. 24:</b> Durch die Hybride JK 384, JK 550 und JK 537 induzierte Förderung der [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindung an <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in Membranen aus CHO-Zellen. ....	155
<b>Abbildung 4. 25:</b> Durch die Hybride JK 549, JK 491, JK 596 und JK 559 induzierte Förderung der [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindung an <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in Membranen aus CHO-Zellen. ....	156
<b>Abbildung 4. 26:</b> Ergebnisse der Anwendung des „Operational Model of Agonism“ auf die Fähigkeit des dualsterischen Hybridpaars JK 537 zur <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptor vermittelten (A) IP1-Akkumulation, (B) cAMP-Akkumulation und (C) Förderung der [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindung. ....	158
<b>Abbildung 4. 27:</b> Graphische Darstellung der funktionellen Affinität und der Kopplungseffizienz des Hybridpaars JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ) auf dem G <sub>q</sub> -, G <sub>s</sub> - und dem G <sub>i</sub> -Signalweg. ....	161
<b>Abbildung 4. 28:</b> Graphische Darstellung der funktionellen Affinität und der Kopplungseffizienz des Hybridpaars JK 549 (C <sub>4</sub> ) und JK 491 (C <sub>6</sub> ) auf dem G <sub>q</sub> -, G <sub>s</sub> - und dem G <sub>i</sub> -Signalweg. ....	162
<b>Abbildung 4. 29:</b> Graphische Darstellung der funktionellen Affinität und der Kopplungseffizienz des Hybridpaars JK 596 (C <sub>4</sub> ) und JK 559 (C <sub>6</sub> ) auf dem G <sub>q</sub> -, G <sub>s</sub> - und dem G <sub>i</sub> -Signalweg. ....	163
<b>Abbildung 4. 30:</b> Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Hybridsubstanzen (Substanzserie 1) ermittelt auf der Basis von IP1-Akkumulations- (G <sub>q</sub> ), cAMP-Akkumulations- (G <sub>s</sub> ), und GTP S-Bindungs- (G <sub>i</sub> ) Daten. ....	167
<b>Abbildung 4. 31:</b> Normalisierte Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Hybridsubstanzen (Substanzserie 1) ermittelt auf der Basis von IP1-Akkumulations- (G <sub>q</sub> ), cAMP-Akkumulations- (G <sub>s</sub> ) und [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindungs- (G <sub>i</sub> ) Daten. ....	170
<b>Abbildung 4. 32:</b> Graphische Darstellung der $\log(1/K_A)$ -Werte zur Ermittlung eines etwaigen „Ligand Bias“ zwischen dem (A,B) G <sub>q</sub> - und G <sub>s</sub> -Signalweg, (C,D) G <sub>q</sub> und G <sub>i</sub> -Signalweg und (E,F) G <sub>s</sub> und G <sub>i</sub> -Signalweg, induziert durch die Iperoxo/BQCAD Hybridliganden an <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in CHO-Zellen. ....	174
<b>Abbildung 4. 33:</b> Graphische Darstellung der IP1-Akkumulation, induziert durch die allosterischen Fragmente (BQCAD) der dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden. ....	175
<b>Abbildung 4. 34:</b> Effekt einer festgelegten Konzentration der allosterischen Fragmente JK 532 (C <sub>4</sub> ) und JK 533 (C <sub>6</sub> ) sowie der korrespondierenden Hybridliganden JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ) auf die Inhibition der [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindung durch ACh zur Ermittlung der Kooperativität der Testsubstanzen mit ACh. ....	178

<b>Abbildung 4. 35:</b> Homologe Konkurrenz zwischen [ <sup>3</sup> H]Iperoxo und Iperoxo an Membransuspensionen aus CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	180
<b>Abbildung 4. 36:</b> Effekt verschiedener allosterischer Modulatoren auf die [ <sup>3</sup> H]Iperoxo-Gleichgewichtsbindung an Membranhomogenaten aus CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	181
<b>Abbildung 4. 37:</b> Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der allosterischen Fragmente JK 372-1, JK 533 und JK 532 mit dem orthosterischen Radioagonisten [ <sup>3</sup> H]Iperoxo. ....	183
<b>Abbildung 4. 38:</b> Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der allosterischen Fragmente JK 596, JK 559, JK 544 und JK 469 mit dem orthosterischen Radioagonisten [ <sup>3</sup> H]Iperoxo. ....	184
<b>Abbildung 4. 39:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von DMR- und [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 550 (C <sub>4</sub> ), JK 537 (C <sub>6</sub> ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 533 (C <sub>4</sub> ) und JK 532 (C <sub>6</sub> ) an CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	189
<b>Abbildung 4. 40:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1-Akkumulations- und [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 550 (C <sub>4</sub> ), JK 537 (C <sub>6</sub> ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 533 (C <sub>4</sub> ) und JK 532 (C <sub>6</sub> ) an CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	190
<b>Abbildung 4. 41:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von cAMP-Akkumulation- und [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 550 (C <sub>4</sub> ), JK 537 (C <sub>6</sub> ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 533 (C <sub>4</sub> ) und JK 532 (C <sub>6</sub> ) an CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	191
<b>Abbildung 4. 42:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von [ <sup>35</sup> S]GTP S- und [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 550 (C <sub>4</sub> ), JK 537 (C <sub>6</sub> ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 533 (C <sub>4</sub> ) und JK 532 (C <sub>6</sub> ) an CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen/-Membranen. ....	192
<b>Abbildung 4. 43:</b> Graphische Darstellung der mit Hilfe globaler Analyse von Bindung und Funktion ermittelten funktionellen Parameter R <sub>pose</sub> , R <sub>dyn</sub> und E <sub>max</sub> * unter Verwendung der Daten aus DMR-, IP1-Akkumulations-, cAMP-Akkumulations- und [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindungsexperimenten sowie der Hybrid induzierten Maximaleffekte E <sub>max</sub> des Hybridpaares JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ). ....	195
<b>Abbildung 4. 44:</b> Graphische Darstellung der mit Hilfe globaler Analyse von Bindung und Funktion ermittelten Parameter R <sub>pose</sub> , R <sub>dyn</sub> und E <sub>max</sub> * unter Verwendung der DMR-, IP1-Akkumulations-, cAMP-Akkumulations- und [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindungsdaten sowie der Hybrid-induzierten Maximaleffekte (E <sub>max</sub> ) des Hybridpaares JK 549 (C <sub>4</sub> ) und JK 491 (C <sub>6</sub> ). ....	198
<b>Abbildung 4. 45:</b> Graphische Darstellung der mit Hilfe globaler Analyse der Bindungs- und Funktionsdaten ermittelten Parameter R <sub>pose</sub> , R <sub>dyn</sub> und E <sub>max</sub> * unter Verwendung der DMR-, IP1-Akkumulations-, cAMP-Akkumulations- und [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindungsdaten sowie der Hybrid induzierten Maximaleffekte (E <sub>max</sub> ) des Hybridpaares JK 596 (C <sub>4</sub> ) und JK 559 (C <sub>6</sub> ). ....	202
<b>Abbildung 4. 46:</b> Homologe Konkurrenz zwischen [ <sup>3</sup> H]NMS und NMS an Flp- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt und <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in lebenden CHO-Zellen. ....	206

<b>Abbildung 4. 47:</b> Homologe Konkurrenz zwischen [ <sup>3</sup> H]NMS und NMS an CHO-Flp-Zellen, die stabil transfiziert wurden mit dem <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptor bzw. <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren mit unterschiedlichen Punktmutationen im allosterischen Bindungsareal.....	207
<b>Abbildung 4. 48:</b> Kinetik der Dissoziation von [ <sup>3</sup> H]NMS von <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in CHO- und CHO-Flp-Zellen.....	209
<b>Abbildung 4. 49:</b> Kinetik der Dissoziation von [ <sup>3</sup> H]NMS von <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren mit Punktmutationen im allosterischen Bindungsareal stabil transfizierter CHO-Flp-Zellen.....	210
<b>Abbildung 4. 50:</b> Interaktion von JK 533 (allosterisches Fragment) und JK 550 (dualsterisches Hybrid) mit den aufgeführten orthosterisch durch [ <sup>3</sup> H]NMS-besetzten <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren mit Punktmutationen im Bereich des putativ allosterischen Bindungsareal.....	212
<b>Abbildung 4. 51:</b> Interaktion von JK 532 (allosterisches Fragment) und JK 537 (dualsterisches Hybrid) mit den aufgeführten orthosterisch durch [ <sup>3</sup> H]NMS-besetzten <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren mit Punktmutationen im Bereich des putativ allosterischen Bindungsareal.....	213
<b>Abbildung 4. 52:</b> Bedeutung unterschiedlicher Punktmutationen in allosterischen Epitopen des <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf die Gleichgewichtsbindung des endogenen Vollagonisten Acetylcholin.....	216
<b>Abbildung 4. 53:</b> Bedeutung unterschiedlicher Punktmutationen in allosterischen Epitopen des <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf die Gleichgewichtsbindung des Vollagonisten Iperoxo.....	218
<b>Abbildung 4. 54:</b> Bedeutung unterschiedlicher Punktmutationen in allosterischen Epitopen des <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf die spezifische Bindung der allosterischen Bausteine JK 533 (C <sub>4</sub> ) und JK 532 (C <sub>6</sub> ).....	221
<b>Abbildung 4. 55:</b> Bedeutung unterschiedlicher Punktmutationen in allosterischen Epitopen des <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf die Bindung der dualsterischen Hybridliganden JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ).....	223
<b>Abbildung 4. 56:</b> Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des dynamischen Hybridliganden JK 550 (C <sub>4</sub> ) in der aktiven und der inaktiven Bindungspose an Wildtyp und punktmultierten <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren.....	225
<b>Abbildung 4. 57:</b> Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des dynamischen Hybridliganden JK 537 (C <sub>6</sub> ) in der aktiven und der inaktiven Bindungspose an Wildtyp und punktmultierten <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren.....	226
<b>Abbildung 4. 58:</b> Ergebnisse der globalen Analyse der [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten von Fragment (JK 533) und Hybrid (JK 550) basierend auf dem Bindungsmodell für dualsterische Hybridliganden und dem ternären Modell allosterischer Interaktionen an den gezeigten Rezeptoren in intakten CHO-Flp- <i>hM<sub>1</sub></i> -Zellen...	227
<b>Abbildung 4. 59:</b> Ergebnisse der globalen Analyse der [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten von Fragment (JK 532) und Hybrid (JK 537) basierend auf dem Bindungsmodell für dualsterische Hybridliganden und dem ternären Modell allosterischer Interaktionen an den gezeigten Rezeptoren in intakten CHO-Flp- <i>hM<sub>1</sub></i> -Zellen...	229
<b>Abbildung 4. 60:</b> Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf die ACh-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- <i>hM<sub>1</sub></i> -Zellen.....	231
<b>Abbildung 4. 61:</b> Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf die Iperoxo-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- <i>hM<sub>1</sub></i> -Zellen.....	233
<b>Abbildung 4. 62:</b> Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf die JK 550-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- <i>hM<sub>1</sub></i> -Zellen.....	234
<b>Abbildung 4. 63:</b> Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf die JK 537-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- <i>hM<sub>1</sub></i> -Zellen.....	236



<b>Abbildung 4. 64:</b> Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen des potentiellen allosterischen Bindungsareals des hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf die Fragment-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp-hM <sub>1</sub> -Zellen.....	237
<b>Abbildung 4. 65:</b> Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf die ACh-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp-hM <sub>1</sub> -Zellen. ....	239
<b>Abbildung 4. 66:</b> Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf die Iperoxo-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp-hM <sub>1</sub> -Zellen.....	240
<b>Abbildung 4. 67:</b> Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf die JK 550-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp-hM <sub>1</sub> -Zellen.....	241
<b>Abbildung 4. 68:</b> Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf die JK 537-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp-hM <sub>1</sub> -Zellen.....	242
<b>Abbildung 4. 69:</b> Ergebnisse der Anwendung des „Operational Model of Agonism“ auf die Fähigkeit des dualsterischen Hybrides JK 550 zur hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptor vermittelten IP1-Akkumulation und cAMP-Akkumulation. ....	245
<b>Abbildung 4. 70:</b> Einfluss unterschiedlicher Rezeptorpunktmutationen des potentiellen allosterischen Bindungsareals des hM <sub>1</sub> -Rezeptors auf die durch JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ) induzierte funktionelle Affinität K <sub>A</sub> und Kopplungseffizienz im G <sub>q</sub> -und G <sub>s</sub> -Signalweg in CHO-Flp-hM <sub>1</sub> -Zellen.....	246
<b>Abbildung 4. 71:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrides JK 550 sowie seines allosterischen Fragmentes JK 533 an intakten CHO-Flp-hM <sub>1</sub> -wt-Zellen. ....	251
<b>Abbildung 4. 72:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrides JK 537 sowie seines allosterischen Fragmentes JK 532 an intakten CHO-Flp-hM <sub>1</sub> -wt-Zellen. ....	252
<b>Abbildung 4. 73:</b> Graphische Darstellung der mit Hilfe globaler Analyse von Bindung und Funktion ermittelten Parameter $\tau_{dyn, max}^*$ und R <sub>pose</sub> unter Verwendung der Daten aus IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten des Hybridpaares JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ) an hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Flp-Zellen.....	253
<b>Abbildung 4. 74:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrides JK 550 sowie seines allosterischen Fragmentes JK 533 an intakten CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala-Zellen. ....	254
<b>Abbildung 4. 75:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrides JK 537 sowie seines allosterischen Fragmentes JK 532 an intakten CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala-Zellen. ....	255
<b>Abbildung 4. 76:</b> Graphische Darstellung der mit Hilfe globaler Analyse von Bindung und Funktion ermittelten Parameter $\tau_{dyn, max}^*$ und R <sub>pose</sub> unter Verwendung der Daten aus IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten des Hybridpaares JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ) an M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala-Rezeptoren in intakten CHO-Flp-Zellen.....	257
<b>Abbildung 4. 77:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie [ <sup>3</sup> H]NMS-	

Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrides JK 550 sowie seines allosterischen Fragmentes JK 533 an intakten CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala-Zellen. ....	258
<b>Abbildung 4. 78:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrides JK 537 sowie seines allosterischen Fragmentes JK 532 an intakten CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala-Zellen. ....	259
<b>Abbildung 4. 79:</b> Graphische Darstellung der mit Hilfe globaler Analyse von Bindung und Funktion ermittelten Parameter $\tau_{dyn}$ , $\tau_{max}^*$ und $R_{pose}$ unter Verwendung der Daten aus IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten des Hybridpaares JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ) an M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala-Rezeptoren in intakten CHO-Flp-Zellen.....	260
<b>Abbildung 4. 80:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrides JK 550 sowie seines allosterischen Fragmentes JK 533 an intakten CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala-Zellen. ....	261
<b>Abbildung 4. 81:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrides JK 537 sowie seines allosterischen Fragmentes JK 532 an intakten CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala-Zellen. ....	262
<b>Abbildung 4. 82:</b> Graphische Darstellung der mit Hilfe globaler Analyse von Bindung und Funktion ermittelten Parameter $\tau_{dyn}$ , $\tau_{max}^*$ und $R_{pose}$ unter Verwendung der Daten aus IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten des Hybridpaares JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ) an M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala-Rezeptoren in intakten CHO-Flp-Zellen.....	263
<b>Abbildung 4. 83:</b> Keine der untersuchten Substanzen zeigte, bezogen auf den Referenzagonisten Acetylcholin, an CHO-Flp-hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptoren eine ligandspezifische Bevorzugung eines Signalweges. ....	266
<b>Abbildung 4. 84:</b> Keine der untersuchten Substanzen zeigte, bezogen auf den Referenzagonisten Iperoxo, an CHO-Flp-hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptoren eine ligandspezifische Bevorzugung eines Signalweges .....	268
<b>Abbildung 4. 85:</b> Nur Iperoxo zeigt, bezogen auf den Referenzagonisten Acetylcholin, am M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala-Rezeptor eine ligandspezifische Bevorzugung eines Signalweges. ....	271
<b>Abbildung 4. 86:</b> Keine der untersuchten Substanzen zeigt, bezogen auf den Referenzagonisten Iperoxo, an CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala-Zellen eine ligandspezifische Bevorzugung eines Signalweges. ....	272
<b>Abbildung 4. 87:</b> Ligandspezifische Bevorzugung des IP1-Signalweges durch JK 550 an CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala-Zellen bezogen auf den Referenzagonisten ACh. ....	274
<b>Abbildung 4. 88:</b> Ligandspezifische Bevorzugung des IP1-Signalweges durch JK 550 an CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala Zellen bezogen auf den Referenzagonisten Iperoxo. ....	275
<b>Abbildung 4. 89:</b> Ligandspezifische Bevorzugung des IP1-Signalweges von Iperoxo JK 537 an CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala-Zellen bezogen auf den Referenzagonisten Acetylcholin.....	277
<b>Abbildung 4. 90:</b> Ligandspezifische Bevorzugung des cAMP-Signalweges von JK 550, JK 537 und ACh an CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala-Zellen bezogen auf den Referenzagonisten Iperoxo .....	278
<b>Abbildung 4. 91:</b> Schematische Übersicht des strukturellen Aufbaus der in diesem Ergebnisteil untersuchten potenziell dualsterischen Hybridliganden der Substanzserie 2 sowie der allosterischen Fragmente der Substanzserien 2 und 3. ....	282

<b>Abbildung 4. 92:</b> Interaktion von UR-MD-13 und UR-MD-14 (dualsterische Hybridliganden) und UR-MD-5 und UR-MD-6 (allosterische Fragmente) an [ <sup>3</sup> H]NMS-besetzten <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. .....	283
<b>Abbildung 4. 93:</b> Einfluss der beiden orthosterischen Bausteine AF292 (Substanzserie 2) und Iperoxo (Substanzserie 1) auf die [ <sup>3</sup> H]NMS-Dissoziation von <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.....	285
<b>Abbildung 4. 94:</b> Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der allosterischen Fragmente UR-MD-5 und UR-MD-6 mit dem orthosterischen Radioantagonisten [ <sup>3</sup> H]NMS an <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.....	286
<b>Abbildung 4. 95:</b> Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der dualsterischen Hybride UR-MD-13 und UR-MD-14 mit dem orthosterischen Radioantagonisten [ <sup>3</sup> H]NMS an <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.....	287
<b>Abbildung 4. 96:</b> Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des dynamischen Hybridliganden UR-MD-13 in der aktiven und der inaktiven Bindungspose am muskarinischen <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptor. .....	289
<b>Abbildung 4. 97:</b> Ergebnisse der globalen Analyse der [ <sup>3</sup> H]NMS Gleichgewichtsbindungsdaten des Hybrides UR-MD-13 und des Fragmentes UR-MD-5 basierend auf dem Bindungsmodell für dualsterische Hybridliganden und dem ternären Modell allosterischer Interaktionen an <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. ....	290
<b>Abbildung 4. 98:</b> Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der allosterischen Fragmente UR-MD-5 und UR-MD-6 mit dem orthosterischen Radioagonisten [ <sup>3</sup> H]Iperoxo an Membranhomogenaten aus CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	291
<b>Abbildung 4. 99:</b> Schematische Darstellung der Rezeptor/G Protein-Kopplung und der daraus resultierenden DMR-Signale sowie der verwendeten Sigalweghemmstoffe im Epic <sup>®</sup> -Biosensor System.....	293
<b>Abbildung 4. 100:</b> Messung der Ligand-induzierten dynamischen Massenumverteilung an <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen, vor und nach G <sub>q</sub> - oder G <sub>i</sub> -Signalweginhibition. ....	294
<b>Abbildung 4. 101:</b> Graphische Darstellung der Ligand-induzierten dynamischen Massenumverteilung an <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen, vor und nach G <sub>q</sub> - oder G <sub>i</sub> -Signalweginhibition. ....	295
<b>Abbildung 4. 102:</b> Interaktion von UR-MD-5 (allosterisches Fragment) mit den aufgeführten orthosterisch durch [ <sup>3</sup> H]NMS-besetzten <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren mit Punktmutationen im Bereich des putativ allosterischen Bindungsareal.....	298
<b>Abbildung 4. 103:</b> Bedeutung unterschiedlicher Rezeptorpunktmutationen in allosterischen Epitopen des <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf die Bindung des allosterischen Fragments UR-MD-5.....	299
<b>Abbildung 4. 104:</b> Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im Bereich der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf die UR-MD-5 induzierte IP1- und cAMP-Akkumulation in CHO-Flp- <i>M<sub>1</sub></i> -Zellen. ....	302
<b>Abbildung 4. 105:</b> Interaktion von UR-MD-2 (TBPBd) mit den aufgeführten orthosterisch durch [ <sup>3</sup> H]NMS-besetzten <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren in CHO-Flp-Zellen. ....	304
<b>Abbildung 4. 106:</b> Bedeutung unterschiedlicher Rezeptorpunktmutationen des <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf die Bindung des allosterischen Fragments UR-MD-5. ....	306
<b>Abbildung 4. 107:</b> Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der allosterischen Fragmente UR-MD-1 und UR-MD-2 mit dem orthosterischen Radioagonisten [ <sup>3</sup> H]Iperoxo. ....	307
<b>Abbildung 4. 108:</b> Durch UR-MD-2 induzierte IP1-Akkumulation in CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen.....	309

<b>Abbildung 4. 109:</b> Durch UR-MD-2 induzierte cAMP-Akkumulation in CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	310
<b>Abbildung 4. 110:</b> Graphische Darstellung der $\log(1/K_A)$ -Werte zur Ermittlung eines „Ligand-Bias“ für das allosterische Fragment UR-MD-2 in CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	312
<b>Abbildung 4. 111:</b> Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf die durch UR-MD-2 induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- <i>hM<sub>1</sub></i> -Zellen. ....	313
<b>Abbildung 4. 112:</b> Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf die UR-MD-2-induzierte cAMP-Akkumulation in CHO-Flp- <i>hM<sub>1</sub></i> -Zellen. ....	314
<b>Abbildung 4. 113:</b> Graphische Darstellung der $\log(1/K_A)$ -Werte zur Ermittlung eines durch das allosterische Fragment UR-MD-2 an CHO-Flp- <i>M<sub>1</sub></i> -wt, <i>M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala</i> und <i>M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala</i> -Rezeptoren induzierten „Ligand-Bias“. ....	317
<b>Abbildung 5. 1:</b> Ergebnis der HPLC mit GC/MS Detektion des allosterischen Fragmentes JK 532 nach vierstündiger Inkubation bei 28°C. ....	322
<b>Abbildung 5. 2:</b> Ergebnis der HPLC mit GC/MS Detektion des allosterischen Fragmentes JK 532 und Glutathion nach vierstündiger Inkubation bei 28 °C. ....	323
<b>Abbildung 5. 3:</b> Graphische Darstellung des Vergleiches der maximalen, fraktionellen Rezeptorbesetzung sowie der $R_{\text{pose}}$ -Werte der dualsterischen Hybridliganden JK 550 ( <i>C<sub>4</sub></i> ) und JK 537 ( <i>C<sub>6</sub></i> ), ermittelt mit den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten drei Analysemethoden (a, b und c). ....	327
<b>Abbildung 5. 4:</b> Schematisch Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem Parameter $R_{\text{pose}}$ und der fraktionellen Rezeptorbesetzung induziert durch die Bindung dualsterischer Hybridliganden. ....	328
<b>Abbildung 5. 5:</b> Das dualsterische Hybridpaar JK 550 ( <i>C<sub>4</sub></i> ) und JK 537 ( <i>C<sub>6</sub></i> ) induziert signifikant unterschiedliche Fraktionen aktiver Rezeptoren, zeigt jedoch keine Unterschiede hinsichtlich der maximalen Rezeptoraktivierung ( $E_{\text{max}}$ ) im DMR Experiment. ....	329
<b>Abbildung 5. 6:</b> Trotz des niedrigeren $R_{\text{pose}}$ -Wertes zeigt das dualsterischen Hybrid JK 550 ( <i>C<sub>4</sub></i> ) die gleiche maximale Wirksamkeit und sogar eine signifikant höhere Wirkstärke auf dem $G_q$ - und $G_s$ -Signalweg als JK 537 ( <i>C<sub>6</sub></i> ). ....	330
<b>Abbildung 5. 7:</b> Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Rezeptorbesetzung, induziertem Stimulus und daraus resultierender Zellantwort in Bezug auf das „Operational Model of agonism“ (Black und Leff, 1983). ....	333
<b>Abbildung 5. 8:</b> Weder die Kopplungseffizienz noch die funktionelle Affinität lieferte eine Begründung für die durch JK 550 und JK 537 induzierten identischen Maximaleffekte in DMR-Messungen sowie auf dem $G_q$ - und dem $G_s$ -Signalweg. ....	334
<b>Abbildung 5. 9:</b> Die Simulation von Konzentrations-Effekt-Kurven zeigen, dass die Aktivierung des Rezeptors durch dualsterische Liganden abhängig ist gemäß dem "Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands" vom Orientierungsverhältnis $R_{\text{pose}}$ . ....	334
<b>Abbildung 5. 10:</b> Die dynamische Kopplungseffizienz liefert keine Hinweise auf den durch JK 550 induzierten identischen Maximaleffekt im $G_q$ und $G_s$ Protein-vermittelten Signalweg. ....	335
<b>Abbildung 5. 11:</b> Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem dynamischen, bzw. maximalen Transduktionskoeffizienten und der maximalen intrinsischen Aktivität, induziert durch einen dualsterischen Liganden am Rezeptorprotein. ....	336

<b>Abbildung 5. 12:</b> Die höhere systemunabhängige maximale intrinsische von JK 550 (C <sub>4</sub> ) bei 100%iger Rezeptorbesetzung in der dualsterischen Pose $\epsilon_{max}^*$ kompensiert dessen durch eine geringere dualsterische Bindungsorientierung induzierte geringere aktive Rezeptorfraction. ....	337
<b>Abbildung 5. 13:</b> Graphische Darstellung der logEC <sub>0,5, Diss</sub> -Werte der allosterischen Fragmente sowie der dualsterischen Hybride.....	338
<b>Abbildung 5. 14:</b> Graphische Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgestellten Datenanalyseverfahren zur Analyse von Experimenten zu Bindungs- und Funktion dualsterischer Hybridliganden .....	339
<b>Abbildung 5. 15:</b> Die Gleichgewichtsbindungskonstante dualsterischer Hybride in der dualsterischen Bindungsorientierung $K_A$ reguliert das untere Plateau der Bindungsinhibition dualsterischer Hybridliganden. ....	
<b>Abbildung 5. 16:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“ mit geteilten Bindungskoopertivitäten zwischen dem dualsterischen Hybrid ( $\epsilon_{Hybrid}$ ) und dem allosterischen Fragment ( $\epsilon_{Fragment}$ ) sowie einer festgelegten Kurvensteilheit von $n_{Fragment} = -1$ für die allosterischen Fragmente, ermittelt mit Hilfe von DMR- und [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 550 (C <sub>4</sub> ), JK 537 (C <sub>6</sub> ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 533 (C <sub>4</sub> ) und JK 532 (C <sub>6</sub> ) an intakten lebenden CHO- <i>hM</i> <sub>1</sub> -wt-Zellen.....	346
<b>Abbildung 5. 17:</b> Schematische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Quantifizierung einer Signalwegbevorzugung („Ligand-Bias“). ....	350
<b>Abbildung 5. 18:</b> Graphische Gegenüberstellung der durch die Referenzagonisten ACh und Iperoxo induzierten Wirkstärken („potencies“) auf den drei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Signalwegen (G <sub>q</sub> , G <sub>s</sub> und G <sub>i</sub> ). 353	
<b>Abbildung 5. 19:</b> Grafische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Signalwegelektivitäten $\log(\epsilon/K_A)$ der sieben dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden.....	355
<b>Abbildung 5. 20:</b> Graphische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten <i>hM</i> <sub>1</sub> -Rezeptoren mit Punktmutationen in der orthosterischen, bzw. im putativ allosterischen Bindungsareal. ....	359
<b>Abbildung 5. 21:</b> Die Verwendung unterschiedlicher Expressionssysteme/Vektoren führt zu signifikanten Unterschieden der <i>hM</i> <sub>1</sub> -Rezeptorexpression. ....	361
<b>Abbildung 5. 22:</b> Vergleich der mit Hilfe von Analyse a, b und c der für die dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537 an <i>hM</i> <sub>1</sub> -Rezeptoren mit Punktmutationen im Bereich des allosterischen Bindungsareals ermittelten (A) maximalen fraktionellen Rezeptorbesetzungen und (B) $R_{pose}$ -Werte. ....	363
<b>Abbildung 5. 23:</b> Punktmutationen im Bereich des allosterischen Bindungsareals führen zu einem deutlichen Verlust der Bindungsneigung des orthosterischen Agonisten Iperoxo.....	364
<b>Abbildung 5. 24:</b> Vergleich der durch JK 550 und JK 537 induzierten Wirkstärke logEC <sub>50</sub> und ihrer intrinsischen Wirksamkeit $E_{max}$ hinsichtlich der G <sub>q</sub> und G <sub>s</sub> Protein-Kopplung an <i>hM</i> <sub>1</sub> -Rezeptoren mit Punktmutationen im allosterischen Bindungsareal. ....	367
<b>Abbildung 5. 25:</b> Vergleich der von Iperoxo induzierten Wirkstärke logEC <sub>50</sub> und intrinsischen Wirksamkeit $E_{max}$ hinsichtlich der G <sub>q</sub> und G <sub>s</sub> Protein-Kopplung an <i>hM</i> <sub>1</sub> -Rezeptoren mit Punktmutationen im allosterischen Bindungsareal.....	368
<b>Abbildung 5. 26:</b> Graphische Darstellung der durch Punktmutationen allosterischer Epitope des <i>hM</i> <sub>1</sub> -Rezeptors induzierten Signalwegbevorzugung durch die Bindung des orthosterischen Agonisten Iperoxo sowie den dualsterischen Hybriden JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ).....	371

<b>Abbildung 5. 27:</b> Schematische Darstellung der hypothetischen Einflussnahme der allosterischen Fragmente auf das Bindungsverhalten der entsprechenden dualsterischen Hybridliganden.....	377
<b>Abbildung 5. 28:</b> Möglicher Zusammenhang zwischen allosterisch agonistischem Effekt der allosterischen Fragmente und dem partialagonistischen Effekt der putativen dualsterischen Hybridliganden UR-MD-13 und 14 and CHO-Flp- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen.....	379
<b>Abbildung 5. 29:</b> Modulatorische Effekte der BQCAD-Derivate UR-MD-5 und UR-MD-6 auf die [ <sup>3</sup> H]Iperoxo-Gleichgewichtsbindung an Membranhomogenate aus CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen in schematischer Darstellung.....	381
<b>Abbildung 5. 30:</b> Schematische Darstellung der N-benzylisatin-Derivate und ihren unterschiedlichen Subtypselektivitäten an muskarinischen Rezeptoren.....	382
<b>Abbildung 5. 31:</b> Das allosterische Fragment UR-MD-5 zeigt PAM-Eigenschaften hinsichtlich der Iperoxo-induzierten G <sub>s</sub> -Signalwegaktivierung am muskarinischen <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptor..	387
<b>Abbildung 5. 32:</b> Graphischer Vergleich des Einflusses von Punktmutationen im Bereich des allosterischen Bindungsareales des <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf die Bindungsneigung von UR-MD-2 sowie der „bitopischen“ Liganden TBPB und 77-LH-28-1.....	391
<b>Abbildung 5. 33:</b> Die Konzentration von UR-MD-2 die benötigt wird, um einen allosterischen Effekt auf die Verzögerung der [ <sup>3</sup> H]NMS-Dissoziation zu erreichen, zeigt am orthosterisch unbesetzten Rezeptorprotein bereits einen gesättigten Effekt.....	392
<b>Abbildung 5. 34:</b> Strukturformeln von TBPB sowie dessen Einzelfragmenten VP813, VP794, dem TBPB-Derivat UR-MD-2 und die für TBPB und VCP794 postulierte Bindungstopographie am muskarinischen <i>M<sub>1</sub></i> -Rezeptor.....	393
<b>Abbildung 5. 35:</b> Pilotexperimente zur Interaktion von [ <sup>3</sup> H]NMS mit UR-MD-2 an Membransuspensionen aus CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> , <i>hM<sub>2</sub></i> , <i>hM<sub>3</sub></i> , <i>hM<sub>4</sub></i> und <i>hM<sub>5</sub></i> -Rezeptoren.....	394
<b>Abbildung 5. 36:</b> Vergleich der von UR-MD-2 (TBPBd) induzierten Wirkstärke (logEC <sub>50</sub> ) und maximalen intrinsischen Wirksamkeit (E <sub>max</sub> ) an <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren mit Punktmutationen im allosterischen Bindungsareal hinsichtlich der G <sub>q</sub> und G <sub>s</sub> Protein-Kopplung.....	397
<b>Abbildung 5. 37:</b> Graphische Darstellung der bei der Entwicklung dualsterischer Liganden zu berücksichtigenden Eigenschaften hinsichtlich ihrer Bindungsorientierung, der daraus resultierende Effekte bezüglich der Fähigkeit zur Rezeptoraktivierung, ihrer Signalwegelektivität und Subtypselektivität.....	399
<b>Abbildung 9. 1:</b> Einfluss des endogenen Agonisten Acetylcholin (ACh) sowie des orthosterischen Vollagonisten Iperoxo auf die [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindung an lebenden CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen.....	454
<b>Abbildung 9. 2:</b> Heterologe Konkurrenz zwischen [ <sup>3</sup> H]Iperoxo und ACh an Membranhomogenaten aus CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen.....	455
<b>Abbildung 9. 3:</b> Das allosterische Fragment UR-MD-5 zeigt PAM-Eigenschaften hinsichtlich der Iperoxo-induzierten G <sub>s</sub> -Signalwegaktivierung am muskarinischen <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptor.....	456
<b>Abbildung 9. 4:</b> Pilotexperimente bezüglich des modulatorischen Effektes von UR-MD-5 auf die [ <sup>3</sup> H]Iperoxo-Gleichgewichtsbindung an Membranhomogenaten aus CHO- <i>hM<sub>2</sub></i> -wt-Zellen.....	457
<b>Abbildung 9. 5:</b> Bedeutung unterschiedlicher Rezeptorpunktmutationen des <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptors auf die Gleichgewichtsbindung des allosterischen Fragments UR-MD-2.....	458
<b>Abbildung 9. 6:</b> Pilotexperimente zur Interaktion von [ <sup>3</sup> H]NMS mit UR-MD-2 an Rezeptoren in Membransuspensionen aus CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> , <i>hM<sub>2</sub></i> , <i>hM<sub>3</sub></i> , <i>hM<sub>4</sub></i> und <i>hM<sub>5</sub></i> -Zellen mit Kennzahlen.....	459

<b>Abbildung 9. 7:</b> Durch BQCA induzierte IP1- und cAMP-Akkumulation sowie dynamische Massenumverteilung (DMR) in CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	460
<b>Abbildung 9. 8:</b> Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Hybridsubstanzen (Substanzserie 1) ermittelt auf der Basis von DMR-Daten. ....	461
<b>Abbildung 9. 9:</b> Normalisierte Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Hybridsubstanzen (Substanzserie 1) ermittelt auf der Basis von DMR-Daten.....	462
<b>Abbildung 9. 10:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „ <i>Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands</i> “, ermittelt mit Hilfe von DMR- und [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 596 (C <sub>4</sub> ), JK 559 (C <sub>6</sub> ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 569 (C <sub>4</sub> ) und JK 551 (C <sub>6</sub> ) an lebenden CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen.....	465
<b>Abbildung 9. 11:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „ <i>Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands</i> “, ermittelt mit Hilfe von IP1-Akkumulations- und [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 596 (C <sub>4</sub> ), JK 559 (C <sub>6</sub> ) sowie ihre allosterischen Fragmente JK 569 (C <sub>4</sub> ) und JK 551 (C <sub>6</sub> ) an CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	466
<b>Abbildung 9. 12:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „ <i>Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands</i> “, ermittelt mit Hilfe von cAMP-Akkumulations- und [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 596 (C <sub>4</sub> ), JK 559 (C <sub>6</sub> ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 569 (C <sub>4</sub> ) und JK 551 (C <sub>6</sub> ) an lebenden CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen.....	467
<b>Abbildung 9. 13:</b> Ergebnisse der der globalen Analyse basierend auf dem „ <i>Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands</i> “, ermittelt mit Hilfe von [ <sup>35</sup> S]GTP S- und [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 596 (C <sub>4</sub> ), JK 559 (C <sub>6</sub> ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 569 (C <sub>4</sub> ) und JK 551 (C <sub>6</sub> ) an lebenden intakten sowie Membranen aus CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	468
<b>Abbildung 9. 14:</b> Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „ <i>Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands</i> “, ermittelt mit Hilfe von DMR- und [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 549 (C <sub>4</sub> ), JK 491 (C <sub>6</sub> ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 544 (C <sub>4</sub> ) und JK 469 (C <sub>6</sub> ) an lebenden CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen.....	469
<b>Abbildung 9. 15:</b> Ergebnisse der der globalen Analyse basierend auf dem „ <i>Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands</i> “, ermittelt mit Hilfe von IP1-Akkumulations- und [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 549 (C <sub>4</sub> ), JK 491 (C <sub>6</sub> ) sowie ihre allosterischen Fragmente JK 544 (C <sub>4</sub> ) und JK 469 (C <sub>6</sub> ) an intakten CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	470
<b>Abbildung 9. 16:</b> Ergebnisse der der globalen Analyse basierend auf dem „ <i>Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands</i> “, ermittelt mit Hilfe von cAMP-Akkumulation- und [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 549 (C <sub>4</sub> ), JK 491 (C <sub>6</sub> ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 544 (C <sub>4</sub> ) und JK 469 (C <sub>6</sub> ) an CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	471
<b>Abbildung 9. 17:</b> Ergebnisse der der globalen Analyse basierend auf dem „ <i>Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands</i> “, ermittelt mit Hilfe von [ <sup>35</sup> S]GTP S- und [ <sup>3</sup> H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 549 (C <sub>4</sub> ), JK 491 (C <sub>6</sub> ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 544 (C <sub>4</sub> ) und JK 469 (C <sub>6</sub> ) an lebenden intakten sowie Membranen aus CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	472

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1. 1:</b> Ausgewählte Beispiele für die Lokalisation und physiologischen Effekte nach Aktivierung unterschiedlicher muskarinischer Acetylcholinrezeptoren.....	3
<b>Tabelle 1. 2:</b> Vorteile eines potenziellen therapeutischen Gebrauches von GPCR Liganden, die an allosterische Bindungsstellen interagieren (Christopoulos 2002; Christopoulos und Kenakin 2002; Birdsall und Lazareno 2005). .....	14
<b>Tabelle 2. 1:</b> Übersicht über die für die unterschiedlichen CHO-Zellen verwendeten Nährmedien sowie die Herkunft der verwendeten Zellen.....	39
<b>Tabelle 3. 1:</b> Tabellarische Übersicht über die verwendeten Radioligand-Konzentrationen.....	81
<b>Tabelle 3. 2:</b> Pipettierschema für ein an Membranhomogenaten durchgeführtes Konkurrenzexperiment. ....	82
<b>Tabelle 3. 3:</b> Pipettierschema für ein an lebenden, intakten CHO-Zellen durchgeführtes Konkurrenzexperiment. ....	82
<b>Tabelle 3. 4:</b> Pipettierschema eines heterologen Konkurrenzexperimentes mit Acetylcholin und [ <sup>3</sup> H]NMS in An- und Abwesenheit eines allosterischen Modulators durchgeführt an Membranhomogenaten. ....	84
<b>Tabelle 3. 5:</b> Pipettierschema zur Durchführung eines kompletten Dissoziationsexperimentes unter Verwendung von ganzen, intakten lebenden CHO-Zellen. ....	86
<b>Tabelle 3. 6:</b> Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Inkubationszeiten der durchgeführten „Drei-Punkt“-Kinetiken. ....	90
<b>Tabelle 3. 7:</b> Pipettierschema zur Durchführung einer „Drei-Punkt“-Kinetik zur Erfassung des Einflusses allosterischer Fragmente /Modulatoren/Hybride auf die [ <sup>3</sup> H]NMS-Bindung. ....	90
<b>Tabelle 3. 8:</b> Beispiel für ein Zeitprotokoll einer „Drei-Punkt“-Kinetik .....	91
<b>Tabelle 3. 9:</b> Pipettierschema zur Durchführung eines [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindungsexperimentes. ....	93
<b>Tabelle 3. 10:</b> Pipettierschema zur Durchführung eines IP1-Akkumulationsexperimentes. ....	97
<b>Tabelle 3. 11:</b> Pipettierschema zur Durchführung eines Experimentes zur Bestimmung der cAMP-Akkumulation.....	99
<b>Tabelle 4. 1:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.2 dargestellten homologen Kompetitionen mit [ <sup>3</sup> H]NMS an hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptoren an lebenden CHO-Zellen nach drei- und achtstündiger Inkubationszeit. ....	116
<b>Tabelle 4. 2:</b> Numerische Schätzwerte der Bindungsparameter für die in dieser Arbeit verwendeten Membransuspensionen aus CHO-hM <sub>1</sub> -wt-Zellen. ....	118
<b>Tabelle 4. 3:</b> Halbwertszeiten der Dissoziation des Radioliganden [ <sup>3</sup> H]NMS von hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.....	119
<b>Tabelle 4. 4:</b> Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.5 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven.....	121
<b>Tabelle 4. 5:</b> Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.6 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven.....	123
<b>Tabelle 4. 6:</b> Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.8 dargestellten Bindungskurven. ....	128
<b>Tabelle 4. 7:</b> Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.9 dargestellten Bindungskurven. ....	129
<b>Tabelle 4. 8:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.10 dargestellten Bindungskurven. ....	131
<b>Tabelle 4. 9:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.12 dargestellten Bindungskurven. ....	134
<b>Tabelle 4. 10:</b> Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.14 dargestellten Bindungskurven .....	138
<b>Tabelle 4. 11:</b> Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.15 dargestellten Bindungskurven. ....	140



<b>Tabelle 4. 12:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.17 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der Agonist-induzierten IP1-Akkumulation.....	144
<b>Tabelle 4. 13:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.18 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 384, JK 550 und JK 537 induzierten IP1-Akkumulation. ....	146
<b>Tabelle 4. 14:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.19 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 596, JK 559, JK 549 und JK 491 induzierten IP1-Akkumulation.....	148
<b>Tabelle 4. 15:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.20 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der Agonist-induzierten cAMP-Akkumulation.....	149
<b>Tabelle 4. 16:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.21 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 384, JK 550 und JK 537 induzierten cAMP-Akkumulation. ....	151
<b>Tabelle 4. 17:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.22 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 549, JK 491, JK 596 und JK 559 induzierten cAMP-Akkumulation. ....	152
<b>Tabelle 4. 18:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.23 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der Agonist-induzierten [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindung.....	154
<b>Tabelle 4. 19:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.24 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 384, JK 550 und JK 537 induzierten [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindung. ....	155
<b>Tabelle 4. 20:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.25 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 549, JK 491, JK 596 und JK 559 induzierten [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindung.....	157
<b>Tabelle 4. 21:</b> Kenngrößen der mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ ermittelten Kenngrößen log K <sub>A</sub> und log .....	160
<b>Tabelle 4. 22:</b> Transduktionskoeffizienten ermittelt nach Shonberg et al. 2014 von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybrids-substanzen (Substanzserie 1) auf der Basis von IP1-Akkumulationsdaten (G <sub>q</sub> - Signalweg) am hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptor unter Verwendung des Referenzagonisten ACh (links) oder Iperoxo (rechts).....	165
<b>Tabelle 4. 23:</b> Transduktionskoeffizienten ermittelt nach Shonberg et al. 2014 von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybrids-substanzen (Substanzserie 1) auf der Basis von cAMP-Akkumulationsdaten (G <sub>s</sub> - Signalweg) am hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptor. ....	166
<b>Tabelle 4. 24:</b> Transduktionskoeffizienten ermittelt nach Shonberg et al., 2014 von ACh, Iperoxo sowie der sieben dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybrids-substanzen (Substanzserie 1) ermittelt auf der Basis von ([ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindungsdaten (G <sub>i</sub> - Signalweg) am hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptor. ....	166
<b>Tabelle 4. 25:</b> Normalisierte Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybrids-substanzen (Substanzserie 1) auf der Basis von IP1-Akkumulationsdaten (G <sub>q</sub> - Signalweg) am hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptor.....	168
<b>Tabelle 4. 26:</b> Normalisierte Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Hybrids-substanzen (Substanzserie 1) auf Basis von cAMP-Akkumulationsdaten (G <sub>s</sub> -Signalweg) am hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptor.....	168
<b>Tabelle 4. 27:</b> Normalisierte Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo sowie der sieben dualsterischen Hybrids-substanzen (Substanzserie 1) auf Basis von [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindungsdaten (G <sub>i</sub> -Signalweg) am hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptor.....	169

<b>Tabelle 4. 28:</b> $\log(1/K_A)$ -Werte ermittelt durch Differenzbildung zwischen normalisierten Transduktionskoeffizienten $\log(1/K_A)$ der IP1-Akkumulation ( $G_q$ -Signalweg) und der cAMP-Akkumulation ( $G_s$ -Signalweg) von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben Hybrids-substanzen (Substanzserie 1). .....	171
<b>Tabelle 4. 29:</b> $\log(1/K_A)$ -Werte ermittelt durch Differenzbildung zwischen normalisierten Transduktionskoeffizienten $\log(1/K_A)$ der IP1-Akkumulation ( $G_q$ -Signalweg) und der Förderung der [ $^{35}$ S]GTP S-Bindung ( $G_i$ -Signalweg) von ACh, Iperoxo sowie der sieben Hybrids-substanzen (Substanzserie 1). .....	172
<b>Tabelle 4. 30:</b> $\log(1/K_A)$ -Werte ermittelt durch Differenzbildung zwischen den normalisierten Transduktionskoeffizienten $\log(1/K_A)$ der cAMP-Akkumulation ( $G_s$ -Signalweg) und der Förderung der [ $^{35}$ S]GTP S-Bindung ( $G_i$ -Signalweg) von ACh, Iperoxo sowie der sieben Hybrids-substanzen (Substanzserie 1). .....	173
<b>Tabelle 4. 31:</b> Kenngrößen des in Abbildung 4. 33 dargestellten Balkendiagramms.....	176
<b>Tabelle 4. 32:</b> Zusammenfassung der pharmakologischen Parameter aus den Insets von Abbildung 4.34, die den Effekt der untersuchten Substanzen auf die Acetylcholin-Bindung an Membranen aus CHO- $hM_1$ -wt-Zellen wiedergeben. ....	179
<b>Tabelle 4. 33:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.35 dargestellten homologen Konkurrenz mit dem Radioagonisten [ $^3$ H]Iperoxo an Membransuspensionen aus CHO- $hM_1$ -wt-Zellen.....	180
<b>Tabelle 4. 34:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.36 dargestellten Bindungskurven.....	182
<b>Tabelle 4. 35:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.37 dargestellten Gleichgewichtsbindungskurven für die allosterischen Fragmente JK 372-1, JK 533 und JK 532. ....	183
<b>Tabelle 4. 36:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.38 dargestellten Gleichgewichtsbindungskurven für die allosterischen Fragmente JK 569, JK 551, JK 544 und JK 469. ....	185
<b>Tabelle 4. 37:</b> Zusammenfassung der mit Hilfe globaler, simultaner Analyse von Funktions- und Bindungsdaten ermittelten Bindungsparameter für das Hybridpaar JK 550 und JK 537.....	193
<b>Tabelle 4. 38:</b> Graphische Darstellung der mit Hilfe der globalen Analyse von Bindungs- und Funktionsdaten ermittelten funktionellen Parameter $\tau_{dyn}$ und $E_{max}^*$ unter Verwendung der funktionellen DMR-, IP1-Akkumulations-, cAMP-Akkumulations- und [ $^{35}$ S]GTP S-Bindungsdaten sowie der Hybrid-induzierten Maximaleffekte ( $E_{max}$ ) des Hybridpaares JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ). ....	195
<b>Tabelle 4. 39:</b> Zusammenfassung der mit Hilfe globaler, simultaner Analyse von Funktions- und Bindungsdaten ermittelten Bindungsparameter für das Hybridpaar JK 549 und JK 491.....	196
<b>Tabelle 4. 40:</b> Zusammenfassung der mit Hilfe globaler Analyse von Funktions- und Bindungsdaten ermittelten Parameter $\tau_{dyn}$ und $E_{max}^*$ unter Verwendung der DMR-, IP1-Akkumulations-, cAMP-Akkumulations- und [ $^{35}$ S]GTP S-Bindungsdaten sowie der Hybrid induzierten Maximaleffekte $E_{max}$ des Hybridpaares JK 549 ( $C_4$ ) und JK 491 ( $C_6$ ).....	198
<b>Tabelle 4. 41:</b> Zusammenfassung der mit Hilfe globaler, simultaner Analyse von Funktions- und Bindungsdaten ermittelten Bindungsparameter des Hybridpaares JK 596 und JK 559.....	200
<b>Tabelle 4. 42:</b> Graphische Darstellung der mit Hilfe globaler Analyse der Bindungs- und Funktionsdaten ermittelten Parameter $\tau_{dyn}$ und $E_{max}^*$ unter Verwendung der DMR-, IP1-Akkumulations-, cAMP-Akkumulations- und [ $^{35}$ S]GTP S-Bindungsdaten sowie der Hybrid induzierten Maximaleffekte ( $E_{max}$ ) des Hybridpaares JK 596 ( $C_4$ ) und JK 559 ( $C_6$ ). ....	203

<b>Tabelle 4. 43:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.46 dargestellten homologen Kompetitionen mit [ <sup>3</sup> H]NMS an CHO-Flp- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen und CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	206
<b>Tabelle 4. 44:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.47 dargestellten homologen Kompetitionen mit [ <sup>3</sup> H]NMS an CHO-Flp-Zellen stabil transfiziert mit dem <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptor bzw. <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren mit unterschiedlichen Punktmutationen im allosterischen Bindungsareal. ....	208
<b>Tabelle 4. 45:</b> Halbwertszeiten der Dissoziation des Radioliganden [ <sup>3</sup> H]NMS von <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptoren in intakten CHO- und CHO-Flp-Zellen.....	209
<b>Tabelle 4. 46:</b> Kenngrößen der Dissoziation des Radioliganden [ <sup>3</sup> H]NMS von Wildtyp und punktmutierten <i>hM<sub>1</sub></i> -Rezeptoren in CHO-Flp-Zellen. ....	211
<b>Tabelle 4. 47:</b> Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.50 und 4.51 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven.....	214
<b>Tabelle 4. 48:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.52 dargestellten Bindungskurven.....	217
<b>Tabelle 4. 49:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.53 dargestellten Bindungskurven.....	218
<b>Tabelle 4. 50:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.54 dargestellten Bindungskurven.....	222
<b>Tabelle 4. 51:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.55 dargestellten Bindungskurven.....	224
<b>Tabelle 4. 52:</b> Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.58 dargestellten Bindungskurven der globalen Analyse. ....	228
<b>Tabelle 4. 53:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.59 dargestellten Bindungskurven der globalen Analysen.....	230
<b>Tabelle 4. 54:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.60 dargestellten gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven der Acetylcholin-induzierten IP1-Akkumulation .....	232
<b>Tabelle 4. 55:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.61 dargestellten gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven der Iperoxo-induzierten IP1-Akkumulation. ....	233
<b>Tabelle 4. 56:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.62 dargestellten gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 550 induzierten IP1-Akkumulation. ....	235
<b>Tabelle 4. 57:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.63 dargestellten gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 537 induzierten IP1-Akkumulation. ....	236
<b>Tabelle 4. 58:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.64 dargestellten Fragment-induzierten IP1-Akkumulation.....	238
<b>Tabelle 4. 59:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.65 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch ACh induzierten cAMP-Akkumulation.....	239
<b>Tabelle 4. 60:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.66 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch Iperoxo induzierten cAMP-Akkumulation.....	241
<b>Tabelle 4. 61:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.67 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 550 induzierten cAMP-Akkumulation.....	242
<b>Tabelle 4. 62:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.68 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 537 induzierten cAMP-Akkumulation.....	243
<b>Tabelle 4. 63:</b> Zusammenfassung der in Abbildung 4.70 dargestellten numerischen Parameter. ....	247
<b>Tabelle 4. 64:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.71 und 4.72 dargestellten Ergebnisse, die mit Hilfe einer globalen simultanen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“ an intakten CHO-Flp- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen für die dualsterischen Liganden JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ) ermittelt wurden. ....	253

<b>Tabelle 4. 65:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.74 und 4.75 dargestellten Ergebnisse, die mit Hilfe einer globalen simultanen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“ an intakten CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala-Zellen für die dualsterischen Liganden JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ) ermittelt wurden. ...	256
<b>Tabelle 4. 66:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.77 und 4.78 dargestellten Ergebnisse, die mit Hilfe einer globalen simultanen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“ an intakten CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala-Zellen für die dualsterischen Liganden JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ) ermittelt wurden. ...	260
<b>Tabelle 4. 67:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.80 und 4.81 dargestellten Ergebnisse, die mit Hilfe einer globalen simultanen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“ an intakten CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala-Zellen für die dualsterischen Liganden JK 550 (C <sub>4</sub> ) und JK 537 (C <sub>6</sub> ) ermittelt wurden. ...	264
<b>Tabelle 4. 68:</b> Numerische Schätzwerte der in Abbildung 4.83 und 4.84 dargestellten Parameter $\log(1/K_A)$ , $\log(1/K_A)$ , und $\log(1/K_A)$ zur Berechnung einer ligandspezifisch bevorzugten Signalwegaktivierung an CHO-Flp-hM <sub>1</sub> -wt-Zellen. ....	269
<b>Tabelle 4. 69:</b> Numerische Schätzwerte der in Abbildung 4.85 und 4.86 dargestellten Parameter $\log(1/K_A)$ , $\log(1/K_A)$ , und $\log(1/K_A)$ zur Berechnung einer ligandspezifisch bevorzugten Signalwegaktivierung an CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala-Zellen. ....	273
<b>Tabelle 4. 70:</b> Numerische Schätzwerte der in Abbildung 4.87 und 4.88 dargestellten Parameter $\log(1/K_A)$ , $\log(1/K_A)$ , und $\log(1/K_A)$ zur Berechnung einer ligandspezifisch bevorzugten Signalwegaktivierung an CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala-Zellen. ....	276
<b>Tabelle 4. 71:</b> Numerische Schätzwerte der in Abbildung 4.89 und 4.90 dargestellten Parameter $\log(1/K_A)$ , $\log(1/K_A)$ , und $\log(1/K_A)$ zur Berechnung einer ligandspezifisch bevorzugten Signalwegaktivierung an CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala-Zellen. ....	280
<b>Tabelle 4. 72:</b> Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.92 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven. AF: allosterisches Fragment plus Zwischenkette (C <sub>1</sub> oder C <sub>8</sub> ).....	284
<b>Tabelle 4. 73:</b> Parameterschätzwerte des in Abbildung 4.93 dargestellten Effektes der orthosterischen Bausteine AF 292 (Substanzserie 2) und Iperoxo (Substanzserie 1) auf die Geschwindigkeitskonstante k <sub>1</sub> der [ <sup>3</sup> H]NMS Dissoziation von hM <sub>1</sub> -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. ....	285
<b>Tabelle 4. 74:</b> Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.94 dargestellten Bindungskurven. ....	287
<b>Tabelle 4. 75:</b> Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.95 dargestellten Bindungskurven. ....	288
<b>Tabelle 4. 76:</b> Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.97 dargestellten Bindungskurven der globalen Analyse. ....	290
<b>Tabelle 4. 77:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.98 dargestellten Bindungskurven.....	292
<b>Tabelle 4. 78:</b> Messdaten der in Abbildung 4.101 dargestellten Ligand-induzierten dynamischen Massenumverteilung an CHO-hM <sub>1</sub> -wt-Zellen, vor und nach G <sub>q</sub> - oder G <sub>i</sub> -Signalweginhibition. ....	295
<b>Tabelle 4. 79:</b> Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.102 dargestellten Bindungskurven. ....	298
<b>Tabelle 4. 80:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.103 dargestellten Bindungskurven. ....	300
<b>Tabelle 4. 81:</b> Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.104 dargestellten Effekte der UR-MD-5-induzierten IP1- und cAMP-Akkumulation. ....	302
<b>Tabelle 4. 82:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.105 dargestellten Kurven für die Verzögerung der Dissoziation von [ <sup>3</sup> H]NMS durch UR-MD-2.....	304
<b>Tabelle 4. 83:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.106 dargestellten Bindungskurven .....	306
<b>Tabelle 4. 84:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.107 dargestellten Bindungskurven. ....	308

<b>Tabelle 4. 85:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.108 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch UR-MD-2 induzierten IP1-Akkumulation. ....	309
<b>Tabelle 4. 86:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.109 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für die durch UR-MD-2 induzierte cAMP-Akkumulation. ....	310
<b>Tabelle 4. 87:</b> Zusammenfassung der $\log(1/K_A)$ , $\log(1/K_A)$ , und $\log(1/K_A)$ -Werte des allosterischen Fragmentes UR-MD-2 für den $G_q$ - und den $G_s$ -Signalweg an CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	311
<b>Tabelle 4. 88:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.111 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch UR-MD-2 induzierten IP1-Akkumulation. ....	313
<b>Tabelle 4. 89:</b> Kenngrößen der in Abbildung 4.112 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch UR-MD-2 induzierten cAMP-Akkumulation. ....	314
<b>Tabelle 4. 90:</b> Zusammenfassung der $\log(1/K_A)$ , $\log(1/K_A)$ , und $\log(1/K_A)$ -Werte des allosterischen Fragmentes UR-MD-2 am CHO-Flp- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt, $M_1^{179}$ Tyr Ala, $M_1^{400}$ Trp Ala und $M_1^{401}$ Glu Ala Rezeptor. ....	316
<b>Tabelle 9. 1:</b> Kenngrößen der in Abbildung 9.1 dargestellten Gleichgewichtsbindungskurven. ....	454
<b>Tabelle 9. 2:</b> Kenngrößen der in Abbildung 9.2 dargestellten Gleichgewichtsbindungskurven aus heterologen Kompetitionsexperimenten mit dem Radioagonisten [ <sup>3</sup> H]Iperoxo an Membranhomogenaten aus CHO- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Zellen. ....	455
<b>Tabelle 9. 3:</b> Kenngrößen der in Abbildung 9. 3 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven. ....	456
<b>Tabelle 9. 4:</b> Kenngrößen der in Abbildung 9.4 dargestellten Bindungskurve. ....	457
<b>Tabelle 9. 5:</b> Kenngrößen der in Abbildung 9.5 dargestellten Bindungskurven. ....	458
<b>Tabelle 9. 6:</b> Kenngrößen der in Abbildung 9.7 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven des Agonisten BQCA. ....	460
<b>Tabelle 9. 7:</b> Transduktionskoeffizienten ermittelt nach Shonberg et al. 2014 von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Iperoxo/BQCA-Hybrids-substanzen (Substanzserie 1) auf der Basis von DMR-Daten am <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptor unter Verwendung des Referenzagonisten ACh (links) oder Iperoxo (rechts).....	461
<b>Tabelle 9. 8:</b> Normalisierte Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Hybrids-substanzen (Substanzserie 1) auf Basis von DMR-Daten am <i>hM<sub>1</sub></i> -wt-Rezeptor.....	462
<b>Tabelle 9. 9:</b> $\log(1/K_A)$ -Werte ermittelt durch Differenzbildung zwischen normalisierten Transduktionskoeffizienten $\log(1/K_A)$ der IP1-Akkumulations- und der DMR-Daten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben Hybrids-substanzen (Substanzserie 1).....	463
<b>Tabelle 9. 10:</b> $\log(1/K_A)$ -Werte, ermittelt durch Differenzbildung zwischen normalisierten Transduktionskoeffizienten $\log(1/K_A)$ der DMR-Daten und der [ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindungsdaten für ACh, Iperoxo sowie der sieben Hybrids-substanzen (Substanzserie 1).....	463
<b>Tabelle 9. 11:</b> $\log(1/K_A)$ -Werte ermittelt durch Differenzbildung zwischen normalisierten Transduktionskoeffizienten $\log(1/K_A)$ der DMR-Daten und der cAMP-Akkumulationsdaten für ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben Hybrids-substanzen (Substanzserie 1).....	464



# 1 Einleitung

Mit Hilfe unterschiedlicher Botenstoffe sind Zellen des menschlichen Körpers in der Lage, über membranständige Rezeptoren miteinander zu kommunizieren. Ein Beispiel für einen solchen Botenstoff stellt der Neurotransmitter Acetylcholin (ACh) dar, welcher seine Effekte über zwei verschiedene Rezeptor-Typen vermitteln kann – über nikotinische (nAChR) und muskarinische ACh-Rezeptoren (mAChR). Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren liegt, soll diese Familie im Folgenden näher erörtert werden.

## 1.1 Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren

### 1.1.1 Allgemeine Grundlagen

Muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren (mAChR) gehören mit ihren fünf Subtypen ( $M_1$ - $M_5$ ) zur Superfamilie der G Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Diese Familie stellt die größte und zugleich die von stärkster Diversität geprägte Gruppe von Zelloberflächenproteinen dar, die an der Signalübertragung beteiligt ist (Insel et al. 2012). Im menschlichen Genom codieren fast 800 verschiedene Gene für Rezeptoren unterschiedlicher extrazellulärer Liganden, wie z.B. verschiedene Kationen, Hormone, Lipide, Zucker, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren, ebenso wie Rezeptoren für sensorische Signale aus der Umwelt, wie z.B. Photonen (Licht), Geruchs- und Geschmacksstoffe (Lagerström und Schiöth 2008; Stevens et al. 2013). Auf Grund ihrer ubiquitären Expression, ihrer Interaktionen mit einer Fülle intrazellulärer Proteine sowie ihrer Beteiligung an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse, stellen GPCR sehr interessante Zielstrukturen in der heutigen Wirkstoffforschung dar (Tyndall und Sandilya 2005; Overington et al. 2006). Heutzutage erkennen etwa 30-35% der sich auf dem Markt befindlichen Arzneistoffe G Protein-gekoppelte Rezeptoren als Zielstruktur (Overington et al. 2006), was ihre Bedeutung für die Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen unterstreicht. Diese bislang bereits etablierten Arzneistoffe zielen allerdings lediglich auf eine sehr kleine Zahl der GPCR ab, was das große Potenzial in diesem Bereich noch weiter unterstreicht (Fredriksson et al. 2003). Gegenwärtig sind über 1000 unterschiedliche GPCR bekannt, die sich phylogenetisch in fünf Klassen (A-E) unterteilen lassen, wobei die beiden Klassen D und E nicht in der Gruppe der Wirbeltiere vertreten sind (vgl. GRAFS-Nomenklatur in Glutamat-, Rhodopsin-, Adhäsions-, „*Frizzled*“- , Sekretin-Rezeptorklasse; Fredriksson et al. 2003).

<b>Klasse A:</b>	Rhodopsin-ähnliche GPCR
<b>Klasse B:</b>	Sekretinrezeptor-ähnliche GPCR
<b>Klasse C:</b>	metabotrope Glutamatrezeptoren
<b>Klasse D:</b>	fungale Pheromonrezeptoren
<b>Klasse E:</b>	cAMP Rezeptoren
<b>Klasse F:</b>	<i>Frizzled/Smoothed</i> Rezeptoren

Mit Hilfe phylogenetischer Untersuchungen der einzelnen GPCR-Proteinsequenzen, gelang zudem eine Unterscheidung in fünf Hauptfamilien (Fredriksson et al. 2003; Trzaskowski et al. 2012):

<b>Glutamat-Familie:</b>	15 GPCR Mitglieder
<b>Rhodopsin-Familie:</b>	701 GPCR-Mitglieder
<b>Adhäsions-Rezeptoren:</b>	24 GPCR-Mitglieder
<b><i>Frizzled/Taste2</i> Rezeptoren:</b>	24 GPCR-Mitglieder
<b>Sekretin-Familie:</b>	15 GPCR-Mitglieder

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten muskarinischen Acetylcholinrezeptoren (mAChR) werden der Klasse A (Rhodopsin-artige GPCR) zugeordnet, welche mit ca. 701 Vertretern, bestehend aus 460 olfaktorischen und 241 nicht-olfaktorischen Rezeptoren, die größte Gruppe innerhalb der Superfamilie der GPCR repräsentiert (Fredriksson et al. 2003).

Mit Hilfe von Klonierungsstudien von Kubo et al. 1986a; Kubo et al. 1986b; Peralta et al. 1987; Bonner et al. 1987; und Bonner et al. 1988 erfolgte eine weitere Unterteilung der mAChR in fünf Muskarin-Rezeptorsubtypen ( $M_1$ - $M_5$ ). Jeder dieser fünf Subtypen verfügt über ein unterschiedliches Verteilungsmuster (vgl. Tab. 1.1). So wird der  $M_1$ -,  $M_4$ - und  $M_5$ -Rezeptor prädominant im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert, wohingegen der  $M_2$ - und  $M_3$ -Rezeptor sowohl im ZNS als auch in der Peripherie vertreten ist (Hulme 1990; Caulfield 1993; Caulfield und Birdsall 1998; Eglén 2005).



Acetylcholinrezeptor-Subtyp (muskarinisch)	Lokalisation	Funktion
M <sub>1</sub>	ZNS (Hippocampus, zerebraler Cortex, Striatum)	Kognitive Funktion
M <sub>2</sub>	Herz, Glatte Muskelzellen, ZNS (Hippocampus, zerebraler Cortex)	Chronotropie, Muskelkontraktion, Gedächtnis, Antinozizeption
M <sub>3</sub>	Glatte Muskelzellen, Drüsen, ZNS, Pankreatische -Zellen	Muskelkontraktion, Salivation, Appetit, Insulinfreisetzung
M <sub>4</sub>	ZNS (Striatum, Vorderhirn)	Motorik, Antinozizeption, Verhalten
M <sub>5</sub>	Zerebrale Gefäße, Substantia nigra	Vasodilatation, Motorik

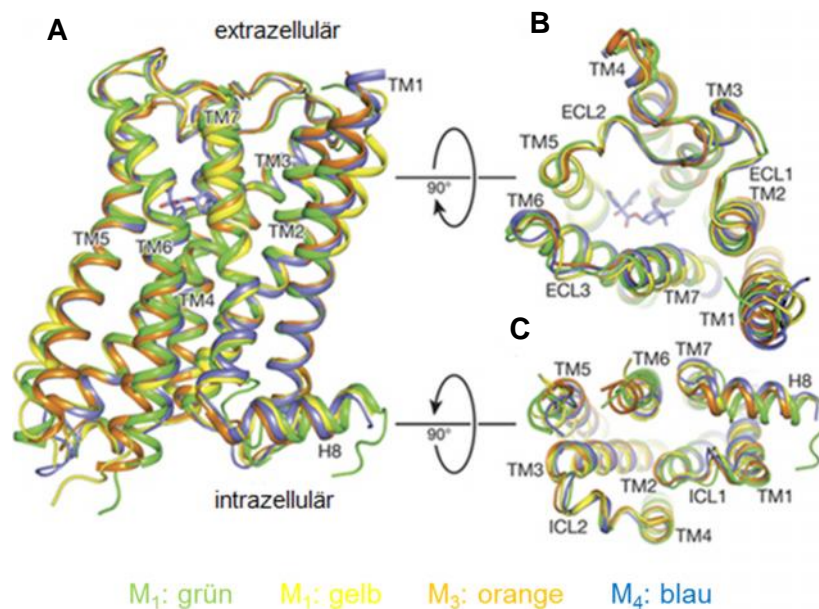
**Tabelle 1. 1: Ausgewählte Beispiele für die Lokalisation und physiologischen Effekte nach Aktivierung unterschiedlicher muskarinischer Acetylcholinrezeptoren.** Hervorgehoben ist der in dieser Arbeit verwendete M<sub>1</sub>-Rezeptorsubtyp. Modifiziert nach Caulfield und Birdsall 1998; Wess 2004; Langmead et al. 2008; Ruiz de Azua et al. 2011.

Auf Grund der ubiquitären Verteilung von mAChR und der damit einhergehenden cholinergen Wirkung, ausgelöst durch die Interaktion des Neurotransmitters ACh am mAChR, spielen diese Rezeptoren eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl von zentral und peripher gesteuerten Funktionen, wie beispielsweise Lernen, Gedächtnis und Aufmerksamkeit, Nozizeption, der Regulierung des Schlaf-Wach-Rhythmus, Herz-Kreislauf-Funktionen, Nieren- und Magen-Darm-Funktionen u.a. (Bonner et al. 1987; Bonner et al. 1988; Birdsall et al. 1999; Felder et al. 2000; Bymaster et al. 2003; Hasselmo 2006; Briand et al. 2007). Eine Vielzahl von Erkrankungen des zentralen Nervensystems, wie beispielsweise Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Schizophrenie, Epilepsie, Schlafstörungen, neuropathische Schmerzen und andere Krankheiten, stehen zudem in engem Zusammenhang mit einer Fehlfunktion in der cholinergen Erregungsübertragung zwischen den Nervenzellen in Regionen des basalen Vorderhirns (Levey 1993). Das wiederum impliziert, dass Arzneistoffe, die einzelne Subtypen der Muskarinrezeptor-Familie selektiv aktivieren könnten, ein hohes therapeutisches Potenzial zur Behandlung vieler verschiedener Krankheiten aufweisen würden (Felder et al. 2001; Langmead et al. 2008).

### 1.1.2 Struktur

Durch den enormen Fortschritt hinsichtlich der Anwendung und Durchführung von Kristallisationstechniken (Salon et al. 2011), konnten bis heute mehr als 142 GPCR, mit steigender Tendenz kristallisiert werden (Munk et al. 2016). Für einige Rezeptoren, wie beispielsweise den Rhodopsin- (Palczewski et al. 2000; Park et al. 2008; Scheerer et al. 2008; Kang et al. 2015), den  $\rho_1$ - (Huang et al. 2013) und den  $\rho_2$ -Rezeptor (Cherezov et al. 2007; Rosenbaum et al. 2007; Rasmussen et al. 2011a; Rasmussen et al. 2011b), den  $\mu$ -Opioid-Rezeptor (Manglik et al. 2012; Huang et al.

2015), den Adenosin A<sub>2</sub>-Rezeptor (Jaakola et al. 2008; Lebon et al. 2011; Xu et al. 2011), den P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub>-Rezeptor (Zhang et al. 2014a; Zhang et al. 2014b) und den muskarinischen M<sub>2</sub>-Rezeptor (Haga et al. 2012; Kruse et al. 2013), konnte zudem, neben der inaktiven auch die aktive Rezeptorkonformation mit einem gebundenen Agonisten dargestellt werden. Die daraus entstandene Fülle von strukturellen Informationen erlaubt daher sowohl eine detaillierte Beschreibung der Architektur der Familie der GPCR (und damit verbunden auch der mAChR) als auch detailliertere Informationen über die Strukturveränderungen, die mit einer Rezeptoraktivierung durch einen Liganden einhergehen, abzuleiten.



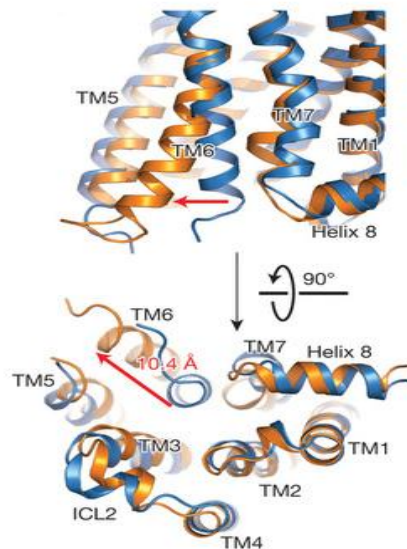
**Abbildung 1. 1: Modellhafte Abbildung des muskarinischen M<sub>1</sub>-, M<sub>2</sub>-, M<sub>3</sub>- und M<sub>4</sub>-Rezeptors mit dem orthosterischen Antagonisten Tiotropium.** Gezeigt wird in (A) ein Überblick der muskarinischen Struktur mit dem M<sub>1</sub>-Rezeptor dargestellt in grün, M<sub>2</sub> in gelb (PDB accession number 3UON), M<sub>3</sub> in orange (PDB accession number 4U15, chain A) und M<sub>4</sub> (chain A) in blau. Vergleich der Sichtweise von (B) extrazellulär und (C) intrazellulär. Modifiziert nach Thal et al. 2016.

Der charakteristische Aufbau muskarinischer Acetylcholinrezeptoren ist durch die sieben transmembranären  $\alpha$ -Helices (auch transmembranäre Domänen, TM-Domänen, genannt) gekennzeichnet. Beginnend mit dem extrazellulär gelegenen, aminoterminalen Ende mit potenziellen N-Glykosylierungsstellen, tragen die *transmembranären* Domänen die Nummern TM I-VII (1-7). Das C-terminale Ende des Proteins befindet sich intrazellulär (Hulme 1990; Wess 1993). Die sieben  $\alpha$ -Helices sind dabei durch drei intra- (ICL) und drei extrazelluläre (ECL) Schleifen („loops“) miteinander verbunden (vgl. Abbildung 1.1). Somit kann ein GPCR in drei funktionelle Segmente

unterteilt werden: die extrazelluläre Region, die transmembranäre Region und die intrazelluläre Region (vgl. Abb. 1.1).

Die transmembranäre Region ist durch eine ringförmige Anordnung der sieben Transmembranen gekennzeichnet, in deren Mitte sich eine Bindungstasche befindet, die auch als orthosterische Bindungsstelle (Präfix ortho-, griechisch: richtig) bezeichnet wird. Bei dieser Bindungsstelle, handelt es sich sowohl um die Bindungsstelle des endogenen Neurotransmitters Acetylcholin (Shi und Javitch 2002; Hulme et al. 2003; Haga et al. 2012) sowie zahlreicher exogener orthosterischer Agonisten und Antagonisten (Pogozheva et al. 1997; Palczewski et al. 2000; Rosenbaum et al. 2009). Die Aktivierung des Rezeptors findet jedoch vornehmlich durch die Transmembranen III (TM3), V (TM5), VI (TM6) und VII (TM7) statt (Spalding et al. 1994; Baldwin et al. 1997; Gether 2000; Lu et al. 2001), der Konservierungsgrad von Aminosäuren in diesen Regionen beläuft sich auf etwa 74% (Bonner et al. 1988). Die drei intrazellulären Schleifen sowie der C-Terminus vermitteln den direkten Kontakt des Rezeptors mit seinen Signalproteinen wie beispielsweise G Proteinen, G Proteingekoppelten Rezeptor Kinasen (GRKs) und Arrestinen. Wie alle Mitglieder der Klasse A GPCR verfügen die mAChR ebenfalls über eine lange extrazelluläre Schleife mit einer großen Diversität, die möglicherweise als eine zusätzliche Bindungsstelle fungiert. Eine Charakteristik der muskarinischen AChR ist die konservierte Disulfidbrücke zwischen Cysteinen in der ersten und zweiten extrazellulären Schleife, sowie das DRY-Motiv (i.e. Asp-Arg-Tyr), welches sich im Bereich der dritten transmembranären Domäne und der zweiten extrazellulären Schleife befindet (van Koppen und Nathanson 1990; Wess 1993).

Wie anhand von unterschiedlichen Kristallstrukturen nachgewiesen werden konnte, führt die Aktivierung des Rezeptorproteins durch einen orthosterischen Liganden zu einem Auseinanderdriften von Teilen der intrazellulären transmembranären Helices V, VI und VII (TM5, 6 und 7), was folglich die Bindung an intrazelluläre G Proteine ermöglicht. Die extrazellulären Teile der Transmembrandomänen V und VI (TM5 und 6) führen infolgedessen zu einer "Einwärtsbewegung" der Transmembrandomänen V und VI (TM5 und 6), die zu einer Art Kontraktion der Ligandbindungsstelle und einem „Abriegeln“ dieser gegenüber dem extrazellulären Raum führt (vgl. Abb. 1.2).



**Abbildung 1. 2: Schematische Übersicht über die intramolekularen Veränderungen des muskarinischen  $M_2$ -Rezeptors nach Aktivierung durch den orthosterischen Liganden Iperoxo.** Vergleich der inaktiven (blau) und aktiven (orange) Struktur des  $M_2$ -Rezeptors. Die Aktivierung des  $M_2$ -Rezeptors durch den orthosterischen Agonisten Iperoxo führt zu einem Auseinanderdriften von Teilen der intrazellulären transmembranären Helices V, VI und VII (TM 5, 6 und 7), was folglich die Rezeptorbindung an intrazelluläre G Proteine ermöglicht. Modifiziert nach Kruse et al. 2013. Für weitere Informationen vgl. Text.

Lange Zeit wurde angenommen, dass G Protein-gekoppelte Rezeptoren in der Plasmamembran exklusiv als Monomere vorliegen, wo es infolge einer Ligandbindung zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, zur Bindung des G Proteins und der damit verbundenen Regulation von Kaskaden sekundärer Botenstoffe, Rezeptor Phosphorylierung, Desensitisierung und Internalisierung kommt (Lefkowitz 2004; Hill 2006; Lefkowitz 2007). Mittlerweile gibt es jedoch immer mehr Hinweise darauf, dass G Protein-gekoppelte Rezeptoren der Klasse A in der Lage sind, sowohl Dimere als auch Oligomere zu bilden (Milligan 2004; Milligan 2008; Milligan 2010; Palczewski 2010; Milligan 2013; Ferré et al. 2014; Guitart et al. 2014).

### 1.1.3 Signaltransduktion über heterotrimere G Proteine

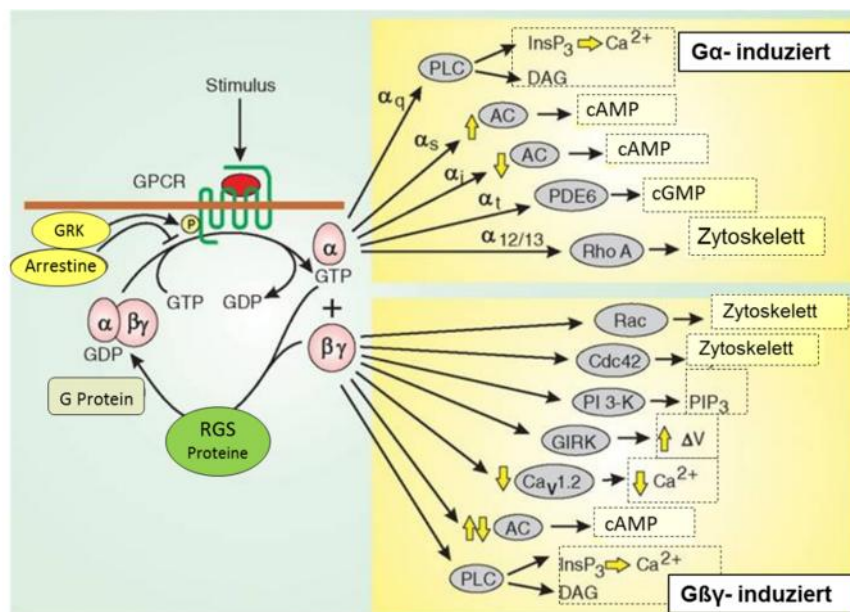
Durch die Interaktion eines Liganden mit einer extrazellulären Bindungsstelle eines GPCR kommt es zur Bildung eines Rezeptor-Ligand-Komplexes. Auf Grund der darauf folgenden Konformationsänderung, kommt es zu Änderungen im Bereich der zytoplasmatischen Enden der transmembranären Domänen, die zu einer Interaktionsoberfläche für intrazelluläre Adapterproteine, wie bspw. G Proteine, G Protein Interaktions-Proteine (GIPs), G Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) und  $\beta$ -Arrestinen führt (Rosenbaum et al. 2009; Ritter und Hall 2009; Katritch et al. 2013; Venkatakrishnan et al. 2013). Hauptsächlich sind jedoch die G Proteine für die meisten GPCR-vermittelten Signalgebungen verantwortlich (Milligan und Kostenis 2006). Die in der Zellmembran

lokalisierten heterotrimeren G Proteine setzen sich aus drei Untereinheiten zusammen: der  $\alpha$ -, der  $\beta$ - und der sogenannten  $\gamma$ -Untereinheit (Hamm 1998). Die G -Untereinheit, setzt sich aus zwei unterschiedlichen Domänen zusammen. Eine Domäne (*G-domain*) bindet und hydrolysiert das Guanosintriphosphat (GTP), die zweite fungiert dagegen als eine Art „Deckel“, durch den das GTP im Inneren der G -Untereinheit festgehalten wird (Noel et al. 1993). Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten sind über N-terminale „coiled-coil“-Wechselwirkungen miteinander verknüpft und bilden gemeinsam ebenfalls eine funktionelle Einheit. Mittels Myristoylierung am N-Terminus der  $\beta$ -Untereinheit und Isoprenylierung der  $\gamma$ -Untereinheit sind die Untereinheiten ebenfalls in der Zellmembran verankert (Vogel et al. 1989; Kisselev et al. 1994; Vögler et al. 2008). Im inaktiven Zustand trägt die  $\beta\gamma$ -Untereinheit Guanosindiphosphat (GDP) in der Guanin-Nukleotid-Bindungsstelle. Durch die Aktivierung des Rezeptorproteins fungiert der Rezeptor als Guaninnukleotid-Austauschfaktor und das an der  $\beta\gamma$ -Untereinheit gebundene GDP wird durch GTP ersetzt. Die daraus resultierende Konformationsänderung der  $\beta\gamma$ -Untereinheit führt daraufhin zu einem Affinitätsverlust zur  $\alpha$  /  $\beta\gamma$  - Untereinheit (Chung et al. 2011). Nachfolgend kommt es zur Dissoziation des G -GTP-Komplexes in die G -GTP und die nicht dissoziierbare G -Untereinheit, die im inneren Blatt der Phospholipid-Doppelschicht zurückbleibt (Bourne et al. 1991). Sowohl die  $\alpha$ -, als auch die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten weisen regulatorische Eigenschaften auf und sind damit in der Lage, unabhängig voneinander nachgeschaltete Signalwege zu regulieren und zu beeinflussen (Clapham und Neer 1993; Chisari et al. 2009). Auf Grund der bereits erwähnten GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit kommt es zur Hydrolyse des gebundenen GTP zu GDP, worauf die drei Untereinheiten reassoziieren. Folge dieser Reassoziations ist die Rückführung des G Proteins in seinen inaktiven Zustand (Spiegel 1987; Gilman 1987)(vgl. Abb. 1.3).

Bisher konnten mit Hilfe von Klonierungs- und Sequenzierungstechniken 16  $\alpha$ -, 5  $\beta$ - und 14  $\gamma$ -Untereinheiten identifiziert werden (Milligan und Kostenis 2006). Durch die Bildung unterschiedlicher G Proteine sind diese in der Lage, eine Vielzahl nachgeschalteter Signalwege zu aktivieren. Aufgrund ihrer  $\beta\gamma$ -Untereinheiten lassen sich die G Proteine in unterschiedliche Klassen einteilen. Die vier wichtigsten bisher beschriebenen Gruppen von G sind  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_{q/11}$  und  $G_{12/13}$  (Milligan und Kostenis 2006). Für die fünf beschriebenen mAChR-Subtypen ( $M_1$ - $M_5$ ) ergeben sich durch die Kopplung von mAChR an G Proteine mit unterschiedlichen  $\beta\gamma$ -Untereinheiten verschiedenste intrazelluläre Möglichkeiten der Signalwegaktivierung und daraus resultierende spezifische zelluläre Funktionen. Die Rezeptorsubtypen  $M_1$ -,  $M_3$ - und  $M_5$ - koppeln vornehmlich an  $G_{q/11}$  Proteine, wodurch die Isoenzyme  $C_1$  und  $C_4$  der Phospholipase C stimuliert werden können (Wess 1996). Dadurch folgt die Bildung der sekundären Botenstoffe Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) sowie eine nachgeschaltete  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern. Zudem konnte gezeigt werden, dass  $M_1$ -,  $M_3$ - und  $M_5$ - Rezeptoren ebenfalls die Phospholipase A2 (PLA2), die Phospholipase D (PLD) sowie Tyrosinkinasen aktivieren können (Wess 1996). Die Rezeptorsubtypen  $M_2$  und  $M_4$

koppeln bevorzugt an  $G_{i/o}$  Proteine und vermitteln über die Hemmung der Adenylylzyklase eine Inhibition der Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) (Hulme et al. 1990).

Die Aktivierung der  $G_i$  Untereinheiten der  $M_2$ - und  $M_4$ - Subtypen moduliert ebenfalls eine Vielzahl an Ionenkanälen wie z.B. spannungsabhängige Calcium Kanäle sowie einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (K-IR). Alle Subtypen sind ebenfalls in der Lage, "extracellular signal related" Kinasen (ERK) zu aktivieren. Bei ERK handelt es sich um ein Signalprotein, welches sowohl in das Zellwachstum als auch in die Zelldifferenzierung und das Überleben der Zelle involviert ist (Hulme et al. 2003). Die Funktionen von  $G_{12/13}$ -Proteinen sind weniger charakterisiert und beinhalten die Aktivierung von kleinen monomeren GTPasen (Marinissen und Gutkind 2001). Nach der Aktivierung eines GPCR kann es zu GRK-vermittelter Phosphorylierung des Rezeptorproteins in Regionen des C-Terminus und Kernregionen der Transmembrandomänen kommen (Zhang et al. 1999). Dieser Phosphorylierungsprozess führt nachfolgend zu einer Bindung von  $\beta$ -Arrestin, gefolgt von einer Desensibilisierung und/oder Internalisierung des Rezeptorproteins (Gurevich und Gurevich 2003; Lefkowitz und Shenoy 2005; Shenoy und Lefkowitz 2005; Liggett 2011). Daneben ist mittlerweile ebenfalls bekannt, dass  $\beta$ -Arrestine selber als alternatives, G Protein-unabhängiges Signalisierungssystem funktionieren können (Pierce et al. 2002). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass GPCRs in der Lage sind, eine Vielzahl von unterschiedlichen Effektoren zu stimulieren, die sowohl G Protein-abhängig, als auch G Protein-unabhängig sein können.



**Abbildung 1. 3: Schematische Darstellung der Aktivierung eines G Protein-gekoppelten Rezeptors durch Agonist-Stimulation.** Die Bindung eines agonistischen Liganden, in Rot dargestellt, führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins und zur Bindung des G Proteins. Es folgt der Austausch von GDP zu GTP durch das zugehörige G Protein und die darauf folgende Dissoziation in die  $G$  und  $G$  Untereinheit. Diese sind in der Lage unterschiedliche nachgeschaltete Effektoren zu aktivieren. Gelbe Pfeile stehen entweder für eine Aktivierung (↑) oder Inhibition (↓) der Zielproteine. Modifiziert nach Berridge 2012.

### 1.1.4 Partialagonismus

Die Fähigkeit einer Verbindung, eine pharmakologische Signalantwort zu bewirken, wird oft als intrinsische Aktivität (engl. „*efficacy*“) definiert (Stephenson 1956). Nach dieser Definition können Liganden kategorisiert werden in inverse Agonisten, neutrale Antagonisten, Vollagonisten und Partialagonisten. Somit kann eine agonistisch wirkende Verbindung pharmakologisch auf Grund ihrer Fähigkeit zur Aktivierung eines bestimmten Rezeptortyps entweder als Voll- oder Partialagonist eingeteilt werden, je nach dem in welchem Ausmaß diese erfolgt. Vollagonisten sind in der Lage, einen vollen (maximalen) Effekt des endogenen Agonisten auszulösen, während Partialagonisten, selbst wenn sie eine höhere Rezeptoraffinität besitzen als Vollagonisten und eine vollständige Rezeptorbesetzung aufweisen, keinen vollständigen Maximaleffekt erzielen können (Kenakin 1995; Smith et al. 2011). Als mechanistische Erklärungen für Partialagonismus gelten eine im Gegensatz zu Vollagonisten verminderte Bindungsaffinität an Epitope innerhalb des Rezeptorproteins (Warne et al. 2011), eine schwächere Stabilität der verengten Agonist-Bindungs-Tasche (Warne et al. 2011) oder eine teilweise Störung von Mikroschaltern, die für eine volle Rezeptoraktivierung notwendig sind (Swaminath et al. 2005; Yao et al. 2006). Eine Vermutung ist, dass der Partialagonist gleiche Bindungstopographien wie der Vollagonist nutzt, aber wahrscheinlich unterschiedliche Konformationen stabilisiert, die zu einer verminderten intrinsischen Aktivität hinsichtlich der Signalwegaktivierung führen (Nikolaev et al. 2006; Zürn et al. 2009; Kenakin und Miller 2010; Kofuku et al. 2012). Die Betrachtung schließt ein, dass ein Agonist nur in einer bestimmten Orientierung mit dem Rezeptorprotein interagiert und eine Art reversible Rezeptorkonformation bewirkt, die dann in der Lage ist an eine Vielzahl unterschiedliche Effektorproteine zu binden (Nygaard et al. 2013). Die Verwendung eines Partialagonisten verhindert eine Vielzahl von Effekten, die durch die Verwendung von Vollagonisten auftreten können: Partialagonisten minimieren sowohl die Desensibilisierung (January et al. 1997; January et al. 1998; Johnson 1998; Clark et al. 1999; Hanania et al. 2002; Bleecker et al. 2006; Moore et al. 2007) als auch die Anpassung auf Rezeptorvermittelte Wirkstoffaktivitäten, wie Toleranz und Abhängigkeit (Miller et al. 1990). So konnte der Einsatz eines spezifischen Partialagonisten des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren ein dauerhaftes Level der Rezeptorstimulation aufrecht erhalten, was zu einem vorteilhaften Effekt im Bereich der kongestiven Herzinsuffizienz führte (Nuttall und Snow 1982; Pouleur et al. 1982; Rousseau et al. 1983; Ikäheimo und Takkunen 1984; Jennings et al. 1984; Molajo und Bennett 1985; Furlong und Brogden 1988; Shabetai 1990).

## 1.2 Der muskarinische M<sub>1</sub>-Rezeptor

### 1.2.1 Allgemeine Informationen

Unter den muskarinischen Acetylcholinrezeptoren ist der M<sub>1</sub>-Rezeptor der prädominant exprimierte mAChR-Subtyp im ZNS, wobei er besonders in postsynaptischen Bereichen des Vorderhirns, wie dem zerebralen Cortex, dem Hippocampus und dem Striatum an postsynaptischen Membranen lokalisiert ist (Levey et al. 1991; Levey et al. 1995; Levey 1996)(vgl. Tab. 1.1). Auf Grund seines hohen Vorkommens in diesen speziellen Bereichen des ZNS, konnte dem M<sub>1</sub>-Rezeptor eine wichtige Funktion bei der Wahrnehmung sowie bei Lern- und Erinnerungsprozessen zugesprochen werden (Eglen 2005). M<sub>1</sub>-„knock-out“-Mäuse zeigten Defizite in vom pränatalen Cortex- sowie vom Hippocampus abhängigen Erinnerungsfunktionen, was zu der Vermutung führte, dass dieser Subtyp höchst wahrscheinlich Wahrnehmungs- und Erinnerungsprozesse beeinflussen kann (Langmead et al. 2008). Das wiederum führte zu der Annahme, dass der M<sub>1</sub>-Rezeptor an einer Vielzahl von psychischen und neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt zu sein scheint, (Wess et al. 2007; Thomas et al. 2008), weshalb der Möglichkeit einer pharmakologischen Beeinflussung von Erkrankungen, wie beispielsweise Schizophrenie (Dean 2004) und Morbus Alzheimer (Caccamo et al. 2006; Caccamo et al. 2009; Davis et al. 2010) ein großes Potential zugemessen wird. Somit könnte beispielsweise eine Substanz, die den M<sub>1</sub>-Rezeptor aktiviert, die Wahrnehmung verbessern und über einen längeren Zeitraum das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen (Ma et al. 2009). Der Ansatz Acetylcholinesterase-Hemmstoffe wie beispielsweise Donepezil, Galantamin und Rivastigmin zu entwickeln, basierte auf der Hypothese, dass viele Symptome der Alzheimerschen Krankheit auf eine Degeneration bestimmter cholinergischer Neuronen zurückgeführt werden kann (Hansen et al. 2008). Der Einsatz dieser Hemmstoffe, zeigte jedoch nur eine mäßige Wirksamkeit, die zudem von sehr kurzer Dauer war. Dennoch konnte der Einsatz dieser Wirkstoffe zeigen, dass eine gesteigerte cholinerge Funktion eine effektive Strategie in Bezug auf die Behandlung von Morbus Alzheimer ist. Dass die direkte Aktivierung des muskarinischen M<sub>1</sub>-Rezeptors ein guter Ansatzpunkt zur Behandlung von Symptomen ist, die mit dieser Krankheit einhergehen, konnte bereits mit einer Vielzahl von nichtselektiven, muskarinischen Agonisten, wie beispielsweise Xanomelin untersucht und bestätigt werden (Bodick et al. 1997a; Greenlee et al. 2001). Auf Grund der Aktivierung anderer muskarinischer Subtypen als dem M<sub>1</sub>-Rezeptor kommt es jedoch zu einer Reihe cholinergischer Nebenwirkungen, wie gastrointestinalen Beschwerden, vermehrtem Speichelfluss, vermehrter Schweißsekretion und Erbrechen (Bodick et al. 1997a; Bodick et al. 1997b; Bartolomeo et al. 2000; Thal et al. 2000).



## 1.2.2 Bindungsstellen des muskarinischen M<sub>1</sub>-Rezeptors

Die Aktivierung des Rezeptors durch konventionelle Agonisten erfolgt über die Bindung eines Agonisten an die orthosterische Bindungsstelle, über die auch ACh seine Wirkung entfaltet. Mit Hilfe von Mutagenese- und Molekül-Docking-Studien sowie der Verwendung von Homologie-Modellen, basierend auf der kristallographischen-Struktur von Rinder-Rhodopsin, konnten Modelle der orthosterischen Bindungsstelle erstellt werden (Hulme et al. 2003; Peng et al. 2006). Diese Studien zeigten, dass die orthosterische Bindungsstelle im Bereich der transmembranären Domänen angesiedelt ist und durch Bereiche von TM III (TM3), IV (TM4), VI (TM6) und VII (TM7) gebildet wird (Jacobson et al. 2010). Kristallstrukturen des M<sub>2</sub>- und M<sub>3</sub>-Rezeptors (Kruse et al. 2012; Haga et al. 2012; Kruse et al. 2013; Kruse et al. 2014) zeigten, dass sich die Homologien ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur bis zur orthosterischen Bindungsstelle ausdehnen. Seit kurzem liegen ebenfalls die Kristallstrukturen der Subtypen M<sub>1</sub> und M<sub>4</sub> vor (Thal et al. 2016). Aus dieser Kristallstruktur ist ersichtlich, dass die inaktive Struktur des M<sub>1</sub>-Rezeptors den bereits bekannten Strukturen inaktiver M<sub>2</sub>- und M<sub>3</sub>-Rezeptoren sehr ähnlich ist und eine gleichartige Positionierung der sieben transmembranären Bündel (TM I-VII) mit einer Standardabweichung von lediglich 0,6 – 0,9 Å (vgl. Abbildung 1.1) zeigt (Kruse et al. 2012; Haga et al. 2012; Thal et al. 2016). Feine Unterschiede zwischen den Rezeptoren zeigten sich in den intrazellulären und extrazellulären Bereichen, die auf den dort niedrigeren Konservierungsgrad zwischen den Subtypen zurückzuführen ist (vgl. Abb. 1.1).

Neben der beschriebenen orthosterischen Bindungsstelle, welche sich im Zentrum einer von den sieben transmembranären Domänen gebildeten Bindungstasche befindet, gibt es noch weitere, sogenannte allosterische Haftareale (allo-, griechisch: anders). Diese allosterischen Areale sind im Gegensatz zur orthosterischen Bindungsstelle in den äußeren Bereichen der transmembranären Helices sowie in den extrazellulär gelegenen Schleifen (ECL) lokalisiert (Wess et al. 2007) und durch eine weniger ausgeprägte Konservierung ihrer Aminosäuresequenz innerhalb der fünf Rezeptorsubtypen gekennzeichnet (Wess 2005). In ersten Untersuchungen auf der Basis zielgerichteter Mutagenese durch Matsui und Mitarbeiter (1995), wurde von dem Vorhandensein lediglich einer allosterischen Bindungsstelle ausgegangen. Später zeigten Radioligand-Bindungsuntersuchungen neue Hinweise auf die Existenz einer weiteren allosterischen Bindungsstelle (Lazareno et al. 2000; Lazareno et al. 2002). Durch spezielle Docking-Simulationen mit Staurosporin und Indolocarbazolderivaten (an einem auf der Struktur von Rhodopsin basierenden Homologie-Modell des M<sub>1</sub>-Rezeptors) wurde die Existenz von insgesamt drei verschiedenen allosterischen Bindungsstellen postuliert, an die bereits identifizierte allosterische Modulatoren bevorzugt binden sollen (Espinoza-Fonseca und Trujillo-Ferrara 2005). Zwei dieser allosterischen Bindungsstellen wurden extrazellulär, eine intrazellulär vermutet (vgl. Abb. 1.4). Da die zwei extrazellulären allosterischen Bindungsstellen topographisch nah beieinander liegen, könnte es sich möglicherweise auch, anstelle von zwei verschiedenen Bindungsstellen, um zwei Bereiche in einem größeren allosterischen Bindungsareals handeln (Espinoza-Fonseca und Trujillo-

Ferrara 2005, 2006). Somit könnten dort auch größere, raumgreifendere allosterische Liganden binden, wie es bereits für den M<sub>2</sub>-Rezeptor gezeigt wurde (Tränkle et al. 2005).



**Abbildung 1. 4:** Dreidimensionale Darstellung der drei postulierten allosterischen Bindungsstellen des M<sub>1</sub>-Rezeptors nach Espinoza-Fonseca, L. M., und Trujillo-Ferrara, J. G. (2005), erstellt mit dem Programm AutoDock. Die roten und rosa markierten Bereiche zeigen die beiden extrazellulär gelegenen allosterischen Bindungsstellen. Das violette Areal im unteren Bereich zeigt die intrazellulär postulierte allosterische Bindungsstelle. Die transmembranären Domänen (TMs) sind rot (TM1), braun (TM2), olivgrün (TM3), dunkelgrün (TM4), hellgrün (TM5), cyan (TM6) und blau (TM7) eingefärbt.

Spalding et al. (2006) stellten die Hypothese auf, die durch Jacobson et al. (2010) unterstützt wurde, dass die Aktivierung von M<sub>1</sub>-Rezeptoren durch unterschiedliche Liganden über mindestens drei Bindungsdomänen stattfinden kann: über die orthosterische Bindungsstelle für Acetylcholin, über ein definiertes allosterisches Haftareal, welches sich nahe der orthosterischen Bindungsstelle befindet sowie über eine weitere allosterische Bindungsstelle, welche oberhalb der orthosterischen Bindungsstelle lokalisiert ist. Bis heute sind die genaue Anzahl allosterischer Bindungsstellen sowie deren Lokalisation innerhalb des M<sub>1</sub>-Rezeptorproteins nicht sicher bekannt, wodurch die Möglichkeiten der Ausbeutung einer allosterischen Modulation der Ligandbindung und der Rezeptorfunktion, bzw. allosterischer Agonisten, limitiert werden.

### 1.2.3 M<sub>1</sub>-Rezeptor induzierte Signalwegaktivierung

Obwohl bekannt ist, dass der muskarinische M<sub>1</sub>-Rezeptor nach der Ligandbindung zu einer G<sub>q/11</sub>-abhängigen Phospholipase C Aktivierung führt, konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der dieser Rezeptorsubtyp weitere nachgeordnete Effektor-Signalwege beeinflussen kann; Befunde, die auf eine unterschiedliche G Protein Verwendung schließen lassen. So konnte gezeigt werden, dass der M<sub>1</sub>-Rezeptor sowohl G<sub>q/11</sub> und G<sub>i/o</sub> Proteine (Offermanns et al. 1994; Akam et al. 2001) als auch G<sub>s</sub> Proteine (Burford und Nahorski 1996) aktivieren kann. Es ist zudem bekannt, dass er an der Regulation einer Vielzahl von Ionenkanälen beteiligt ist, wie z.B. der KCNQ (spannungsabhängiger

Kalium Kanal) (Jones 1993; Lanzafame et al. 2003; Liu et al. 2006), spannungsabhängigen Calcium Kanälen (Jones 1993; Felder 1995; Lanzafame et al. 2003; Liu et al. 2006 ) und NMDA Rezeptoren (Marino et al. 1998). Weitere Studien konnten zeigen, dass der M<sub>1</sub>-Rezeptor im ZNS auch in der Lage ist, durch Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen) zu aktivieren (Hamilton et al. 1997; Hamilton und Nathanson 2001). Studien an M<sub>1</sub> „*knock-out*“-Mäusen bestätigten die Rolle des M<sub>1</sub>-Rezeptors in Lern- und Gedächtnisprozessen. Zudem zeigten diese Mäuse eine signifikant erhöhte Dopamin Transmission im Striatum und eine gesteigerte lokomotorische Aktivität (Gerber et al. 2001; Miyakawa et al. 2001).

### 1.3 Allosterische Modulation

Auf Grund des bereits erläuterten hohen Grades an Sequenzhomologie unter den Aminosäureresten in den transmembranären Domänen III, V, VI und VII (TM3, 5, 6 und 7), welche die orthosterische Bindungsstelle von M<sub>1</sub> - M<sub>5</sub> mAChR bilden, ist es bis heute nicht gelungen, orthosterische Liganden für muskarinische Acetylcholinrezeptoren zu entwickeln, die eine ausgeprägte Rezeptorsubtypselektivität aufweisen (Hulme et al. 2003). Viele GPCRs und so auch die mAChR, besitzen, wie erwähnt neben der orthosterischen Bindungsstelle weitere, davon räumlich getrennte Haftareale, welche als allosterische Bindungsstellen (griechisch: allos = anders, verschieden, vgl. auch Monod et al. 1963) bezeichnet werden (Christopoulos und Kenakin 2002; Christopoulos et al. 2004). Per definitionem befinden sich diese allosterischen Bindungsstellen in Rezeptorbereichen, die nicht der orthosterischen Bindungsstelle zugeschrieben werden können. Dieser Umstand erlaubt es, den Rezeptor mit einem orthosterischen und allosterischen Liganden simultan zu besetzen (Tränkle et al. 1998; Christopoulos, 2002; Christopoulos und Kenakin, 2002; Birdsall und Lazareno 2005). Die allosterische Bindungsstelle muskarinischer Acetylcholinrezeptoren wird in extrazellulären Rezeptorbereichen nahe der orthosterischen Bindungsstelle vermutet. Daran beteiligt sind bestimmte Aminosäure-Reste, die in der zweiten und dritten extrazellulären Schleife sowie in unterschiedlichen Transmembrandomänen, wie TM VII (TM7), lokalisiert sind und durch einen niedrigeren Konservierungsgrad unter den fünf Subtypen charakterisiert sind (Matsui et al. 1995; Ellis 1997; Christopoulos, 2002; Mohr et al. 2003; Hulme et al. 2003; Birdsall und Lazareno 2005; Gregory et al. 2007; May et al. 2007a; Haga et al. 2012; Kruse et al. 2012; Dror et al. 2013; Thal et al. 2016). Die extrazellulären Schleifen muskarinischer Acetylcholinrezeptoren sind weitaus weniger konserviert, als die TM-Rezeptor Kernregionen, welche die orthosterische Bindungsstelle ausbilden (Wess 1996; Ellis 1997; Caulfield und Birdsall 1998). Herkömmlich sind allosterische Bindungsstellen dazu bestimmt, endogene Mineral-Kationen wie Natrium, Calcium, Zink und Magnesium zu binden (Christopoulos 2002). Daneben stellen diese allosterischen Haftareale auch eine interessante Zielstruktur für Arzneistoffe dar (vgl. Tab. 1.2) und begründen gegenwärtig die Hoffnung auf die Entwicklung neuartiger allosterisch-muskarinisch wirkender Arzneistoffe, die sich durch eine

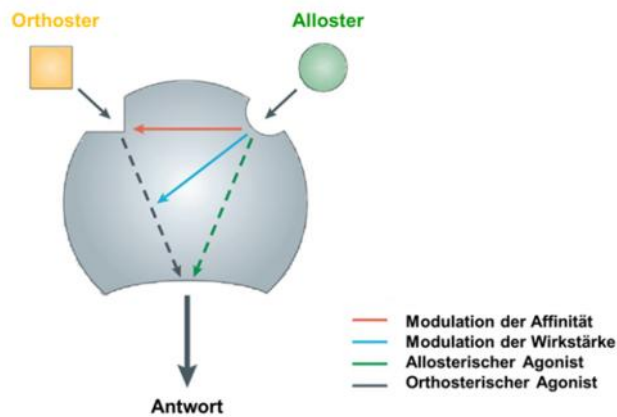
Rezeptorsubtypeselektivität, eine verstärkte Wirksamkeit und durch verminderte Nebenwirkungen auszeichnen (Birdsall und Lazareno 2005; Gregory et al. 2007).

Eigenschaften allosterischer Liganden oder Bindungsstellen	Potenzieller therapeutischer Vorteil
Der Effekt allosterischer Modulatoren ist sättigbar („ <i>ceiling</i> “-Effekt)	Reduziert das Risiko der Toxizität auf Grund einer Überdosierung
Die funktionelle Aktivität eines allosterischen „ <i>enhancers</i> “ ist abhängig von der Anwesenheit/synaptischen Freisetzung des endogenen GPCR Liganden	Aufrechterhaltung der physiologischen Neurotransmission sowie des Schemas der Rezeptoraktivierung
Allosterische Bindungsstellen an GPCRs sind gewöhnlich weniger konserviert unter den verschiedenen Subtypen als die orthosterischen Bindungsstellen	Möglichkeit der Entwicklung von Liganden mit gesteigerter Subtypeselektivität

**Tabelle 1. 2: Vorteile eines potenziellen therapeutischen Gebrauches von GPCR Liganden, die an allosterische Bindungsstellen interagieren (Christopoulos 2002; Christopoulos und Kenakin 2002; Birdsall und Lazareno 2005). Modifiziert nach Wess 2005.**

### 1.3.1 Arten Allosterischer Liganden

Durch die Bindung eines Liganden an eine allosterische Bindungsstelle ist dieser in der Lage, sowohl die Bindung des orthosterischen Liganden als auch die Rezeptoraktivierung/Signalübertragung durch die Veränderung der globalen Rezeptorkonformation zu beeinflussen (Christopoulos und Kenakin 2002; Christopoulos 2002). Der resultierende Effekt ist abhängig vom Rezeptor, dem orthosterischen Liganden und dem jeweiligen allosterischen Modulator. Je nachdem, welche Eigenschaft der allosterische Ligand gegenüber dem orthosterischen Liganden aufweist, wird er als PAM (positiv allosterischer Modulator), NAM (negativ allosterischer Modulator) oder als SAM (stiller allosterischer Modulator) bezeichnet. Des Weiteren ist mittlerweile bekannt, dass es allosterische Liganden gibt, die eine Signalwegaktivierung auslösen, *ohne* dass die orthosterische Bindungsstelle durch einen Agonisten besetzt ist (Schwartz und Holst 2007).



**Abbildung 1. 5: Schematische Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten allosterischer Modulation.** Allosterische Liganden binden an eine von der orthosterischen Bindungsstelle topographisch verschiedene Bindungsstelle des Rezeptors (grau), und können damit die Affinität (rot)/ Wirkstärke (blau) endogener und exogener orthosterischer Liganden (schwarz) regulieren. Manche allosterischen Liganden sind in der Lage, ohne die Anwesenheit eines orthosterischen Liganden den Rezeptor zu aktivieren (grün). Modifiziert nach Conn et al. 2009).

#### Negativ allosterische Modulatoren (NAM):

Liganden, welche in Bereichen der allosterischen Bindungsstelle binden und die Affinität sowie die Rezeptorfunktion senken, werden negativ (wirkende) allosterische Modulatoren genannt. NAM verursachen eine Rechtsverschiebung und/oder eine Absenkung des oberen Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurve. Beide Effekte sind sättigbar und erreichen ein Maximum, wenn der NAM alle für ihn zugänglichen Bindungsstellen komplett besetzt hat. Dieses Phänomen unterscheidet NAM von klassischen kompetitiven Antagonisten, welche theoretisch in der Lage sind eine unlimitierte, deutlich ausgeprägtere Rechtsverschiebung der Agonist Konzentrations-Effekt-Kurve zu induzieren, da ihr antagonistischer Effekt per definitionem nicht sättigbar ist. Es wird angenommen, dass NAMs entweder die Energiebarriere für die aktive Konformation erhöhen, oder aber die inaktive Konformation stabilisieren, wodurch eine reduzierte Affinität des orthosterischen Liganden zum Rezeptorprotein resultiert (Burford et al. 2011). Ein Beispiel für einen bereits auf dem Markt befindlichen hoch affinen, negativ wirkenden, allosterischen Modulator des HIV-gp120 Proteins am CCR5 Rezeptor ist Maraviroc (Celsentri<sup>®</sup>/Selzentry<sup>®</sup>; Pfizer). Die Substanz hindert das Andocken des HI-Virus und damit die Aufnahme in die menschliche Wirtszelle (Abel et al. 2009). Ein weiterer Arzneistoff mit NAM-Eigenschaften stellt Plerixafor (Mozobil<sup>®</sup>/AMD-3100; Genzyme) dar. Er verhindert die Bindung des endogenen Liganden CXCL 12 am CXCR4 Rezeptor, woraufhin es zu einer verstärkten Mobilisierung der Zelle kommt (Slater 2012; Scholten et al. 2012). Die Zulassung auf dem deutschen Markt erhielt dieser Wirkstoff im Jahr 2009 für Patienten mit Lymphom oder multiplem Myelom.

### Positiv allosterische Modulatoren (PAM):

Positiv (wirkende) allosterische Modulatoren sind Liganden, die an die allosterische Bindungsstelle binden und die Gleichgewichtsbindung eines simultan bindenden endogenen oder exogenen, orthosterischen Liganden erhöhen. Dies geschieht entweder über eine Erhöhung der Affinität des orthosterischen Liganden zum Rezeptorprotein, oder aber sie verringern die Aktivierungsbarriere für den Übergang von der inaktiven zur aktiven Rezeptorkonformation (Burford et al. 2011). Wie bei negativ allosterischen Modulatoren ist auch bei einem PAM das Ausmaß des allosterischen Verstärkung limitiert und ist dann maximal, wenn alle allosterischen Bindungsstellen mit dem Modulator besetzt sind. Ebenso wie NAM können diese Modulatoren ihren Effekt nur in der Gegenwart des endogenen Liganden oder eines anderen orthosterischen Liganden im ternären Komplex mit dem Rezeptor ausüben. Dieser Umstand führte bei einer Nutzung als Arzneistoff zur Behandlung von Morbus Alzheimer zu einer abnehmenden Wirkung, da es im fortgeschrittenen Stadium dieser Erkrankung zu einem Verlust des Neurotransmitters ACh kommt. Ein klassisches Beispiele für einen positiv allosterischen Modulator stellt die Substanzklasse der Benzodiazepine dar. Diese bieten eine effektive und sichere Behandlung von Angstzuständen und Schlafstörungen, ohne den potenziell tödlichen Effekt direkt bindender GABA Rezeptoragonisten zu verursachen (Möhler et al. 2002). Ein weiteres Beispiel stellt der Arzneistoff Cinacalcet (Mimpara<sup>®</sup>) dar. Bei dieser Substanz handelt es sich um einen positiv allosterischen Modulator gegenüber Calciumionen am Calciumsensitiven Rezeptor (CaSR), einem GPCR (Lindberg et al. 2005). Nach der Bindung an der allosterischen Bindungsstelle des CaSR in den C-Zellen der Nebenschilddrüse induziert Cinacalcet eine Konformationsänderung, die von einer erhöhten Sensitivität des Rezeptors für extrazelluläre Calciumionen begleitet ist. Somit führt es zu einer reduzierten Freisetzung des Parathormon in das Blut, welches ein wichtiges Hormon für den Knochenstoffwechsel darstellt. Anwendung findet der Wirkstoff z.B. in der Behandlung von sekundärem Hyperparathyreoidismus, eine Erkrankung der Nebenschilddrüse (Kebig und Mohr 2008).

Einen großen Meilenstein in der Entwicklung muskarinischer allosterischer Modulatoren stellte die Entdeckung von BQCA (*benzylquinolone carboxylic acid*) dar, einer ausgeprägt M<sub>1</sub>-selektiven Verbindung, die mit allosterischen Bindungsstellen des M<sub>1</sub>-Rezeptors interagiert (Ma et al. 2009; Shirey et al. 2009). BQCA interagiert nicht mit der orthosterischen Bindungsstelle, ist aber in der Lage, die Aktivität von Acetylcholin über die Bindung an die allosterische Bindungsstelle zu verstärken (Ma et al. 2009). Sie besitzt eine vorteilhafte Pharmakokinetik indem es im ZNS anflutet; diese Eigenschaft macht es für *in vivo*-Studien nutzbar (Ma et al. 2009).

### Stille allosterische Modulatoren (SAMs):

Stille allosterische Modulatoren binden, wie die zuvor beschriebenen Arten von Modulatoren, im Bereich einer allosterischen Bindungsstelle an den Rezeptor, beeinflussen jedoch nicht die Bindung, bzw. Rezeptoraktivierung des orthosterischen Liganden. Binden die stillen allosterischen Modulatoren an der gleichen allosterischen Bindungsstelle wie PAM, NAM und allosterische Agonisten, weisen SAM diesen gegenüber ein kompetitives Verhalten auf und führen zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve. Aus diesem Grund werden SAM auch als allosterische Antagonisten bezeichnet und stellen ein interessantes pharmakologisches Werkzeug dar (Burford et al. 2011).

### Allosterische Agonisten

Allosterische Agonisten sind dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Signalwegaktivierung auslösen, *ohne* dass die orthosterische Bindungsstelle durch einen Agonisten besetzt ist (Schwartz und Holst 2007). Hinweise auf allosterischen Agonismus wurde 1990 erstmalig am Adenosin  $2_A$  ( $A_{2A}$ )-Rezeptor dokumentiert. Weitere Untersuchungen bestätigten, dass eine Vielzahl allosterischer Liganden ein agonistisches Verhalten aufweisen können (Raddatz et al. 2007; Schwartz und Holst 2007; Bridges und Lindsley 2008; Nawaratne et al. 2010). Außerdem ist bekannt, dass manche Substanzen, denen eine PAM-Aktivität zugesprochen wird, in Abwesenheit eines orthosterischen Liganden, ebenfalls über ein allosterisch agonistisches Verhalten verfügen. Typischerweise zeigt sich ein allosterisch agonistischer Effekt aber erst in Konzentrationen, die höher sind als diejenigen, die für eine PAM-Aktivität benötigt werden (Schwartz und Holst 2006; Bridges und Lindsley 2008).

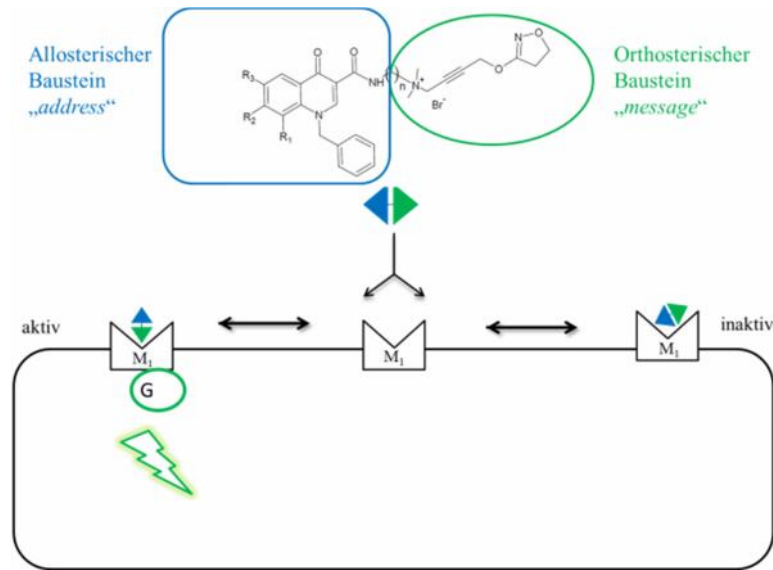
Ein großer Fortschritt in der Erforschung  $M_1$ -selektiver Aktivatoren kam mit der Entdeckung des ersten  $M_1$ -selektiven allosterischen Agonisten AC42, welcher in der Lage ist, den Rezeptor, ohne das Vorhandensein eines orthosterischen Liganden, voll zu aktivieren (Spalding et al. 2002). AC42 zeigt ein signifikantes funktionelles Profil mit 400-facher Selektivität für die Aktivierung des  $M_1$ -Rezeptors im Vergleich zu den vier übrigen Subtypen  $M_2$ - $M_5$  (Spalding et al. 2002). Des Weiteren interagiert AC42 allosterisch mit dem Antagonisten [ $^3$ H]NMS und Atropin (Langmead et al. 2006; Spalding et al. 2006) und ist relativ insensitive gegenüber Mutationen im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle ( $M_1^{106}$ Tyr Ala,  $M_1^{381}$ Tyr Ala und  $M_1^{382}$ Asn Ala), die eine hochgradig hemmenden Effekt auf die Bindung und/oder Funktion des prototypischen, nichtselektiven orthosterischen Agonisten Carbachol induzieren (Spalding et al. 2002; Spalding et al. 2006). Eine weitere, als allosterischer Agonist am muskarinischen  $M_1$ -Rezeptor identifizierte Substanz ist 77-LH-28-1 (1-[3-(4-butyl-1-piperidinyl)propyl]-3,4-dihydro-2(1H)-quinolinone), bei der es sich um ein Strukturanalogon von AC-42 handelt. 77-LH-28-1 verfügt, verglichen mit den weiteren M-Subtypen, ebenfalls über eine funktionelle Selektivität für den  $M_1$ -Rezeptor (May et al. 2007a; Langmead et al. 2008). Einen weiteren putativ allosterischen Agonisten am muskarinischen  $M_1$ -Rezeptor stellt die Substanz TBPB (1-(1'-(2-methylbenzyl)-[1,4'bipiperidin]-4-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2-(3H)-one) dar

(Jones et al. 2006; Jones et al. 2008). TBPB verfügt, anders als AC42, über Eigenschaften, die es ermöglichen, diese Substanz für Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* einzusetzen. Durch spätere Mutagenesestudien orthosterischer sowie benachbarter allosterischer Domänen des muskarinischen M<sub>1</sub>-Rezeptors konnten jedoch Hinweise gefunden werden, dass es sich bei allen drei als allosterische Agonisten postulierten Liganden um „bitopische“ Liganden handelt, die sowohl mit Teilen der orthosterischen als auch mit Arealen der allosterischen Bindungsstelle interagieren (Spalding et al. 2002; Langmead et al. 2006; Spalding et al. 2006; Avlani et al. 2010; Jacobson et al. 2010; Keov et al. 2013; Keov et al. 2014). Somit stellen sie offenbar keine rein allosterischen Agonisten dar, wie zuvor postuliert wurde.

### 1.4 Allosterisch/orthosterische Hybridliganden

Einen weiteren Ansatz zur Entwicklung subtypselektiver Liganden stellt das Konzept der dualsterischen Interaktion dar, welches durch die zeitgleiche Bindung eines Liganden an die weniger konservierte allosterische Bindungsstelle sowie an das stark konservierte orthosterische Haftareal gekennzeichnet ist (Disingrini et al. 2006; Antony et al. 2009; Mohr et al. 2010). Dieses Konzept leitet sich von dem bereits in den 1970er Jahren von Schwytzer publizierten „*message-address*“-Konzept ab (Schwyzer 1977). Bei diesem Prinzip soll der orthosterische Molekülteil den Rezeptor aktivieren bzw. inhibieren und somit als Botschaft (engl. „*message*“) fungieren, wohingegen der allosterische Baustein die weniger konservierte allosterische Bindungsstelle adressieren soll, um damit die gewünschte Subtypselektivität („*address*“) zu vermitteln (vgl. Abb. 1.6). Verbunden sind beide Bausteine durch eine Zwischenkette. Die Länge der Zwischenkette ist wichtig, damit die Molekülbausteine ihre jeweilige Bindungsstelle auch erreichen und mit ihr interagieren können. Ebenso kann die Zwischenkettenlänge sowohl Einfluss auf die Subtypselektivität (Steinfeld et al. 2011; Bock et al. 2012; Bonifazi et al. 2014) als auch auf die intrinsische Aktivität und/oder Signalwegaktivierungen (Messerer et al. 2017) des jeweiligen Rezeptor-Ligand-Komplexes haben. Diese neue Topographie von Ligand/Rezeptor-Interaktion wurde als dualsterische Binding betitelt. Weitere Begriffe, die in dem Zusammenhang verwendet werden sind „bitopisch orthosterisch/allosterisch“ (Tahtaoui et al. 2004; Valant et al. 2008) und „multivalent orthosterisch/allosterisch“ (Steinfeld et al. 2007) sowie dualsterisch (Antony et al. 2009).





**Abbildung 1. 6:** Beispielhaft schematische Darstellung des Bauprinzips und der Bindungsmöglichkeiten der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten dualsterischen agonistischen Hybridliganden an  $M_1$ -Rezeptoren. Der orthosterische Baustein Iperoxo wurde kovalent mit unterschiedlichen allosterischen Bausteinen verknüpft, die sich von dem hoch  $M_1$  selektiven, positiv allosterischen Modulator BQCA ableiten. Eine Besonderheit dieser Liganden liegt in ihrer Fähigkeit, in zwei unterschiedlichen Orientierungen mit dem Rezeptorprotein interagieren zu können; der dualsterischen oder der rein allosterischen Bindungsorientierung, wobei die dualsterische Bindung zu einer Aktivierung des Rezeptorproteins führt und die rein allosterische Bindungsneigung die inaktive Rezeptorkonformation stabilisiert (modifiziert nach Chen, Klöckner und Holze et al. 2015).

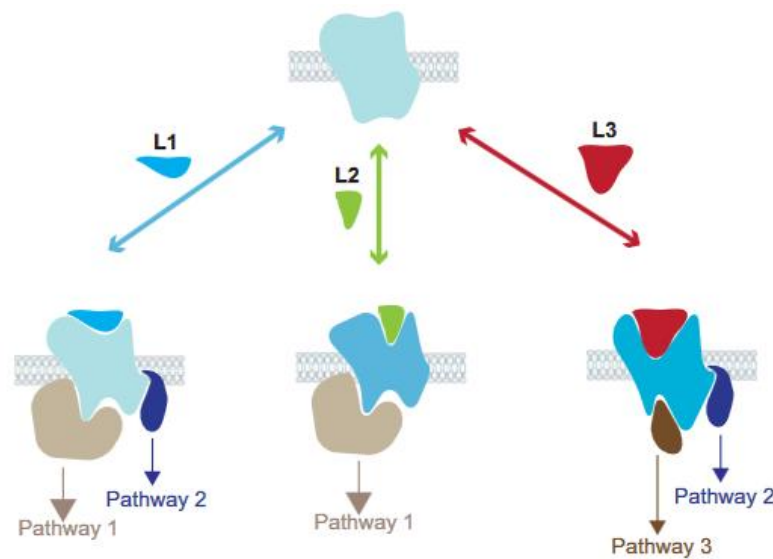
Die simultane Besetzung der orthosterischen und der allosterischen Bindungsstelle impliziert eine Menge theoretischer Vorteile, wie beispielsweise eine verbesserte Affinität zum Zielrezeptor und/oder eine verbesserte Selektivität entweder auf der Ebene der Rezeptor-Subtypbindung oder aber einer Bevorzugung eines Signalweges. Am muskarinischen  $M_2$ -Rezeptor konnte gezeigt werden, dass, verglichen mit dem endogenen orthosterischen Agonisten ACh, dualsterische Liganden in der Lage sind, ein völlig neues Kollektiv von Rezeptorkonformationen zu ermöglichen, womit eine Signalwegelektivität verbunden sein kann (Bock et al. 2012). Ein zusätzlicher Vorteil dualsterischer Liganden gegenüber rein allosterisch wirkenden Liganden ist, dass der allosterische Ligand auf das Vorhandensein des orthosterischen Liganden angewiesen ist, wohingegen dualsterische Liganden die orthosterische Bindungsstelle in Abwesenheit (bspw. bei neurodegenerativen Erkrankungen) des endogenen Liganden besetzen (Lane et al. 2013). Der Nachweis, dass agonistische, dualsterische Hybridliganden in ihrer dualsterischen Bindungsorientierung die aktive Rezeptorkonformation und damit verbundene G Protein-Aktivierungen und die rein allosterische Bindungsorientierung die inaktive Rezeptorkonformation favorisiert und stabilisiert, zeigte, dass die Bindungsorientierung dieser Liganden nicht nur wichtig für die Bindungsaffinität der Liganden ist, sondern ebenfalls von großer Bedeutung für die Aktivierung des Rezeptorproteins und nachfolgender Effektor-Moleküle (Bock et al. 2014a). Somit eröffnet dieses Prinzip zusätzlich neue Wege im Hinblick darauf, eine gestufte „*efficacy*“ erzeugen zu können (Bock et al. 2014a; Chen, Klöckner und Holze et al. 2015). Darüber hinaus liefert das Konzept der dualsterischen Bindung ebenfalls die Möglichkeit, rezeptorsubtypselektive Agonisten (Antony et al. 2009) und auch Antagonisten (Schmitz et al. 2014) zu generieren.

## 1.5 Signalwegselektivität

Die meisten Verbindungen, die als Zielstruktur einen G Protein-gekoppelten Rezeptor besitzen, wurden phänotypisch als Voll- oder Partialagonisten, (neutrale) Antagonisten oder inverse Agonisten eingeordnet, je nach ihrer gemessenen Aktivität auf dem jeweilig anerkannten Signalweg. Wird beispielsweise der adrenerge  $\alpha_2$ -Rezeptor betrachtet, wurden die meisten Agonisten, inversen Agonisten, sowie neutrale Antagonisten auf Grund ihrer intrinsischen Wirksamkeit („*efficacy*“) gegenüber ihrem Hauptsignalweg klassifiziert, obwohl bekannt ist, dass der  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptor in der Lage ist, pleiotropisch mit mehreren Signalwegen zu interagieren (Evans et al. 2010). Diese Beobachtung ist für eine ganze Reihe von GPCR zutreffend. Mittlerweile gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass sich das Verhalten eines Liganden mit dem betrachteten Signalweg ändern kann (vgl. Abb. 1.7). So wurden beispielsweise Verbindungen, die auf Grund ihrer intrinsischen Wirksamkeit („*efficacy*“) gegenüber cAMP, als  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor-neutrale Antagonisten oder inverse Agonisten eingeordnet, obwohl sie an anderen Signalwegen durchaus ein agonistisches Verhalten zeigten, wie beispielsweise gegenüber der *extracellular signal-regulated kinase*  $\frac{1}{2}$  (ERK) (Azzi et al. 2003; Galandrin und Bouvier 2006; Shenoy et al. 2006). Die Fähigkeit eines Liganden ein Rezeptorprotein in einer signalwegabhängigen Weise unterschiedlich zu beeinflussen, wird meistens mit den Begriffen „funktionelle Selektivität, oder „*Signaling bias*“ bezeichnet (Kenakin und Christopoulos 2013b). Die erste molekulare Beschreibung dieses Phänomens wurde als Effekt beschrieben, unterschiedliche aktive Rezeptorkonformationen mit Hilfe unterschiedlicher Agonisten zu stabilisieren (Kenakin und Morgan 1989; Kenakin 1995;). Der Fähigkeit der verwendeten Agonisten unterschiedliche Signalwege zu aktivieren, wurde eine Reihe von Namen gegeben „*stimulus trafficking*“ (Kenakin 1995), „*functional selectivity*“ (Lawler et al. 1999; Kilts et al. 2002; Shapiro et al. 2003), „*functional dissociation*“ (Whistler und Zastrow 1999), „*biased inhibition*“ (Kudlacek et al. 2002), „*differential engagement*“ (Manning 2002). Der Begriff „*Biased signaling*“ wurde von (Jarpe et al. 1998) eingeführt und wird, in Bezug auf dieses Thema als Term favorisiert.

Neben der Feststellung, dass Liganden unterschiedliche Rezeptorkonformationen beeinflussen können, die folglich einen unterschiedlichen Einfluss auf die Signalwegaktivierung aufweisen können, weiß man mittlerweile, dass viele GPCRs neben dem klassischen Weg über die Bindung an ein heteromeres G Protein (Lefkowitz 2004) zusätzlich in der Lage sind, Signalwege auch G Protein-unabhängig zu aktivieren, wie z.B. über den MAP-Kinase-Weg, ERK1/2 und Jun Kinasen durch Rezeptorphosphorylierung und Interaktion mit Arrestin-Adapter-Proteinen (Shenoy und Lefkowitz 2011). Häufig fokussiert sich die Ermittlung eines „*Ligand-Bias*“ auf den Vergleich zwischen G Protein-abhängigen Signalwegen und der  $\beta$ -Arrestin-Aktivierung (Lovell et al. 2015; Carr et al. 2016) sowie dem Vergleich unterschiedlicher G Proteinaktivierungen (Schrage et al. 2013; Thompson et al. 2016) oder aber der G Protein vermittelten Aktivierung unterschiedlicher nachgeschalteter Effektoren (Lovell et al. 2015).

Die Tatsache, dass die physiologische Wirkung zahlreicher Liganden von G Protein-gekoppelten Rezeptoren auf einen „Bias“ zurückzuführen ist, zeigt das Potenzial dieses Konzepts bei der Entwicklung neuer, therapeutisch relevanter Liganden. Die Entdeckung, dass der  $\beta$ -Arrestin-Weg auch G Protein unabhängig aktiviert werden kann, legt darüber hinaus die Bedeutung eines „Ligand-Bias“ hinsichtlich regulatorischer Prozesse wie der Rezeptor-Internalisierung, der „Downregulation“ und der Desensibilisierung nahe (Gregory et al. 2012). So gibt es Berichte von Liganden, die als neutrale Antagonisten oder inverse Agonisten für die akute Signaltransduktion fungieren, aber positive Agonisten für Rezeptorregulationsprozesse sind (Barker et al. 1994; Labrecque et al. 1995; Roettger et al. 1997; Blanpain et al. 2002; Wei et al. 2003).



**Abbildung 1. 7: Schematische Darstellung der durch unterschiedliche Liganden ausgelösten Signalwegbevorzugung.** Die Liganden L1 – L3 bewirken unterschiedliche Rezeptorkonformationen, die zu unterschiedlichen funktionellen Effekten führen. Modifiziert nach Shonberg et al. 2014. Für weitere Informationen, vgl. Text.

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Durch eine Beschädigung der zerebralen, cholinergen Transmission - entweder durch eine Entzündungsreaktion, Neurodegeneration, Toxine oder den fortschreitenden Alterungsprozess - können sich neurologische oder psychische Krankheiten, einschließlich Morbus Alzheimer (Langmead et al. 2008; Fisher 2012) und Schizophrenie (Jones et al. 2012) manifestieren. Somit stellen einzelne muskarinische Rezeptoren, vor allem der muskarinische  $M_1$ - und der  $M_4$ -Rezeptor, ein ideales Ziel für pharmakologische Interventionen dar, um die gestörte cholinerge Transmission wiederherzustellen (z.B. (Greenlee et al. 2001; Conn et al. 2009; Gullledge et al. 2009; Dasari und Gullledge 2011; Dencker et al. 2012). Auf Grund einer sehr hohen Sequenzhomologie der orthosterischen Bindungsstelle - und damit auch der Bindungsstelle des endogenen Transmitters ACh - unter den fünf Muskarinsubtypen (Hulme et al. 1990) ist es bis heute jedoch sehr schwierig, subtypselektive mAChR-Substanzen zu entwickeln. Dualsterische Hybridliganden, bestehend aus einem allosterischen und einem orthosterischen Baustein, die über eine Zwischenkette verbundenen sind, gelten als ideale Werkzeuge zur Entwicklung subtyp- und signalwegselektiver Liganden. Abhängig von den Bindungsneigungen der einzelnen Bausteine zu den für sie vorgesehenen Bindungsstellen (entweder orthosterisch oder allosterisch), können diese Liganden entweder in einer dualsterischen oder in einer rein allosterischen Bindungsorientierung mit dem Rezeptorprotein interagieren. Bezüglich der Bindung dualsterischer Hybridliganden am muskarinischen  $M_2$ -Rezeptor konnte von Bock und Mitarbeitern (2014a), der dynamische Wechsel zwischen der aktiven und der inaktiven Bindungsorientierung ( $R_{pose}$ ) zum rationalen Design von Partialagonisten verwendet werden. Aus diesem Grund bestand das essentielle Ziel der vorliegenden Arbeit in der Untersuchung und Charakterisierung der Bindungstopographie von sieben Hybridliganden (Iperoxo/BQCA-Hybride), die sich von dem hoch  $M_1$ -selektiven positiv allosterischen Modulator BQCA und dem  $M_1$ -Rezeptorvollagonisten Iperoxo ableiten. Zwei im Rahmen dieser Arbeit neu etablierte Gleichungen, die den Erkenntnisrahmen der Vorgängerversionen nach Antony und Mitarbeitern (2009) substanziell modifizierten, sollten zur Ermittlung der Bindungsneigung der dualsterischen Liganden in der dualsterischen bzw. rein allosterischen Bindungsorientierung eingesetzt und die mit ihrer Hilfe erhaltenen Ergebnisse und ihr Erkenntnisgewinn diskutiert werden. Daneben sollten die in einer vorangegangenen Arbeit durch funktionelle DMR-Experimente (Holze, Masterarbeit 2013) erhobenen Befunde partialagonistischen Verhaltens dieser Hybridliganden mit Hilfe von für einzelne Signalwege charakteristischen Experimentalansätzen näher charakterisiert werden. Da bereits bekannt war, dass dualsterische Hybridliganden in der Lage sind, eine Signalwegselektivität zu induzieren (Bock et al. 2014a, Valant et al. 2014), sollte die Berechnung des „Ligand-Bias“ einen Einblick in die bevorzugte G Protein-Aktivierung der Hybride bringen. Der Nachweis, dass die Verlängerung der Zwischenkette im dualsterischen Iperoxo/BQCA-Hybridpaar JK 550 ( $C_4$ ) um zwei Methylengruppen zu einem signifikanten Unterschied von  $R_{pose}$  und damit zu einem Wechsel von einer allosterischen zu einer

überwiegend dualsterischen Bindungsorientierung für das verlängerte JK 537 ( $C_6$ ) kommt, sich aber hinsichtlich der maximalen intrinsische Aktivität  $E_{\max}$  kein signifikanter Unterschied zeigte, führte darüber hinaus zu der Entwicklung einer neuen globalen Analyse, die es erlaubt, die systemunabhängige intrinsische Aktivität des dualsterischen Liganden zu ermitteln (Chen, Klöckner und Holze et al. 2015). Dieses Vorgehen sollte es erstmalig auf der Basis der durch die Hybridliganden JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) induzierten Rezeptoraktivierung ( $E_{\max}^*$ , vgl. Kapitel 4.1.9) erlauben, Ursachen für die (trotz unterschiedlicher Bindungsorientierung) gleich ausgeprägten Maximaleffekte auf allen untersuchten Signalwegen anzugeben.

Um einen noch besseren Einblick in die Bindungstopographie des Hybridpaares JK 550 und JK 537 zu erlangen, sollte zudem erstmals der Einfluss unterschiedlicher Mutationen im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstelle des humanen  $M_1$ -Rezeptors ( $hM_1$ ) auf die Bindung und die Signalwegaktivierung orthosterischer Vollagonisten, wie z.B. Acetylcholin und Iperoxo sowie dualsterischer Hybridliganden untersucht werden. Zusätzlich wurde überprüft, ob die Punktmutationen im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptors in der Lage sind, eine Ligand-spezifische Bevorzugung eines speziellen Signalweges auszulösen. Auf diese Weise sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welche Aminosäuren an der  $hM_1$ -Rezeptorbindung an unterschiedliche G Proteine sowie der Ausbildung signalwegrelevanter  $hM_1$ -Rezeptorkonformation der Hybride beteiligt sind.

Neben den bereits beschriebenen dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybriden (Substanzserie 1; vgl. Abb. 4.1), sollte im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres Paar dualsterischer Hybridliganden (UR-MD-13 und UR-MD-14, Substanzserie 2; vgl. Abbildung 4.91) vorgestellt und hinsichtlich seines Bindungsmodus und seiner Signalwegaktivierung näher untersucht werden. Auf Grund der deutlich positiven Kooperativität zwischen dem allosterischen Fragment UR-MD-5 des dualsterischen Hybrides UR-MD-13 und dem Radioagonisten [ $^3$ H]Iperoxo (vgl. Kapitel 4.3.1.3), erschien es außerdem interessant, mehr über die Bindungstopographie und potentielle Signalwegaktivierung dieser Substanz zu erfahren. Dazu wurde der Einfluss unterschiedlicher Mutationen, im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstellen des humanen  $hM_1$ -Rezeptors in Bezug auf die Bindung des Modulators UR-MD-5 untersucht.

In einer vorangegangenen Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass UR-MD-2, ein allosterisches Fragment des dualsterischen Hybridliganden UR-MD-4, in funktionellen DMR-Experimenten an lebenden  $hM_1$ -CHO-Zellen einen Maximaleffekt  $E_{\max}$  von  $62 \pm 2\%$  bewirkte (Zimmermann, Masterarbeit 2012). Da es sich bei UR-MD-2 um ein Derivat des allosterischen/bitopischen Agonisten TBPB (TBPBd) (Christopoulos und Mitchelson 1997; Jacobson et al. 2010) handelt, erschien es weiterhin interessant, den potenziell allosterischen/bitopischen Agonisten UR-MD-2 weitergehend zu charakterisieren. Neben funktionellen Experimenten, welche die durch unterschiedliche G Proteine angestoßene Signalwegaktivierungen beleuchten sollten, galt es auch, die Bindung des putativ

allosterischen Fragmentes näher zu untersuchen, da für die Muttersubstanz TBPB bekannt war, dass sie wahrscheinlich sowohl mit der allosterischen, aber auch mit Teilen der orthosterischen Bindungsstelle interagieren kann (Avlani et al. 2010). Mit Hilfe von *hM<sub>1</sub>*-Rezeptoren, die Punktmutationen im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstelle aufwiesen, sollte die Bindungstopographie des potenziell allosterischen Agonisten UR-MD-2 eingehender untersucht werden.

## 2 Materialien

Im folgenden Kapitel werden alle für diese Arbeit benötigten Materialien, unterteilt in Verbrauchsmaterialien und Geräte sowie Reagenzien, Lösungen und Toxine alphabetisch aufgeführt. Es folgt eine Auflistung der verwendeten Zellen sowie der diesbezüglichen Kulturmedien. Anschließend werden alle verwendeten Computerprogramme, Datenbanken und Bezugsquellen der verwendeten Materialien aufgeführt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten chemischen Substanzen sind am Ende dieses Kapitels aufgelistet.

### 2.1 Verbrauchsmaterialien

Kürzel	Material	Artikelnummer	Firma
V1	Aluminiumfolie	-	REWE
V2	<i>Cell Assay Plate</i> , 384 well (Mikrotiterplatte)	5040	Corn
V3	Cellstar® Zellkulturschale, 100 x 20 mm, steril	664160	Grein
V4	Cellstar® Zellkulturschale, 145 x 20 mm, steril	639160	Grein
V5	<i>Cryogenic Vials</i> , 1ml (Einfrierröhrchen)	50001012	Nalge
V6	Finntip Stepper 0,5; 1,25; 2,5; 5,0; 12,5 (Multivolumendispensierhilfe)	9404170; 9404180; 9404190; 9404200; 9404210	Thermo
V7	Inject® Einmalspritzen 10ml, 20ml		B.Braun
V8	Meltilex™ A (Wachsplatte), 73x109mm (Feststoffsintillator)	1450-441	Perk
V9	Mikrotiterplatte, 384 Well	788093	Grein

## 2 Materialien

<b>V10</b>	<i>Microtubes</i> MCT-200-C, 2ml (Reaktionsgefäß)	31110051	Axyg
<b>V11</b>	Parafilm® M <i>laboratory film</i>	PM-996	Bemis
<b>V12</b>	Pasteurpipetten aus Glas, ca. 150mm	747715	Brand
<b>V13</b>	Pipettenspitzen 5ml	539191	Brand
<b>V14</b>	Polypropylen-Reaktionsgefäß 1,5ml mit angehängtem Deckel	616201	Grein
<b>V15</b>	Falcon™ 15 ml (PP-Behältnis, mit konischem Boden)	188271	Grein
<b>V16</b>	Falcon™ 50 ml (PP-Behältnis, mit konischem Boden)	227261	Grein
<b>V17</b>	<i>Printed Filtermat A</i> (Glasfaserfiltermatte), 90x120mm	1450-421	Perk
<b>V18</b>	Qualilab® <i>Syringe Filter</i> 0,22 µM steril (Sterilfilter)	5122110	Merck
<b>V19</b>	<i>Sample Bag</i> für MicroBeta™ Trilux (Plastiktüte für mit Szintillator dotierte Filtermatte)	1450-432	Perk
<b>V20</b>	Serologische Pipette 5 ml	861253001	Sar
<b>V21</b>	Serologische Pipette 10 ml	861254001	Sar
<b>V22</b>	Serologische Pipette 25ml	861685001	Sar
<b>V23</b>	Sterican® Einmalkanüle (0,9 x 70mm)	4665791	B.Braun
<b>V24</b>	<i>Storage Plate</i> , 384 Well „ <i>Source plate</i> “ (Vorratsplatte für Versuchsreagenzien)	3657	Corn
<b>V25</b>	<i>Storage Plate</i> , 96 Well, 1,2 ml (Versuchsansatzplatte)	12114172 AB-0564	Fisher
<b>V26</b>	Szintillationsgefäße aus Polypropylen 20ml	73.662.500	Sar



## 2 Materialien

<b>V27</b>	<i>Tissue Culture Flask, 75 cm<sup>2</sup></i> (Zellkulturflasche)	83.3911.002	Sar
<b>V28</b>	<i>Tissue Culture Plate, 6 well</i> (Zellkulturplatte)	83.1839.300	Sar
<b>V29</b>	Whatman™ Filter Unit 0,2 µM (Glasfasermatten für Filtrationsbindungsversuche)	10462200	GE
<b>V30</b>	Zellschaber 25cm, steril	83.1830	Sar
<b>V31</b>	200µl <i>Yellow, Bevelled Tip</i> (Pipettenspitzen)	S1111-1006	Starlab
<b>V32</b>	1000µl <i>Blue, Graduated Tip</i> (Pipettenspitzen)	S1111-2021	Starlab

## 2.2 Geräte und Apparaturen

<b>Kürzel</b>	<b>Gerät/Apparatur</b>	<b>Firma</b>
<b>G1</b>	390pH/Temp/mV/ISE Meter 511213	Beckm
<b>G2</b>	1450 Microbeta® Trilux <i>Liquid Scintillation &amp; Luminescence Counter</i>	Perk
<b>G3</b>	Absaugvorrichtung, achtarmig	FM
<b>G4</b>	AccuJet® (elektrische Pipettierhilfe)	Brand
<b>G5</b>	Analysenwaage AG204	Met
<b>G6</b>	Avanti® J-20 XP Zentrifuge, Rotortypen: JS 4.3, JS 5.3, JA 25.50	Beckm
<b>G7</b>	Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss
<b>G8</b>	Beckmann <i>Counter</i> LS6000 SC + 6500 SC (Flüssigkeits-Szintillationszähler)	Beckm

<b>G9</b>	CyBi® Selma Seriennummer 307001162002 (Halbautomatisches Pipettiergerät für 96 und 384 <i>well</i> Platten)	CyBio
<b>G10</b>	Dri-Block® DB-2A (Blockheizgerät)	Techne
<b>G11</b>	Eismaschine, AF 100 AS-E 23/50/1	Scot
<b>G12</b>	Elix® - Wasseraufbereitungssystem	Milli
<b>G13</b>	Epic® Biosensor, -Version (Quantifizierung intrazellulärer dynamischer Massenumverteilung)	Corn
<b>G14</b>	Epic® BT ALPHA 157700 Seriennummer 252787	Corn
<b>G15</b>	Eppendorf Pipette (0,1-1µl)	Epp
<b>G16</b>	Eppendorf Zentrifuge 5417C	Epp
<b>G17</b>	Etikettiergerät	Brady
<b>G18</b>	Finnpipette® 4500 fixed 50µl, fixed 1000µl, 0,2-2µl, 0,5-10µl, 5-50µl, 20-200µl, 200-1000µl, 1-5 ml	ThermoF
<b>G19</b>	Finnpipette® Novus elektronische Pipette	ThermoF
<b>G20</b>	Finnpipette Multistepper	ThermoF
<b>G21</b>	Gefrierschrank -80°C ULT	ThermoF
<b>G22</b>	Heraeus-Brutschrank, B6060	Kendro
<b>G23</b>	Herasafe-Werkbank HS 15, Klasse I	Hera
<b>G24</b>	Inkubator für CyBi Selma (G): IN 160	Mem

<b>G25</b>	Inkubator für EPIC BT ALPHA(G): IPP110	Mem
<b>G26</b>	Messkolben 100ml/ 500ml/ 1000ml/ 2000ml/ 5000ml	Hirsch
<b>G27</b>	Messzylinder 50ml/ 100ml/ 500ml/ 1000ml	Duran
<b>G28</b>	Mikrowelle NN-E205WEPG	Panas
<b>G29</b>	Milli-Q <sup>®</sup> Reinstwassersystem	Milli
<b>G30</b>	Mithras LB 960 Mikroplatten Luminometer	Berthold
<b>G31</b>	“ <i>Mr Frosty</i> ” 5100 Cryo 1°C Freezing Container	Nalge
<b>G32</b>	Neubauer Zählkammer	VWR
<b>G33</b>	Pipetus <sup>®</sup> -akku 9211305 (elektronische Pipettierhilfe)	Hirschm
<b>G34</b>	Plate Cassette für TriLux <sup>®</sup> (Zählrahmen für Szintillationsmessung)	Perk
<b>G35</b>	Polytron Homogenisator PT 10-35	Kinem
<b>G36</b>	Präzisionsküvetten 100-QS	Hellma
<b>G37</b>	Stickstofftank LS 750	TW
<b>G38</b>	Tomtec <sup>®</sup> Harvester 96 <sup>®</sup> Mach III (Produktnummer 963-589)	Tomt
<b>G39</b>	Tomtec <sup>®</sup> Harvester 96 <sup>®</sup> Mach III M (Produktnummer 990607010)	Tomt
<b>G40</b>	Trockenschrank UM500	Mem

<b>G41</b>	UV-Meter: Ultrospec 3300 pro	Bioch
<b>G42</b>	Vakuumpumpe RE16/1023-703Q-ER56X	Vac/Gast
<b>G43</b>	Variomag <sup>®</sup> Elektronikrührer/Monotherm Heizgerät	H+P
<b>G44</b>	Vortex Genie 2 <sup>®</sup> , G-560 E	Sci
<b>G45</b>	Waage AG204, B2002-S, PB1502-S, PB403-S	Met
<b>G46</b>	Wasserbad Julabo TW12, temperierbar	Julabo

### 2.3 Reagenzien und Chemikalien

<b>Kürzel</b>	<b>Reagenz</b>	<b>Artikelnummer</b>	<b>Firma</b>
<b>R1</b>	Aluminiumchlorid, 98%, wasserfrei, sublimiert	CN86.1	Carl Roth
<b>R2</b>	<i>Aqua destillata</i> (umkehrosmotisch hergestellt mittels einer Elix <sup>®</sup> -Wasseraufbereitungsanlage (G12))	-	Milli
<b>R3</b>	<i>Aqua pro analysi</i> (Herstellung durch Milli Q <sup>®</sup> -Reinstwassersystem (G29))	-	Milli
<b>R4</b>	Calciumchlorid	125747	Grüss
<b>R5</b>	Dimethylsulfoxid (DMSO)	472301	Sigma
<b>R6</b>	Dimethylsulfoxid, steril filtriert (DMSO)	D2438	Sigma
<b>R7</b>	DL-Dithiothreitol (DTT)	D0623	Sigma
<b>R8</b>	D(+)-Glukose-Monohydrat	X997.1	Roth

## 2 Materialien

<b>R9</b>	D-PBS ( <i>Dulbecco's phosphate buffered salt solution</i> ) ohne Magnesium und Calcium	P04-36500	PAN
<b>R10</b>	EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz; Na <sub>2</sub> EDTA; Maßlösung; 100 mM)	20271	Grüss
<b>R11</b>	Emulsifier Safe™ Szintillationscocktail	6013389	Perk
<b>R12</b>	Ethyldiaminotetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA-Natrium), Maßlösung 100 mM	20271	Grüss
<b>R13</b>	Fetales Kälberserum	F7524 P30-3702	Sigma PAN
<b>R14</b>	Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz	1.090.010.500	Merck
<b>R15</b>	Forskolin	F-6886	Sigma
<b>R16</b>	Geneticin® (G 418 Disulfat) (M = 692,8 g/mol)	A-1720	Sigma
<b>R17</b>	Guanosin-5-diphosphat-Natrium (GDP)	G7127	Sigma
<b>R18</b>	Guanosin-5-triphosphat-Natriumsalz (GTP)	G8877	Sigma
<b>R19</b>	<i>Hank's balanced salt solution</i> (HBSS) (1,26 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,4 mM MgSO <sub>4</sub> , 5,3 mM KCl, 0,44 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 4,2 mM NaHCO <sub>3</sub> , 137,9 mM NaCl, 0,34 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 5,56 mM Dextrose)	14025050	Invit
<b>R20</b>	HEPES, freie Säure	A10690250	AppliChem
<b>R21</b>	HEPES, Natriumsalz	A10400100	AppliChem
<b>R22</b>	HEPES, wässrige Puffer Lösung 1 M	15630-056	Invit
<b>R23</b>	HTRF®-cAMP dynamic 2-kit	62AM4PEC	Cisbio
<b>R24</b>	HTRF®-IP-One Tb -kit	62IPAPEX	Cisbio

<b>R25</b>	Humanes Serumalbumin	A1653	Sigma
<b>R26</b>	Hygromycin B in PBS, 50 mg/ml	10687-010	Invit
<b>R27</b>	3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	I5879	Sigma
<b>R28</b>	Isopropanol 100 %		ZVE
<b>R29</b>	Kaliumchlorid	6781.3	Roth
<b>R30</b>	Kaliumnatriumtartrat-Tetrahydrat	A0651,0250	AppliChem
<b>R31</b>	Kupfersulfat-Pentahydrat	A1034,0500	AppliChem
<b>R32</b>	L-Glutamin-Lösung 200mM (C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ; M = 146,15 g/mol)	G7513	Sigma
<b>R33</b>	Lipofectamine™ 2000 Reagent	11668-027	Invit
<b>R34</b>	Lithiumchlorid	62478	Sigma
<b>R35</b>	Magnesiumchlorid-Hexahydrat	31413	Riedel
<b>R36</b>	Magnesiumchlorid	KK36.1	Roth
<b>R37</b>	Natriumbutyrat 98 %+	A11079	Alfa Aesar
<b>R38</b>	Natriumcarbonat, wasserfrei	A3900,0500	AppliChem
<b>R39</b>	Natriumchlorid	1.06404.1000	Merck
<b>R40</b>	Natriumfluorid, 99,995 %	4503.1	Carl Roth

<b>R41</b>	Natronlauge 0,1 N	35263	Fluka
<b>R42</b>	Natronlauge 1 M	35256	Fluka
<b>R43</b>	N-Tris[Hydroxymethyl]methyl-glycine (Tricine)	T-0377	Sigma
<b>R44</b>	<i>Nutrient Mixture F-12</i>	N4888	Sigma
<b>R45</b>	Penicillin-Streptomycin-Lösung (Penicillin 10000 U/ml; Streptomycin 10 mg/ml)	P0781	Sigma
<b>R46</b>	Polyethylenimin-Lösung 50 % in Wasser (m/v) (PEI)	P3143	Fluka
<b>R47</b>	ThermoClean Blau (Stabilisationskonzentrat für Wasserbäder und Brutschränke)	002522-0100	Bioanalytic
<b>R48</b>	Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin vom Schwein und 0,2 g/l Natrium-EDTA)	T3924	Sigma
<b>R49</b>	Wasser, BioScience-Grade, nuklease-frei und autoklaviert 18,02 g/mol	T143	Roth

## 2.4 Lösungen

### L1 Albumin-Lösung 2mg/ml

Humanes Serumalbumin (R25) wird je nach dem gewünschtem Gesamtvolumen in HEPES-Puffer (L9) gelöst.

### L2 Aluminiumchlorid-Lösung 2,4 mM in Inkubationspuffer für IP-1-Messungen (L17)

0,00032 g Aluminiumchlorid (R1) wird in Inkubationspuffer für IP-1 Messungen (L17) zu 1 ml gelöst.

### L3 Aluminiumchlorid-Lösung 1,2 mM in Inkubationspuffer für IP-1-Messungen (L17)

Aluminiumchlorid-Lösung 2,4 mM (L2) und Natriumfluoridlösung 80 mM (L19) werden im Verhältnis 1:1 gemischt.

**L4 Arbeitslösung für die Proteinbestimmung nach Lowry**

2%ige Natriumcarbonat-Lösung (R38) wird in 0,1 N Natronlauge (R41) mit einer 2%igen Kaliumnatriumtartrat-Lösung (R30 und R2) und einer 1%igen Kupfersulfat-Lsg (R31 und R2) in einem Verhältnis von 100:1:1 gemischt.

**L5 Folin-Ciocalteu`s Phenolreagenz**

Ein Teil Folin-Ciocalteu`s Phenolreagenz (R14) wird mit drei Teilen *Aqua destillata* (R2) verdünnt.

**L6 Forskolin-Stammlösung (40 mM)**

In einem variablen Ansatzvolumen wird eine 40 mM Lösung von Forskolin (R15) in DMSO (R5) hergestellt.

**L7 GDP-Stammlösung 10 mM**

Guanosin-5'-diphosphat-Natrium (R17) wird in *Aqua destillata* (R2) gelöst. Die Lagerung erfolgt als Aliquots bei -20 °C.

**L8 [<sup>35</sup>S]GTP S-Lagerungspuffer**

Tricine (R43) und DDT (R7) werden in einer Endkonzentration von 10 mM in *Aqua destillata* (R2) gelöst. Der pH-Wert wird überprüft (G1) und gegebenenfalls mit NaOH, 1 M (R42) auf 7,4 eingestellt.

**L9 HEPES-Puffer (12,5 mM)**

1,085 g HEPES Natriumsalz (R21), 1,986 g HEPES-Säure (R20), 2,541 g Magnesiumchlorid-Hexahydrat (R35) und 7,305 g Natriumchlorid (R39) werden zu 1000 ml in *Aqua destillata* (R2) gelöst. Der pH-Wert wird überprüft (G1) und gegebenenfalls mit NaOH, 1 M (R42) auf 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgt bei 2-8 °C.

**L10 HEPES-Stammlösung (200 mM)**

17,35 g HEPES-Natriumsalz (R21) und 31,77 g HEPES-Säure (R20) werden zu 1000 ml in *Aqua destillata* (R2) gelöst. Der pH-Wert wird überprüft (G1) und gegebenenfalls mit NaOH, 1 M (R42) auf 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgt bei 2-8 °C.

**L11 Homogenisationspuffer**

50 ml HEPES-Stammlsg. 200 mM (L10) und 0,5 ml Natrium-EDTS-Lsg. 100 mM (R10) werden mit *Aqua destillata* (R2) zu 500 ml ergänzt. Die Lagerung des Puffers erfolgt bei 2-8 °C.



**L12 IBMX-Stamm-Lösung (1 M)**

IBMX (R27) wird in DMSO (R5) gelöst und bei -20 °C gelagert.

**L13 Inkubationspuffer für cAMP-Messungen**

IBMX-Stammlösung (L12) wird zu einer Endkonzentration von 1 mM in Inkubationspuffer für DMR-Messungen (L14) gelöst. Der Puffer wird an jedem Versuchstag frisch hergestellt.

**L14 Inkubationspuffer für DMR-Messungen**

490 ml *Hank's balanced salt solution* (R19) wird mit 10 ml 1M HEPES-Lösung (R22) versetzt, sodass eine Endkonzentration von 20 mM HEPES entsteht. Der pH Wert des Epic<sup>®</sup>-Puffers lag bei 7,0. Die Lagerung erfolgte bei 2-8 °C.

**L15 Inkubationspuffer für DMR-Messungen + 1,3 %/ 1,4 % DMSO**

Da viele Testsubstanzen auf Grund ihrer schlechten Löslichkeit in ihrer niedrigsten Verdünnungsstufe (d.h. der höchsten eingesetzten Konzentration) einen Restgehalt von noch 1,3% DMSO enthielten, wurde dem Inkubationspuffer für DMR-Messungen 1,3% DMSO als Lösungsmittel zugesetzt und war in allen hergestellten Verdünnungsreihen anwesend. Die Vorbehandlung und das Waschen der Zellen mit diesem Inkubationspuffer für DMR-Messungen + 1,4 % diente der Vermeidung möglicher DMSO-Signalartefakte. Beide Puffer wurden stets frisch hergestellt. Dazu wurde dem Puffer (L14) die entsprechende Menge DMSO (R5) zugesetzt.

**L16 Inkubationspuffer für IP1 Messungen (Stimulationspuffer: „*Stimulation buffer 5x*“)**

0,4338 g HEPES-Natriumsalz (R21), 0,7944 g HEPES-Säure (R20), 0,0555 g Calciumchlorid (R4), 0,0238 g Magnesiumchlorid (R36), 0,1566 g Kaliumchlorid (R29), 4,2661 g Natriumchlorid (R39), 0,4954 g Glukose (R8) und 1,060 g Lithiumchlorid (R34) wurden zu 100ml in *Aqua destillata* (R2) gelöst. Der pH-Wert wird überprüft (G1) und gegebenenfalls mit NaOH, 1 M (R42) auf 7,4 eingestellt. Die Lagerung erfolgt bei 2-8 °C.

**L17 Inkubationspuffer für IP1 Messungen (Stimulationspuffer: „*Stimulation buffer 1x*“)**

Inkubationspuffer für IP-1 Messungen (*Stimulation buffer 5x*) (L16) wird 1:5 mit *Aqua pro analysi* (R3) verdünnt. Der Puffer wird an jedem Versuchstag frisch hergestellt.

**L18 Natriumbutyrat-Stammlösung (100 mM)**

Zur Herstellung der Stammlösung wird Natriumbutyrat (R37) in *Aqua pro analysi* (R3) gelöst. Die Lösung wird bei 2-8 °C gelagert.

**L19 Natriumfluorid-Lösung 80 mM für IP-1-Messungen in Stimulationspuffer (1x)**

3,36 mg Natriumfluorid (R40) werden im Inkubationspuffer IP-1-Messungen (L17) gelöst.

**L20 Polyethylenimin (PEI)-Stammlösung 1 %**

9,96 g PEI-Lösung 50 % (R46) werden zu 500 ml in *Aqua destillata* (R2) gelöst. Die Lagerung der Lösung erfolgt bei 2-8 °C.

**L21 Polyethylenimin (PEI)-Stammlösung 0,1 %**

Zur Herstellung von 500 ml werden 50 ml der PEI-Stammlösung 1 % (L20) ad 500 ml mit *Aqua destillata* (R2) ergänzt. Die Lagerung der Lösung erfolgt bei 2-8 °C.

**L22 Zentrifugationspuffer**

50 ml HEPES-Stammlsg. 200mM (L10) und 0,5 ml Natrium-EDTS-Lsg. 100 mM (R10) werden mit *Aqua destillata* (R2) zu 500 ml ergänzt. Die Lagerung des Puffers erfolgt bei 2-8 °C.

**2.5 Toxine**

Kürzel	Toxin	Artikelnummer	Herkunft
T1	Pertussistoxin (PTX)	BP0372	Biotrend
T2	MH/QiC/FR		MH-362-63-08 Zur Verfügung gestellt durch den Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. E. Kostenis (Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn). Für weitere Informationen vgl. (Nesterov et al. 2010; Schrage et al. 2015)

### 2.6 Zellen

#### 2.6.1 Zelllinien

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie, handelt es sich um chinesische Hamster Ovarian-Zellen (CHO-Zellen). Diese, durch eine unbegrenzte Lebensdauer charakterisierte Zelllinie, wurde bei der Biopsie von Ovarien eines erwachsenen chinesischen Hamsters *Cricetulus griseus* im Jahre 1957 von T. T. Puck isoliert. Da bekannt ist, dass diese Zelllinie nachweislich keinen der fünf Muskarinrezeptor-Subtypen (Lazareno und Birdsall 1995; Eckstein, Dissertationsschrift 2004) exprimiert, eignet sie sich hervorragend für die konstante und stabile Expression dieser Rezeptoren. Ein weiterer enormer Vorteil dieses Modellorganismus ist zudem, dass CHO-Zellen endogen keine Cholinesterasen exprimieren (Lazareno et al. 1993; Lazareno und Birdsall 1995). Dies ermöglicht es, den endogenen Neurotransmitter Acetylcholin zu verwenden ohne seinen enzymatischen Abbau befürchten zu müssen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression der Rezeptorsubtypen im Vergleich zu endogenen Rezeptorproteinen vergleichbare Tertiärstrukturen sowie posttranslationale Modifikationen aufweisen. Das Wachstum ist in einem weiten Temperaturbereich möglich (28 - 40 °C), die optimale Temperatur liegt jedoch bei 36 - 38 °C. Unter diesen optimalen Wachstumsbedingungen dauert der Zellzyklus der CHO-Zellen etwa 14 Stunden. Nach Bildung eines aus einer einzelnen Zellschicht bestehenden konfluenten Zellrasens, der auch als „*Monolayer*“ bezeichnet wird, stellen die Zellen auf Grund von Kontaktinhibition ein übereinander wachsen ein. Mitotische Zellen runden sich ab, haften nur locker an der Unterlage und sind gut von den spindelförmigen Interphase-Zellen zu unterscheiden. Nach ungefähr 40-50 Passagen wurden die Zellen abgesaugt und durch neue, frisch aufgetaute Zellen ersetzt. CHO-Zellen sind sehr widerstandsfähig und überstehen die Kulturbedingungen, ohne Schaden zu nehmen.

#### 2.6.2 Expressionssysteme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Rezeptorproteine sind durch die Expression in unterschiedlichen Plasmidvektoren gekennzeichnet und sollen im Weiteren kurz erörtert werden.

##### 2.6.2.1 Expression im pcDNA3.1 Vektorsystem

Bei einem Großteil der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren lagen die cDNAs im pcDNA3.1 Vektor vor. Diese Vektoren enthalten ein „neo“-Reportergen als dominanten Selektionsmarker, welches für eine Aminoglykosid-Phosphotransferase kodiert. Dieses Enzym überträgt eine Phosphatgruppe auf Aminoglykoside, wie beispielsweise Neomycin oder auch das Neomycinanalogon Genticin (G418), woraufhin es zu einer Inaktivierung des Aminoglykosides

kommt. Durch diese Vorgehensweise kann G418 als positiver Selektionsmarker verwendet werden, der für ein Überleben der transfizierten Zellen sorgt. Ist die Zelle in der Lage die Aminoglykosid-Phosphotransferase zu exprimieren, kommt es durch Phosphorylierung zu einer Inaktivierung des G418, wodurch dieses nicht mehr in der Lage ist, die Proteinsynthese in Säugerzellen zu blockieren (Koch-Brandt, 1993).

Zellen, die den zu untersuchenden Rezeptor in diesem Expressionssystem exprimierten, sollen im Folgenden CHO-M<sub>1</sub>-wt oder CHO-M<sub>2</sub>-wt genannt werden.

### 2.6.2.2 Expression im FlpIn<sup>TM</sup>-System

Eine weitere Möglichkeit der stabilen Transfektion stellt das Flp-In<sup>TM</sup>-System dar. Ein wesentlicher Vorteil dieses Systems, liegt in der Möglichkeit einer spezifischen Integration eines Vektors in einen transkriptionell aktiven Genomlocus der Wirtszelle von Säugern. Im Gegensatz zu dem in 2.6.2.1 beschriebenen Expressionssystem besteht das Flp-In<sup>TM</sup>-System aus drei verschiedenen Vektoren, bzw. Plasmiden:

#### 1.) pFRT/lacZeocin-Vektor:

Dieser Vektor dient zur Generierung der Wirtszelllinie, in diesem Fall der CHO-Zelllinie. Er verfügt über eine sogenannte FRT-Schnittstelle (FRT = *Flp Recombination Target*, ursprünglich aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert) an die die Rekombinase, welche die genetische Rekombination katalysiert, binden kann. Des Weiteren enthält der Vektor ein lacZ-Zeocin<sup>TM</sup> Gen, welches über einen SV40 (Simian-Virus 40) Promotor gesteuert wird und der Selektionierung der Wirtszelllinie dient. Der Einbau dieses pFRT/lacZeocin-Vektors in das Genom der CHO-Zelle geschieht zufällig.

#### 2.) Flp-Rekombinase-Expressionsvektor pOG44 (pOG44-Plasmid)

Bei einer Ko-Transfektion mit diesem Vektor kommt es auf Grund der konstitutiven Aktivität des pOG44-Plasmids zur gleichzeitigen Expression der Flp-Rekombinase. Bindet die Flp-Rekombinase an die FRT-Bindungsstellen kommt es zu einer homologen Rekombination, woraufhin das pcDNA5/FRT-Konstrukt, welches die DNA des gewünschten Rezeptors beinhaltet, in das Wirtszellgenom eingebaut wird (O'Gorman et al. 1991).

#### 3.) pcDNA5/FRT

Dieser Vektor besitzt neben einem CMV-Promotor ein Hygromycin-Resistenz-Gen, über welches nach erfolgreicher Transfektion die Selektionierung erfolgen kann. Durch die Integration in die FRT-Erkennungsstelle wird ein ATG-Startcodon für die Hygromycin-Resistenz generiert. Zeitgleich kommt es zur Inaktivierung des lacZ-Zeocin-Gens, was somit zu einem Verlust der Zeocin-Resistenz führt.

Zellen, die in diesem Expressionssystem exprimiert werden, werden im Rahmen dieser Arbeit CHO-Flp-M<sub>1</sub> genannt.

Alle Zellen, ihre verwendeten Nährmedien sowie deren Herkunft sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen wurden dankenswerterweise von Herrn Prof. Dr. G. Lambrecht (Abteilung Pharmakologie, Biozentrum Niederursel, Universität Frankfurt/Main) zur Verfügung gestellt. Die CHO-Flp-M<sub>1</sub>-wt-Zellen sowie die vier mit unterschiedlichen Punktmutationen des M<sub>1</sub>-Rezeptors stabil transfizierten Zelllinien, waren eine freundliche Überlassung von Herrn Prof. Dr. Arthur Christopoulos (Monash-Universität, Australien).

Zelllinie	Zellmedium	Herkunft
CHO- <i>hM</i> <sub>1</sub> - <i>hM</i> <sub>5</sub> -wt	N1	Prof. Dr. G. Lambrecht (Abteilung Pharmakologie, Biozentrum Niederursel, Universität Frankfurt/Main)
CHO-Flp- <i>hM</i> <sub>1</sub> -wt	N2	Prof. Dr. A. Christopoulos (Monash-Universität, Australien).
CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>106</sup> Tyr Ala	N2	Prof. Dr. A. Christopoulos (Monash-Universität, Australien).
CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	N2	Prof. Dr. A. Christopoulos (Monash-Universität, Australien).
CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	N2	Prof. Dr. A. Christopoulos (Monash-Universität, Australien).
CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	N2	Prof. Dr. A. Christopoulos (Monash-Universität, Australien).

Tabelle 2. 1: Übersicht über die für die unterschiedlichen CHO-Zellen verwendeten Nährmedien sowie die Herkunft der verwendeten Zellen.

## 2.7 Nährmedien

Die Herstellung aller im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Nährmedien fand unter aseptischen Bedingungen unter einer Laminar-Airflow-Bank (G23) statt. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 2-8 °C.

Kürzel	Komponente	Volumen (ml)
N1	Nutrient Mixture F-12 Ham (R44)	500
	Fetales Kälberserum (R13)	50
	L-Glutamin-Lösung 200 mM (R32)	3

	Penicillin-Streptomycin-Lsg. (R45)	<b>5</b>
	G418 (R16)	<b>1</b>
<b>N2</b>	<i>Nutrient Mixture</i> F-12 Ham (R44)	<b>500</b>
	Fetales Kälberserum (R13)	<b>50</b>
	L-Glutamin-Lösung 200 mM (R32)	<b>6</b>
	Penicillin-Streptomycin-Lsg. (R45)	<b>5</b>
<b>N3</b>	Natriumbutyrat-Stammlösung (L18) steril filtriert	
	Zelllinien spezifisches Nährmedium (N1, N2)	

## 2.8 Computerprogramme

	<b>Bezeichnung</b>		<b>Hersteller</b>
<b>P1</b>	Citavi 5	Literaturverwaltung	Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, CAN
<b>P2</b>	Epic Imager	Datenerfassung und -management bei der Versuchsdurchführung mit dem Epic System™	
<b>P3</b>	GraphPad Prism 5.03 for Windows	Analyse und graphische Darstellung der Bindungs- und Funktionsdaten	GraphPad Software®, San Diego, Kalifornien, USA, <a href="http://www.graphpad.com">www.graphpad.com</a>
<b>P4</b>	Microsoft Excel 2010	Tabellarische Darstellung und Analyse der Ergebnisse	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
<b>P5</b>	Microsoft Excel Makro "Microplate Analyzer v2.0"	Datenerfassung und -management bei der Versuchsdurchführung mit dem Epic System™	Corning, New York, USA
<b>P6</b>	Microsoft Powerpoint 2010	Präsentation der Ergebnisse	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
<b>P7</b>	Microsoft Word 2010	Textverarbeitung, Publikationserstellung	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
<b>P8</b>	MicroWin 4.37	Datenerfassung bei IP1-/cAMP-Akkumulationsexperimenten	Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, GER

## 2.9 Datenbanken

	Bezeichnung	Herausgeber
<b>D1</b>	IUPHAR (muskarinische Acetylcholin Rezeptoren)	N.J.M.Birdsall, D.A. Brown, N.J. Buckley, A. Christopoulos, R.M. Eglén, F. Ehlert, C.C.Felder, R.Hammer, H.J. Kilbinger, G.Lambrecht, C.Langmesd, F. Mitchelson, E.Mutschler, N.M. Nathanson, R.D. Schwarz, A.B.Tobin, J.Wess
<b>D2</b>	Pubmed	U.S: National Library of Medicine
<b>D3</b>	Rote Liste (Onlineversion, Stand August 2016)	Rote Liste <sup>®</sup> Service GmbH; Frankfurt a.M., Deutschland
<b>D4</b>	UniProtKB/SwissProt	European Informatics Institute, Cambridge, UK; SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Genf, Schweiz; Protein Information Resource, Washington D.C.,USA

## 2.10 Bezugsquellen

Alfa Aesar	Alfa Aesar GmbH+CoKG, Karlsruhe, Deutschland
AppliChem	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Axyg	Axygen scientific, California, USA
B.Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Beckm	Beckmann Instruments, Palo Alto, USA
Bemis	Bemis,Flexible Packaging, Neenah,WI 54965,USA
Berthold	Berthold Technologies GmbH+Co KG, Bad Wildbad, Deutschland

Bioanalytic	Bioanalytic GmbH, Umkirch/Freiburg, Deutschland
Bioch	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
Biotrend	Biotrend Chemicals AG, Wangen, Zürich
Brady	Brady Corporation, Milwaukee, USA
Brand	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Carl Roth	Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Cisbio	Cisbio Bioassays, Codolet, FRA
Corn	Corning Incorporated, New York, USA
CyBio	CyBio AG, Jena, Deutschland
Duran	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Epp	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fisher	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Fluka	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz; seit 2005 Vertrieb der Chemikalien durch Sigma-Aldrich
FM	Feinmechanische Werkstatt der Universität, Bonn, Deutschland
Gast	Gast Manufacturing Inc., Benton Harbor, USA
GE	GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK
Greiner	Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland
Grüss	Grüssing Diagnostika Analytika, Filsum, Deutschland
Hellma	Hellma GmbH+Co KG, Mühlheim, Deutschland
Hera	Heraeus, Hilden, Deutschland
Hirschm	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG, Eberstadt, Deutschland
H+P	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland



Invit	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Inviv	InvivoGen, San Diego, USA
Julabo	Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland
Kendro	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Kinem	Kinematica AG, Littau, Schweiz
Mem	Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland
Merck	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Met	Mettler-Toledo AG, Gießen, Deutschland
Milli	Millipore GmbH, Schwabach, Deutschland
Nalge	Nalgene Nunc International, Rochester, USA
PAN	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Panas	Panasonic Manufacturing U.K. Ltd., Cardiff, UK
Perk	Perkin Elmer Life Science GmbH, Rodgau-Jügesheim, GER
REWE	REWE-Markt, Köln, Deutschland
Riedel	Riedel-de-Haën, seit 2008 Vertrieb der Chemikalien unter Sigma-Aldrich
Roth	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Sar	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht, Deutschland
Sci	Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA
Scot	Scotsman Ice-Systems, Bettolino di Pogliano, Mailand, Italien
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Starlab	STARLAB GmbH, Hamburg, Deutschland
Techne	Techne AG, Jahnsdorf, Deutschland
ThermoF	Thermo Forma Scientific, Marietta, USA

Tomt	TOMTEC Inc., Hamden, USA
TW	Taylor Wharton Harsco GmbH, Husum, Deutschland
Vac	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
VWR	VWR International, Langenfeld, Deutschland
Zeiss	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
ZVE	Zentrale Chemikalienversorgung Endenich der Universität, Bonn, Deutschland

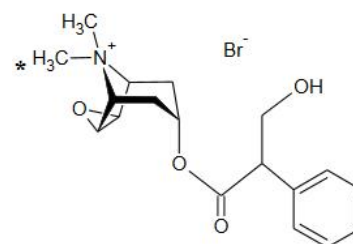
## 2.11 Substanzen

Im Folgenden werden die zur Erstellung dieser Dissertation eingesetzten Substanzen aufgeführt und kurz erläutert. Die verwendeten Substanzen konnten entweder käuflich erworben werden oder wurden im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. U. Holzgrabe (AK Holzgrabe) oder Herr Prof. Dr. M. Decker (AK Decker) im Pharmazeutischen Institut der Universität Würzburg synthetisiert und freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

### 2.11.1 Radioliganden

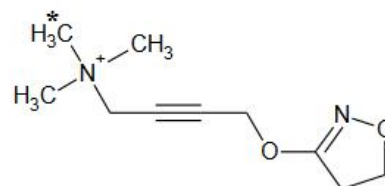
#### [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin ([<sup>3</sup>H]NMS)

Molekulargewicht:	398,39 g/mol
Hersteller:	Perkin Elmer
Artikelnummer:	NET636001MC
* :	Position der radioaktiven Markierung



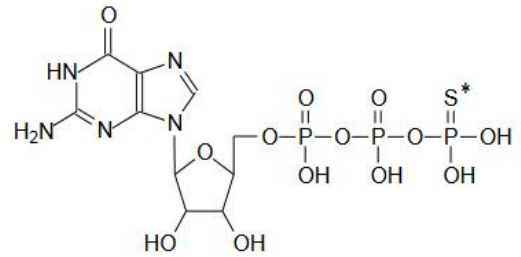
#### [<sup>3</sup>H]Iperoxo

Molekulargewicht:	398,3 g/mol
Hersteller:	Perkin Elmer
Artikelnummer:	100226
*:	Position der radioaktiven Markierung



$^{35}\text{S}$ GTP S

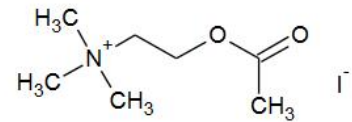
Molekulargewicht: 539,2 g/mol  
 Hersteller: PerkinElmer  
 Artikelnummer: NEG030H250UC  
 \*: Position der radioaktiven Markierung



**2.11.2 Orthosterische Agonisten**

Acetylcholin-Iodid

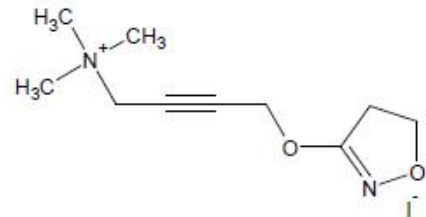
Molekulargewicht: 273,11 g/mol  
 Hersteller: Sigma  
 Artikel-Nummer: A 7000



Iperoxo-Iodid

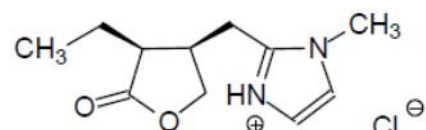
Molekulargewicht: 324,16 g/mol

Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg) und Prof. Dr. Marco De Amici (Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi di Milano, Italien).



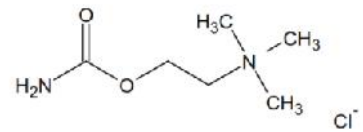
Pilocarpin-Hydrochlorid

Molekulargewicht: 244,7 g/mol  
 Hersteller: Sigma  
 Artikel-Nummer: P6503



Carbachol:

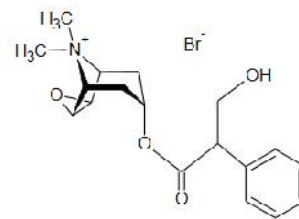
Molekulargewicht: 182,65 g/mol  
 Hersteller: Sigma  
 Artikel-Nummer: C4382-1G



**2.11.3 Orthosterische Antagonisten/ Inverse Agonisten**

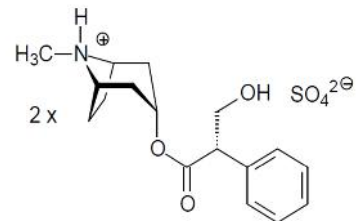
N-Methylscopolaminbromid (NMS)

Molekulargewicht: 398,3 g/mol  
 Hersteller: Sigma  
 Artikel-Nummer: S8502



Atropin-Sulfat

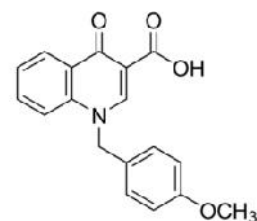
Molekulargewicht: 676,8 g/mol  
 Lieferant: Sigma  
 Artikel-Nummer: A 0257

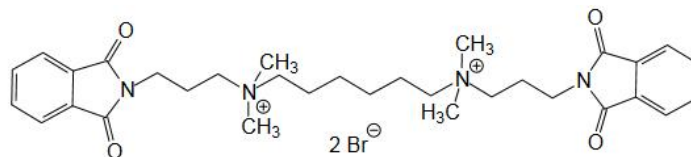


**2.11.4 Allosterische Modulatoren**

BQCA (1(4-Methoxybenzyl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid)

Molekulargewicht: 309,32 g/mol  
 Lieferant: Sigma  
 Artikel-Nummer: 338747-41-4



W84 (Hexamethylen-bis-[dimethyl-(3-phthalimidopropyl)ammonium]dibromid

Molekulargewicht: 708,5 g/mol

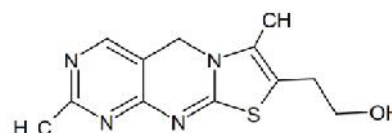
Lieferant: Dr. Pfeffer, Universität Kiel, Deutschland

Thiochrome

Molekulargewicht: 262,33 g/mol

Lieferant: Sigma

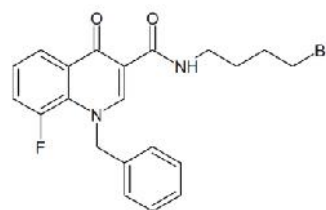
Artikel-Nummer: T7891

**2.11.5 Testsubstanzen**

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Testsubstanzen handelt es sich um potentiell dualsterische Hybride, die durch einen orthosterischen und einen allosterischen Molekülbaustein charakterisiert sind. Beide Hybridteile sind jeweils über eine unterschiedlich lange Alkylkette miteinander verbunden.

**Substanzserie 1:**

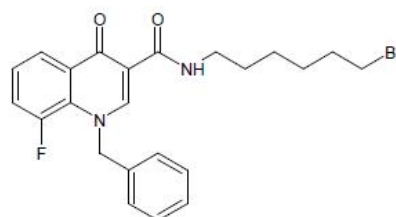
Bei Substanzen der Substanzserie 1 handelt es sich um dualsterische Hybride sowie deren allosterische Fragmente, die von der Chemikerin Frau Dr. Jessica Klöckner (JK) und Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe synthetisiert und freundlicherweise für die Untersuchungen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Bei dem für Hybride dieser Substanzserie verwendeten orthosterischen Baustein handelt es sich um den Vollagonisten Iperoxo (vgl. 2.11.2). Die allosterischen Bausteine sind Derivate, abgeleitet von dem bekannten hoch  $M_1$ -selektiven, positiven allosterischen Modulator BQCA (1-(4methoxybenzyl)-4-oxo-1,4-dihydroquinoline-3-carboxylic acid)(Ma et al. 2009; Shirey et al. 2009)(vgl. 2.11.4), einem Förderer der Bindung und Wirkung von Acetylcholin (Shirey et al. 2009) und Carbachol (Canals et al. 2012) (vgl. 2.11.4) und verfügen über unterschiedlich lange Zwischenketten ( $C_4$  oder  $C_6$ ).

**Allosterische Fragmente der Substanzserie 1****JK 533**

Molekulargewicht: 431,30 g/mol

Löslichkeit: DMSO

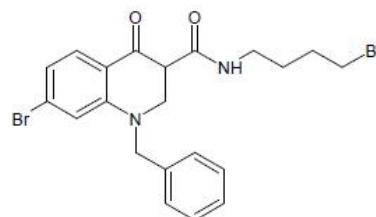
Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrave (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**JK 532**

Molekulargewicht: 459,35 g/mol

Löslichkeit: DMSO

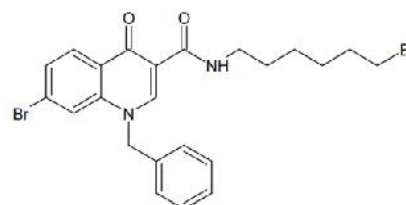
Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrave (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**JK 544**

Molekulargewicht: 492,20 g/mol

Löslichkeit: DMSO

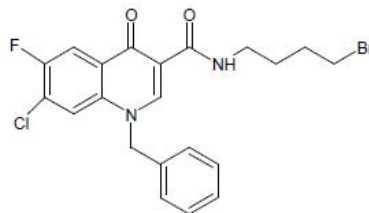
Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrave (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**JK 469**

Molekulargewicht: 520,26 g/mol

Löslichkeit: DMSO

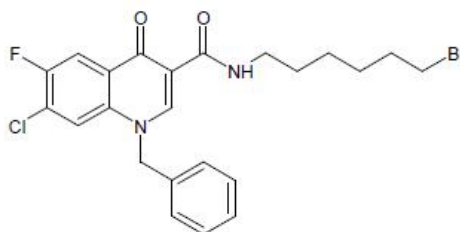
Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrave (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**JK 569**

Molekulargewicht: 465,74 g/mol

Löslichkeit: DMSO

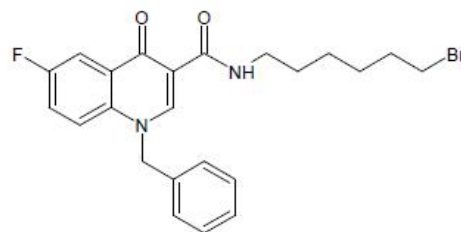
Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrave (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**JK 551**

Molekulargewicht: 493,80 g/mol

Löslichkeit: DMSO

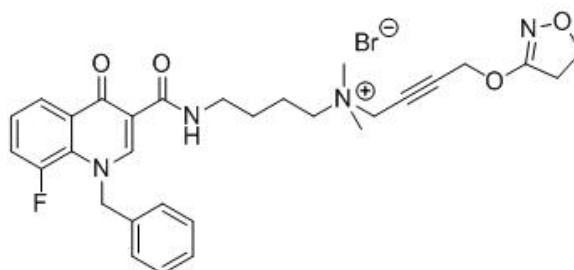
Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrave (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**JK 372-1**

Molekulargewicht: 459,35 g/mol

Löslichkeit: DMSO

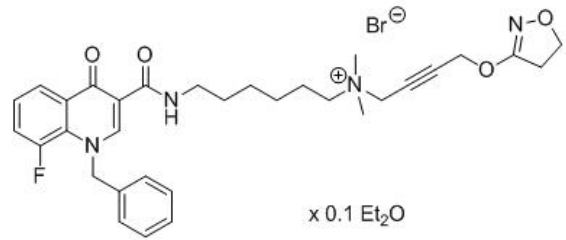
Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrave (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**Dualsterische Hybridliganden aus Substanzserie 1****JK 550**

Molekulargewicht: 613,52 g/mol

Löslichkeit: DMSO

Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrave (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**JK 537**

Molekulargewicht:

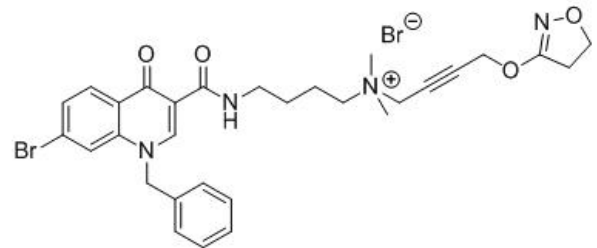
641,57 g/mol (+7,41 g/mol)

Löslichkeit:

DMSO

Synthese:

Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrave (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**JK 549**

Molekulargewicht:

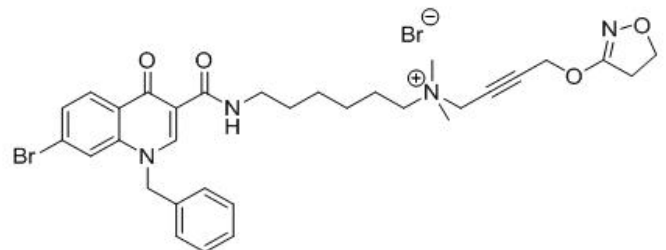
674,42 g/mol

Löslichkeit:

DMSO

Synthese:

Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrave (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**JK 491**

Molekulargewicht:

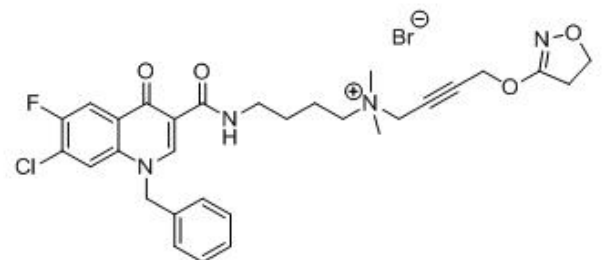
702,48 g/mol

Löslichkeit:

DMSO

Synthese:

Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrave (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**JK 596**

Molekulargewicht:

647,96 g/mol

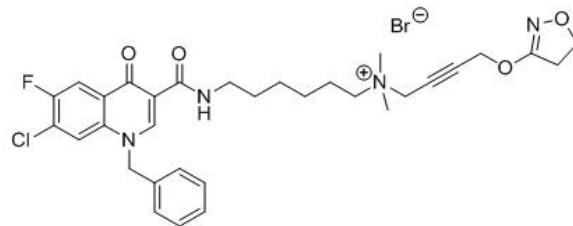
Löslichkeit:

DMSO

Synthese:

Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrave (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

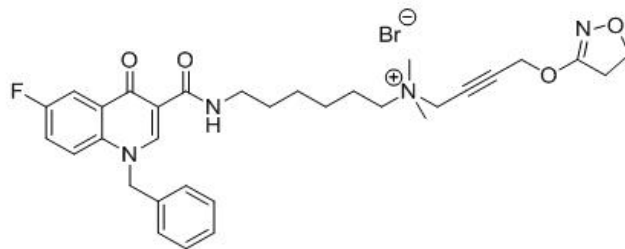


**JK 559**

Molekulargewicht: 676,02 g/mol

Löslichkeit: DMSO

Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**JK 384**

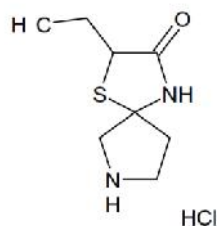
Molekulargewicht: 641,57 g/mol

Löslichkeit: DMSO

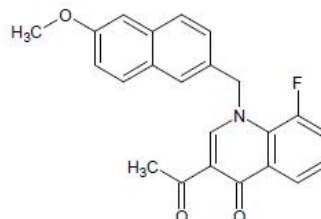
Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**Substanzserie 2:**

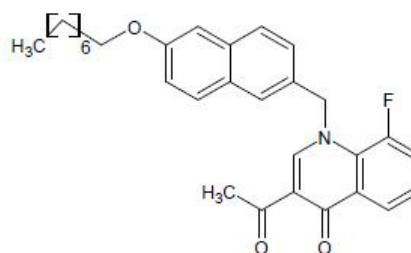
Bei Substanzen der Substanzserie 2 handelt es sich um dualsterische Hybride sowie deren allosterischen Fragmente, die von Herrn Xinyu Chen und Prof. Dr. Michael Decker synthetisiert und freundlicherweise für die Untersuchungen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt wurden. Der orthosterische Baustein dieser Substanzserie ist AF292 (US Patent: US7049321). Diese Substanz leitet sich von dem bereits im Kontext von Morbus Alzheimer untersuchten M<sub>1</sub>-Agonisten AF267B ab (Fisher et al. 2002). Die allosterischen Bausteine sind ebenfalls Derivate, abgeleitet von dem hoch M<sub>1</sub>-selektiven positiven allosterischen Modulators BQCA (vgl. 2.11.4) (Ma et al. 2009; Shirey et al. 2009). Sie verfügen über unterschiedlich lange Alkylketten (C<sub>3</sub> oder C<sub>8</sub>).

**Orthosterischer Baustein der Substanzserie 2****AF 292**

Molekulargewicht:	236,76 g/mol
Löslichkeit:	DMSO
Synthese:	Arbeitskreis Prof. Dr. Michael Decker (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**Allosterische Fragmente der Substanzserie 2****UR-MD-5**

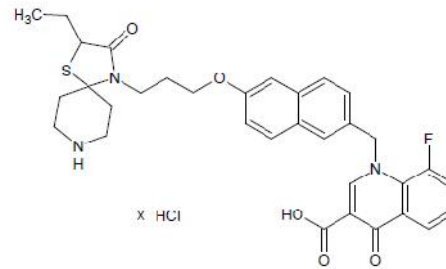
Molekulargewicht:	377,37g/mol
Löslichkeit:	DMSO
Synthese:	Arbeitskreis Prof. Dr. Michael Decker (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**UR-MD-6**

Molekulargewicht:	475,55g/mol
Löslichkeit:	DMSO
Synthese:	Arbeitskreis Prof. Dr. Michael Decker (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**Dualsterische Hybridliganden der Substanzserie 2**

**UR-MD-13**

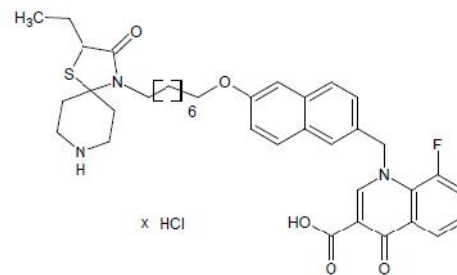


Molekulargewicht: 640,16g/mol

Löslichkeit: DMSO

Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. Michael Decker (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**UR-MD-14**



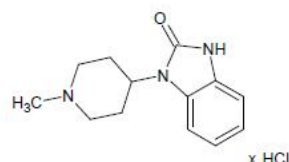
Molekulargewicht: 710,30g/mol

Löslichkeit: DMSO

Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. Michael Decker (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**Substanzserie 3**

Bei Substanzen der Substanzserie 3, handelt es sich um allosterische Bausteine, die sich von dem selektiven Agonisten TBPB (1-(1-(2-Methylbenzyl)-1,4-bipiperidin-4-yl)-1H-benzo[d]imidazol-2(3H)-one) (Jones et al. 2008) ableiten. Bei TBPB handelt es sich um einen bitopischen Liganden, der nachweislich sowohl mit der orthosterischen als auch mit der allosterischen Bindungsstelle interagiert (Keov et al. 2013). Die Derivate wurden ebenfalls von Herrn Xinyu Chen und Prof. Dr. Michael Decker synthetisiert.

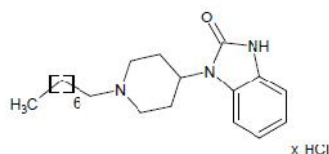
**Allosterische Fragmente der Substanzserie 3****UR-MD-1**

Molekulargewicht: 267,75g/mol

231,29g/mol

Löslichkeit: DMSO

Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. Michael Decker (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

**UR-MD-2**

Molekulargewicht: 365,94g/mol

Löslichkeit: DMSO

Synthese: Arbeitskreis Prof. Dr. Michael Decker (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Würzburg)

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Arbeiten

Die Kultivierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen, erfolgte bei aseptischen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom (G23). Alle für diese Arbeit benötigten Geräte sowie Verbrauchsmaterialien wurden vor dem Einbringen in die Sicherheitswerkbank mit Isopropanol 70 % desinfiziert. Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, EppendorfgeläÙe, Pasteurpipetten sowie Flaschen aus Glas wurden vor der Verwendung unter der Werkbank autoklaviert.

Die Kultivierung der adhärent wachsenden CHO-Zellen erfolgte entweder in sterilen Zellkulturschalen (V3, V4) oder in T75 Zellkulturflaschen (V27) in einem Brutschrank (G22) bei 37 °C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 96 %. Die entsprechenden Zelllinien sowie die verwendeten Nährmedien sind in Kapitel 2.7 aufgeführt.

#### 3.1.1 Kultivierung von Zellen

Je nach Konfluenz (ca. 80-100 %) wurden die Zellen alle zwei bis drei Tage passagiert. Die für diesen Vorgang benötigten Puffer und Medien wurden vor der Benutzung im Wasserbad (G46) auf eine Temperatur von 37°C erwärmt. Die Trypsin-EDTA-Lösung (R48) wurde durch vorzeitiges Entnehmen aus dem Kühlschrank lediglich auf Raumtemperatur erwärmt. Als erster Schritt wurde das alte Kulturmedium vorsichtig abgesaugt und der Zellrasen zweimal mit 10 ml PBS-Puffer (R9) gewaschen. Die Waschschritte dienten dazu, Reste des verbrauchten Mediums, Zelltrümmer und abgestorbene Zellen zu entfernen. Im Anschluss wurden 3 ml Trypsin-EDTA-Lsg. (R48) gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt und ca. drei Minuten bei 37°C inkubiert. Auf Grund des in der Trypsin-Lösung enthaltenen Komplexbildners Ethylen-Diamino-Tetraessigsäure (EDTA), wird sowohl der durch zweiwertige Kationen vermittelt Kontakt der Zellen untereinander, als auch der Kontakt der Zellen mit der Oberfläche des Substrats unterbunden. Durch ein leichtes Klopfen auf die Unterseite der Schale sowie den Schalenrand, wurde das Ablösen der Zellen zusätzlich gefördert. Die Enzymwirkung des Trypsins wurde durch die Zugabe von 7 ml frischen Kulturmediums gestoppt. Es wurde stets darauf geachtet, dass die Zellen nicht zu lange mit der Trypsin-EDTA-Lösung in Kontakt blieben, da es bei zu langer Inkubation zu irreversibler Schädigung der Zellen kommen kann. Nach Zugabe des frischen Mediums, wurden die Zellen durch anschließendes Auf- und Abpipettieren suspendiert und vereinzelt. Im Anschluss wurde der gewünschte Anteil der Zellsuspension in eine mit frischem Nährmedium beschickte Kulturschale gegeben. Um eine optimale Zellverteilung zu garantieren, wurde die Schale leicht horizontal und vertikal bewegt.

### 3.1.2 Zellzahlbestimmung

Um eine standardisierte Bedingung und Einstellung der Zellzahl für die jeweiligen Versuche zu gewährleisten, wurden die Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer (G32) gezählt. Hierzu wurden die Zellen wie unter 3.1.1 beschrieben von der Zellkulturschale gelöst, in ein 50 ml Falcon (V16) überführt und für 4 Minuten bei 4°C und 900 rpm (185·x g, Rotortyp JS. 4.3)(G6) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in frischem Nährmedium bzw. Puffer resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellkonzentration wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und seitlich zwischen Deckgläschen und Zählkammer gegeben. Auf Grund von dort wirkenden Kapillarkräften, wird die Zellsuspension in den vorhandenen Zwischenraum gezogen. Vor Aufbringen der Zellsuspension sollte ebenfalls darauf geachtet werden, dass die sogenannten „Newton Ringe“ zu erkennen sind. Dabei handelt es sich um Positionierungshilfen, die einen korrekten Sitz des Deckgläschens gewährleisten. Unter dem Mikroskop wurden immer die Zellen aus 4 x 4 = 16 Kleinquadraten des Großquadrats gezählt. Kam es auf Grund einer zu hohen Zellzahl oder einer inhomogenen Zellsuspension zu einer deutlichen Abweichung der Zellzahlen zwischen den ausgezählten Großquadraten und damit zu einer prozentualen Abweichung von über 20% des Mittelwertes, wurde die Zellsuspension erneut verdünnt und gezählt. Der aus den 4 Zählungen ermittelte Mittelwert, multipliziert mit dem Faktor 10.000 ergab die Zelldichte der Suspension in Zellen/ml. Wurde die Zellzahl/ml mit dem Volumen der Zellsuspension multipliziert, resultierte die Gesamtzellzahl.

### 3.1.3 Kryokonservierung der Zellen

Zur längerfristigen Lagerung der kultivierten Zellen wurden je nach Bedarf Aliquota der jeweiligen Zelllinie eingefroren. Für diesen auch als Kryokonservierung bezeichneten Prozess, wurden die jeweiligen Zellen bei einer Konfluenz von ca. 90-95 %, wie unter 3.1.1 beschreiben vom Boden der Kulturschale gelöst, in ein 50 ml fassendes Falcon-Behältnis (V16) überführt und bei 900 rpm (*rounds per minute*, Umdrehungen pro Minute) bei Raumtemperatur für 4 min zentrifugiert (mit Rotor JS 4.3 (G6)). Im Anschluss wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet jeder einzufrierenden Kulturschale in 900 µl des für die jeweilige Zelllinie verwendeten Mediums (vgl. 2.7) resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden dann 900 µl in ein mit 100 µl Dimethylsulfoxid (R6) vorgelegtes Kryovial (V5) überführt. Durch die Verwendung dieser DMSO-Konzentration von 10%, wurde die Bildung von Eiskristallen verhindert und der Zerstörung der Zellen während des Einfrierens entgegengewirkt. Die fertig präparierten Kryovials (V5) wurden sofort in ein mit Isopropanol 100 % (R28) befülltes Einfrierbehältnis (Mr. Frosty, (G31)) gegeben, welches im Anschluss bei -80 °C gelagert wurde. Dieses spezielle Verfahren garantiert ein langsames und schonendes Herunterkühlen

der Zellsuspension mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 °C/min. Nach etwa 24 Stunden erfolgte die Überführung der Kryovials in einen Stickstofftank (G37) zur weiteren Lagerung bei -196 °C.

### 3.1.4 Auftauen der Zellen

Zur Reaktivierung und Kultivierung der gewünschten Zellen, wurde ein in flüssigem Stickstoff gelagertes Aliquot entnommen und zügig per Hand erwärmt. Da es sich bei dem in der Zellsuspension enthaltenen DMSO (10 %) um eine Substanz mit zelltoxischen Eigenschaften handelt, wurde die geschmolzene Zellsuspension unmittelbar in ein zuvor mit 10 ml frischem Nährmedium (N1-N2) versehenes Falcon (V16) überführt. Zur Entfernung des DMSO folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 900 rpm (= 185 x g in einem Rotortyp JS 4.3 (G6)) für 4 Minuten. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 2 bis 3 ml vorgewärmtem Nährmedium (N1-N2) sorgfältig resuspendiert und in eine Kulturschale (V4) mit ca. 18 ml vorgelegtem, frischem Medium überführt. Die weitere Kultivierung erfolgte wie unter 3.1.1 beschreiben.

### 3.1.5. Membranhomogenate

Ein kleiner Teil der Bindungsexperimente wurde auf Grund eines zu geringen Expressionslevels oder von Internalisierungsproblemen nicht mit ganzen Zellen, sondern mit Membranhomogenaten durchgeführt. Zur Herstellung der Membranhomogenate wurden die Zellen von 20 oder 40 Kulturschalen verarbeitet. Bei der Herstellung von Membranhomogenaten wurden Kulturschalen einer Zelllinie verwendet, sobald diese eine Konfluenz von 100 % aufwiesen. Zur Steigerung der Rezeptorexpression, wurde 16-18h vor der geplanten Herstellung einer Membranpräparation das Kulturmedium abgesaugt und durch sterilfiltriertes Butyrat-haltiges frisches Medium (5 mM Natriumbutyrat (N3)) ersetzt. Obwohl bekannt ist, dass Natriumbutyrat als HDAC Hemmstoff die Zellproliferation inhibiert, verstärkt es die Zunahme der Rezeptorexpression (Kruh 1982). Das Nährmedium jeder Kulturschale wurde abgesaugt und durch 2,4 ml Homogenisations-Puffer (L11) ersetzt. Der Zellrasen wurde mit einem Zellschaber (V30) vom Boden der Kulturschale abgelöst. Die jeweils aus fünf Kulturschalen erhaltenen Zellsuspensionen, wurden in ein Zentrifugationsröhrchen überführt und auf Eis gelagert. Um eine möglichst vollständige Überführung der Zellsuspensionen zu erreichen, wurden diese fünf Kulturschalen im Anschluss mit insgesamt 6,0 ml Homogenisations-Puffer (L11) gespült und ebenfalls in das Zentrifugationsröhrchen überführt. Der Zellaufschluss erfolgte durch zweimalige Homogenisation der Zellen für jeweils 20 Sekunden durch Einsatz des Polytron-Homogenisators (G35) auf Stufe 6. Die Lagerung der Proben erfolgte in der Zwischenzeit auf Eis. Anschließend wurde das entstandene Zellhomogenat dreimal bei 40.000 x g und 2 °C für

10 Minuten zentrifugiert (Rotor JA 25.50 (G6)). Nach dem dritten Zentrifugationsschritt wurden die Pellets in 15 ml Zentrifugationspuffer (L22) resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes erfolgte die Resuspendierung in der entsprechenden Menge *Aqua destillata* (R2). Die erhaltenen Membranhomogenate wurden in 1,0 ml bzw. 0,5 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße (V14) aliquotiert und bei -80 °C eingefroren (G21) und gelagert.

### **3.1.6. Proteinbestimmung**

Zur genauen Bestimmung der Proteinkonzentrationen der in dieser Arbeit untersuchten Membranpräparationen wurde die Methode nach (Lowry et al. 1951) verwendet, welche auf der Quantifizierung zweier aufeinanderfolgender Farbreaktionen basiert. Bei der ersten Reaktion kommt es durch die Zugabe einer alkalischen Kupfer (II)-sulfat-Lösung (L4) auf Grund einer Komplexbildung zwischen der vorliegenden Peptidbindung und den Kupfer (II)-Ionen zu einer Biuretreaktion. Im Verlauf einer zweiten Reaktion reduziert der zuvor entstandene Kupfer-Protein-Komplex sich im Folin-Ciocalteu-Reagenz (L5) zu Molybdänblau. Da die so entstandene Blaufärbung der Lösung proportional zum Proteingehalt ist, eignet sich diese Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration.

Um den genauen Proteingehalt bestimmen zu können, wurde im ersten Schritt eine Eichreihe aus humanem Serumalbumin (HSA) (R25) generiert (0,25 – 2 mg/ml). Nach Zugabe von 2,0 ml Arbeitslösung (L4) zu jeweils 200 µl der hergestellten Verdünnungen der Membranpräparationen (1:1, 1:2, 1:4 und 1:8), erfolgte die Inkubation der Proben für 10 Minuten unter Lichtausschluss. Im Anschluss wurden die Proben mit jeweils 200 µl der Farblösung (L5) versehen und erneut für 30 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Die Licht-Absorption der Proben wurde bei einer Wellenlänge von 500 nm mit einem UV-Photometer (G41) ermittelt. Die Messungen der Proteinbestimmung wurden in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Die Erstellung der Kalibriergeraden und genaue Berechnung des Proteingehaltes erfolgte mit Hilfe der Software Microsoft Excel®.



## 3.2 Radioligand-Bindungsstudien

### 3.2.1 Filtrationsmethode

Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten radioaktiven Bindungsexperimente, wurden in speziellen 96-well Platten (V25) durchgeführt. Zur Beendigung der Bindungsreaktion erfolgte eine Vakuumfiltration mit Hilfe eines Tomtec<sup>®</sup>-Harvesters (G38). Bei Versuchen mit dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS und [<sup>3</sup>H]Iperoxo wurde der Glasfaserfilter (V17) vor der Filtration für ca. eine Minute in 0,1 %ige Polyethyleniminlösung (L21) (2-8 °C) gelegt und im Anschluss vorsichtig in das Filtrationsgerät überführt. Die PEI-Lösung sorgt auf Grund der positiven Molekülladung von Polyethylenimin und [<sup>3</sup>H]NMS zu einer Abstoßung beider Substanzen, die zu einer Reduzierung der unspezifischen Bindung des freien Radioliganden an das Filtermaterial führt. Bei Versuchen mit dem Radioliganden [<sup>35</sup>S]GTP S reichte es, den verwendeten Filter kurz vor der Filtration mit *Aqua destillata* (R2) zu benetzen.

Bei Verwendung von mit Tritium markierten Radioliganden erfolgte nach der Filtration das Spülen mit eiskaltem *Aqua destillata* (R2), wodurch eine Verlangsamung der Dissoziation filtergebundener Rezeptor-Ligand-Komplexe bewirkt wurde. Nach erfolgter Filtration der Versuchsansätze, wurde der Filter drei Minuten bei 300 Watt in der Mikrowelle (G28) getrocknet. Nach vollständiger Trocknung des Filters, wurde dieses auf Aluminiumfolie (V1) überführt und mit einer mit Szintillator dotierten Wachsplatte (V8) auf einem Heizblockes (G10) verschmolzen. Nach abkühlen und erhärten des Waxes, wurde der mit Wachs gesinterte Filter in eine Plastikhülle (V19) überführt und die membrangebundene Radioaktivität in einer speziellen Messkassette (G34) im Szintillationszähler MicroBeta<sup>®</sup> Trilux 1450 (G2) vermessen.

### 3.2.2 Szintillationszählverfahren

In allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Radioligand-Bindungsuntersuchungen, wurde entweder [<sup>3</sup>H]N-Methylscopolamin ([<sup>3</sup>H]NMS) oder [<sup>3</sup>H]Iperoxo (vgl. 2.11.1) als Radiosonde verwendet. Bei Tritium ([<sup>3</sup>H]) handelt es sich um superschweren Wasserstoff, welcher sich von Wasserstoff [<sup>1</sup>H], durch die Anwesenheit eines zweiten Neutrons im Zellkern unterscheidet. Kommt es zu einem  $\beta^-$ -Zerfall, zerfällt ein Neutron in ein Proton, ein  $\beta^-$ -Elektron und ein Antineutrino. Zur quantitativen Bestimmung der emittierten  $\beta^-$ -Elektronen kamen zwei Szintillationsverfahren zum Tragen. Zur Bestimmung der auf den Filtern vorhandenen Radioligand-Rezeptorkomplexe wurde die Feststoffsintillation verwendet. Um die Konzentration einer radioaktiven Testsubstanz einer Lösung zu berechnen wurde die Flüssigsintillationsmethode gewählt. Beide Szintillationsverfahren sorgen für

die Verstärkung der verhältnismäßig schwachen Energie, die bei einem  $\beta$ -Zerfall entsteht. Die Grundlage beider Verfahren basiert auf der Umwandlung der  $\beta$ -Zerfallsenergie in detektierbare und zählbare Lichtblitze.

### 3.2.2.1 Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie

Zur genauen Berechnung von z.B. Affinitäten der unterschiedlichen Testsubstanzen, der Kooperativität allosterischer Modulatoren oder aber auch der Anzahl an Bindungsstellen ( $B_{\max}$ ) (vgl. 3.2.4.1) ist eine genaue Angabe der eingesetzten Konzentration des Radioliganden notwendig. Hierfür wurden 50  $\mu$ l der eingesetzten Radioligand-Lösung in ein Szintillationsgefäß (V26) gegeben und mit 5 ml des Szintillationscocktails (R11) versetzt. Dieser spezielle Cocktail, enthält neben Lösungsmitteln (Alkylbenzole) und Lösungsvermittlern (z.B. Triton X-100) auch primäre und sekundäre Szintillatoren (z.B. 2,5-Diphenyloxazol (PPO) bzw. 1,4-Bis(5-phenyloxazol-2-yl)benzen (POPOP)). Kommt es nun zu einem  $\beta$ -Zerfall, so geht die Zerfallsenergie zuerst auf die Moleküle des Lösungsmittels über. Im Anschluss wird sie auf die  $\beta$ -Elektronensysteme der Szintillatoren übertragen, die ihrerseits dann die Energie in Form von Lichtblitzen (Photonen) abgeben. Der primäre Szintillator gibt die aufgenommene Energie in Form von Licht mit einer Wellenlänge von 357 nm ab, welche aufgrund der kurzen Wellenlänge jedoch schlecht zu detektieren ist. Zu diesem Zweck befindet sich ein zweiter Szintillator im Cocktail, welcher in der Lage ist, die Energie des primären Szintillators zu absorbieren und mit einer Wellenlänge von 410 nm zu emittieren. Durch diese Möglichkeit wurden die entstandenen Blitze nun mit Hilfe eines Photomultipliers (G8) in elektronische Impulse umgewandelt und detektiert. Die entstandenen Impulse waren proportional zur Energie des  $\beta$ -Elektrons. Mit Hilfe der folgenden Formel konnten dann Rückschlüsse auf die molare Konzentration der vermessenen Probe getroffen werden. Die Bestimmung der Radioligandkonzentration erfolgte an jedem Versuchstag jeweils als Doppelbestimmung.

$$[L] = \frac{A}{A_{\text{spez.}} \cdot V \cdot 2220} \cdot 10^{-9} \quad \text{Gleichung 1}$$

[L]:	Konzentration der radioaktiven Probe (mol/l)
A:	Gemessene Radioaktivität (dpm)
$A_{\text{spez.}}$ :	Spezifische Aktivität der radioaktiven Probe (Ci/mmol)
2220:	Umrechnungsfaktor
V:	Eingesetztes Volumen (ml)

### 3.2.2.2 Feststoffszintillationsspektrometrie

Das Verfahren der Feststoffszintillationsspektrometrie basiert auf dem gleichen Prinzip, wie bereits für die Flüssigkeitsszintillationsmessung beschrieben. Bei dieser Art der Szintillationsmessung, befinden sich die einzelnen Komponenten zur Signalgenerierung in der Matrix der aufgeschmolzenen Wachsplatten (V8).

### 3.2.3 Theoretische Grundlagen der Rezeptortheorie

Zur Beschreibung der Interaktion eines Wirkstoffes mit einem Rezeptor hat die Pharmakologie eine Vielzahl von mathematischen, thermodynamischen und biochemischen Modellen hervorgebracht. Eine der wichtigsten aus diesen Modellen entstandenen Theorie ist die sogenannte Okkupationstheorie, die besagt, dass die biologische Wirkung einer Substanz direkt abhängig ist von der Zahl der durch den Liganden besetzten (okkupierten) Rezeptoren. Mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes gelang es, die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor zu quantifizieren, wobei sowohl die Anzahl freier Rezeptoren als auch die Anzahl freier Liganden zur der Anzahl gebildeter Rezeptor-Ligand-Komplexe in Beziehung gestellt wurden.



[R]: Rezeptorkonzentration

[L]: Ligandkonzentration

[RL]: Konzentration der Ligand-Rezeptor-Komplexe

Die Bildung der entstandenen Ligand-Rezeptor-Komplexe wird durch die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{+1}$  beschrieben und ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$V_{hin} = k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] \quad \text{Gleichung 3}$$

Der Zerfall der Ligand-Rezeptor-Komplexe wird dementsprechend durch die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  beschrieben und setzt sich wie folgt zusammen:

$$v_{rück} = k_{-1} \cdot [RL] \quad \text{Gleichung 4}$$

Liegt ein Bindungsgleichgewicht vor, so laufen Assoziation und Dissoziation mit gleicher Geschwindigkeit ab und die Anzahl der Ligand-Rezeptor-Komplexe verändert sich nicht mehr. Somit sollte es bei einer vollständigen Besetzung der Rezeptoren auch zu einem maximalen Effekt ( $E_{\max}$ ) kommen. Kommt es zu einem maximalen Effekt, ohne dass alle Rezeptoren in einem Ligand-Rezeptor-Komplex vorliegen, so werden die unbesetzten Rezeptoren auch als „*spare receptors*“ oder Rezeptorreserve bezeichnet.

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

Durch die Bildung des Quotienten beider Geschwindigkeitskonstanten, wird die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  (Einheit: mol/l) erhalten, welche ein Maß für die Affinität eines Liganden zum Rezeptor darstellt. Der  $K_D$ -Wert spiegelt die Konzentration wider, bei der die Hälfte des zu untersuchenden Liganden am Rezeptor gebunden vorliegt. Verfügt ein Ligand über eine hohe Affinität zum Rezeptor, so spiegelt sich dies in einem kleinen  $K_D$ -Wert wider. Die Gleichgewichtsassoziationskonstante ( $K_A$ ) bildet den reziproken Wert.

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

### 3.2.4 Experimente im Bindungsgleichgewicht

#### 3.2.4.1 Homologe Competition

##### Theoretische Grundlagen

Ein kompetitives Bindungsexperiment wird als homolog bezeichnet, wenn zwei strukturidentische Liganden eingesetzt werden, die um die gleiche Bindungsstelle am Rezeptorprotein konkurrieren. Diese spezielle Art von Inhibitionsversuchen ist durch eine Strukturgleichheit der verwendeten Liganden gekennzeichnet, die sich lediglich in der radioaktiven Markierung einer der Liganden unterscheiden (vgl. 2.11.1). Substanzen, die mit einer solchen radioaktiven Markierung versehen sind, werden als Radioliganden bezeichnet. Die homologe Competition diente im Rahmen dieser Arbeit, durch Ermittlung einer Maßzahl für die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor ( $K_D$ ) sowie durch Erfassung der vorhandenen Zahl spezifischer Bindungsstellen ( $B_{\max}$ ), der Charakterisierung des zu untersuchenden Rezeptorproteins. Durch die Strukturgleichheit der Liganden bestehen keine Affinitätsunterschiede zum Rezeptor, womit die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  des

Radioliganden der Gleichgewichtsinhibitionskonstante  $K_I$  des Inhibitors entspricht. Somit gilt:

$$K_D = K_I \quad \text{Gleichung 7}$$

Bei den in den homologen Konkurrenzexperimenten verwendeten Liganden, handelte es sich zum einen um den orthosterischen Antagonisten N-Methylscopolamin (NMS), zum anderen um den orthosterischen Vollagonisten Iperoxo. Beide Radioliganden tragen an einer Methylgruppe drei tritiierte Wasserstoffe ( $[^3\text{H}]\text{NMS}$  bzw.  $[^3\text{H}]\text{Iperoxo}$ ).

Der Rezeptor wird in Form einer Zellsuspension oder Membranpräparation in konstanter Menge vorgelegt. Die Konzentration des Radioliganden wird ebenfalls konstant gehalten, während die Konzentration des nicht markierten Inhibitors stufenweise erhöht und dadurch der Radioligand zunehmend aus seiner spezifischen Rezeptorbindung verdrängt wird. Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_I$  des Inhibitors zum Rezeptor kann nach (Cheng und Prusoff 1973) ermittelt werden:

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad \text{Gleichung 8}$$

Da bei der homologen Konkurrenz Radioligand und Inhibitor strukturidentisch sind und damit der Spezialfall  $K_D = K_I$  vorliegt, lässt sich diese Gleichung wie folgt vereinfachen:

$$K_I = K_D = IC_{50} - [L] \quad \text{Gleichung 9}$$

Neben der Bestimmung der Affinität eines Liganden zu dem zu untersuchenden Rezeptor, kann durch homologe Konkurrenzexperimente ebenfalls die Konzentration der spezifischen Bindungsstellen oder auch der Gesamtrezeptorzahl  $B_{\max}$  bestimmt werden. Die Summe aus freien Rezeptoren und Rezeptoren die in Rezeptor-Ligand-Komplexen vorliegen, ergibt die Gesamtzahl der spezifischen Bindungsstellen im Reaktionsansatz des Bindungsexperimentes:

$$B_{\max} = [R] + [RL] \quad \text{Gleichung 10}$$

Die Gesamtrezeptorzahl  $B_{\max}$  lässt sich mit Hilfe einer abgewandelten Cheng-Prusoff-Korrektur nach (DeBlasi et al. 1989) bestimmen:

$$B_{\max} = B_0 \cdot \frac{IC_{50}}{[L]} \quad \text{Gleichung 11}$$

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

#### Analyse der Bindungsdaten:

Allgemein gilt bei dieser Art von Versuchen, dass die Gesamtrezeptorzahl  $B_{\max}$  im Reaktionsansatz nicht größer sein sollte als 1/10 der ermittelten  $K_D$ -Konzentration. Des Weiteren sollte darauf geachtet werden, dass nicht mehr als 10% der eingesetzten Ligand-Konzentration als Ligand-Rezeptor-Komplex vorliegt, um eine Verfälschung der Parameter durch die Wegbindung des Radioliganden an „Nicht-Rezeptor“-Bindungsstellen zu vermeiden. Durch die Gewährleistung dieser beiden Punkte, können dann wahre mikroskopische und nicht die apparenten Bindungskonstanten bestimmt werden (Bennet und Yamamura, 1985).

Die eigentliche Auswertung eines homologen Konkurrenzexperimentes erfolgt durch Auftragen der spezifischen Bindung des Radioliganden ( $[^3\text{H}]\text{NMS}$  oder  $[^3\text{H}]\text{Iperoxo}$ ) gegen den dekadischen Logarithmus der molaren Konzentration des nicht markierten Liganden (NMS oder Iperoxo). Die Kurvenanpassung erfolgte mittels nichtlinearer Regression anhand der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Barlow und Blake 1989).

$$B_{\text{Ges}} = \text{Min} + \frac{\text{Max}-\text{Min}}{1 + (IC_{50}/10^{[X]})^{nH}} \quad \text{Gleichung 12}$$

---

$B_{\text{Ges}}$ :	Gesamtbindung des Radioliganden
Min:	Unteres Kurvenplateau (unspezifische Bindung des Radioliganden)
Max:	Oberes Kurvenplateau (Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit des Inhibitors)
$IC_{50}$ :	Konzentration des Inhibitors, in deren Gegenwart die Rezeptorpopulation halbmaximal besetzt ist
[X]:	Konzentration des Inhibitors
$n_H$ :	Hill-Koeffizient; Maßzahl für die Kurvensteilheit

Der Wendepunkt der im Rahmen dieser Experimente entstandenen sigmoidalen Kurven, entspricht dem  $IC_{50}$ -Wert. Der  $IC_{50}$ -Wert beschreibt die Konzentration des Kompetitors, in deren Gegenwart die spezifische Bindung des Radioliganden an den Rezeptor halbmaximal unterbunden wird. Durch Einsatz des  $IC_{50}$ -Wertes in die bereits beschriebenen Gleichungen nach Cheng und Prusoff (Gleichung 8) sowie nach DeBlasi (Gleichung 11) lässt sich die Affinität des Radioliganden zum Rezeptor ( $K_D$ ) sowie die Anzahl der spezifischen Bindungsstellen ( $B_{\text{max}}$ ) bestimmen. Das untere Plateau der Kurve durch die Bindungsdaten der Gesamtbindung des Radioliganden, entspricht dem Niveau der nicht-sättigbaren Radioligand-Bindung und stellt in der Regel die unspezifische Bindung dar. Eine Beschreibung der Steilheit, der mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ ermittelten sigmoiden Kurve, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch den Parameter  $n_H$ , der dem Hill-Koeffizienten der Hill-Gleichung (Hill 1910) entspricht. Der Hill-Koeffizient  $n_H$  einer sigmoidalen Kurve gibt Auskunft über die Steilheit der Kurve und erlaubt somit Rückschlüsse auf die vorliegende Ligand-Rezeptor-Interaktion. Ist das Steilheitsmaß der Inhibitionskurve nicht signifikant verschieden von  $n_H = -1$ , so kann angenommen werden, dass es sich um eine homogene Rezeptorpopulation handelt und wahrscheinlich eine 1:1 Interaktion zwischen dem Liganden und dem vorliegenden Rezeptorprotein besteht (Monod et al. 1965).

### **3.2.4.2 Heterologe Competition**

Die Heterologe Competition dient, wie die zuvor beschriebene homologe Competition, ebenfalls zur Ermittlung einer Maßzahl für die Affinität eines Liganden zum Rezeptorprotein. Bei dieser Art von Competitionsexperimenten liegt allerdings keine Strukturgleichheit zwischen Testsubstanz und Radioligand vor. Bei heterologen Competitionsexperimenten können im Rahmen dieser Arbeit drei verschiedene Möglichkeiten der Interaktion unterschieden werden.

1. Der zu untersuchende unmarkierte Ligand konkurriert mit dem Radioligand ( $[^3\text{H}]\text{NMS}$ ,  $[^3\text{H}]\text{Iperoxo}$ ) um die gleiche orthosterische Bindungsstelle.
2. Der zu untersuchende unmarkierte Ligand kann sich an eine allosterische Bindungsstelle anlagern.
3. Die Rezeptorbesetzung des zu untersuchenden Liganden stellt eine Mischform der bereits genannten Möglichkeiten dar, indem sie orthosterisch und allosterisch erfolgt.

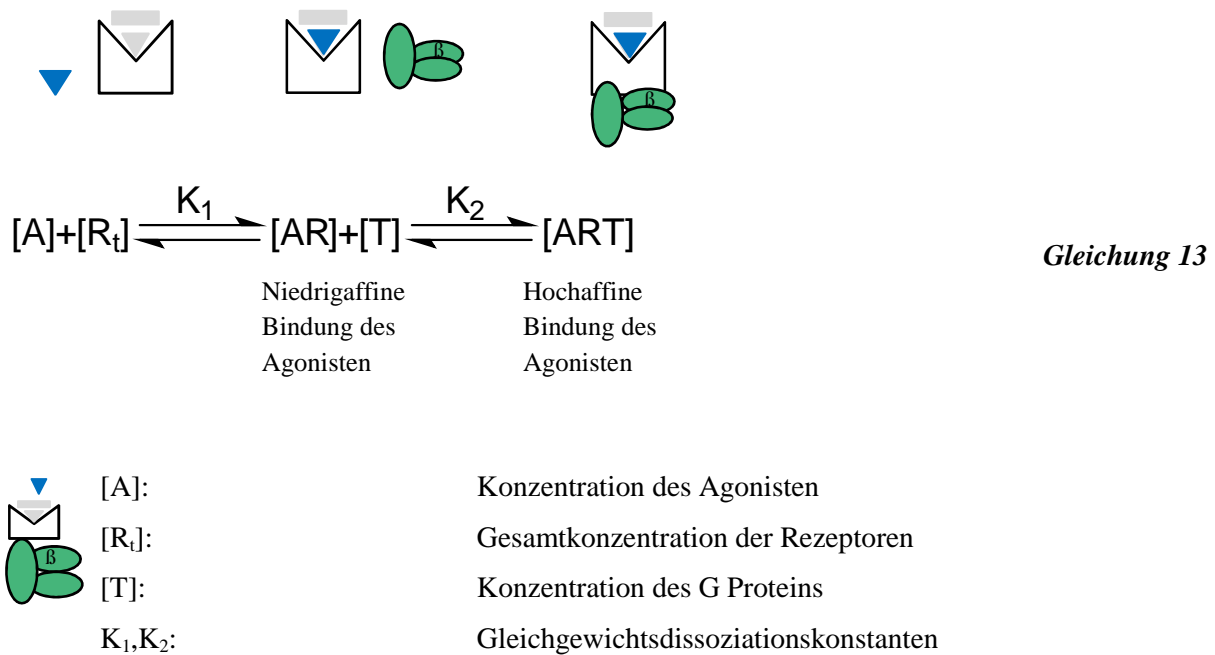
Jede dieser drei Möglichkeiten soll nachfolgend kurz erläutert werden:

### **1. Bindungsverhalten orthosterischer Liganden**

Im Fall einer Strukturverschiedenheit zwischen Radioligand und unmarkiertem Ligand, dient die Gleichung von Cheng-Prusoff (Gleichung 8) zur Berechnung der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten des Inhibitors ( $K_I$ -Wert). Eine wichtige Voraussetzung für die Berechnung des  $K_I$ -Wertes eines Inhibitors ist ein Steilheitsmaß  $n_H$  der erhaltenen Inhibitionskurven, das nicht signifikant von  $n_H = -1$  verschieden ist (F-Test,  $p > 0.05$ , vgl. 3.6.2.2). War die Kurvensteilheit signifikant unterschiedlich von  $n_H = -1$ , wurde die apparente Affinitätskonstante ( $K_{I,app}$ ) angegeben.

Bei der Untersuchung von Agonisten, kommt es bei der Verwendung von Membranhomogenaten häufig zu einem signifikant niedrigeren Steilheitsmaß von  $n_H > -1$  (z.B.  $-0.6$ , im Sinne eines flacheren Kurvenverlaufes). Dieses Phänomen lässt sich auf ein bei Agonisten vorkommendes komplexes Bindungsverhalten und somit auf eine Inhomogenität des Kopplungszustandes des Rezeptors, z.B. an G Proteine, zurückführen. Sind neben dem vorhandenen Agonisten und dem Rezeptorprotein ebenfalls G Proteine vorhanden, so kann es sich um ein zweistufiges Bindungssystem handeln (Kenakin 1997). Dieses besagt, dass die im ersten Reaktionsschritt gebildeten Agonist-Rezeptor-Komplexe in einem zweiten Schritt zu ternären Komplexen aus Agonist, Rezeptor und G Protein weiterreagieren können (vgl. Abb. 3.1 und Gleichung 13), und das beide Bindungsschritte durch unterschiedliche Bindungskonstanten charakterisierbar sind; sind sie verschieden kann ein flacher Kurvenverlauf resultieren.





**Abbildung 3. 1: Schematische Darstellung des zweistufigen Bindungssystems nach Kenakin 1997.**

#### Verwendung von Membranhomogenaten:

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten heterologen Kompetitionsexperimente wurden entweder an lebenden, intakten Zellen oder mit Membranhomogenaten durchgeführt. Bei letzteren kann es durch die teilweise Kopplung vorliegender G Proteine im Homogenat an die Rezeptoren zu zwei unterschiedlichen Rezeptorzuständen kommen; dem hoch und dem niedrig affinen Zustand. Bei ersterem handelt es sich um einen G Protein-gekoppelten Rezeptorzustand, an den der Agonist hochaffin bindet. Im Gegensatz dazu liegt im für den Agonisten niedrig affinen Zustand, ein vom G Protein-entkoppelter Rezeptor vor. Dieses Bindungsverhalten zeigt sich bei Antagonisten nicht, da diese mit gleicher Affinität an G Protein-gekoppelte und G Protein-entkoppelte Rezeptoren binden, was zu einer Markierung beider Rezeptorzustände in gleichem Maße führt. Auf Grund der unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Agonisten, lässt sich bei Verwendung der oben beschriebenen „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) eine flachere Kurvensteilheit mit niedrigem Hill-Koeffizienten  $n_H$  feststellen. Durch Verwendung der Cheng-Prusoff-Gleichung (Gleichung 8) kann hier lediglich eine apparente Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_{I,app}$  ermittelt werden, die semiquantitativ den deskriptiven Zwecken dienen kann. Eine Alternative bietet ein Rezeptormodell, das zwei Bindungsstellen beinhaltet. In diesem Fall erhält man für den verwendeten Agonisten zwei unterschiedliche Bindungskonstanten;  $K_{I, hochaffin}$  und  $K_{I, niedrigaffin}$  unter der Annahme, dass der Radioligand an beide Zustände mit derselben Affinität bindet. Zur Bestimmung dieser beiden Parameter wurde folgende Gleichung verwendet:

$$[B] = \text{Bottom} + \left( \text{Span} \cdot \frac{F1}{1+10^{[X]-\log EC_{50 1}}} \right) + \left( \text{Span} \cdot \frac{1-F1}{1+10^{[X]-\log EC_{50 2}}} \right) \quad \text{Gleichung 14}$$

[B]:	Bindung des Radioliganden
Bottom:	unteres Kurvenplateau
Top:	oberes Kurvenplateau
Span:	spezifische Bindung des Radioliganden (= Top-Bottom)
F1:	Fraktion 1, Anteil des hochaffinen Kompartiments an der spezifischen Bindung (=Span)
EC <sub>50 1</sub> :	Wendepunkt der hochaffinen Fraktion
EC <sub>50 2</sub> :	Wendepunkt der niedrigaffinen Fraktion

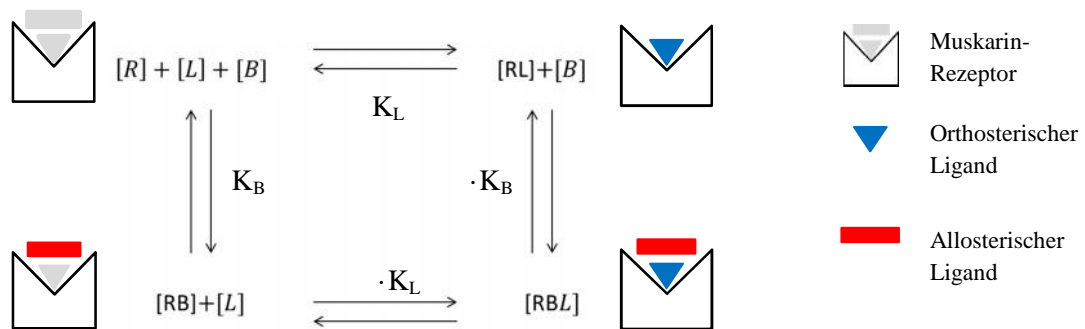
#### Verwendung intakter Zellen:

Es ist gegenwärtig unklar, zu welchem Ausmaß die Affinität von Agonisten zu Muskarinrezeptoren von der G Protein-Kopplung in intakten Zellen abhängig ist. Das liegt daran, dass die G Proteine für die zugehörigen Rezeptoren eine GTPase-Aktivität besitzen, welche das gebundene GTP-Molekül nach der Bindung an einen aktivierten Rezeptor unter Hydrolyse zu GDP umwandelt. Die Rate dieser Reaktion, kann wie bereits erwähnt durch die Zugabe von GTP kontrolliert werden (Kenakin 1997). Liegt GTP im Überschuss vor, wie es z.B. in einem intakten Zellsystem zu finden ist, erfolgt die Bindung von G Proteinen an den Rezeptor sowie das Recycling von Rezeptor/G Protein Komplexen so schnell, dass keine ternären Komplexe [ART] akkumulieren können. Unter diesen Umständen ist [AR] im Gleichgewicht und das Gleichgewicht zwischen [A], [R] und [AR] kann ausreichend durch  $K_1$  beschrieben werden. In Gegenwart von GTP, ist das Recycling von [ART] zu [AR] + [T] so schnell, dass das Ausmaß von  $K_2$  ansteigt, bis  $[T]/K_2 \rightarrow 0$  ist. Somit herrscht unter Ganzzellbedingungen  $K_{\text{obs}} = K_1$  (vgl. Abb. 3.1) (Kenakin 1997).

Bei der Auswertung von Inhibitionsexperimenten, die mit Membranhomogenaten durchgeführt wurden, wurde mit Hilfe eines F-Tests (vgl. 3.6.2.2) überprüft, ob sich die erhobenen Bindungsdaten besser mit einer monophasischen Kurvenanpassung (mit  $n_H = \text{konstant} = -1$ ) (Gleichung 12) oder einer biphasischen Kurve (Gleichung 14) anpassen ließen. Durch die Zugabe von Guanylnukleotiden (z.B. Guanosintriphosphat (GTP) oder GTP-Analoga kann der Anteil an G Protein gekoppelten Rezeptoren vermindert werden. Durch dieses Vorgehen kommt es zu einer Destabilisierung der ternären Komplexe [ART] (vgl. Abb. 3.1) und somit zu einer Entkopplung der Rezeptoren vom G Protein. Die Folge ist eine Aufhebung des hochaffinen Rezeptorzustandes und ein Rückkehr der Inhibitionskurve zu einem Steilheitsmaß, das nicht statistisch verschieden war von  $n_H = -1$  (F-Test,  $p > 0.05$ ).

### Allosterische Interaktion

Besetzen der verwendete Radioligand [ $^3\text{H}$ ]NMS, [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo und der zu untersuchende unmarkierte Ligand zwei unterschiedliche Bindungsstellen, handelt es sich nicht mehr um eine kompetitive Interaktion, bei der Radioligand und Kompetitor um die gleiche Bindungsstelle konkurrieren. Im Falle der allosterischen Interaktion ist es möglich, dass ein Ligand an eine weitere, sogenannte allosterische Bindungsstelle binden kann. Da es sich bei der orthosterischen und der allosterischen Bindungsstelle um unterschiedliche Haftareale am Rezeptorprotein handelt, besteht die Möglichkeit, dass es zur Bildung ternäre Komplexe bestehend aus dem Rezeptor, dem orthosterischen Ligand und dem allosterischen Modulator kommen kann. Zur Beschreibung dieser Interaktion kann das ternäre Modell allosterischer Interaktionen (Ehlert 1988) verwendet werden (vgl. Abb. 3.2):



[R]: Konzentration der freien Rezeptoren

[L]: Konzentration des orthosterischen Liganden

[B]: Konzentration des allosterischen Liganden

[RL], [RB], Konzentration der entsprechenden Rezeptor-

[RLB]: Ligand-Komplexe

$K_L$ : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des orthosterischen Liganden

$K_B$ : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des allosterischen Liganden

$\alpha$ : Kooperativitätsfaktor: mit  $>1$  negative;  $<1$  positive;  $=1$  neutrale Kooperativität

**Abbildung 3. 2: Schematische Darstellung des ternären Modells allosterischer Interaktionen nach Ehlert (1988) und Piktogramm mit den unterschiedlichen Rezeptorbesetzungszuständen, modifiziert nach Mohr et al. 2003. Für weitere Informationen, vgl. Text.**

Die Bindung einer allosterischen Substanz an einen Rezeptor kann die Affinität des Orthosters erhöhen, verringern oder sie unbeeinflusst lassen. Diese gegenseitige Beeinflussung der Affinität der Bindungspartner wird auch als Kooperativität bezeichnet. Der Gesamteffekt der Kooperativität ergibt sich als Resultat der Beeinflussung der Assoziation bzw. Dissoziation des orthosterischen Liganden durch den allosterischen Modulator. Kommt es zu einer Assoziationshemmung durch den allosterischen Modulator, führt dies zu einer Bindungshemmung des orthosterischen Liganden,

während eine Dissoziationsverzögerung die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden fördert. Liegt eine Hemmung der Gleichgewichtsbindung des Orthosters vor, so ist die Affinität des allosterischen Modulators zu freien Rezeptoren höher als zum besetzten Rezeptor (negative Kooperativität), wohingegen eine Zunahme der Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden für eine höhere Affinität des allosterischen Modulators zu orthosterisch besetzten Rezeptoren spricht (positive Kooperativität). Im Fall negativer Kooperativität überwiegt die Assoziationshemmung. Im Falle einer positiven Kooperativität ist die Affinität des allosterischen Modulators zu den mit orthosterischen Liganden besetzten Rezeptoren höher als zu freien Rezeptoren, wodurch die Dissoziationsverzögerung überwiegt und es zu einer gegenseitigen Bindungsförderung kommt. Liegt eine neutrale Kooperativität vor, egalisieren sich die Effekte des allosterischen Modulators auf die Kinetik der Assoziation und der Dissoziation des orthosterischen Liganden, da der allosterische Modulator die gleiche Affinität zu freien und zu den mit orthosterischen Liganden besetzten Rezeptoren aufweist und somit die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden unbeeinflusst bleibt. 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.

#### Datenanalyse

Das zuvor beschriebene ternäre Modell allosterischer Interaktionen, lässt sich durch Gleichungen beschreiben mit denen eine nichtlineare Regressionsanalyse durchgeführt werden kann. Damit lassen sich zwei wichtige Parameter ermitteln; die Gleichgewichtsdissoziations-Konstante  $K_B$  des zu untersuchenden allosterischen Modulators und der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$ . Die entsprechende Gleichung lautet (Ehlert 1988):

$$B_B = B_0 \cdot \frac{[L] + K_L}{[L] + K_L \cdot \frac{K_B + [B]}{K_B + \frac{[B]}{\alpha}}} \quad \text{Gleichung 15}$$

$B_B$ :	spezifische Bindung des Radioliganden in Anwesenheit des allosterischen Modulators B
$B_0$ :	spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des allosterischen Modulators B
$K_L$ :	Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Radioliganden
$K_B$ :	Gleichgewichtsdissoziationskonstante des allosterischen Modulators B
$\alpha$ :	Kooperativitätsfaktor
$[B]$ :	Konzentration des allosterischen Modulators
$[L]$ :	Konzentration des Radioliganden

Im Sinne der Einheitlichkeit der allosterischen Analysen dieser Arbeit, wurde der Kooperativitätsfaktor aus der Originalgleichung 15 durch Bildung des Kehrwertes als  $\alpha' = 1/\alpha$  ausgedrückt. Dies hatte überdies den Vorteil für die Charakterisierung allosterischer Förderer der Ligandbindung (vgl. Kapitel 4.1.8.2.1 und 4.3.1.3), dass positive Kooperativität durch Kooperativitätsfaktoren von  $\alpha' > 1$  und nicht von  $\alpha' < 1$ , ausgedrückt werden kann.

In manchen Fällen, ergab die Analyse des Effektes der allosterischen Fragmente auf die Radioligandbindung im Gleichgewicht steilere oder flachere Kurven, als es für den Fall einer kompetitiven Interaktion an einer einheitlichen Population von Bindungsstellen mit einer 1:1 Stöchiometrie zu erwarten gewesen wäre. Zur Auswertung derartiger Daten wurde die eine Gleichung verwendet, die ein Steigungsmaß zu ihrer Quantifizierung enthielt nach (Tränkle et al. 2003):

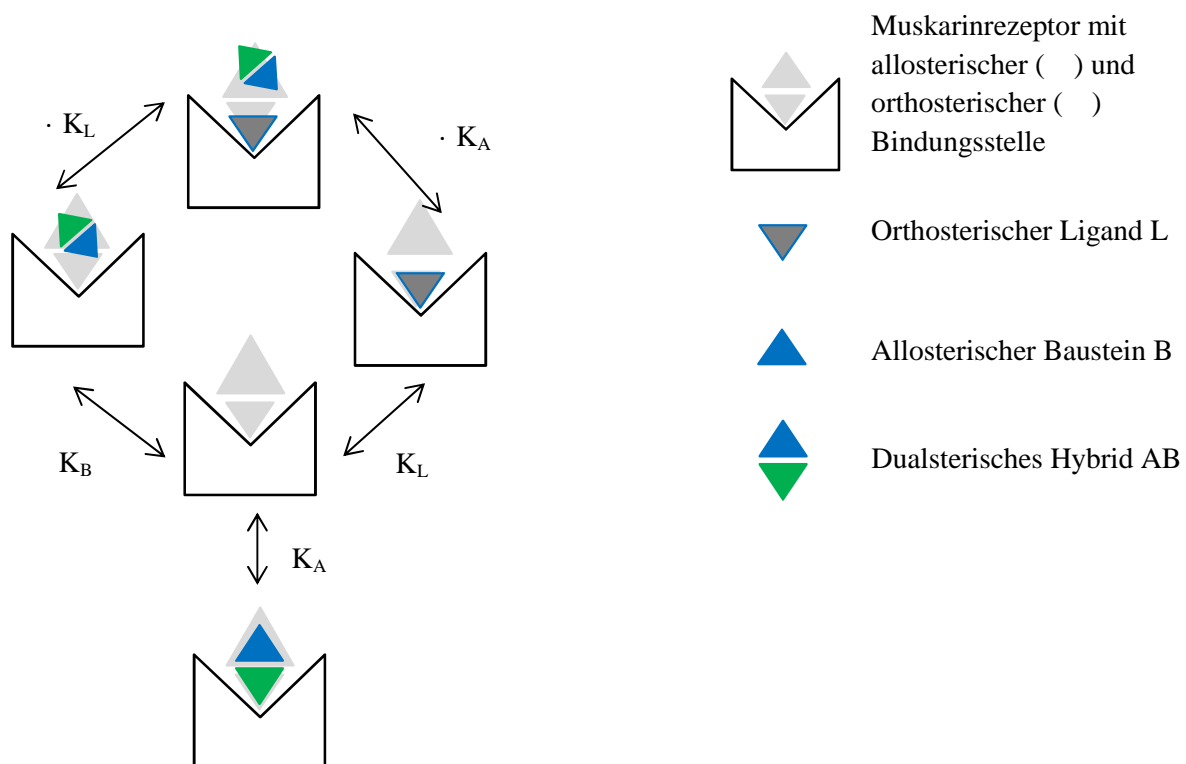
$$B_{LX} = B_0 \cdot \frac{(1 + K_L \cdot [L]) \cdot (1 + \alpha' \cdot (K_B \cdot [X])^{n_H})}{1 + (K_B \cdot [X])^{n_H} + K_L \cdot [L] \cdot (1 + \alpha' \cdot (K_B \cdot [X])^{n_H})} \quad \text{Gleichung 16}$$

$B_{LX}$ :	spezifische Bindung des Radioliganden in Anwesenheit der allosterischen Substanz B
$B_0$ :	spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit der allosterischen Substanz B
$K_L$ :	Gleichgewichtsassoziationskonstante des Radioliganden
$K_B$ :	Gleichgewichtsassoziationskonstante der allosterischen Substanz
$\alpha'$ :	Kooperativitätsfaktor: $\alpha' > 1$ positive; $\alpha' < 1$ negative; $\alpha' = 1$ neutrale Kooperativität
[B]:	Konzentration der allosterischen Substanz
[L]:	Konzentration des Radioliganden
$n_H$ :	Steilheit der Kurve

Im Sinne der Einheitlichkeit der allosterischen Analysen dieser Arbeit, wurden die Gleichgewichtsassoziationskonstanten aus der Originalgleichung 16 als Gleichgewichtsdissoziationskonstante ausgedrückt, indem sie durch  $K_B = 1/K_B$  und  $K_L = 1/K_L$  ersetzt wurden.

## 2. Bindungsmodell allosterisch/orthosterischer Hybridliganden

Dualsterische Hybridliganden besitzen einen orthosterischen und einen allosterischen Baustein, die über eine Zwischenkette miteinander verbunden sind. Betrachtet man die Bindungseigenschaften solcher Hybride, so kann es entweder zu einer gleichzeitigen Besetzung sowohl der orthosterischen als auch der allosterischen Bindungsstelle kommen, oder aber zu einer reinen allosterischen Bindung. Das Phänomen der dualsterischen Bindung führt somit gegenüber dem ternären Modell allosterischer Interaktionen nach Ehlert (1988) zu einer zusätzlichen fünften Rezeptorbindungspose (May et al. 2007b). Zur Analyse der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der Hybridliganden wurde das „Model of bivalent ligand binding to the orthosteric and allosteric site“ (May et al. 2007b) verwendet, bei dem es sich um ein erweitertes ternäres allosterisches Komplexmodell (May et al. 2007b; Antony et al. 2009; Bock et al. 2014a) handelt (vgl. Abb. 3.3).



**Abbildung 3. 3:** Schematische Darstellung des Bindungsmodells für dualsterische Hybridliganden. Modifiziert nach May et al. 2007.

Mit dem Wissen, dass dualsterische Hybridliganden in zwei unterschiedlichen Orientierungen mit dem Rezeptorprotein interagieren können, ergeben sich zwei Bindungskonstanten:  $K_B$  repräsentiert die Affinität des Hybridliganden bei einer Hybrid-Rezeptorbindung über das allosterische Fragment an die allosterische Bindungsstelle;  $K_A$  entspricht der Bindungskonstante des Hybridliganden bei simultaner

Besetzung sowohl der orthosterischen und der allosterischen Bindungsstelle. Die Bindung dualsterischer Hybride dieser Arbeit, deren orthosterischer Baustein ein Agonist ist, stabilisiert in der dualsterischen Bindungs-Pose vornehmlich die aktive Rezeptorkonformation, wohingegen das alleinige Binden der allosterischen Komponente des Hybrides, die inaktive Rezeptorkonformation stabilisiert (vgl. auch Kapitel 4.1.7).

Zur datenanalytischen Quantifizierung der Bindungskonstanten  $K_A$  des dualsterischen und  $K_B$  des allosterischen Bindungsmodus, wurden im Rahmen dieser Arbeit drei verschiedene Methoden eingesetzt:

- a) Bestimmung von  $K_A$  durch Einzelkurvenanalyse des Effekt des Hybrides auf die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Radioliganden unter „konstant“ setzen von  $K_B$  auf den separat für den jeweiligen allosterischen Baustein bestimmten Wert.
- b) Analyse des Effekt des Hybrides und des zugehörigen allosterischen Bausteines auf die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Radioliganden unter Teilung der Konstanten  $K_A$  und  $K_B$  während einer globalen Datenanalyse
- c) Analyse des Effekt des Hybrides und des zugehörigen allosterischen Bausteines auf die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Radioliganden plus des funktionellen Effektes des Hybrides unter Teilung der Konstanten  $K_A$  und  $K_B$  während einer globalen Datenanalyse

Im Rahmen dieser Arbeit werden die drei Methoden a) nichtlineare Datenanalyse einzelner Bindungskurven, b) globale Analyse basierend auf Gleichgewichtsbindungsdaten von Hybrid und Fragment und c) globale Analyse basierend auf Bindungs- und Funktionsdaten auch als Analysen a, b und c bezeichnet und sollen nachfolgend näher beschrieben werden.

### **Zu a) Nichtlineare Datenanalyse einzelner Bindungskurven**

Für das in Abbildung 3.3 gezeigte allosterische Modell, existiert eine Gleichung zur Analyse des Effektes von allosterisch/orthosterischen Hybridliganden auf das Bindungsgleichgewicht eines orthosterischen Radioliganden (May et al. 2007b; Bock et al. 2014a; Chen, Klöckner und Holze et al. 2015):

$$Y = \frac{[L_{hybrin}] \cdot R_T}{[L_{hybrin}] + K_L \cdot \frac{\left(1 + [AB] \cdot \left(\frac{K_A + K_B}{K_A \cdot K_B}\right)\right)}{\left(1 + \frac{\alpha_{hybr} \cdot [AB]}{K_B}\right)}}$$

*Gleichung 17*

---

Y:	spezifische Bindung des Radioliganden L ( $[^3\text{H}]\text{NMS}$ )
$[\text{L}_{\text{hybrid}}]$ :	Konzentration des Radioliganden L ( $[^3\text{H}]\text{NMS}$ )
$R_{\text{T}}$ :	Gesamtkonzentration der Rezeptoren
$K_{\text{L}}$ :	kennzeichnet die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Rezeptor-Komplex und repräsentiert die Affinität des Radioliganden L
$[\text{AB}]$ :	Konzentration des dualsterischen Hybridliganden
$K_{\text{A}}$ :	kennzeichnet die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des aktiven Hybrid-Rezeptor-Komplexes und repräsentiert die Affinität des Hybridliganden in der dualsterischen (aktiven) Bindungspose
$K_{\text{B}}$ :	kennzeichnet die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des inaktiven Hybrid-Rezeptor-Komplexes und repräsentiert die Affinität des Hybridliganden in der rein allosterischen (inaktiven) Bindungspose.
$\hat{\alpha}_{\text{Hybrid}}$ :	kennzeichnet die Kooperativität zwischen L und $[\text{AB}]$ . Wobei Positive Kooperativität durch $\hat{\alpha} > 1$ widerspiegelt wird

Für die nichtlineare Analyse wurde in einem ersten Schritt die Bindungskurve für den Effekt des allosterischen Fragmentes mit Hilfe von Gleichung 15 analysiert. In Fällen, in denen die Steigung der Bindungskurve für das allosterischen Fragmentes einen flachen oder steilen Verlauf nahm, wurde Gleichung 16 verwendet, um einen Wert für das Steigungsmaß abzuschätzen. In einem zweiten Schritt wurden anschließend die Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybridliganden mit Hilfe von Gleichung 17 analysiert; dabei wurde  $K_{\text{B}}$  auf den numerischen Werte konstant gesetzt, der zuvor für das allosterische Fragment bestimmt worden war.

### **Zu b) Globale Analyse basierend auf Gleichgewichtsbindungsdaten von Hybrid und Fragment**

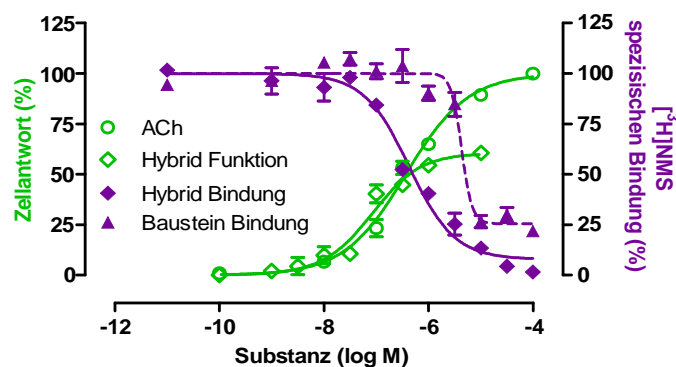
Um die allosterischen Eigenschaften des Hybrides nicht durch diejenigen des Fragmentes, d.h. durch  $K_{\text{B}}$  und  $\hat{\alpha}$ , vorzudefinieren, wurden im Sinne einer Verfeinerung der Analyse die  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride und des dazugehörigen allosterischen Fragmentes simultan einer gemeinsamen globalen Analyse unterzogen, um Schätzwerte für die Bindungskonstanten  $K_{\text{A}}$  und  $K_{\text{B}}$  zu erhalten. Gleichung 16 zusammen mit Gleichung 17 diente dann zur globalen Analyse des Effektes des allosterischen Fragmentes und des dualsterischen Hybrides auf die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Radioliganden.



### Zu c) Globale Analyse basierend auf Bindungs- und Funktionsdaten

Obleich die Bindungsdaten der vorliegenden Arbeit mehrheitlich an lebenden, intakten Zellen erhoben wurden, ist in den Bindungsstudien mit dem inversen muskarinischen Agonisten [ $^3\text{H}$ ]NMS davon auszugehen, dass der  $K_A$ -Wert eines Hybrides bei Anwendung der obengenannten zwei Analysemethoden a) und b) an G Protein *entkoppelten* Rezeptoren ermittelt wird. Die dritte Vorgehensweise zur optimierten Bestimmung sowohl von  $K_A$  als auch  $K_B$  stellt eine globale Analyse basierend auf Bindungs- und Funktionsdaten (vgl. Kapitel 4.1.9 und 4.2.7) zur Beschreibung der aktiven und inaktiven Bindungspose der untersuchten dualsterischen Hybridliganden am Rezeptorprotein dar. Im Gegensatz zu den bereits beschriebenen Analysen, die nur auf den Einzel- und simultanen Analysen von Bindungsdaten des dualsterischen Hybrides und des korrespondierenden allosterischen Fragmentes beruhte, wurden bei dieser Analyse ebenfalls die funktionellen Daten des dualsterischen Hybrides verwendet, also dessen Fähigkeit, die Bindung in eine Rezeptorfunktion zu transduzieren.

Ausgangspunkt dieser Analyse ist ein Satz von vier Konzentrations-Effekt-Kurven (KEK) (vgl. Abb. 3.4). Der erste Datensatz bestehend aus zwei Konzentrations-Effekt-Kurven (KEK) (grün) beschreibt den funktionellen Effekt, induziert zum einen durch den zuvor gewählten Referenz-Vollagonisten Acetylcholin und zum zweiten durch den zu untersuchenden partialagonistisch wirksamen Hybridliganden. Als Funktionelle Experimente für diese Analyse diene entweder die Agonist-induzierte Änderung der dynamischen Massenumverteilung (DMR)(vgl. 3.3.4), der IP1-Akkumulation (vgl. 3.3.2), der cAMP-Akkumulation (vgl. 3.3.3) oder der [ $^{35}\text{S}$ ]GTP S-Bindung (vgl. 3.3.1).



**Abbildung 3. 4: Beispielhafte Darstellung der globalen Analyse basierend auf [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindungsdaten und funktionellen Daten.** Linke Ordinate: Zellantwort des verwendeten funktionellen Experiments in %, normalisiert auf ACh in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ . Rechte Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden in %. Abszisse: Konzentration der jeweiligen Testsubstanz als Logarithmus der molaren Konzentration. Für weitere Informationen, vgl. Text.

Das dritte Set an Daten (violett) umfasst [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten des Hybridliganden wohingegen das vierte Daten-Set (violett) [<sup>3</sup>H]NMS-Bindungsdaten des jeweils zugehörigen allosterischen Fragments beinhaltet. Diese neuartige simultane Analyse ist auf diese Weise in der Lage, Schätzwerte für die Bindungsparameter  $K_A$  und  $K_B$  zu liefern. Auf Grund der einfließenden funktionellen Daten konnte unter Anwendung der hier beschriebenen globalen Anwendung des existierenden „Operational Model of Dynamic Ligand Binding“ (Bock et al. 2014a) erstmals eine Aussage über die systemunabhängige, maximale intrinsische Aktivität des dynamischen Hybridliganden getroffen werden (vgl. Gleichung 24 und Kapitel 4.1.9).

Jedes der vier Datensets, dargestellt von vier verschiedenen Konzentrations-Effekt-Kurven wurde durch folgende Gleichungen global analysiert:

Die Konzentrations-Effekt-Kurve des Hybridliganden (KEK2) wurde zusammen mit der Konzentrations-Effekt-Kurve des Referenzagonisten Acetylcholin (KEK1) mit Gleichung 20 nach Bock et al. 2014a analysiert, die sich aus dem Austausch von  $K_D$  in Gleichung 18 durch Gleichung 19 ergibt.

$$E = \frac{E_{max}}{1 + \frac{([AB] - K_D)^{n_{op}}}{[AB]^{n_{op}} \cdot \tau_{dyn}^{n_{op}}}} \quad \text{Gleichung 18}$$

$$K_D = \frac{K_A \cdot K_B}{K_A + K_B} \quad \text{Gleichung 19}$$

$$E = \frac{E_{max}}{1 + \frac{([AB] + \frac{K_A \cdot K_B}{K_A + K_B})^{n_{op}}}{[AB]^{n_{op}} \cdot \tau_{dyn}^{n_{op}}}} \quad \text{Gleichung 20}$$

$E_{max}$ : Maximale Antwort des Systems, definiert als Maximaleffekt in Anwesenheit von 100  $\mu$ M ACh

[AB]: Konzentration des Hybridliganden

$\tau_{dyn}$ : dynamischer Transduktionskoeffizient des Liganden

$n_{op}$  „transducer slope“

$K_A$  Affinität des Liganden in der aktiven Bindungspose

$K_B$  Affinität des Liganden in der inaktiven Bindungspose

Zur Analyse der [<sup>3</sup>H]NMS-Bindungsdaten (KEK3) der Hybridliganden wurde das durch Gleichung 17 beschriebene „*Model of bivalent ligand binding to the orthosteric and allosteric site*“ (nach May et al. 2007b) verwendet.

Um die Anzahl der Variablen in der neuen globalen Analyse weiter zu reduzieren, wurde in Gleichung 17 der Parameter  $R_T$  durch folgende Gleichung ersetzt:

$$R_T = B_0 \cdot \frac{(K_L - L_{hybrin})}{L_{hybrin}} \quad \text{Gleichung 21}$$

$B_0$ : spezifische Gleichgewichtsbindung einer fixen Radioligand-Konzentration in Abwesenheit eines Hybridliganden [AB]

$K_L$ : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS

Als finale Komponente diente die Analyse der Bindungsdaten der allosterischen Fragmente (KEK4). Als Grundlage hierzu diente das allosterische ternäre Komplexmodell (May et al. 2007b; Antony et al. 2009; Bock et al. 2014a), welches mit folgender Gleichung eingefügt wurde:

$$Y = B_0 \frac{(1 + K_L \cdot [L_{frag:n}]) (1 + \alpha'_{frag} \cdot (K_B \cdot [B])^{n_{frag}})}{1 + (K_B \cdot [B])^{n_{frag}} + K_L \cdot [L_{frag:n}] (1 + \alpha'_{frag} \cdot (K_B \cdot [B])^{n_{frag}})} \quad \text{Gleichung 22}$$

$B_0$ : spezifische Gleichgewichtsbindung einer fixen Konzentration des Radioliganden in Abwesenheit eines allosterischen Fragments B

$K_B$ : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des allosterischen Fragments am freien Rezeptor

$\alpha'_{frag}$ : Kooperativitätsfaktor der Interaktion zwischen dem allosterischen Fragment B und dem Radioliganden L am Rezeptor

$L_{frag:n}$ : Konzentration des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS in Gleichgewichtsbindungsexperimenten zur Charakterisierung der allosterischen Fragmente

$n_{frag}$ : ein Steigungsfaktor, der die Steilheit der Kurve beschreibt

Um den Mechanismus des partiellen Agonismus noch weiter aufzudecken, wurde eine weitere Analyse entwickelt, die einen Parameter für die systemunabhängige, maximale intrinsische Aktivität des dynamischen Hybridliganden liefern soll. Dafür wurde der Parameter  $\tau_{dyn}$  in Gleichung 20 wie folgt aufgelöst:

$$\tau_{dyn} = \tau_{max} \cdot \frac{K_B}{K_A + K_B} = \frac{\varepsilon_{max} \cdot R_T}{K_E} \cdot \frac{K_B}{K_A + K_B} \quad \text{Gleichung 23}$$

$\tau_{dyn}$ : dynamischer Transduktionskoeffizient

$\tau_{max}$ : maximaler Transduktionskoeffizient des dynamischen Hybridliganden bei 100%iger Besetzung der Rezeptoren in der aktiven (dualsterischen) Pose

$\varepsilon_{max}$ : system-unabhängige maximale intrinsische Aktivität des dynamischen Hybridliganden bei 100% iger Besetzung der Rezeptoren in der aktiven (dualsterischen) Pose

Das Ersetzen von  $\tau_{dyn}$  in Gleichung 20 durch die Gleichung 23 ergibt

$$E = \frac{E_{max}}{1 + \frac{([AB] + \frac{K_A \cdot K_B}{K_A + K_B})^{n_{op}}}{[AB]^{n_{op}} \cdot (\frac{\varepsilon_{max} \cdot R_T}{K_E} \cdot \frac{K_B}{K_A + K_B})}} \quad \text{Gleichung 24}$$

Während der globalen Analyse wurden der Quotient  $R_T/K_E$  als eine einzelne Variable betrachtet und auf einen Wert von 1 festgesetzt, um die Rezeptorreserve darzustellen. Durch dieses Vorgehen konnte der Parameter  $\varepsilon_{max}^*$  berechnet werden, der ein Parameter ist, welcher in der Abwesenheit einer Rezeptorreserve  $\varepsilon_{max}$  entspricht.

#### Berechnung der Fraktionellen Rezeptorbesetzung

Nach Bestimmung der beiden Dissoziationskonstanten  $K_A$  und  $K_B$  mit Hilfe der unterschiedlichen Analysen, wurden im nächsten Schritt die fraktionellen Größen der aktiven und der inaktiven Rezeptorpopulation bestimmt (vgl. Abb. 3.5). Das Verhältnis zwischen aktiver und inaktiver Bindungsorientierung der Hybride wurde mit folgender Formel berechnet (Bock et al. 2014a; Bock et al. 2014b; Chen, Klöckner und Holze et al. 2015):

Gesamtbindung:

$$Y_{tot} = \frac{[AB] \cdot R_T}{[AB] + K_{obs}} \quad \text{mit} \quad K_{obs} = \frac{K_A \cdot K_B}{K_A + K_B} \quad \text{Gleichung 25}$$

Fraktionelle Rezeptorbesetzung in der aktiven Pose:

$$Y_{RAB} = \frac{f_{RAB} \cdot [AB] \cdot R_T}{[AB] + K_{obs}} \quad \text{mit} \quad f_{RAB} = \frac{K_B}{K_A + K_B} \quad \text{Gleichung 26}$$

Fraktionelle Rezeptorbesetzung in der inaktiven Pose:

$$Y_{ABR} = \frac{f_{ABR} \cdot [AB] \cdot R_T}{[AB] + K_{obs}} \quad \text{mit} \quad f_{ABR} = \frac{K_A}{K_A + K_B} \quad \text{Gleichung 27}$$

$K_{obs}$ : beobachtete Gleichgewichtsdissoziationskonstante der dualsterischen Hybridliganden unabhängig von deren Orientierung

$f_{RAB}$ : Maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung von [AB] in der aktiven Pose.

$f_{ABR}$ : Maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung von [AB] in der inaktiven Pose

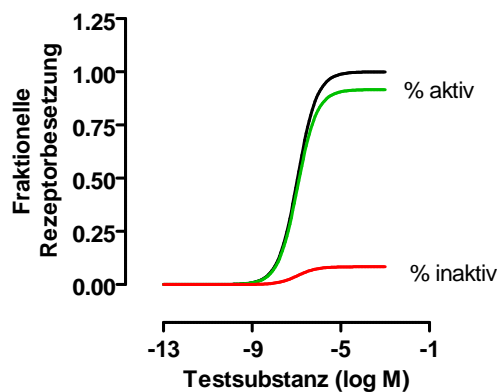


Abbildung 3. 5: Beispielhafte graphische Darstellung des Ergebnisses der Berechnung der maximalen fraktionellen Rezeptorbesetzung für die zwei möglichen Rezeptororientierungen der dualsterischen Hybridliganden auf Basis des zur Datenanalyse verwendeten Modells. Für weitere Informationen, vgl. Text.

Die relative Fraktion der aktiven gegenüber der inaktiven Rezeptororientierung eines Hybrides wird durch die Berechnung des Verhältnisses zwischen aktiver und inaktiver Bindungspose ( $R_{pose}$ ) bestimmt:

$$R_{pose} = -\log\left(\frac{K_A}{K_B}\right)$$



*Gleichung 28*

$R_{pose}$ : Verhältnis von aktiver und inaktiver Bindungspose

$K_A$ : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des dualsterischen Hybridliganden in der aktiven Pose

$K_B$ : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des dualsterischen Hybridliganden in der inaktiven Pose

#### Versuchsdurchführung von Kompetitions-Experimenten:

Die meisten der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Wettbewerbsexperimente wurden an ganzen, lebenden CHO-Zellen durchgeführt, ein kleiner Teil jedoch auch an Membranhomogenaten aus diesen CHO-Zellen. Bei der Verwendung des Vollagonisten [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo wurden ausschließlich Zellhomogenate verwendet, da es bei Verwendung eines Agonisten schnell zu Internalisierung der Rezeptoren auf der Zelloberfläche kommt (Maloteaux und Hermans 1994). Bindungsexperimente, die mit den entsprechenden rezeptorhaltigen Membranhomogenaten durchgeführt wurden, wurden bei 30°C in HEPES-Puffer (L9) durchgeführt. Bei Verwendung ganzer Zellen wurden die Versuche bei 28°C in HBSS + Hepes-Puffer (20mM)(L14), welcher ebenfalls in vielen funktionellen Experimenten verwendet wurde, durchgeführt. Alle Reaktionsansätze (vgl. Tab. 3.2 und 3.3) enthielten entweder den orthosterischen Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]NMS oder [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo (vgl. Tab. 3.1). Die Kompetitoren NMS und Iperoxo oder die Testsubstanz wurden in zunehmender Konzentration zu den Reaktionsansätzen hinzugefügt. Die Gesamtbindung des jeweiligen Radioliganden, die sich aus der spezifischen und unspezifischen Bindung zusammensetzt, wurde in einem Reaktionsgefäß in Abwesenheit eines Kompetitors ermittelt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung des Radioliganden wurde im Fall des Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]NMS, der strukturverschiedene muskarinische Antagonist Atropin eingesetzt, im Fall von [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo der orthosterische muskarinische Agonist Carbachol. Die Endkonzentration der jeweiligen Substanzen betrug jeweils 10  $\mu\text{M}$  im Reaktionsansatz. Zur Einstellung des

Bindungsgleichgewichtes wurden die Proben für drei bis acht Stunden bei 28°C (lebende Zellen) bzw. 30°C (Membranhomogenate) inkubiert.

Zelllinie/ Rezeptor	Radioligand	Radioligandkonzentration
CHO- <i>hM</i> <sub>1</sub> - <i>hM</i> <sub>5</sub> -wt	[ <sup>3</sup> H]NMS	0,2 nM
CHO-Flp- <i>hM</i> <sub>1</sub> -wt	[ <sup>3</sup> H]NMS	0,2 nM
CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>106</sup> Tyr Ala	[ <sup>3</sup> H]NMS	0,2 nM, 1 nM, 2 nM
CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	[ <sup>3</sup> H]NMS	0,2 nM
CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	[ <sup>3</sup> H]NMS	0,2 nM
CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	[ <sup>3</sup> H]NMS	0,2 nM
CHO- <i>hM</i> <sub>1</sub> -wt	[ <sup>3</sup> H]Iperoxo	0,2 nM
CHO- <i>hM</i> <sub>2</sub> -wt	[ <sup>3</sup> H]Iperoxo	1,0 nM

Tabelle 3. 1: Tabellarische Übersicht über die verwendeten Radioligand-Konzentrationen.

Volumen [μl]	Zugegebene Lösung	Konzentration im Versuchsansatz
50 oder 50	[ <sup>3</sup> H]NMS in <i>Aqua destillata</i> (R2)	0,2 nM oder 2 nM
50	[ <sup>3</sup> H]Iperoxo in <i>Aqua destillata</i> (R2)	0,2 nM oder 1nM
50 oder 50 oder 50 oder 50	<i>Aqua pro analysi</i> (R3) (Gesamtbindung)  Atropin in <i>Aqua pro analysi</i> (R3)  NMS-Verdünnungsreihe in <i>Aqua pro analysi</i> (R3)  Iperoxo-Verdünnungsreihe in <i>Aqua pro analysi</i> (R3)	10 μM  1/10 der zugegebenen Konzentration  1/10 der zugegebenen Konzentration

<b>oder</b> <b>50</b>	Testsubstanz-Verdünnungsreihe in <i>Aqua pro analysi</i> (R3)	1/10 der zugegebenen Konzentration
<b>300</b>	Inkubationspuffer (L9)	HEPES-Puffer (L9)
<b>100</b>	Membransuspension in Puffer (L9)	10-40 µg Protein/Vertiefung
<b>500</b>	Gesamtvolumen	

Tabelle 3. 2: Pipettierschema für ein an Membranhomogenaten durchgeführtes Konkurrenzexperiment.

Volumen [µl]	Zugegebene Lösung	Konzentration im Versuchsansatz
<b>50</b>	[ <sup>3</sup> H]NMS in HBSS + Hepes (20mM)-Puffer (L14)	0,2 nM oder 2 nM
<b>50</b>  <b>oder</b> <b>50</b>  <b>oder</b> <b>50</b>  <b>oder</b> <b>50</b>	HBSS + Hepes (20mM)-Puffer (L14) (Gesamtbindung)  Atropin in HBSS + Hepes (20mM)-Puffer (L14) (unspezifische Bindung)  NMS-Verdünnungsreihe in HBSS + Hepes (20mM)- Puffer (L14)  Testsubstanz-Verdünnungsreihe in HBSS + Hepes (20mM)- Puffer (L14)	10 µM  1/10 der zugegebenen Konzentration
<b>300</b>	Inkubationspuffer (L14)	HBSS + Hepes (20mM)-Puffer (L14)
<b>100</b>	Zellen in HBSS-Puffer (L14)	75.000 – 100.000 Zellen/ Vertiefung
<b>500</b>	Gesamtvolumen	

Tabelle 3. 3: Pipettierschema für ein an lebenden, intakten CHO-Zellen durchgeführtes Konkurrenzexperiment.

Nach der Inkubation erfolgte die Filtration zur Abtrennung der gebildeten Radioligand-Rezeptor-Komplexe mit Hilfe eines Tomtec<sup>®</sup>-Harvester (G38)(vgl. 3.2.1).



#### *3.2.4.2.1 Heterologe Konkurrenzexperimente mit Acetylcholin und [<sup>3</sup>H]NMS in An- und Abwesenheit eines Allosters*

Neben den bereits beschriebenen heterologen Interaktionsexperimenten, bei denen die verwendeten CHO-Zellen/Membranhomogenate mit einer konstanten Konzentration [<sup>3</sup>H]NMS/[<sup>3</sup>H]Iperoxo und steigenden Konzentrationen einer Testsubstanz inkubiert wurden, wurden auch heterologe Konkurrenzexperimente mit [<sup>3</sup>H]NMS als Radioligand und mit Acetylcholin als Kompetitor in An- und Abwesenheit einer Testsubstanz (allosterisches Fragment) durchgeführt. Ziel dieser Versuche war es, die Wirkung des verwendeten allosterischen Fragments auf die Bindung des Agonisten Acetylcholin (ACh) zu bestimmen und einen möglichen PAM-Effekt aufzudecken.

In heterologen Konkurrenzexperimenten mit Acetylcholin und [<sup>3</sup>H]NMS in An- und Abwesenheit eines allosterischen Modulators wurden auf Grund einer zu befürchtenden Rezeptorinternalisierung nur Membranhomogenate verwendet. Durch die in Kapitel 3.2.4.2 (Bindungsverhalten von orthosterischen Liganden) beschriebenen experimentellen Gegebenheiten wurde ein Überschuss Guanosin-5'-triphosphat (GTP) (R18) (0,2 mM) zugesetzt, damit die Rezeptoren von ihrem G Protein entkoppelt vorlagen (vgl. 3.2.4.2).

#### Durchführung:

Die Komponenten wurden gemäß der in Tabelle 3.4 aufgeführten Reihenfolge in eine 96-well Platte (V25) pipettiert. Der Ansatz wurde vorsichtig durchmischt und in einem Schüttelwasserbad bei 30 °C inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde die Bindungsreaktion durch Filtration des Versuchsansatzes wie unter 3.2.1 beschrieben beendet.

Volumen [µl]	Zugegebene Lösung	Konzentration im Versuchsansatz
50	[ <sup>3</sup> H]NMS in <i>Aqua pro analysi</i> (R3)	0,2 nM oder 2 nM
50 oder 50 oder 50	<i>Aqua pro analysi</i> (R3) (Gesamtbindung)  Atropin in <i>Aqua pro analysi</i> (R3) (unspezifische Bindung)  Testsubstanz-Verdünnungsreihe in <i>Aqua pro analysi</i> (R3)	  10 µM  1/10 der zugegebenen Konzentration
50	Acetylcholin in <i>Aqua pro analysi</i> (R3)	verschiedene Konzentrationen
50	GTP in <i>Aqua pro analysi</i> (R3)	0,2 mM
250	Inkubationspuffer (L9)	HEPES-Puffer (L9)
100	Membransuspension in Puffer (L9)	10-40 µg Protein/Vertiefung
500	Gesamtvolumen	

**Tabelle 3. 4: Pipettierschema eines heterologen Konkurrenzexperimentes mit Acetylcholin und [<sup>3</sup>H]NMS in An- und Abwesenheit eines allosterischen Modulators durchgeführt an Membranhomogenaten.**

### 3.2.5 Kinetische Experimente

Kinetische Experimente, im Speziellen Dissoziationsexperimente, unterschieden sich zu den bereits beschriebenen Konkurrenzexperimenten durch den Verzicht auf eine Gleichgewichtsbedingung bezüglich der Radioligandbindung. Diese Art Experimente dienen zum einen der Beschreibung des zeitlichen Zerfalls der zu untersuchenden Radioorthoster-Rezeptor-Komplexe, zum anderen bieten sie eine Möglichkeit den Einfluss einer allosterischen Substanz auf den mit einem Orthoster-besetzten Rezeptor in Abhängigkeit von der Zeit zu betrachten. Wie im vorherigen Abschnitt bereits erwähnt, sind allosterische Liganden in der Lage sowohl die Assoziation als auch die Dissoziation eines orthosterischen Liganden an seinen Rezeptor zu hemmen, bzw. zu verzögern. Eine Hemmung der Assoziation durch eine allosterische Testsubstanz kann formal anmuten wie ein kompetitiver Antagonismus, wohingegen z.B. eine Verzögerung der Dissoziation des orthosterischen Liganden durch eine allosterische Testsubstanz ein eindeutiger Hinweis auf dessen allosterische, d.h. von der orthosterischen Bindungsstelle verschiedene Interaktionstopographie der zu untersuchenden Substanz ist (Kostenis und Mohr 1996).

### 3.2.5.1 Komplette Dissoziation

In einem Dissoziationsexperiment kommt es zum Startzeitpunkt durch die Zugabe eines ca. 1000-fachen Überschusses eines nicht markierten orthosterischen Kompetitors zur Unterbindung der Radioligand-Rezeptor-Reassoziaton, wodurch die Geschwindigkeit der Dissoziation der Radioligand-Rezeptor-Komplexe ermittelt werden kann. Die Kinetik einer Dissoziation lässt sich mit Hilfe einer Reaktion erster Ordnung beschreiben:

$$\frac{d[RL]}{dt} = -k_{-1} \cdot [RL] \quad \text{Gleichung 29}$$

Wie es oft für Zerfallsprozesse charakteristisch ist, lässt sich auch der zeitabhängige Zerfall der Ligand-Rezeptor-Komplexe durch eine monoexponentielle Zerfallsfunktion charakterisieren. Durch Integration von Gleichung 29 ergibt sich:

$$[RL]_t = [RL]_0 \cdot e^{-k_{-1} \cdot t} + u \quad \text{Gleichung 30}$$

- [RL]<sub>t</sub>: Gesamtbindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t=0  
 [RL]: Spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt t=0  
 u: unspezifische Bindung des Radioliganden

Mit Hilfe der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  ist die Ermittlung der Halbwertszeit der Dissoziation  $t_{1/2Diss}$  möglich. Diese Halbwertszeit gibt an, in welcher Zeit die Konzentration der Radioligand-Rezeptor-Komplexe auf die Hälfte des Ausgangswertes abgesunken ist und lässt sich wie folgt berechnen:

$$t_{1/2Diss} = \frac{\ln 2}{k_{-1}} \quad \text{Gleichung 31}$$

#### Durchführung

Die Durchführung vollständiger Dissoziationsexperimente erfolgte mit ganzen, lebenden CHO-Zellen jeweils in einer Vierfachbestimmung nach einem „reverse time protocol“ (Hulme und Birdsall 1992). In alle Reaktionsansätze wurde der Radioligand [<sup>3</sup>H]NMS und der Inkubationspuffer (L14) gemäß

dem Pipettierschema vorgelegt (vgl. Tabelle 3.5). Nach Zugabe der Zellsuspension, erfolgte eine Inkubation der Proben für 45 Minuten bei 28°C. Anschließend wurde die Dissoziation zu verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von Atropin im Überschuss (10 µM im Ansatz) gestartet. Die Gesamtbindung, d.h. die Bindung ohne Atropin und die unspezifische Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS, d.h. Zugabe des Atropins vor der des Radioliganden, wurden analog ermittelt. Nach Beendigung der Reaktionszeit in allen Versuchsansätzen wurden die Proben mit Hilfe eines Tomtec-Harvesters (G38) abfiltriert (vgl. 3.2.1).

Volumen [µl]	Zugegebene Lösung	Konzentration im Versuchsansatz
50	[ <sup>3</sup> H]NMS in HBSS+Hepes (20mM)-Puffer (L14)	2 nM
50 oder 50	HBSS+Hepes (20mM)-Puffer (L14) (Gesamtbindung)	
	Atropin in HBSS+Hepes (20mM)-Puffer (L14) (unspezifische Bindung)	10 µM
300	Inkubationspuffer	HBSS+Hepes (20mM)-Puffer (L14)
100	Zellen in HBSS+Hepes (20mM)-Puffer (L14)	75.000 Zellen/ Vertiefung
500	Gesamtvolumen	

**Tabelle 3. 5: Pipettierschema zur Durchführung eines kompletten Dissoziationsexperimentes unter Verwendung von ganzen, intakten lebenden CHO-Zellen.**

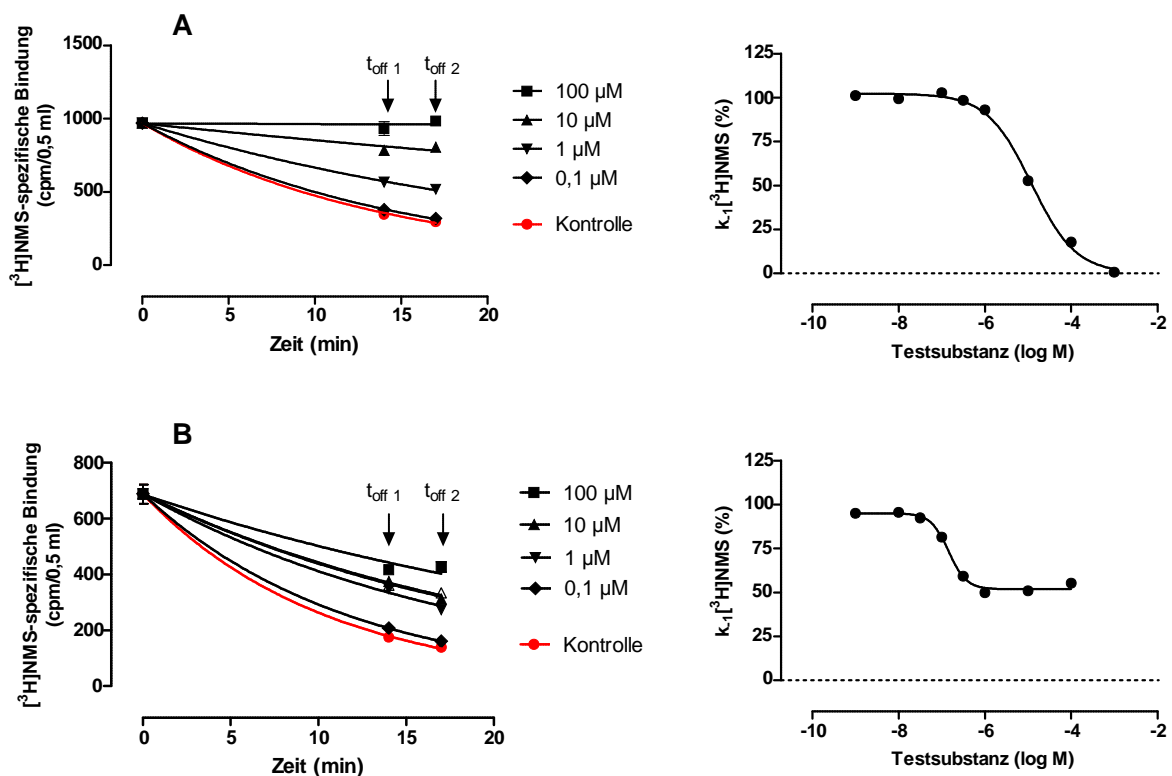
### Auswertung

Zur Auswertung der kompletten Dissoziation wurde die spezifische Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS in Abhängigkeit von der Zeit (min) aufgetragen. Durch Ermittlung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_1$  konnte anhand der monoexponentiellen Zerfallsfunktion (Gleichung 30) die Dissoziationshalbwertszeit des Radioliganden von den Rezeptoren der Expressionssysteme ermittelt werden.

Mittels eines F-Tests wurde überprüft, ob die Dissoziationsdaten der Dissoziationskurve signifikant besser durch eine monophasische oder durch eine biphasische Exponentialfunktion beschrieben werden konnten.

### 3.2.5.2 „Drei-Punkt“-Kinetik

Ein besonderes Verfahren mit dessen Hilfe der Effekt allosterischer Testsubstanzen auf die Dissoziation des orthosterischen Radioliganden untersucht werden kann, stellt die sogenannte „Zwei-Punkt“-Kinetik dar. Bei dieser Methode wird die Bindung des Radioliganden im Versuch zum Zeitpunkt  $t = 0$  und zu einem weiteren Zeitpunkt  $t = t_{\text{off}1}$  gemessen. Der zweite Messzeitpunkt entspricht etwa dem 1,5 fachen der Halbwertszeit des Radioliganden am zu untersuchenden Rezeptor. Dieses erstmals von Kostenis und Mohr (1996) beschriebene Versuchsprotokoll, besitzt Vorteile gegenüber der Untersuchung kompletter Dissoziationsverläufe. Dabei stechen ein geringerer experimenteller Aufwand sowie ein höherer Versuchsdurchsatz hervor (Kostenis und Mohr 1996). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur genaueren Betrachtung des Dissoziationsverlaufes ein zusätzlicher Zeitpunkt gewählt, der bei dem ca. 1,2 fachen der Kontrollhalbwertszeit des Radioliganden lag ( $t_{\text{off}2}$ ). Die Voraussetzung der Anwendbarkeit dieses Versuchsprotokolls ist eine monoexponentiell verlaufende Dissoziation des Radioliganden. Die zu den beiden Zeitpunkten  $t_{\text{off}1}$  und  $t_{\text{off}2}$  (vgl. Tab. 3.6) ermittelte Radioligandbindung erfolgte sowohl in Anwesenheit einer allosterischen Testsubstanz als auch unter Kontrollbedingungen.



**Abbildung 3. 6:** Beispielhafte graphische Darstellung des Ergebnisses und der Auswertung zweier Experimente, die als „Drei-Punkt“-Kinetik an lebenden, intakten CHO-Zellen oder Membranhomogenaten durchgeführt wurde. (A) Die allosterische Testsubstanz führt in der höchst eingesetzten Konzentration zu einer vollständigen Dissoziationsverzögerung. (B) Die allosterische Testsubstanz führt nicht zu einer vollständigen Hemmung der  $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation. Für weitere Informationen, vgl. Text.

Durch eine Computer-gestützte Analyse kann aus einem solchen Experiment zum einen die Halbwertszeit der Radioliganddissoziation in Ab- und Anwesenheit der verschiedenen Testsubstanzkonzentrationen, zum anderen auch die jeweilige Geschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  der Dissoziation ermittelt werden. Um eine Aussage über die Affinität der zu untersuchenden Substanzen zum [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten Rezeptor treffen zu können, wurden deren  $k_{-1}$ -Werte auf den im jeweiligen Experiment ermittelten Kontrollwert prozentualisiert der in Abwesenheit einer Testsubstanz bestimmt wurde. Die derart ermittelten Prozentwerte wurden im zweiten Schritt gegen die eingesetzten Konzentrationen der Testsubstanz aufgetragen und ergeben nach Analyse mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) eine sigmoidale Kurve. Der Wendepunkt der Kurve ( $\text{EC}_{0,5, \text{Diss.}}$ -Wert), kann, unter der Voraussetzung, dass die Bindung der Testsubstanzen 1:1 in einen Effekt umgewandelt wird, als Bindungskonstante des allosterischen Modulators zu [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten Rezeptoren aufgefasst werden.

Auch bei diesem Versuchsprotokoll wurde zur Verhinderung der Reassoziationsstrukturverschiedener, nicht radioaktiv markierter, kompetitiver Antagonist im Überschuss zugegeben.

Ergaben die durchgeführten „Drei-Punkt“-Experimente, dass die Testsubstanz die Geschwindigkeit der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Rezeptorinteraktion veränderte, so musste bei der Durchführung von Gleichgewichtsbindungsexperimenten darauf geachtet werden, dass die Inkubationszeit jeweils angepasst wurde. Dies war besonders bei allosterischen Modulatoren, Hybridsubstanzen sowie bei deren allosterischen Fragmenten der Fall. Mit Hilfe des ermittelten  $\text{EC}_{0,5, \text{Diss.}}$ -Wertes ließ sich nach einer Gleichung von (Lazareno und Birdsall 1995) die Inkubationszeit bis zur Einstellung des Reaktionsgleichgewichts errechnen. Erreicht die  $k_{-1}$ -Kurve in Gegenwart eines Modulators das untere Plateau von  $k_{-1} = 0$  (vgl. Abb. 3.6 (A), rechtes Panel), so ist die benötigte Inkubationszeit  $t = 5 \cdot t_{0,5\text{obs}}$

mit:

$$t_{0,5\text{obs}} = t_{0,5\text{off}} \cdot \left( 1 + \frac{[A]}{\text{EC}_{0,5\text{Diss}}} \right) \quad \text{Gleichung 32}$$

---

$t_{0,5obs}$ :	Halbwertszeit der Dissoziation des Radioliganden in Anwesenheit der Modulatorkonzentration [A]
$t_{0,5off}$ :	Halbwertszeit der Dissoziation des Radioliganden unter Kontrollbedingungen (ohne Modulator)
[A]:	eingesetzte Konzentration des Modulators
$EC_{0,5, Diss}$ :	Konzentration des Modulators, bei der die Dissoziation des Radioliganden halbmaximal verzögert ist

Bei einigen der untersuchten allosterischen Modulatoren, oder den allosterischen Fragmenten kam es vor, dass das untere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve für die Verminderung der Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  der [ $^3$ H]NMS Dissoziation signifikant unterschiedlich von Null war (vgl. Abb. 3.6 (B)), und damit die Anwendung der Gleichung 32 (nach Lazareno und Birdsall 1995) nicht möglich war. In diesen Fällen wurde die Inkubationszeit so berechnet, dass der das untere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve definierende Kurvenwert in Prozent  $k_1$  umgerechnet wurde in ein Vielfaches von  $t_{1/2}$ , das danach mit dem Faktor fünf zur Ermittlung von  $t_{0,5obs}$  multipliziert wurde.

#### Durchführung:

Die Durchführung der „Drei-Punkt“-Kinetik erfolgte mit ganzen, lebenden CHO-Zellen. Die Durchführung der Versuche erforderte zwei getrennte Arbeitsschritte:

- 1.) In eine 96-well-Testplatte (V25) wurden die Testsubstanz (für die Bestimmung der Gesamtbindung Puffer) und Atropin (für die Bestimmung der unspezifischen Bindung) gemäß dem untenstehenden Pipettierschema (vgl. Tab. 3.7) vorgelegt.
- 2.) In 50 ml Falcon Reaktionsgefäßen (V16) wurden zwei Suspensionen („*Mastermix*“ genannt) bestehend aus einem Vielfachen an Radioligand und CHO-M<sub>1</sub>-Zellen/Homogenat zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten für 45 min im Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 400 µl des jeweiligen Mastermixes (vgl. Tab. 3.7) möglichst schnell in die präparierte Platte gegeben. Nach der berechneten Inkubationszeit (vgl. Tab. 3.6) wurde der gesamte Ansatz mit Hilfe eines Tomtec-Harvesters (G38) filtriert um die Zell- bzw. membrangebundene Radioaktivität zu quantifizieren (vgl. Tab. 3.8).

Rezeptor	$t_0$	$t_{\text{off},1}$	$t_{\text{off},2}$
<i>hM<sub>1</sub></i> -wt	0 min	14 min	17 min
Flp- <i>hM<sub>1</sub></i> -wt	0 min	14 min	17 min
Flp- <i>M<sub>1</sub><sup>179</sup></i> Tyr Ala	0 min	14 min	17 min
Flp- <i>M<sub>1</sub><sup>400</sup></i> Trp Ala	0 min	29 min	33 min
Flp- <i>M<sub>1</sub><sup>401</sup></i> Glu Ala	0 min	29 min	33 min

Tabelle 3. 6: Übersicht über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Inkubationszeiten der durchgeführten „Drei-Punkt“-Kinetiken.

Der Versuchsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Volumen [µl]	Zugegebene Lösung	Konzentration im Versuchsansatz
<b><u>Startlösung</u></b>		
50	HBSS + Hepes (20mM)-Puffer (L14)	
oder		
50	Atropin in HBSS + Hepes (20mM)-Puffer (L14) (unspezifische Bindung)	10 µM
oder		
50	Alloster-Verdünnungsreihe in HBSS + Hepes (20mM)-Puffer (L14)	1/10 der zugegebenen Konzentration
<b><u>[<sup>3</sup>H]NMS-Rezeptor-Komplex-Bildung</u></b>		
50	[ <sup>3</sup> H]NMS in HBSS + Hepes (20mM)-Puffer (L14) /	2 nM
300	Inkubationspuffer (L14)	
100	Zellen in HBSS + Hepes (20mM)-Puffer (L14)	75000 Zellen/ Vertiefung
500	Gesamtvolumen	

Tabelle 3. 7: Pipettierschema zur Durchführung einer „Drei-Punkt-Kinetik“ zur Erfassung des Einflusses allosterischer Fragmente /Modulatoren/Hybride auf die [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung.



Zeitpunkt	Durchführung
<b>0 min</b> <b>Master Mix1</b>	Start der Vorinkubation der Radioligand-Rezeptor-Komplexe ( <i>Master Mix1</i> )
<b>3 min</b> <b>Master Mix2</b>	Start der Vorinkubation der Radioligand-Rezeptor-Komplexe ( <i>Master Mix2</i> )
<b>45 min</b>	Zugabe des Master Mix 1 in die mit Atropin und allosterischem Modulator vorbereiteten Vertiefungen
<b>45 min + 3min</b>	Zugabe des Master Mix 2 in die mit Atropin und allosterischem Modulator vorbereiteten Vertiefungen
<b>45min + <math>t_{\text{off},1}/t_{\text{off},2}</math> min</b>	Filtration

**Tabelle 3. 8: Beispiel für ein Zeitprotokoll einer „Drei-Punkt“-Kinetik.** Master Mix: Mischung aus Zellen/Membran, Radioligand und dem jeweiligen Inkubationspuffer. Die Vorinkubation startet nach der Zusammenführung von Membransuspension/Zellen und Radioligand.

### 3.3 Funktionelle Untersuchungen

Im Feld der GPCR-Forschung existiert gegenwärtig eine große Anzahl von Techniken, die zur Detektion von Rezeptor-Ligand-Interaktionen, Rezeptoraktivierungen sowie der Untersuchung nachgeschalteter Signalwege eingesetzt werden. Mit Hilfe der bereits erläuterten Radioligand-Bindungsuntersuchungen, können Einblicke in die Interaktionen zwischen Ligand und Rezeptor gewonnen werden, die Informationen über Affinität und Bindungsverhalten eines Liganden liefern. Experimente zum Funktionszustand des Rezeptors können darüberhinausgehend einen tieferen Einblick in die Aktivierung des Rezeptors durch die zu untersuchende Substanz bieten. Mit Hilfe eines [<sup>35</sup>S]GTPS S-Bindungsexperimentes beispielsweise, kann die G Protein-Aktivierung als das der Rezeptoraktivierung unmittelbar nachgeschaltete Ereignis direkt gemessen werden; diese Methode ist jedoch besonders zur Untersuchung der G Protein-Aktivierung präferenziell G<sub>i</sub>-gekoppelter Rezeptoren geeignet (Milligan 2003). Weiterhin erlauben es verschiedenste experimentelle Ansätze, sogenannte sekundäre Botenstoffe - wie z.B. zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Inositol-1,4,5 Triphosphat (IP<sub>3</sub>) bzw. Inositol-1-phosphat (IP<sub>1</sub>) oder Ca<sup>2+</sup> nach einer Rezeptoraktivierung intrazellulär zu erfassen und zu quantifizieren. Im Gegensatz zu den aufgezählten Methoden, gibt es heutzutage auch die Möglichkeit, die Auswirkung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen an lebenden Zellen in Echtzeit zu untersuchen. Letzteres ist z.B. mit Hilfe des auf optischer Basis arbeitenden Epic<sup>®</sup>-Biosensor-Systems möglich, das die dynamische Massenumverteilung in der Zelle, z.B. als Antwort auf eine Ligand-Rezeptor-Interaktion zu messen, erlaubt. Einige dieser funktionellen

Experimentalmodelle wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet und sollen im Folgenden näher erläutert werden.

### 3.3.1 [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindung

#### 3.3.1.1 Theoretische Grundlagen, Prinzip der Messung

Zur Charakterisierung der G<sub>i</sub> Protein-Aktivierung durch einen GPCR bieten sich [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsexperimente an. Kommt es durch die Bindung eines Agonisten zu einer Rezeptoraktivierung, führt dies an der  $\alpha$ -Untereinheit des mit dem Rezeptor koppelnden G Proteins zu einem Nukleotidaustausch von GDP gegen GTP (Milligan und Kostenis 2006). Das Nukleotid GTP (Guanosin-5'-triphosphat) überführt dann die heterotrimeren G Proteine in ihren aktiven Zustand, indem es die Dissoziation der  $\beta$ - von der  $\alpha$ -Untereinheit des G Proteins initiiert. Durch die Abspaltung der  $\beta$ -Untereinheit von der  $\alpha$ -Untereinheit kommt es nachfolgend zur Aktivierung unterschiedlichster Signalwege, wobei sowohl die  $\beta$ -Untereinheit, als auch der  $\beta\gamma$ -Komplex, Einfluss auf verschiedene nachgeschaltete Effektoren nehmen kann (Clapham und Neer 1993; Chisari et al. 2009). Eine weitere besondere Eigenschaft der  $\alpha$ -Untereinheit, stellt ihre intrinsische GTPase-Aktivität dar, durch die sie in der Lage ist den terminalen Phosphatrests des GTP zu hydrolysieren und es in GDP zu überführen. Dieser Hydrolyseschritt initiiert dann wiederum eine Reassoziaton der Untereinheiten des G Proteins und somit eine Beendigung der G Protein-Aktivierung mit der Wiederherstellung des inaktiven Ausgangszustandes (Hepler und Gilman 1992). Das Prinzip dieses Versuches ist die Untersuchung der Rezeptoraktivierung auf der Ebene der G Proteine. Durch die Verwendung eines radioaktiv markierten, hydrolyseresistenten GTP-Analogons ist es möglich, diese Aktivierung zu messen (Lazareno 1999). Dieses GTP-Analogon ist durch einen Austausch des Sauerstoffatoms im  $\gamma$ -ständigen Phosphat-Rest der Ribose gegen das radioaktive Schwefelisotop <sup>35</sup>S gekennzeichnet, das irreversibel an die  $\alpha$ -Untereinheit des G Proteins bindet und somit den Angriff der GTPase verhindert (Milligan 2003). Da es sich bei der Bindung von GTP S um eine irreversible Bindung handelt, führt dies unweigerlich zu einer Daueraktivierung des G Proteins. Abhängig von der durch den Liganden induzierten Aktivierung des Rezeptors, kumuliert G Protein gebundenes [<sup>35</sup>S]GTP S dann in der Zellmembran. Auf diese Weise kann die Agonist-abhängige Rezeptoraktivierung konzentrationsabhängig bestimmt werden.

#### 3.3.1.2 Durchführung

Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsexperimente wurden CHO-Membranhomogenate verwendet. Die eingesetzte Membransuspension wurde mit Inkubationspuffer (L9) an den unterschiedlichen Versuchstagen so verdünnt, dass die Endkonzentration 20-40  $\mu$ g Membranprotein pro Vertiefung betrug. Die Radioligand-Lösung wurde auf eine Endkonzentration

von 0,07 nM eingestellt. Der Zusatz von GDP sorgte für eine Hemmung der basalen [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindung in Abwesenheit eines Agonisten und schafft so ein größeres Messfenster für eine Agonist-induzierte [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindung (Hilf et al. 1989; Lazareno et al. 1993). Der Versuchsansatz von 500 µl wurde wie in Tabelle 3.9 aufgeführt in eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen (V25) pipettiert. An jedem Versuchstag wurde eine Dreifachbestimmung jedes Messwertes durchgeführt. Nach der Zugabe von [<sup>35</sup>S]GTP S, betrug die Inkubationszeit im Wasserbad 60 min bei 30°C. Beendet wurde die Reaktion durch Vakuumfiltration des Versuchsansatzes mit Hilfe des Tomtec-Harvesters (G39) (vgl. 3.2.1). Die Menge an auf den Filtern detektierter Radioaktivität war proportional zur Zahl aktivierter -Untereinheiten, wodurch sich einen Aussage über die Rezeptoraktivierung treffen ließ.

	Basale Bindung	Atropin	Testsubstanz	Endkonzentration im Ansatz
[ <sup>35</sup> S]GTP S	50	50	50	0,07 nM
<i>Aqua pro analysii</i> (R3)	50			
Testsubstanzen in <i>Aqua pro analysii</i> (R3)			50	1x10 <sup>-(x+1)</sup> M
Atropin in <i>Aqua pro analysii</i> (R3)		50		10 µM
GDP (in Inkubationspuffer (L9))	50	50	50	0,1 µM
Membran (in Inkubationspuffer (L9))	100	100	100	20-40 µg/ml
Inkubationspuffer (L9)	250	250	250	10 mM
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	<b>500</b>	

Tabelle 3. 9: Pipettierschema zur Durchführung eines [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsexperimentes.

### 3.3.1.3 Auswertung

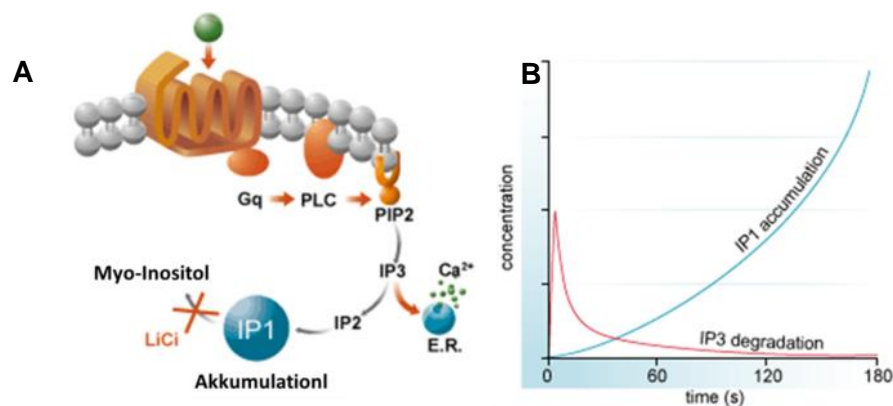
Der dekadische Logarithmus der molaren Konzentrationen der Testsubstanz wurde gegen die im [<sup>35</sup>S]GTP S-Einzelexperiment gemessenen Werte aufgetragen und computergestützt mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Die Effekte der Testsubstanzen wurden auf den Maximaleffekt von Acetylcholin (100 µM = 100 %), das untere Plateau der Kurve auf den Basalwert der Bindung, ein Messwert in Abwesenheit der Testsubstanz (= 0 %) prozentualisiert. Zudem wurde für jede Kurve statistisch geprüft, ob sich der Hill-Koeffizient n<sub>H</sub> und somit die Steilheit der Konzentrations-Effekt-Kurve signifikant von n<sub>H</sub> = 1 unterschied (F-Test, p>0,05)(vgl.3.6.2.2).

Für weiterführende Auswertungen wurden die so prozentualisierten Werte der mit einer Testsubstanz durchgeführten Einzelexperimente arithmetisch gemittelt, um einen Datensatz zu erhalten, der die Summe alle Einzelexperimente darstellt.

### 3.3.2 Inositol-1-phosphat (IP1) Bestimmung

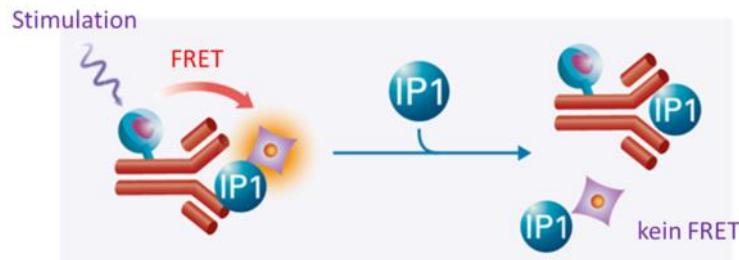
#### 3.3.2.1 Theoretische Grundlagen, Prinzip der Messung

Der IP1 Versuchsansatz diente im Rahmen dieser Arbeit als schnelle und zuverlässige Methode zum Nachweis des sekundären Botenstoffes Inositol-1-phosphat (IP1), einem der wichtigsten Produkte der Phosphatidylinositol-Kaskade, welches hauptsächlich nach der Aktivierung von  $G_q$  Proteinen auftritt. Kommt es zu einer Aktivierung des  $M_1$ -Rezeptors, so kann es zur Aktivierung des Enzyms Phospholipase C ( $PLC\beta$ ) kommen, welche wiederum zur Katalyse des Phosphatidylinositolbisphosphates (PIP2) in Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) führt (Wess et al. 2007). Der Anstieg an IP3 erfolgt in der Regel sehr schnell, gefolgt von einer langsameren linearen Akkumulation von Inositol monophosphat (IP1), eventuell hervorgerufen von einer Dephosphorylierung von IP3 und IP2 und von einer langsamen Hydrolyse von Phosphatidylinositol durch PLC (Berridge und Irvine 1984)(vgl. Abb. 3.7 (B)). Infolgedessen wurde das durch Dephosphorylierung entstandene Inositol-1-Phosphat (IP1) als Nachweis für die über  $G_q$  Proteine vermittelte Zellaktivierung durch  $M_1$ -Rezeptoren herangezogen. Damit es nicht sofort zu einem Abbau des entstandenen IP1 kommt, und eine Messung der IP1-Akkumulation möglich ist, erfolgte die Zugabe von Lithiumchlorid (vgl. Abb. 3.7 (A)).



**Abbildung 3. 7: Funktionsprinzip des Versuchsansatzes zur Bestimmung der IP1-Akkumulation. (A)  $G_q$ -vermittelte Signaltransduktion unter Versuchsbedingungen. (B) Zeitabhängige graphische Darstellung des IP3-Abbaus und der damit verbundenen IP1-Akkumulation.** Der Anstieg von IP3 erfolgt in der Regel relativ schnell. Während des Abbaus von IP3 kommt es zu einer langsamen, fast linearen Akkumulation von IP1. Aus diesem Grund dient Inositol-1-Phosphat (IP1) als Nachweis für diesen Versuch. Weitere Erläuterung im Text. Übernommen von [www.cisbio.com](http://www.cisbio.com).

Das Prinzip des Versuches basiert auf dem Wettbewerb zwischen endogenem IP1, welches von der Zelle nach Agonist Stimulation produziert wurde oder einem IP1-Analagon welches an ein d2-Fluorophor gekoppelt ist (IP1-d2) (Donor) und einem IP1-spezifischen monoklonalen Antikörper, der mit einem Terbium haltigen Farbstoff (Lumi4™-Tb) markiert ist (vgl. Abb. 3.8).

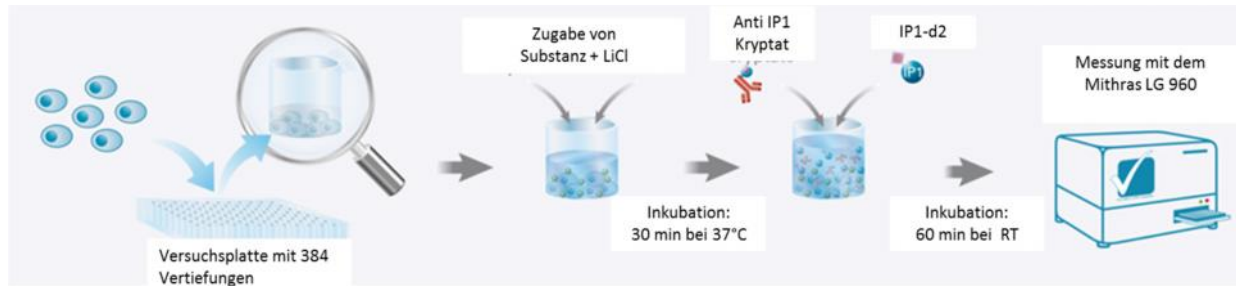


**Abbildung 3. 8: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips einer Inositol-1-phosphat (IP-1) Bestimmung**  
 Weitere Erläuterung im Text. Übernommen von www.cisbio.com.

Der Nachweis von IP1 erfolgt mit Hilfe der homogenen, zeitaufgelösten Fluoreszenz (engl.: *homogenous time resolved fluorescence*, HTRF) gekoppelt mit Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET). Diese spezielle Technologie ist durch eine Energieübertragung zwischen zwei fluorophoren Molekülen gekennzeichnet, wobei der in diesem Versuch verwendete Antikörper durch das enthaltene Terbiumkryptat den Donor und das zugegebene IP1-d2 den Akzeptor darstellt. Bindet der monoklonale Antikörper an das zugegebene IP1-d2, kommt es nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 320 nm zur Aussendung von Energie. Diese wird daraufhin von dem Farbstoffmolekül am IP1-d2 absorbiert und mit Licht einer Wellenlänge von 665 nm emittiert, welche dann mit Hilfe eines Fluoreszenzmessgerätes (Mithras LB 960, G30) gemessen werden kann. Kommt es nach der Aktivierung des M<sub>1</sub>-Rezeptors zu einem Anstieg an endogenem IP1, so führt dies zu einer Verdrängung des d2-gekoppelten IP1 was folglich zu einer Abnahme des gemessenen Fluoreszenzsignals führt. Somit ist das gemessene Signal umgekehrt proportional zur Konzentration des Agonisten.

### 3.3.2.2 Durchführung

Für den IP1-Versuchsansatz (vgl. Tab. 3.10) wurden am Versuchstag Zellen aus laufender Kultur, mit einer Konfluenz von 80-100%, von der Platte (V4) gelöst und auf eine Zellzahl von 100.000 Zellen pro 7 µl eingestellt (vgl. 3.1.2). Zu Beginn des Versuches wurden die Zellen in eine spezielle 384-„well“-Platte (V9) ausgesät, gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation im Inkubator (G22) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Zur Herstellung der Verdünnungsreihen wurde zunächst an jedem Versuchstag frischer Stimulationspuffer (L17) hergestellt. Damit wurden dann die Verdünnungsreihen der zu untersuchenden Substanzen hergestellt. Die eingesetzten Verdünnungen wurden immer in zweifacher höherer Konzentration als im Endansatz vorhanden, angesetzt. Nach Ablauf der 30 Minuten wurden die zuvor frisch hergestellten Substanzverdünnungen (7 µl) zugegeben. Durch kurzes Anfahren der Zentrifugation bis ca. 900 rpm bei Raumtemperatur (Rotor JS 5.3 (G6)) wurden die Lösungen in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte durchmischt. Die anschließende Inkubationszeit betrug 30 min bei 37 °C im Brutschrank (G22).



**Abbildung 3. 9: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung einer 2 Inositol-1-phosphat (IP-1) Bestimmung.** Weitere Erläuterung im Text. Übernommen von [www.cisbio.com](http://www.cisbio.com).

Nach 30 Minuten im Inkubator (G22) wurden den Vertiefungen („wells“) in schneller Abfolge zunächst je 3  $\mu\text{l}$  d2-IP1 und anschließend je 3  $\mu\text{l}$  Terbium-markiertem Antikörper (Lumi4<sup>TM</sup>-Tb) zugesetzt. Nach einer Stunde erreicht das Signal ein Gleichgewicht und ist bei 4°C mehrere Tage stabil. Die Vermessung der Zellplatte im Mithras LB 960 (G30) erfolgte stets eine Stunde nach Antikörperzugabe (vgl. Abb. 3.9). Die dort ermittelten Messwerte stellen einen Quotienten aus den gemessenen Emissionen bei 665 nm und 620 nm dar, welcher im Anschluss mit dem Faktor  $10^4$  multipliziert wurde (vgl. Gleichung 33).

$$\text{Ratio} = \frac{A_{665 \text{ nm}}}{A_{620 \text{ nm}}} \cdot 10^4$$

**Gleichung 33**

A665 nm: Emission des angeregten Akzeptors

A620 nm: Emission des angeregten Donors

Als Negativkontrolle diente ein Ansatz, dem keine Testsubstanz und kein IP1-d2 zugegeben wurden. Durch dieses Vorgehen konnte ermittelt werden, wie viel Signal ohne den verwendeten FRET-Akzeptor (IP1-d2) messbar ist. Die Basalkontrolle enthielt bis auf die Testsubstanz, alle für das Experiment notwendigen Komponenten.

	Normaler Ansatz	Negativkontrolle	Basalkontrolle
<b>Testsubstanz</b> in Stimulations-Puffer (1x)(L17)	7 µl	-	-
<b>CHO-<i>hM<sub>1</sub></i>-wt, Flp-<i>hM<sub>1</sub></i>-wt, Flp-<i>M<sub>1</sub></i>-<sup>179</sup>Tyr Ala;- <sup>400</sup>Trp Ala;-<sup>401</sup>Glu Ala- Zellen</b> 100.000 Zellen/ml	7 µl	7 µl	7 µl
<b>IP1-d2</b> in Lysis-Puffer	3 µl	-	3 µl
<b>Anti-IP1 Kryptat</b> in Lysis-Puffer	3 µl	3 µl	3 µl
<b>Lysis-Puffer</b>	-	7 µl	-
<b>IP1-Puffer</b>	-	7 µl	7 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	20 µl	20 µl	20 µl

Tabelle 3. 10: Pipettierschema zur Durchführung eines IP1-Akkumulationsexperimentes.

### 3.3.2.3 Auswertung

Die Messwerte, die mit Hilfe des Mithras LG 960 (G30) erhoben wurden, stellten den Quotienten aus den gemessenen Emissionen bei 665 nm (Emission Akzeptor) und 620 nm (Emission Donor = interne Referenz) dar. Durch diese ratiometrische Messung von Donor und Akzeptor (US Patent 5527684) können Korrekturen des erhaltenen Ergebnisses durchgeführt werden (vgl. Gleichung 33). Mit Hilfe dieser Methode ist es somit möglich, beispielsweise Unterschiede zwischen verschiedenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte hinsichtlich des Volumens oder der Zellzahl auszugleichen und *Quenching* (engl. *Löschung*)-Effekte zu korrigieren. Der Multiplikationsfaktor 1000 diene lediglich dem Erhalt von ganzen Zahlen.

Der Logarithmus der Konzentrationen der Testsubstanz wurde danach gegen die mit Gleichung 33 ermittelten Werte aufgetragen. Da der IP1-Versuchsansatz auf einer kompetitiven Reaktion basiert, nimmt das Messsignal mit zunehmender IP1-Konzentration ab. Um dem entgegenzuwirken wurde der höchste Messwert auf 0% und der niedrigste Messwert auf 100% prozentualisiert. Für weiterführende Auswertungen wurden die derart prozentualisierten Werte der mit einer Testsubstanz durchgeführten Einzelexperimente arithmetisch gemittelt, um einen Datensatz zu erhalten, der die Summe aller Einzelexperimente darstellt.

### 3.3.3 Bestimmung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP)

#### 3.3.3.1 Theoretische Grundlagen, Prinzip der Messung

Mit Hilfe der Bestimmung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) lässt sich das Ausmaß Agonist-induzierter  $G_s$  Protein-Aktivierung messen. Kommt es nach der Bindung eines Liganden an einen GPCR zu einer Bindung und Aktivierung von  $G_s$  Proteinen, folgt eine Aktivierung der Adenylatcyclase, welche aus Adenosintriphosphat (ATP) zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) herstellt. Der Gehalt an cAMP erlaubt dann einen Rückschluss auf die rezeptorvermittelte Aktivierung von stimulatorischen wirkenden  $G_s$  Proteinen durch die verwendete Testsubstanz. Wie bereits für den IP1-Assay beschrieben, handelt es sich bei der Messung des cAMP-Gehaltes in der vorliegenden Arbeit ebenfalls um einen kompetitiven Immunoassay, dessen Messprinzip auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) beruht. Im diesem Falle konkurriert allerdings das endogen von der Zelle gebildete cAMP zusammen mit dem zugesetzten *dye2* (d2)-markierten cAMP um die Bindung an einen monoklonalen Antikörper, welcher durch eine Europium-Markierung gekennzeichnet ist.

#### 3.3.3.2 Durchführung

Für den cAMP-Assay (vgl. Tab. 3.11) wurden am Versuchstag Zellen in einer Zelldichte von 50.000 Zellen in cAMP-Puffer (L13) eingestellt. Das in diesem Puffer enthaltene 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)(R27) diente zur Hemmung der Phosphodiesterase und verhinderte den Abbau des gebildeten endogenen cAMP in der Zelle. Um dem (potentiell geringen) hemmenden Einfluss etwaig anwesender  $G_i$  Proteine auf die Adenylatcyclase entgegenzuwirken, wurden die Zellen 16-18h vor Versuchsbeginn mit 100 ng/ml PTX (T1) vorbehandelt.

Zu Beginn des Versuches wurden 5  $\mu$ l der Zellsuspension in eine spezielle Mikrotiterplatte mit 384 Vertiefungen (V9) ausgesät, gefolgt von einer kurzen Zentrifugation (10s, bei 900rpm, Raumtemperatur, Rotor JS 5.3, (G6)). Nach einer 30-minütiger Inkubation im Inkubator (G22) bei 37 °C und 5 %  $CO_2$  erfolgte die Zugabe der Testsubstanzen (je 5 $\mu$ l). Die Herstellung der Verdünnungsreihe erfolgte an jedem Versuchstag in frisch hergestelltem cAMP-Puffer (L13) in zweifacher höherer Konzentration als im Endansatz vorhanden. Durch kurzzeitiges zentrifugieren bei ca. 900 rpm bei Raumtemperatur wurden die Lösungen in den Vertiefungen („wells“) durchmischt und die Platte danach erneut bei 37 °C für 30 min inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe von je 5  $\mu$ l des cAMP-d2 und des Europium-markierten Antikörpers, welches zuvor in Lysis-Puffer hergestellt wurde. Die Vermessung der Mikrotiterplatte erfolgte zwei Stunden nach Zugabe von cAMP-d2 und Antikörper. Als Negativkontrolle diente auch hier ein Ansatz, dem keine Testsubstanz und kein cAMP-d2 zugegeben wurde. Die Basalkontrolle enthielt nur cAMP-d2 und den Europium markierten Antikörper.



	Normaler Ansatz	Negativkontrolle	Basalkontrolle
<b>Testsubstanz</b> in cAMP-Puffer (L13)	5 µl	-	-
<b>CHO-<i>hM<sub>1</sub></i>-wt, Flp-<i>hM<sub>1</sub></i>-wt, Flp-<i>M<sub>1</sub></i>-<sup>179</sup>Tyr Ala;-<sup>400</sup>Trp Ala;-<sup>401</sup>Glu Ala-Zellen</b> 50.000 Zellen/ml	5 µl	5 µl	5 µl
<b>cAMP-d2</b> in Lysis-Puffer	5 µl	-	5 µl
<b>Anti-cAMP Kryptat</b> in Lysis-Puffer	5 µl	5 µl	5 µl
<b>Lysis-Puffer</b>	-	5 µl	-
<b>cAMP-Puffer</b>	-	5 µl	5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>20 µl</b>	<b>20 µl</b>

Tabelle 3. 11: Pipettierschema zur Durchführung eines Experimentes zur Bestimmung der cAMP- Akkumulation.

### 3.3.3.3 Auswertung

Aus den Emissionsmessungen bei 665 nm und 620 nm wurde das Verhältnis gebildet und die relative Energietransferrate (Delta F%) ermittelt. Dieser Wert gibt Auskunft über die prozentuale Zunahme des FRET-Signals relativ zur Negativkontrolle. Der Logarithmus der molaren Konzentration der Testsubstanzen wurde anschließend als Funktion gegen die berechneten Delta-F%-Werte aufgetragen.

$$\text{Delta F}\% = \frac{\text{Ratio}_{\text{sample}} - \text{Ratio}_{\text{neg}}}{\text{Ratio}_{\text{neg}}} \cdot 100$$

*Gleichung 34*

Wie im Falle des IP1-Versuchsprotokoll, lagen auch hier die ermittelten Messsignale zunächst invertiert vor. Um dem entgegenzuwirken wurde der höchste Messwert auf 0% und der niedrigste Messwert auf 100% prozentualisiert. Für weiterführende Auswertungen wurden die derart prozentualisierten Werte der mit einer Testsubstanz durchgeführten Einzelexperimente arithmetisch gemittelt, um einen Datensatz zu erhalten, der die Summe alle Einzelexperimente darstellt.

### 3.3.4 Messung der zellulären dynamischen Massenumverteilung (DMR-Messung)

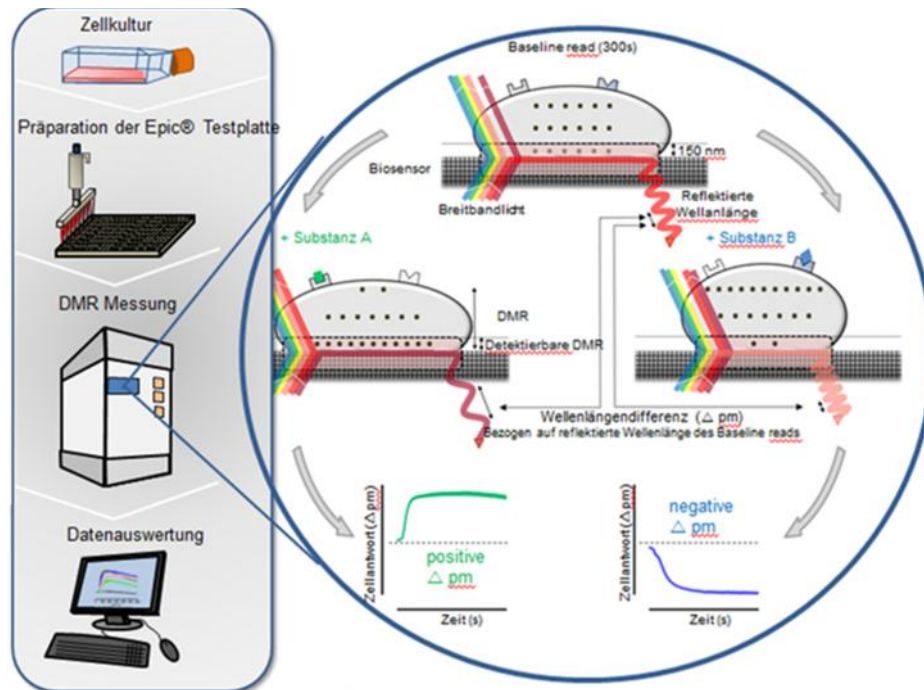
#### 3.3.4.1 Theoretische Grundlagen, Prinzip der Messung

Durch eine Aktivierung von Rezeptoren auf der Zelloberfläche werden intrazellulär räumliche und zeitliche Veränderungen ausgelöst. Diese Umverteilung von Massen führt zu einer Veränderung der optischen Dichte, die als zelluläre dynamische Massenumverteilung („*dynamic mass redistribution*“, DMR) bezeichnet wird. Eine Reihe von Zellreaktionen stehen mit der Massenumverteilung in Beziehung, wie beispielsweise der intrazelluläre Proteintransport („*protein trafficking*“), morphologische Veränderungen, Strukturierung des Zytoskelettes oder auch Rezeptor Internalisierung (Schröder et al. 2011). Mit Hilfe des optisch basierten Epic<sup>®</sup>-Systems, einem nicht-invasiven, Sondenfreien („*label-free*“) Messsystems ist es möglich, Beobachtung von Reaktionen auf pharmakologische Stimuli in Echtzeit und an lebenden Zellen zu detektieren (Fang et al. 2006; Fang et al. 2007).

Auf Grund einer Erneuerung des Epic<sup>®</sup>-Biosensors wurden im Verlaufe dieser Arbeit zwei verschiedene Versionen des Messgerätes verwendet und sollen im weiteren näher erläutert werden.

Alle zu Beginn dieser Arbeit erhobenen DMR-Daten wurden mit dem ersten markteingeführten Model des Epic-Biosensors, Epic<sup>®</sup> Biosensor, -Version, des Herstellers Corning<sup>™</sup> (G13) durchgeführt. Diese -Version des Epic<sup>®</sup>-Systems bestand aus einem vorgelagerten Inkubator, einer Messstation sowie einem automatischen Pipettierroboter, der vor jeder durchgeführten Messung mit neuen Spitzen bestückt wurde. Das Prinzip einer DMR-Messung ist in Abbildung 3.10 dargestellt. Die Unterseite der Messplatte ist mit einem besonderen Biosensor ausgestattet (RWG Sensor, *resonant waveguide grating*), welcher aus einer Glasplatte mit einer integrierten Gitternetzstruktur und einer speziellen Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Beschichtung besteht. Bei der Messung wird nun Breitbandlicht mit Hilfe von 16 parallel geschalteten Lichtkanälen auf je einen 100 µm Durchmesser großen Bereich pro Kavität gestrahlt. Auf Grund des Ausbreitungsbereiches des elektromagnetischen Feldes des eingesetzten Lichtstrahls von etwa 150 nm (Fang et al. 2006), befindet sich das in die Messung eingeschlossene Messfenster nur im unteren Teil der Zelle („*detection zone*“). Je nach optischer Dichte unmittelbar oberhalb des Biosensors, ist dieser in der Lage, die nach Aktivierung des Rezeptors eingetretene Massenumverteilung zu detektieren. Auf Grund einer mit der intrazellulären Umstrukturierung einhergehenden Veränderung der optischen Dichte, kommt es demzufolge zu einer Veränderung des Brechungsindex in der unteren Zellschicht. Wird die Unterseite der Messplatte mit dem polarisiertem Breitbandlicht angestrahlt, wird nun je nach optischer Dichte im Messbereich eine charakteristische Wellenlänge reflektiert und kann vom Detektor gemessen werden. Vor Substanzzugabe erfolgt ein sogenannter „*baseline read*“, bei dem es sich um eine ca. 300 Sekunden andauernde Messung der Ausgangswellenlänge (pm) handelt. Nach Zugabe der zu untersuchenden

Substanzen, erfolgt ungefähr alle 30 Sekunden eine Messung, deren Messwert dann in Bezug zur im Vorfeld ermittelten Ausgangswellenlänge vom Gerät als Differenz =  $\Delta \text{pm}$  errechnet wird.



**Abbildung 3. 10: Prinzip der DMR-Messung.** Modifiziert nach Schröder et al. 2011. Zur Erläuterung der Abbildung wird auf den vorhergehenden Text verwiesen.

Kommt es nun auf Grund einer Rezeptoraktivierung zu einer Erhöhung der optischen Dichte im Messbereich, führt dies zu einer Verschiebung der Wellenlänge in einen positiven Bereich (vgl. Abb. 3.10). Diese Verschiebung lässt sich mit einer langsameren Ausbreitungsgeschwindigkeit und einem damit verbundenen Energieverlust erklären. Die Verringerung der optischen Dichte führt demzufolge zu einem gegenteiligen Effekt und generiert Wellenlängen im negativen Bereich. Je nach verwendeter Zelldichte in der Messplatte oberhalb des Biosensors sowie der verwendeten Zellart, können von Versuch zu Versuch Variationen in der ausgewählten Wellenlänge auftreten, die berücksichtigt werden müssen.

Das „neuere“ Epic-System Epic® BT ALPHA (G14, G25) ist kompatibel mit dem zuvor verwendeten Epic-Biosensor, unterscheidet sich allerdings in der Art und Weise, die Messplatte zu detektieren. Das Epic® BT ALPHA System besitzt anstelle eines Spektrometers ein einfaches CCD-Detektionsmodul und ist damit in der Lage, die gesamte Messplatte innerhalb von 3 Sekunden zu vermessen und nicht wie das Vorgängermodell einzelne Reihen nacheinander. Diese Verbesserung soll eine schnellere Interpretation biologischer Vorgänge erlauben. Ebenfalls erfolgt die Zugabe der Testsubstanz manuell mit Hilfe eines Pipettierroboters (G9, G24). Der Vergleich der mit beiden Geräten erhobenen Messdaten, zeigten keine nennenswerten Unterschiede zwischen den beiden Gerätetypen.

Da es bei der Bindung eines Liganden an einen Rezeptor zu einer Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege kommen kann, stehen verschiedene Substanzen zu Verfügung, die es erlauben, eine differenzierte Betrachtung der Signalwege vorzunehmen. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Pertussistoxin (PTX)(T1) stellt einen direkten Hemmstoff der Funktion von  $G_{i/o}$  Proteinen dar. Durch das Induzieren der Anlagerung von GDP an die G Untereinheit von  $G_i$  Proteinen, verharren diese im ribosylierten inaktiven Zustand. Sie verlieren somit ihre Fähigkeit mit der Adenylylcyclase zu interagieren. Zur näheren Charakterisierung des  $G_q$ -Signalweges wurden die Zellen mit dem  $G_q$ -Inhibitor MH-362-63-08 (T2) (Schrage et al. 2015) in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  vorbehandelt. Der Einsatz dieser Konzentration bewirkte am Cholecystokinin-Rezeptor eine komplette Hemmung der  $G_q$ -vermittelten Rezeptorantwort (Nesterov et al. 2010).

#### **3.3.4.2 Durchführung**

Die Durchführung der DMR-Experimente erfolgte mit Hilfe des von Schröder und Mitarbeitern publizierten Protokolls (Schröder et al. 2011).

Am Vortag der Messung wurden die zuvor kultivierten Zellen gelöst und die Zellsuspension, wie unter 3.1.2 beschrieben, gezählt. Die Zellsuspension mit der erwünschten Zellzahl von 12.500 Zellen/Vertiefung wurde in die Zellplatte (V2) ausgesät. Fand das Experiment ohne den Zusatz von Toxinen statt, so erfolgte die Aussaat der Zellen in einem Volumen von 40  $\mu\text{l}$ . Im Falle einer PTX (T1)-Vorbehandlung hingegen, wurde die gleiche Zellzahl in einem Volumen von 30  $\mu\text{l}$  ausgesät. Etwa 4-6 Stunden nach Aussaat der Zellen, wurden je nach gewünschter G Protein-Inhibition, 10  $\mu\text{l}$  PTX (T1)(400 ng/ml), verdünnt in Medium, in die entsprechenden Kavitäten gegeben, so dass in jeder Kavität eine PTX-Endkonzentration von 100 ng/ml erreicht wurde. Um das mögliche Auftreten von Luftblasen zu vermeiden und eine Adhäsion der Zellen auf dem Boden der Kavität zu garantieren, erfolgte sowohl nach dem Aussähen der Zellen in die EPIC-Platte (V2) sowie nach Zugabe der Toxine ein kurzer Zentrifugationsschritt von 10 s bei 150 x g in einer Beckman Kühlzentrifuge (Rotor JS 5.3) (G6). Im Anschluss wurden die Zellen, bei 37°C und in einer Atmosphäre von 5%  $\text{CO}_2$  und 95% Luftfeuchtigkeit, für 20-24 h im  $\text{CO}_2$  Inkubator (G22) inkubiert. Am zweiten Tag wurden zuerst die Testsubstanzen in einer vierfach höheren Konzentration in entsprechendem Puffer (L14, L15) hergestellt, als es der gewünschten Endkonzentration im Experiment entsprach. Im Anschluss wurde die „source plate“ (V24) mit Aliquota der jeweiligen Testsubstanzen (20-40  $\mu\text{l}$ ) beschickt und vorübergehend bei 3,5 °C im Kühlschrank gelagert. Im zweiten Abschnitt wurden die am Vortag ausgesäten Zellen nach mikroskopischer Überprüfung hinsichtlich Zelldichte und Morphologie zweimal mit entsprechenden Puffer (L14, L15) gewaschen. Dazu wurde zuerst das alte Medium mit Hilfe einer speziellen 16-Kanal-Absaugvorrichtung (G3) entfernt und im Anschluss jede einzelne Kavität vorsichtig mit 2 x 50  $\mu\text{l}$  Puffer (L14, L15) von 37°C gewaschen. Nach den Waschsritten wurde das Endvolumen jeder Kavität auf 30  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Da nach der Verwendung der

Absaugvorrichtung ein definiertes Restvolumen von 10 µl in den einzelnen Kavitäten verbleibt, so erfolgt bei Zugabe des G<sub>q</sub>-Hemmstoffes MH (T2) (10 µl), oder bei Untersuchung eines antagonistischen Effektes von Atropin (10 µl) lediglich ein Endvolumen von 20 µl. Gefolgt wurde dieser Schritt von einer kurzen Zentrifugation bei 900 rpm (197·x g in einem Rotor Typ JS 5.3)(G6) für ca.10 s.

Da die Zellen vor den Messungen mit Hilfe des Epic<sup>®</sup>-Biosensor zunächst zu dessen Aufstellungsort in der Pharmazeutischen Biologie der Universität Bonn, in den Räumlichkeiten der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Evi Kostenis, überführt werden mussten, wurden die Zellen vor dem Transport in einem nicht temperierbaren Sicherheitsbehälter, noch einmal für ca. 10 Minuten bei der für sie physiologischen Umgebungstemperatur von 37 °C inkubiert.

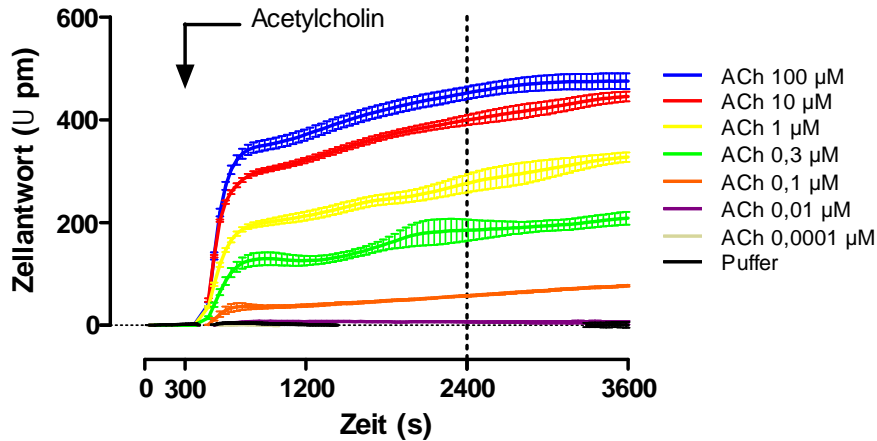
Auf Grund einer Erneuerung des Epic<sup>®</sup>-Biosensors wurden im Verlaufe dieser Arbeit wie bereits erläutert zwei verschiedene Versionen des Messgerätes verwendet.

Bei der Messung mit dem Gerät Epic<sup>®</sup> Biosensor, -Version (G13) wurde sowohl die Testplatte als auch die „*source plate*“ im Inkubator platziert und anschließend bei 28 °C für 1-2 h bis zum Start der Messung inkubiert. Nach anschließendem Start der Messung erfolgte ein kurzer „*baseline read*“, bevor das eigentliche Experiment durch die Zugabe der Testverbindungen gestartet wurde. Die Detektion der dynamischen Massenumverteilung mit dem Epic<sup>®</sup> BT ALPHA (G14) unterschied sich leicht. Die Testplatte wurde für eine Stunde bei 28°C auf die sich in einem Inkubator befindliche Vertiefung auf dem Epic<sup>®</sup>-Gerät platziert. Nach Ablauf einer Stunde, wurde die eigentliche Messung, allerdings ohne die Zugabe von Testsubstanzen, gestartet, um eine Grundlinienmessung („*baseline-read*“) zu veranlassen. Währenddessen wurde in einem benachbarten Inkubator die vorbereitete Substanzplatte („*source plate*“) in den sich dort befindlichen Pipettierroboter CyBi®Selma (G9) platziert und 10 µl der sich dort befindlichen Testsubstanzen aufgezogen. Nach einer Messung der Grundlinie („*baseline read*“) von ca. 4 Minuten wurde die Messung unterbrochen, die Testplatte entnommen und die aufgezogenen Testsubstanzen zugegeben. Unmittelbar im Anschluss, wurde die Testplatte wieder in die Vertiefung auf dem Epic<sup>®</sup> BT ALPHA platziert und die Messung für 75 Minuten fortgeführt.

#### **3.3.4.3 Auswertung**

Durch die Verwendung eines „*Microplate Analyzer v2.0*“ der Firma Corning konnten die Daten geöffnet und verwaltet werden. Die dort tabellarisch angeordneten Rohdaten wurden in das Programm GraphPad Prism version 5.03b for Windows<sup>®</sup> (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) überführt und dort weiter analysiert. Die graphische Darstellung der optischen Signaturen erfolgte in Form von um den der jeweiligen Puffereffekt korrigierten Originalsignaturen, um eine Beurteilung des reinen Effektes zu ermöglichen. In vorherigen Arbeiten konnten unter

anderem Schröder et al. 2011 für  $M_2$  und  $M_3$ -Rezeptoren und Zimmermann (Zimmermann, Masterarbeit 2012) für den  $hM_1$ -Rezeptor, zeigen, dass es keine Abweichung zwischen den verschiedenen Methoden der Ableitung von Konzentrations-Effekt-Kurven aus den Originalsignaturen (Ableitungen nach 1200 s, 2400 s, 3600 s oder der *area under curve* (AUC)) gab. Aus diesem Grund wurde bei positiv gerichteten Signaturen der Ablesezeitpunkt 2400s gewählt (vgl. Abb. 3.11).



**Abbildung 3. 11: Darstellung der Originalsignaturen, beispielhaft für die Acetylcholin-induzierte dynamische Massenumverteilung in  $hM_1$ -CHO-Zellen.** Dargestellt sind Originalsignaturen eines repräsentativen Einzelversuches, der als Vierfachbestimmung durchgeführt wurde (Mittelwert  $\pm$  S.E.M.) Ordinate: Zellantwort: Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern ( pm). Abszisse: Messdauer in Sekunden (s). Aufgetragen ist die Zellantwort steigender Konzentrationen von Acetylcholin. Der Pfeil gibt den Zeitpunkt der Substanzzugabe wieder. Die vertikale gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt nach 2400s, zu dem die ACh-Effekte abgelesen wurden, um Konzentrations-Effekt Kurven zu erstellen. Die Messwerte wurden durch Punkt zu Punkt Linien miteinander verbunden und sind nicht um den Puffereffekt-korrigiert.

Die um den Puffereffekt korrigierten Wellenlängenverschiebungen nach 2400s (vgl. Abb. 3.11) wurden auf den Effekt prozentualisiert, der in Gegenwart von 100  $\mu$ M Acetylcholin, erreicht wurde. Zu diesem Zweck wurde am jeweiligen Versuchstag stets Acetylcholin in einer Konzentration von 100  $\mu$ M zu Kontrollzwecken mitgeführt.

Durch Auftragung der prozentualisierten Zellantwort gegen die Konzentration der Testsubstanzen und einer nachfolgenden nichtlinearen Kurvenanalyse mittels der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung“ (Gleichung 12) wurden Konzentrations-Effekt-Kurven erstellt. Im Idealfall lassen sich diese Datenpunkte durch einen sigmoidalen Kurvenverlauf beschreiben. Für jede Kurve wurde statistisch geprüft, ob sich der Hill-Koeffizient  $n_H$  und somit die Steilheit der Konzentrations-Effekt-Kurve signifikant von  $n_H = 1$  unterschied; außerdem wurde geprüft, ob das obere Plateau der Kurve (*Top*) und das untere Plateau der Kurve (*Bottom*) sich signifikant von  $Top=100\% = \text{konstant}$ , bzw.  $Bottom = 0\% = \text{konstant}$  unterschied (F-Test).

Da es sich bei der Messung der dynamischen Massenumverteilung um eine sehr sensitive Methode handelt, können die Signale der Zellantwort und damit die Originalsignaturen relativ starken Schwankungen unterliegen. Deshalb wurden die Daten zunächst für jeden einzelnen Versuchstag

ausgewertet, prozentualisiert und anschließend durch Mittelwertbildung mit den Ergebnissen der Versuchswiederholungen zusammengefasst.

Die prozentualisierten Mittelwertkurven der Einzelversuche wurden anschließend ebenfalls, wie zuvor bereits für die untransformierten Originaldaten der individuellen Versuchstage beschrieben, mittels der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert.

### 3.4. Operational Model

Das „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983) wurde unter anderem im Rahmen dieser Arbeit dazu verwendet, einen ersten Einblick darüber zu gewinnen, wie effizient die Rezeptorbindung eines Agonisten in eine Signalantwort übertragen wird. Black und Leff führten dafür den Parameter  $\tau$  ein, der auch als Kopplungseffizienz bezeichnet wird. Dieser Parameter beschreibt das Verhältnis der Gesamtkonzentration an Rezeptoren  $R_T$ , zu den Rezeptoren  $K_E$ , die durch Interaktion mit einem Agonisten für eine halbmaximale Systemantwort nötig sind (Gleichung 35) (Black und Leff 1983).

$$\tau = \frac{[R_T]}{K_E} \quad \text{Gleichung 35}$$

$K_E$ : Agonist-Rezeptor Komplex [AR] Konzentration welche eine halb maximale Systemantwort produziert

$[R_T]$ : Gesamtrezeptordichte des Gewebes

Zur Bestimmung des Parameters  $\tau$ , wurden die in funktionell ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven mit dem „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983) analysiert. Neben der Kopplungseffizienz ( $\tau$ ) wurde mit Hilfe dieser Analyse auch der Parameter  $K_A$  ermittelt, der ein Maß für die funktionelle Affinität darstellt. Bei diesem Parameter handelt es sich nicht zwangsläufig um die gleiche Affinität, die mit Hilfe von Bindungsexperimenten ermittelt wurde. Im Prozess der Rezeptoraktivierung kann es beispielsweise zu Konformationsänderungen im Rezeptorprotein kommen, die zu einer Änderung der Affinität führen können (Keov et al. 2014).

$$E = \frac{E_{max} \cdot \tau^n [A]^n}{(K_A + [A])^n + \tau^n [A]^n} \quad \text{Gleichung 36}$$

---

$E_{\max}$ :	Maximal mögliche Antwort des Systems
:	Kopplungskonstante, ein Maß für Kopplungseffizienz
$K_A$ :	Funktionelle Affinität des Partialagonisten
$n$ :	Maß für die Steilheit der Kopplungsbeziehung („ <i>transducer slope</i> “)

### 3.5 „Bias“ Berechnung

Mit der Entdeckung steigender Zahlen potenzieller subtypselektiver Liganden war es wichtig, Methoden zu entwickeln, die es ermöglichen das Phänomen der Subtypselektivität zu vergleichen. Das wiederum erfordert zum einen ein formales Verständnis darüber, was funktionelle Selektivität wirklich ist und zum anderen wurde eine Methode benötigt, die es ermöglicht, eine quantitative Aussage über eine mögliche ligandspezifische Bevorzugung eines Signalweges, gegenüber einem anderen (= „*Ligand-Bias*“) zu treffen. Wichtig war es dabei, eine Methode zu entwickeln, die zum einen experimentell durchführbar ist und zum anderen aber auch statistisch robust ist. Durch die Verwendung und Weiterführung des „*Operational Model of Agonism*“ (Black und Leff 1983) (vgl. 3.4), konnten signifikante analytische Vorteile im Bereich der „*Bias*“-Berechnung beschrieben werden (Ehlert 2008; Figueroa et al. 2009; Evans et al. 2011; Rajagopal et al. 2011; Kenakin et al. 2012; Kenakin und Christopoulos 2013b). Mit diesem Verfahren ist es möglich, den gemessenen Agonismus mit Hilfe eines systemunabhängigen Parameters zu quantifizieren, welcher zum einen die funktionelle Affinität, als auch die intrinsische Aktivität „*efficacy*“ des Agonisten enthält. Ausgedrückt wird dies in Form des sogenannten „*Transduktionskoeffizienten*“:  $\tau/K_A$ , wobei  $\tau$  die Agonist „*efficacy*“, die Rezeptordichte und die Systemkopplung einbringt und die Dissoziationskonstante  $K_A$  den Kehrwert der „*conditional affinity*“ des Agonisten in einem funktionellen System darstellt (Kenakin 2013). Dieser Parameter beschreibt die Effizienz, mit der eine Substanz einen möglichen Effekt auslöst. Dieser einzelne numerische Wert kann dann dazu verwendet werden, um Substanzen in unterschiedlichen Experimentalmodellen („*readouts*“) miteinander zu vergleichen und einen möglichen „*Bias*“ aufzudecken und sein Ausmaß zu quantifizieren (Kenakin et al. 2012; Kenakin und Christopoulos 2013b). Es ist wichtig anzumerken, dass zusammen mit der Bestimmung der Ligand-Effizienz, die Tau-Werte auch system-abhängige Variablen, wie beispielsweise die Rezeptordichte ( $R_0$ ) mit einbringen (Black und Leff 1983; Charfi et al. 2015).



Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine modifizierte Gleichung nach (Shonberg et al. 2014) verwendet.

$$E = \frac{E_{max} \left(\frac{\tau}{K_A}\right)^n [A]^n}{\left(\frac{\tau}{K_A}\right)^n [A]^n + \left(\frac{[A]}{K_A} + 1\right)^n} \quad \text{Gleichung 37}$$

Ein enormer Vorteil dieser Gleichung ist es, dass der Bruch  $\tau/K_A$  als ein *einzig*er Parameter definiert werden kann (Shonberg et al. 2014; Krüger, Masterarbeit 2014).

Durch Subtraktion des Referenzagonist-Transduktionskoeffizienten von den Transduktionskoeffizienten der Testsubstanz erhält man die normalisierten  $\Delta \log(\tau/K_A)$ -Werte (Gleichung 38):

$$\Delta \log \left(\frac{\tau}{K_A}\right) = \log \left(\frac{\tau}{K_A}\right)_{\text{Testligand}} - \log \left(\frac{\tau}{K_A}\right)_{\text{Referenzagonist}} \quad \text{Gleichung 38}$$

Diese normalisierten Werte können anschließend verwendet werden, um die Ligand-induzierte Signaleffizienz unterschiedlicher Signalwege zu vergleichen. Ebenfalls lässt sich durch eine weitere Berechnung bestimmen, wieviel mehr oder weniger effizient ein Ligand einen bestimmten Signalweg gegenüber einem anderen aktiviert. Für die Berechnung dieses sogenannten „Bias“ werden  $\log(\tau/K_A)$ -Werte ermittelt, die sich ganz einfach aus einer erneuten Subtraktion der normalisierten Transduktionskoeffizienten jedes zu vergleichenden Signalweges ermitteln lassen (Gregory et al. 2012; Charfi et al. 2015). Wichtig ist es zu berücksichtigen, dass die Berechnung des „Bias“ immer ein Ergebnis eines Vergleiches von Transduktionskoeffizienten ist, die auf einen Referenzagonisten normalisiert wurden, somit ist der berechnete „Bias“ immer in Hinsicht auf diesen Referenzagonisten zu betrachten (Charfi et al. 2015).

$$\Delta \Delta \log \left(\frac{\tau}{K_A}\right) = \Delta \log \left(\frac{\tau}{K_A}\right)_{\text{Signalweg1}} - \Delta \log \left(\frac{\tau}{K_A}\right)_{\text{Signalweg2}} \quad \text{Gleichung 39}$$

Die jeweiligen Standardfehler berechneten sich wie folgt:

$$SE \left(\Delta \log \left(\frac{\tau}{K_A}\right)\right) = \sqrt{(SE_{\text{Testligand}})^2 + (SE_{\text{Referenzagonist}})^2} \quad \text{Gleichung 40}$$

$$SE \left(\Delta \Delta \log \left(\frac{\tau}{K_A}\right)\right) = \sqrt{\left(SE \left(\Delta \log \left(\frac{\tau}{K_A}\right)\right)_{\text{Signalweg1}}\right)^2 + \left(SE \left(\Delta \log \left(\frac{\tau}{K_A}\right)\right)_{\text{Signalweg2}}\right)^2} \quad \text{Gleichung 41}$$

### 3.6 Statistik

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen, aufbereiteten und ausgewerteten Daten erforderten die Anwendung verschiedener mathematisch-statistischer Analysemethoden, die entweder mit GraphPad Prism® oder Microsoft Excel® durchgeführt wurden. Im nachfolgenden Abschnitt sollen die verwendeten Methoden kurz erläutert werden.

#### 3.6.1 Deskriptive Statistik

Die Bestimmung der statistischen Lage- und Streuungsparameter sowie die Durchführung der statistischen Tests wurden unter der Annahme durchgeführt, dass die ermittelten Daten einer Normalverteilung unterliegen.

##### 3.6.1.1 Berechnung des arithmetischen Mittelwertes $\bar{x}$

Das arithmetische Mittel  $\bar{x}$  stellt ein Lagemaß dar, bei dem die Lage des mittleren Bereiches einer Messreihe ermittelt wird, weshalb es auch als Mittelwert oder Durchschnitt bezeichnet wird. Es ergibt sich aus der Summe der Einzelwerte, geteilt durch die Anzahl der Einzelversuche  $n$ .

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} \quad \text{Gleichung 42}$$

- $x_1$ : Messwert des ersten Versuches
- $x_2$ : Messwert des zweiten Versuches
- $x_n$ : Messwert des n-ten Versuches
- $x_i$ : Messwert des i-ten Einzelversuches
- $n$ : Anzahl unabhängiger Einzelversuche

##### 3.6.1.2 Berechnungen der Streuung

Durch Verwendung der Streuungsmaße kann eine Aussage über die Einheitlichkeit und damit Verlässlichkeit der Messwerte einer Versuchsreihe getroffen werden. Um eine Aussage über die Verteilung der Einzelwerte um den Mittelwert zu treffen dient die Standardabweichung (englisch: *standard deviation*), welche sich als positive Quadratwurzel aus der Varianz  $s^2$  definiert.

$$SD = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Gleichung 43}$$

Das Ausmaß der Abweichung des Mittelwertes vom tatsächlichen Wert gibt der Standardfehler (engl. *standard error of the mean*, SEM) an. Er errechnet sich aus der Standardabweichung der Einzelwerte (SD) unter Einbeziehung des Versuchsumfangs (n).

$$SEM = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad \text{Gleichung 44}$$

Bei den im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurde jeweils das arithmetische Mittel  $\pm$  SEM angegeben.

### 3.6.2 Statistische Prüfverfahren

#### 3.6.2.1 t-Test

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl ein ungepaarter, zweiseitiger als auch ein Einstichproben t-Test (*one sample t-test*) verwendet. Ein ungepaarter t-Test prüft, ob zwei voneinander unabhängige Mittelwerte sich signifikant voneinander unterscheiden. Eine Voraussetzung dafür ist allerdings, dass die beiden Messreihen annähernd dieselbe Standardabweichung besitzen und die Einzelwerte normalverteilt sind. Mit Hilfe des Einstichproben t-Test wird verglichen, ob ein ermittelter Mittelwert sich signifikant von einem vorgegebenen Wert (z.B. 0) unterscheidet.

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right) \cdot \frac{(n_1 - 1) \cdot SD_1^2 + (n_2 - 1) \cdot SD_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}} \quad \text{Gleichung 45}$$

Aus dem ermittelten t-Wert lässt sich über statistische Tabellen oder Computerprogramme ein p-Wert zur Beschreibung der Irrtumswahrscheinlichkeit ermitteln. Je kleiner der p-Wert ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass die zu vergleichenden Werte signifikant verschieden voneinander sind.

Mit Hilfe der sogenannten *one-way Analysis of Variance (one-way ANOVA Analyse)*, die als eine Erweiterung des t-Tests zum Zwecke des Vergleiches mehrerer Mittelwerte aufgefasst werden kann, können signifikante Unterschiede zwischen mehreren Mittelwerten aufgezeigt werden. Die ANOVA-Analyse gibt allerdings lediglich an, ob ein signifikanter Unterschied besteht ( $p < 0,05$ ), nicht aber,

welche Mittelwerte sich voneinander unterscheiden. Für diesen Vergleich wurden in der vorliegenden Arbeit alle statistischen ANOVA-Analysen mit einem Post-Test nach Tukey durchgeführt.

Sollen ein oder mehrere Parameter verglichen werden, die mit Hilfe einer globalen Analyse aus unterschiedlichen Datensets ermittelt wurden, so bietet sich neben den bereits beschriebenen statistischen Prüfverfahren ein weiterer t-Test an. Das t-Verhältnis wird wie folgt berechnet:

$$t = \frac{|Parameter_{Kontrolle} - Parameter_{Vergleich}|}{\sqrt{SE_{Kontrolle}^2 + SE_{Vergleich}^2}} \quad \text{Gleichung 46}$$

Der assoziierte p-Wert wird mit Hilfe von Microsoft Excel 2010 und folgender Operation ermittelt:

=**TVERT**(t;DF;Seiten)

t: der mit Hilfe von Gleichung 46 ermittelte t Wert

DF: Freiheitsgrade, eine ganze Zahl, mit der die Anzahl der Freiheitsgrade angegeben wird

Seiten: Ist **Seiten** = 1, gibt TVERT den Wert für einen *einseitigen* Test zurück. Ist **Seiten** = 2, gibt TVERT den Wert für einen *zweiseitigen* Test zurück.

Beispiel aus Motulsky und Christopoulos (2003):

Substanz	log EC <sub>50</sub>	Standardfehler	Freiheitsgrade
A	-6,373	0,07034	22
B	-6,295	0,09266	22

Berechnung des t-Wertes:

$$t = \frac{|Parameter_A - Parameter_B|}{\sqrt{SE_A^2 + SE_B^2}} = \frac{0,078}{0,1163} = 0,67$$

Berechnung des p-Wertes mit Hilfe von Excel:

= TVERT(0,67;44;2) = 0,51

### 3.6.2.2 F-Test

Um unterschiedliche Kurvenanpassungen (z.B. hinsichtlich Kurvensteilheit  $n_H$ ,  $EC_{50}$ ,  $E_{max}$ ) miteinander vergleichen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit der F-Test verwendet. Weisen beide Kurvengleichungen unterschiedliche Anzahl an Variablen auf, wurde per F-Test geprüft, ob es durch die Einführung der überzähligen Variable zu einer signifikanten Verringerung der Summe der Abstandsquadrate, welche die Güte der Kurvenanpassung beschreibt, kam. Dazu wurde die relative Differenz der Abstandsquadrate ( $ss = \text{sum of squares}$ ), durch die relative Differenz der Freiheitsgrade ( $df = \text{degrees of freedom}$ ) dividiert. Zur Bestimmung der Abstandsquadrate, wurde der Abstand jedes Datenpunktes zur errechneten Kurve quadriert und im Anschluss aufsummiert. Je besser die Datenpunkte durch das gewählte Modell beschrieben werden konnten, desto kleiner wurde die Summe der Abstandsquadrate.

$$F = \frac{\frac{ss_1 - ss_2}{df_1 - df_2}}{\frac{ss_2}{df_2}}$$

**Gleichung 47**

- $ss_1$ : Summe der Abstandsquadrate von Modell 1
- $ss_2$ : Summe der Abstandsquadrate von Modell 2
- $f_1$ : Anzahl der Freiheitsgrade von Modell 1
- $f_2$ : Anzahl der Freiheitsgrade von Modell 2.

Aus dem ermittelten F-Wert lässt sich über Tabellen der F-Verteilung (die auch in gängigen Computerprogrammen enthalten sein können, z.B. in MS Excel<sup>TM</sup>) ein p-Wert zur Beschreibung der Irrtumswahrscheinlichkeiten ermitteln. Lag der errechnete F-Wert für diese Irrtumswahrscheinlichkeit oberhalb eines tabellierten Wertes oder ist er mit diesem identisch, so ergibt die Gleichung mit der zusätzlichen Variable eine signifikant bessere Kurvenanpassung; das komplexere Modell beschreibt demnach die Datenpunkte besser. Liegt der F-Wert unterhalb des tabellierten Wertes der F-Verteilung, wird das einfachere Modell gewählt. Auch bei diesen Prüfungen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  festgelegt.

### **2.6.2.3 Nichtlineare globale Kurvenanalyse**

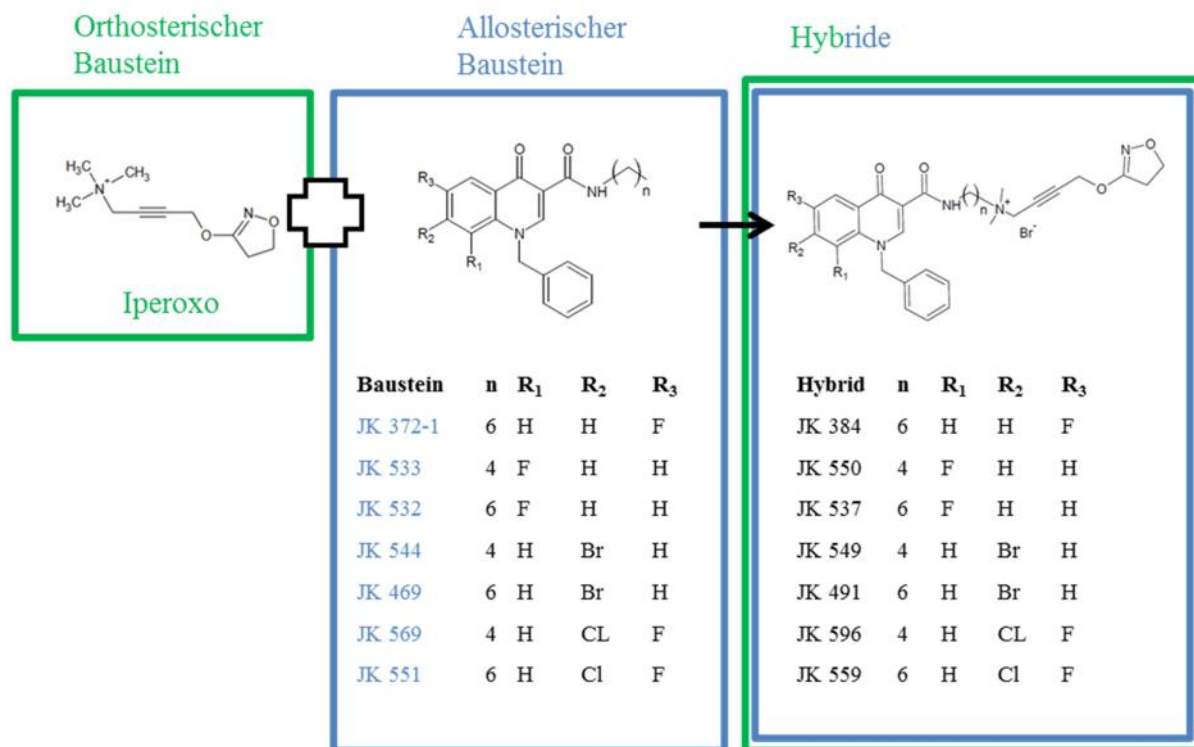
Mit Hilfe der nichtlinearen globalen Kurvenanalyse wurde mit Hilfe eines F-Tests verglichen, ob zwei verschiedene Datensätze sich signifikant besser als zwei einzelne Kurven, oder aber als eine gemeinsame Kurve anpassen ließen. Darüber hinaus erfolgt in einem zweiten Schritt der Vergleich zweier einzelner Parameter: der Wendepunkte sowie des oberen Plateaus durch teilen (*sharing*) dieser Parameter zwischen den nichtlinearen Kurvenanalysen. Auch hierbei wurde jeweils mit Hilfe eines F-Testes verglichen, ob sich z.B.  $\log EC_{50}$ , bzw.  $E_{\max}$  signifikant besser durch zwei verschiedene, oder aber besser durch einen gemeinsamen, geteilten Wert anpassen ließen (Motulsky und Christopoulos 2003).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung dualsterischer Iperoxo/BQCAD Hybridliganden hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften und Signalwegaktivierung an muskarinischen $hM_1$ -Rezeptoren

#### 4.1.1 Einfluss unterschiedlicher Halogensubstitution im allosterischen Baustein sowie unterschiedlicher Zwischenkettenlängen auf das Bindungsverhalten dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden am muskarinischen $hM_1$ -Rezeptor

Die Ergebnisse funktioneller DMR-Experimente, (Methode vgl. 3.3.4) einer vorangegangenen Arbeit (Holze, Masterarbeit 2013) zeigten, dass dualsterische Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden (Substanzserie 1, vgl. 2.11.5) an muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptoren als Partialagonisten fungierten und diesen Effekt maßgeblich über die Kopplung von  $G_q$  Proteinen vermittelten. Bei diesen Hybridsubstanzen handelte es sich um Liganden, die über einen orthosterischen und einen allosterischen Baustein verfügen und entweder über eine  $C_4$ - oder  $C_6$ -Zwischenkette miteinander verbunden sind. Den orthosterischen Baustein stellt Iperoxo dar, welches sich in funktionellen Experimenten an muskarinischen Acetylcholinrezeptorsubtypen als Vollagonist (Dallanoce et al. 1999) oder Superagonist ( $M_2$ -Rezeptor) (Schrage et al. 2013) mit einer sehr hohen Wirksamkeit erwiesen hat. Die allosterischen Bausteine sind Derivate (d), die sich von dem hoch  $M_1$ -selektiven positiven allosterischen Modulator BQCA (vgl. Shirey et al. 2009; Ma et al. 2009; Mistry et al. 2013; Mistry et al. 2013; Yeatman et al. 2014) und 2.11.4) ableiten und werden demnach nachfolgend als BQCAD betitelt. Alle Hybridsubstanzen vom Typ Iperoxo/BQCAD unterscheiden sich zum einen in der Länge der Zwischenkette ( $C_4$  oder  $C_6$ ), die den orthosterischen und allosterischen Teil miteinander verbindet und zum anderen, in der Art und Position der Halogensubstitution im allosterischen Molekülbaustein. Eine schematische Übersicht des strukturellen Aufbaus dieser Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden ist in Abbildung 4.1 dargestellt.



**Abbildung 4. 1:** Schematische Übersicht des strukturellen Aufbaus der in diesem Kapitel untersuchten dualsterischen Hybridliganden (Substanzserie 1). Die dualsterischen Iperoxo/BQCA-Hybride bestehen aus dem orthosterischen Baustein (grün) Iperoxo sowie unterschiedlichen allosterischen Bausteinen (blau) abgeleitet von dem M<sub>1</sub>-selektiven, positiv allosterischen Modulator BQCA. Für weitere Informationen, vgl. Text.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Hybridliganden hinsichtlich ihrer Bindungsfähigkeit und Interaktion mit dem muskarinischen hM<sub>1</sub>-Rezeptor näher untersucht werden. Um die Reproduzierbarkeit der funktionellen Befunde aus früheren DMR-Messungen (Holze, Masterarbeit 2013) hinsichtlich der aktivierten Signalwege zu prüfen, wurden sieben dualsterischen Hybride in weiteren unterschiedlichen funktionellen Experimentalansätzen dahingehend untersucht, ob sie den G<sub>q</sub>-, G<sub>s</sub>- und G<sub>i</sub>-Signalweg zu aktivieren vermögen. Durch das Einbeziehen des Effektes der dualsterischen Hybride und ihrer allosterischen Fragmente auf die [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindung sowie von Ergebnissen aus den unterschiedlichen funktionellen Experimentalansätzen, ist es zudem gelungen, eine Analyseverfahren zu entwickeln, die es ermöglicht, tiefgehenden Aufschluss über die Bindungsorientierung und die dadurch ausgelöste Rezeptoraktivierung zu liefern (vgl. 4.1.9) (Chen, Klöckner und Holze et al. 2015) als dies bisher möglich war (Bock et al. 2014a).

#### 4.1.1.1 Bindungseigenschaften muskarinischer hM<sub>1</sub>-Rezeptoren in stabil transfizierten CHO-Zellen

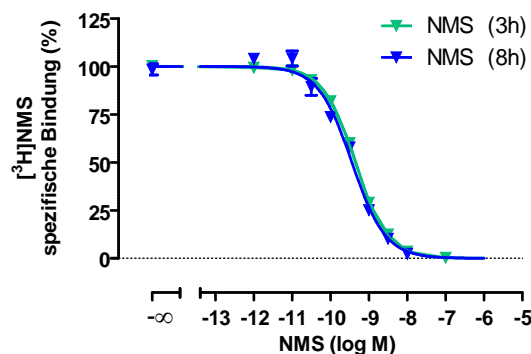
Die meisten im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsexperimente wurden auf Grund einer besseren Vergleichbarkeit mit den funktionellen Experimenten, an intakten CHO-K<sub>1</sub> bzw. CHO-Flp-Zellen durchgeführt (vgl. 2.6.2). Diese enthielten den humanen muskarinischen hM<sub>1</sub>-Rezeptor in stabil transfizierter Form. Ein kleiner Teil der Bindungsexperimente - beispielsweise zur Verhinderung einer



etwaigen Rezeptorinternalisierung - erforderte allerdings die Verwendung von Membranhomogenaten aus diesen Zellen (Maloteaux und Hermans 1994) (vgl. 3.1.5). Zur Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Testsubstanzen an  $hM_1$ -Rezeptoren (sowohl in intakten CHO-Zellen als auch in Membranhomogenaten) dienen im Falle des Radioliganden [ $^3H$ ]NMS homologe Konkurrenzexperimente, auf deren Basis die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  und die Gesamtzahl seiner Bindungsstellen  $B_{max}$  ermittelt werden konnten (vgl. 3.2.4.1).

#### 4.1.1.1.1 Charakterisierung der Bindungseigenschaften von [ $^3H$ ]NMS nach drei und acht Stunden Inkubationszeit an $hM_1$ -wt-Rezeptoren in stabil transfizierten, intakten CHO-Zellen

Nachfolgend sind die Ergebnisse homologer Konkurrenzexperimente mit [ $^3H$ ]NMS an ganzen, intakten CHO-Zellen, die den  $hM_1$ -Rezeptor stabil exprimierten, dargestellt. Auf Grund heterologer Bindungsexperimente, die für manche der dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden eine Inkubationszeit von bis zu acht Stunden für die Gleichgewichtseinstellung erforderten, wurden homologe Konkurrenzexperimente, neben der üblichen Inkubationszeit von drei Stunden (h) auch mit Inkubationszeiten von acht Stunden durchgeführt. Abbildung 4.2 zeigt das Ergebnis der homologen Konkurrenzexperimente zwischen dem Radioligand [ $^3H$ ]NMS und dem nicht markierten Kompetitor N-Methylscopolamin (NMS) an intakten CHO- $hM_1$ -wt-Zellen.



**Abbildung 4. 2: Homologe Konkurrenz zwischen [ $^3H$ ]NMS und NMS an  $hM_1$ -wt-Rezeptoren an lebenden CHO-Zellen nach drei- und achtstündiger Inkubationszeit.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [ $^3H$ ]NMS in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen [ $^3H$ ]NMS-Bindung in Anwesenheit von 10  $\mu$ M Atropin, 100% entspricht der spezifischen [ $^3H$ ]NMS-Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des eingesetzten unmarkierten Kompetitors NMS. Die Radioligandkonzentration betrug 0,2 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28°C. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils als eine Vierfachbestimmung ausgeführt wurden.

Durch nichtlineare Regressionsanalyse der Bindungsdaten konnte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Barlow und Blake 1989; vgl. 3.2.4.1, Gleichung 12) ein sigmoidaler Kurvenverlauf ermittelt werden. Der Hill-Koeffizient unterschied sich nicht signifikant von  $n_H = -1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ), sodass davon ausgegangen werden konnte, dass es sich um eine 1:1 Interaktion

zwischen dem eingesetzten Ligand und dem Rezeptorprotein handelt (Monod et al. 1965). Das obere Plateau der Kurve entspricht der Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit des unmarkierten Kompetitors NMS. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10  $\mu\text{M}$  Atropin bestimmt. Die spezifische Bindung ergab sich aus der Differenz aus Gesamt- und unspezifischer Bindung. Der Wendepunkt der Konzentrations-Bindungs-Kurve liefert den  $\text{IC}_{50}$ -Wert, der durch die Verwendung einer Gleichung von (Cheng und Prusoff 1973) (Gleichung 8) im Sinne eines Spezialfalles die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  errechnen lässt (vgl. 3.2.4.1). Tabelle 4.1 enthält die nach DeBlasi et al. (1989)(Gleichung 11) erhaltenen numerischen Schätzwerte für die Parameter  $K_D$  und  $B_{\text{max}}$ .

Der nach drei Stunden ermittelte  $\log K_D = -9.72 \pm 0,06$  unterschied sich nicht signifikant von  $\log K_D = -9,92 \pm 0,07$ , nach achtstündiger Inkubation (t-Test,  $p > 0,05$ ). Nach DeBlasi (1989) konnte unter Berücksichtigung der verwendeten Zellzahl von 75.000 Zellen pro Vertiefung und der Avogadro-Konstante der  $B_{\text{max}}$ -Wert in  $\text{pmol/ml}$  sowie in Teilchen (Rezeptor) pro Zelle berechnet werden. Der Vergleich der  $B_{\text{max}}$ -Werte zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ( $B_{\text{max (3h)}} = 144000 \pm 14800$  Teilchen/Zelle;  $B_{\text{max (8h)}} = 121000 \pm 17600$  Teilchen/Zelle, (t-Test,  $p > 0,05$ )). Aus diesen Daten konnte geschlussfolgert werden, dass auch nach achtstündiger Inkubation in HBSS + Hepes Puffer (20 mM)(L14), die Zellen noch keine Hinweise auf eine nennenswerte Rezeptorinternalisierung oder eine Veränderung ihrer Bindungseigenschaften aufwiesen.

Rezeptor	$\log K_D$	$B_{\text{max}}$ (pmol/ml)	$B_{\text{max}}$ (Teilchen/Zelle)	n
<b><i>hM<sub>1</sub>-wt (3h)</i></b>	$-9.72 \pm 0,06$	$0,043 \pm 0,004$	$144000 \pm 14800$	5
<b><i>hM<sub>1</sub>-wt (8h)</i></b>	$-9,92 \pm 0,07$	$0,031 \pm 0,004$	$121000 \pm 17600$	4

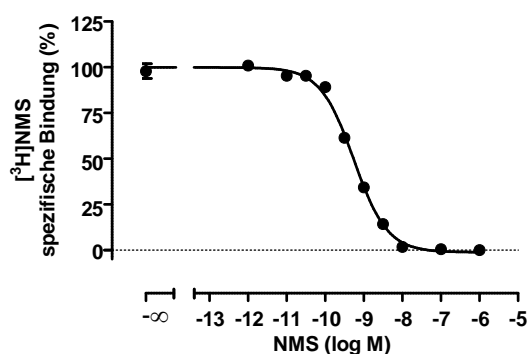
**Tabelle 4. 1: Kenngrößen der in Abbildung 4.2 dargestellten homologen Kompetitionen mit [<sup>3</sup>H]NMS an *hM<sub>1</sub>-wt*-Rezeptoren an lebenden CHO-Zellen nach drei- und achtstündiger Inkubationszeit.**  $\log K_D$ : Dekadischer Logarithmus der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsdissoziationskonstante.  $B_{\text{max}}$ : Anzahl der spezifischen Bindungsstellen für [<sup>3</sup>H]NMS. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

#### 4.1.1.1.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften von [<sup>3</sup>H]NMS in Membranhomogenaten aus stabil transfizierten CHO-*hM<sub>1</sub>-wt*-Zellen

Wie bereits erläutert, konnten nicht für alle Bindungsexperimente lebende, intakte CHO-Zellen verwendet werden. Bei Bindungsexperimenten, die mit dem Radioagonisten [<sup>3</sup>H]Iperoxo durchgeführt wurden sowie bei [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsexperimenten, wurden im Rahmen dieser Arbeit Membranhomogenate aus CHO-*hM<sub>1</sub>-wt*-Zellen verwendet (vgl. 3.1.5). Zur Charakterisierung der

Bindungseigenschaften wurden, wie zuvor beschrieben, homologe Konkurrenzexperimente mit [<sup>3</sup>H]Iperoxo oder [<sup>3</sup>H]NMS durchgeführt (vgl. 3.2.4.1).

Abbildung 4.3 zeigt exemplarisch die Inhibitionskurve eines repräsentativen homologen Konkurrenzexperimentes zwischen dem Radioligand [<sup>3</sup>H]NMS und dem nicht markierten Kompetitor NMS an Membransuspensionen des muskarinischen *hM<sub>1</sub>*-Rezeptors in CHO-Zellen, die nachfolgend bspw. in [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsexperimenten eingesetzt wurden. Der Hill-Koeffizient unterschied sich auch hier nicht signifikant von  $n_H = -1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4. 3: Repräsentatives Ergebnis eines homologen Konkurrenzexperimentes mit [<sup>3</sup>H]NMS und steigender Konzentrationen von NMS an Membranhomogenaten aus CHO-*hM<sub>1</sub>*-wt-Zellen.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Anwesenheit von 10  $\mu$ M Atropin, 100% entspricht der spezifischen [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des eingesetzten unmarkierten Kompetitors NMS. Die Radioligandkonzentration betrug 0,2 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HEPES (12,5mM) Puffer (L9), pH 7,4, 30°C. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler eines repräsentativen Experimentes, welches jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt und drei bis sechs Mal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde (vgl. Tabelle 4.2).

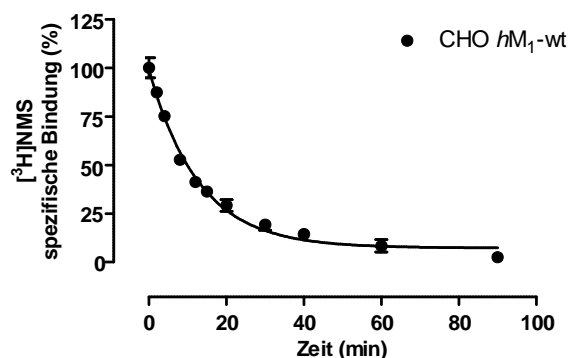
Mit dem für jedes Homogenat ermittelten  $IC_{50}$ -Wert konnte nach (Cheng und Prusoff 1973) der  $\log K_D$ -Wert von [<sup>3</sup>H]NMS an den jeweiligen Homogenaten berechnet werden (vgl. 3.2.4.1). Unter Berücksichtigung des verwendeten Proteingehaltes der Membransuspension und der Verdünnung der Membransuspension im Ansatz konnte der  $B_{max}$ -Wert nach (DeBlasi et al. 1989) in einer versuchsunabhängigen Form berechnet werden. Die Parameter  $\log K_D$  und  $B_{max}$  der verwendeten Membranhomogenate sind in Tabelle 4.2 aufgeführt. Die für die jeweiligen Homogenate bestimmten Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $\log K_D$ , unterschieden sich nicht signifikant voneinander, ebenso wenig ihre  $B_{max}$ -Werte (t-Test,  $p > 0,05$ ).

Homogenat	log K <sub>D</sub>	B <sub>max</sub> (pmol/mg)	n
CHO- <i>hM</i> <sub>1</sub> -wt vom 06.08.2013	-9,29 ± 0,02	13,9 ± 1,23	6
CHO- <i>hM</i> <sub>1</sub> -wt vom 16.08.2013	-9,22 ± 0,12	13,7 ± 1,01	4
CHO- <i>hM</i> <sub>1</sub> -wt vom 20.08.2013	-9,29 ± 0,04	16,5 ± 1,41	3

**Tabelle 4. 2:** Numerische Schätzwerte der Bindungsparameter für die in dieser Arbeit verwendeten Membransuspensionen aus CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen. logK<sub>D</sub>: Dekadischer Logarithmus der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziationskonstante. B<sub>max</sub>: Anzahl der spezifischen Bindungsstellen des Radioliganden. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

#### 4.1.1.1.3 Charakterisierung der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation von *hM*<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren in intakten, lebenden CHO-Zellen

Im Folgenden wurden zur Ermittlung der Dissoziationshalbwertszeit von [<sup>3</sup>H]NMS seine Dissoziation von *hM*<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen in Form kompletter Kinetiken untersucht (vgl. 3.2.5.1). Durch die Zugabe eines ca. 5000-fachen Überschusses von Atropin in einer Konzentration von 10 μM (im Verhältnis zur eingesetzten Konzentration von 2,0 nM [<sup>3</sup>H]NMS) zur Unterbindung der Radioligand-Rezeptor-Assoziation nach dem Starten der Dissoziation, konnte der Zeitgang der Dissoziation der Radioligand-Rezeptor-Komplexe sichtbar gemacht werden. Das Ergebnis eines repräsentativen Versuches ist in Abbildung 4.4 dargestellt.



**Abbildung 4. 4:** Kinetik der Dissoziation von [<sup>3</sup>H]NMS von *hM*<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. Dargestellt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes. Ordinate: Spezifische Bindung von [<sup>3</sup>H]NMS in %. Abszisse: Zeit in Minuten (min). Die Konzentration des Radioliganden betrug 2,0 nM in HBSS + HEPES (20mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28°C. Die Datenpunkte wurden signifikant besser durch einen monophasischen als durch einen biphasischen Dissoziationsverlauf beschrieben (F-Test, p>0,05). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler einer Vierfachbestimmung eines repräsentativen Experimentes, das dreimal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde (vgl. Tabelle 4.3).

Die Halbwertszeit für die [<sup>3</sup>H]NMS Dissoziation von CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren betrug im Mittel  $t_{1/2, \text{Diss}} = 11,3 \pm 1,2$  min, die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_1 = 0,05 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$  (vgl. Tab. 4.3).

Ein Vergleich dieser Halbwertszeiten, mit solchen, die zuvor für CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Membranhomogenate von anderen Autoren berichtet worden waren (z.B. Vogel, Dissertationsschrift 2015:  $M_{1,t1/2} = 11,6 \pm 1,5$  min; (Matsui et al. 1995):  $M_{1,t1/2} = 9,4 \pm 0,4$  min), ergab keinen signifikanten Unterschied (*one-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test*,  $p > 0,05$ ).

Rezeptor	$t_{0,5, \text{Diss}}$ (min)	$k_{-1}$ (min <sup>-1</sup> )	n
CHO- <i>hM</i> <sub>1</sub> -wt	11,3 ± 1,2	0,05 ± 0,003	4

**Tabelle 4. 3: Halbwertszeiten der Dissoziation des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS von *hM*<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.**  $t_{0,5, \text{Diss}}$ : Halbwertszeit der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation in Minuten (min).  $k_{-1}$ : Geschwindigkeitskonstante der [<sup>3</sup>H]NMS Dissoziation (min<sup>-1</sup>). n: Anzahl der durchgeführten Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

#### 4.1.2 Charakterisierung möglicher allosterischer Effekte dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden und ihrer Einzelkomponenten auf die [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation von *hM*<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen

Wie bereits unter 4.1 beschrieben, handelt es sich bei den in diesem Ergebnisteil untersuchten Substanzen (vgl. Abb. 4.1) um Hybridliganden, die eine simultane Besetzung des weniger zwischen den Subtypen konservierten allosterischen Haftareals sowie des stark konservierten orthosterischen Haftareal eingehen können. Ein erster Schritt in der Aufklärung des Bindungsverhaltens dieser ersten Hybridligandserie (Substanzserie 1) bestand in der Klärung, ob die dualsterischen Verbindungen über den allosterischen Molekülteil auch mit der allosterischen Bindungsstelle des *hM*<sub>1</sub>-Rezeptorproteins interagieren. Zu diesem Zweck wurden Dissoziationsexperimente in Form von „Drei-Punkt“-Kinetiken durchgeführt (vgl. 3.2.5.2). Mit Hilfe dieser Methode sollte über die Prüfung auf dissoziationsverzögernde Eigenschaften der zu untersuchenden Substanzen hinsichtlich des orthosterischen Liganden [<sup>3</sup>H]NMS, eine allosterische Interaktion eindeutig nachgewiesen werden (Kostenis und Mohr 1996). Die spezifische Radioligandbindung zu den beiden Messzeitpunkten  $t_{\text{off1}}$  (14 min) und  $t_{\text{off2}}$  (17 min) (vgl. Tab. 3.6, Kapitel 3.2.5) wurde sowohl in Anwesenheit einer allosterischen Testsubstanz als auch in deren Abwesenheit unter Kontrollbedingungen bestimmt. Zur Verhinderung der Re-Assoziation des Radioliganden an das Rezeptorprotein, wurde wie bei der Vermessung kompletter Dissoziationsverläufe Atropin als strukturverschiedener, nicht radioaktiv markierter, kompetitiver Antagonist, im Überschuss in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt.

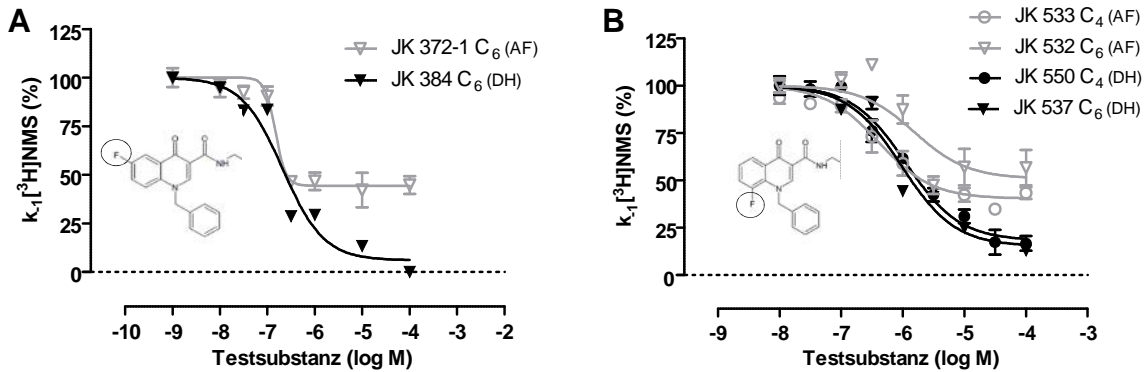
Die mit Hilfe nichtlinearer Regressionsanalyse des [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziationsverlaufes ermittelten apparenten Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten  $k_{-1}$  (vgl. 3.2.5.2), wurden in Prozent der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante der Kontrollkurve in Abwesenheit eines allosterischen Liganden ausgedrückt und gegen die log-Konzentration des dualsterischen Liganden oder des allosterischen Fragmentes aufgetragen. Die Anwendung der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“

(Gleichung 12) erbrachte Konzentrations-Wirkungs-Kurven für den allosterischen Effekt der Testsubstanz auf die [<sup>3</sup>H]NMS Dissoziation, deren log-Konzentration am Wendepunkte  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$  als Messgröße für die Affinität der Testsubstanzen zum [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptor diente.

#### **4.1.2.1 Einfluss dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden und ihrer allosterischen Fragmente auf die [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation von hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen**

Die ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven für die Hybridliganden JK 384 (C<sub>6</sub>), JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) und ihrer allosterischen Fragmente JK 372-1 (C<sub>6</sub>), JK 533 (C<sub>4</sub>) und JK 532 (C<sub>6</sub>) werden in Abbildung 4.5 (A und B) gezeigt. Diese dualsterischen Hybride sind gekennzeichnet durch eine Fluor-Substitution im allosterischen Baustein (vgl. Abb. 4.1 und Formelausschnitt in Abb. 4.5). JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) verfügen dabei über die gleiche Position des Fluor-Substituenten und unterscheiden sich lediglich in der Länge der zwischen den Bausteinen vorhandenen Zwischenkette (C<sub>4</sub> oder C<sub>6</sub>). Die  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ -Werte der Konzentrations-Effekt-Kurven für das dualsterische Hybrid JK 384 (C<sub>6</sub>) und für seinen allosterischen Baustein JK 372-1 (C<sub>6</sub>) (Abb. 4.5 (A)), unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Tab. 4.4; t-Test,  $p > 0,05$ ). Die unteren Plateaus beider Konzentrations-Effekt-Kurven  $E_{\text{min}, \text{JK}384} = 44 \pm 2\%$  und  $E_{\text{min}, \text{JK}372-1} = 7 \pm 6\%$  unterschieden sich dagegen signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Kurve des dualsterischen Hybrides zeigte ein Steilheitsmaß, dessen Wert nicht signifikant verschieden war von  $n_H = -1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ), wohingegen die Steilheit des Kurve des Bausteins  $n_H = -3,95 \pm 1,61$  signifikant größer war (F-Test,  $p < 0,05$ ).

Die für die Hybride JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) und ihre Bausteine JK 533 (C<sub>4</sub>) und JK 532 (C<sub>6</sub>) sind in Abbildung 4.5 (B) sowie in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Das obere Plateau konnte auf 100% festgesetzt werden, da es sich in allen Fällen nicht signifikant von 100% unterschied (F-Test,  $p > 0,05$ ). Das Steilheitsmaß der Kurven wich in keinem der vier Fälle signifikant von  $n_H = -1$  ab (F-Test,  $p > 0,05$ ). Die unteren Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurven der allosterischen Fragmente unterschieden sich nicht signifikant ( $E_{\text{min}, \text{JK}533} \text{ (C}_4\text{)} = 40 \pm 3\%$  und  $E_{\text{min}, \text{JK}532} \text{ (C}_6\text{)} = 51 \pm 7\%$ ; (t-Test,  $p > 0,05$ )). Die unteren Plateaus der allosterischen Fragmente unterschieden sich damit, wie schon in Abb. 4.5 (A) für JK 372-1 und JK 384 gezeigt, von dem des jeweiligen Hybridliganden  $E_{\text{min}, \text{JK}550} = 18 \pm 3\%$  bzw.  $E_{\text{min}, \text{JK}537} = 15 \pm 4\%$  signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ -Werte aller vier Substanzen in Abbildung 4.5 (B) zeigten keine signifikante Abweichung voneinander (*one-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test*,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4. 5: Interaktion von JK 384, JK 550, JK 537 (dualsterische Hybride) und JK 372-1, JK 533, JK 532 (allosterische Fragmente) an  $[^3\text{H}]$ NMS-besetzten  $hM_1$ -Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.** Ordinate: Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  der  $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation in % des Werte in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug 2,0 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28 °C. Die Formelfragmente in (A) und (B) illustrieren die jeweilige Position des Fluorsubstituenten. Kurvenanpassung: Die nichtlineare Datenanalyse erfolgt mit Hilfe einer „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. AF: Allosterisches Fragment plus Zwischenkette. DH: Dualsterisches Hybrid.

Substanz		Unteres Plateau (%)	$\log EC_{0,5, \text{Diss}}$	$k_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$n_H$	n
JK 372-1 ( $C_6$ )	AF	$44 \pm 2$	$-6,83 \pm 0,08$	$0,08 \pm 0,003$	$-3,95 \pm 1,61^\#$	3
JK 384 ( $C_6$ )	DH	$7 \pm 6^{**}$	$-6,70 \pm 0,11$	$0,06 \pm 0,01$	$-1,00$	3
JK 533 ( $C_4$ )	AF	$40 \pm 3$	$-6,39 \pm 0,11$	$0,08 \pm 0,01$	$-1,00$	6
JK 550 ( $C_4$ )	DH	$18 \pm 3^{**}$	$-5,95 \pm 0,07$	$0,08 \pm 0,01$	$-1,00$	6
JK 532 ( $C_6$ )	AF	$51 \pm 7$	$-5,81 \pm 0,27$	$0,09 \pm 0,003$	$-1,00$	3
JK 537 ( $C_6$ )	DH	$15 \pm 4^*$	$-6,02 \pm 0,09$	$0,09 \pm 0,003$	$-1,00$	3

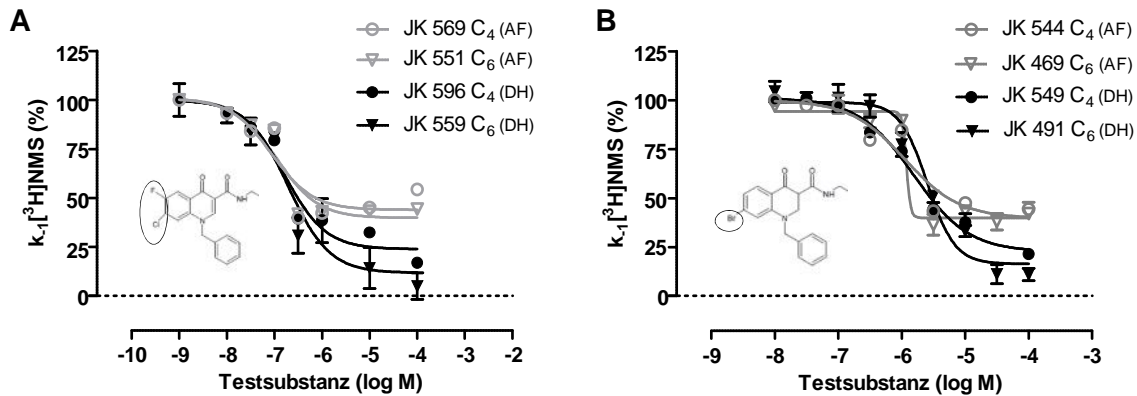
**Tabelle 4. 4: Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.5 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven.** AF: Allosterisches Fragment plus Zwischenkette. DH: dualsterisches Hybrid.  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ : Dekadischer Logarithmus derjenigen Konzentration der Testsubstanz, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der  $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation führt.  $k_1$ : Geschwindigkeitskonstante der  $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation ( $\text{min}^{-1}$ ).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl durchgeführter Versuche. Dargestellt sind die Datenpunkte als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*,\*\*: Wert signifikant verschieden von dem entsprechenden Parameterschätzwert des entsprechenden allosterischen Fragmentes (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). #: Wert signifikant unterschiedlich zu einer Kurvensteilheit von  $n_H = -1$  (F-Test,  $p < 0,05$ ).

Zwei weitere zu charakterisierenden Hybridliganden waren JK 596 und JK 559, welche neben einer Fluor- zusätzlich eine Chlorsubstitution im allosterischen Fragment enthalten (vgl. Abbildung 4.1 und den Formelausschnitt in Abbildung 4.6 (A)). Beide Hybride unterschieden sich in der Länge der Zwischenkette, die im Falle von JK 596 eine  $C_4$ - und im Falle von JK 559 eine  $C_6$ -Kette darstellte. Der hemmende Effekt dieser Verbindungen ist in Abbildung 4.6 (A), ihre pharmakologischen Parameterwerte in Tabelle 4.5 dargestellt. Die Kurvensteilheit war in allen Fällen nicht signifikant

verschieden von  $n_H = -1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ). Das obere Kurvenplateau konnte auf 100% festgesetzt werden, da es bei allen Regressionsanalysen der vier Konzentrations-Effekt-Kurven nicht signifikant von 100% abwich (F-Test,  $p > 0,05$ ). Die Konzentrations-Effekt-Kurve des dualsterischen Hybrides JK 559 ( $C_6$ ) ergab ein unteres Plateau von  $7 \pm 7\%$ , das nicht signifikant unterschiedlich von 0% war (F-Test,  $p > 0,05$ ). Die Kurve für das dazugehörige allosterische Fragment JK 551 ( $C_6$ ) besaß ein unteres Plateau von  $40 \pm 3\%$  und erzeugte damit eine signifikant geringere Dissoziationshemmung (t-Test,  $p < 0,05$ ). Der Wendepunkt des dualsterischen Hybrides JK 559 ( $C_6$ )  $\log EC_{0,5, \text{Diss}} = -6,71 \pm 0,11$  sowie der seines allosterischen Fragmentes JK 551  $\log EC_{0,5, \text{Diss}} = -6,95 \pm 0,15$  waren nicht signifikant unterschiedlich (t-Test,  $p > 0,05$ ). Die unteren Kurvenplateaus des Hybrides mit der kürzeren Zwischenkette JK 596 ( $C_4$ ) und des allosterischen Fragmentes JK 569 ( $C_4$ ), unterschieden sich ebenfalls signifikant (t-Test  $p < 0,05$ ). Der Wendepunkt des dualsterischen Hybrides JK 596 ( $C_4$ ) betrug  $\log EC_{0,5, \text{Diss}} = -6,79 \pm 0,09$  und wich damit nicht signifikant ab von dem  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ -Wert seines allosterischen Fragmentes JK 569 ( $C_4$ ) (vgl. Tab. 4.5; t-Test,  $p > 0,05$ ).

Abbildung 4.6 (B) zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurven der beiden dualsterischen Hybride JK 549 ( $C_4$ ) und JK 491 ( $C_6$ ) und ihrer allosterischen Fragmente JK 544 ( $C_4$ ) und JK 469 ( $C_6$ ). Diese Hybridpaare verfügen nicht wie die zuvor beschriebenen Hybride über eine Fluorsubstitution, sondern sind durch eine einzelne Brom-Substitution im allosterischen Molekülteil gekennzeichnet (vgl. Abb.4.1 und Formelausschnitt in Abb. 4.6 (B)). Die zu Abbildung 4.6 (B) korrespondierenden pharmakologischen Parameterwerte sind Tabelle 4.5 zu entnehmen. Mit der Ausnahme des allosterischen Bausteins JK 469, welcher eine Kurvensteilheit von  $n_H = -3,21 \pm 0,87$  aufwies, konnten alle Konzentrations-Effekt-Kurven mit einer Kurvensteilheit von  $n_H = -1$  beschrieben werden (F-Test,  $p > 0,05$ ). Keines der oberen Plateaus der in Abbildung 4.6 (B) gezeigten Kurven war verschieden von 100% (F-Test,  $p > 0,05$ ) und wurde deshalb auf diesen Wert festgesetzt. Wie bereits für die zuvor untersuchten Hybrid/Baustein-Paare beschrieben, differierten die unteren Plateaus auch im Falle von JK 549 ( $C_4$ ) und JK 491 ( $C_6$ ) von denjenigen ihrer allosterischen Fragmente (F-Test,  $p < 0,05$ ). Die Konzentrations-Effekt-Kurve des kurzen Hybrides JK 549 ( $C_4$ ) lieferte ein unteres Plateau von  $23 \pm 3\%$ , die des allosterischen Fragmentes JK 544 ( $C_4$ ) von  $40 \pm 4\%$  (vgl. Tabelle 4.5). Das längere Hybrid erreichte ein unteres Plateau von  $6 \pm 5\%$ , das sich nicht signifikant von 0% unterschied (F-Test,  $p > 0,05$ ). Sein korrespondierendes allosterisches Fragment JK 469 ( $C_6$ ) erreicht lediglich ein unteres Plateau von  $42 \pm 2\%$ . Der Wendepunkt der Kurve für das Hybrid JK 549 ( $C_4$ ) betrug  $\log EC_{0,5, \text{Diss}} = -5,81 \pm 0,07$ , ebenfalls ohne signifikanten Unterschied zum  $\log EC_{0,5, \text{Diss}} = -5,95 \pm 0,13$  seines allosterischen Fragmentes JK 544 ( $C_4$ ). Qualitativ dasselbe Ergebnis konnte für das dualsterische Hybrid JK 491 ( $C_6$ ) und sein allosterisches Fragment ermittelt werden (JK 491  $\log EC_{0,5, \text{Diss}} = -5,54 \pm 0,09$ ; JK 469  $\log EC_{0,5, \text{Diss}} = -5,76 \pm 0,07$ ; t-Test,  $p > 0,05$ ).





**Abbildung 4. 6:** Interaktion von JK 596, JK 559, JK 549, JK 491 (dualsterische Hybride) und JK 569, JK 551, JK 544, JK 469 (allosterischen Fragmente) an  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten  $h\text{M}_1$ -Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. AF: Allosterisches Fragment plus Zwischenkette. DH: Dualsterisches Hybrid. Ordinate: Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation in % des Werte in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug 2,0 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28 °C. Die Formelfragmente in (A) und (B) illustrieren die jeweilige Position des Halogensubstituenten. Kurvenanpassung: Die nichtlineare Datenanalyse erfolgt mit Hilfe einer „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz		$E_{\min}$ (%)	$\log EC_{0,5, \text{Diss}}$	$k_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$n_H$	n
<b>JK 569</b> ( $C_4$ )	AF	44 $\pm$ 4	-7,06 $\pm$ 0,21	0,07 $\pm$ 0,003	= -1,00	3
<b>JK 596</b> ( $C_4$ )	DH	26 $\pm$ 4*	-6,79 $\pm$ 0,09	0,08 $\pm$ 0,003	= -1,00	3
<b>JK 551</b> ( $C_6$ )	AF	40 $\pm$ 3	-6,95 $\pm$ 0,15	0,08 $\pm$ 0,003	= -1,00	3
<b>JK 559</b> ( $C_6$ )	DH	7 $\pm$ 7*	-6,71 $\pm$ 0,11	0,07 $\pm$ 0,01	= -1,00	3
<b>JK 544</b> ( $C_4$ )	AF	40 $\pm$ 4	-5,95 $\pm$ 0,13	0,08 $\pm$ 0,003	= -1,00	3
<b>JK 549</b> ( $C_4$ )	DH	23 $\pm$ 3*	-5,81 $\pm$ 0,07	0,08 $\pm$ 0,003	= -1,00	3
<b>JK 469</b> ( $C_6$ )	AF	42 $\pm$ 2	-5,76 $\pm$ 0,07	0,07 $\pm$ 0,003	-3,21 $\pm$ 0,87 <sup>#</sup>	3
<b>JK 491</b> ( $C_6$ )	DH	6 $\pm$ 5**	-5,54 $\pm$ 0,09	0,07 $\pm$ 0,01	= -1,00	3

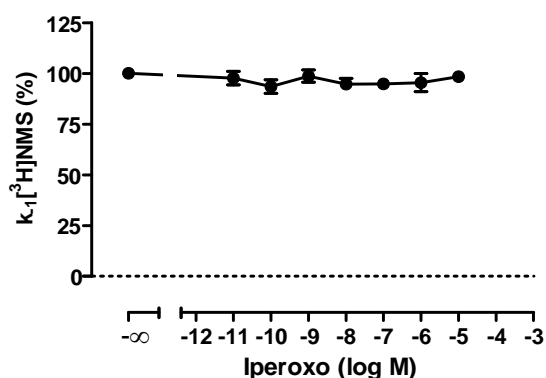
**Tabelle 4. 5:** Parameterschätzwerte der in **Abbildung 4.6** dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven. AF: Allosterisches Fragment plus Zwischenkette. DH: dualsterisches Hybrid.  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ : Dekadischer Logarithmus derjenigen Konzentration der Testsubstanz, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation führt.  $k_1$ : Geschwindigkeitskonstante der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation ( $\text{min}^{-1}$ ).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl durchgeführter Versuche. Dargestellt sind die Datenpunkte als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*,\*\*: Wert signifikant verschieden von dementsprechenden Parameterschätzwert des entsprechenden allosterischen Fragmentes (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). #: Wert signifikant unterschiedlich zu einer Kurvensteilheit von  $n_H = -1$  (F-Test,  $p < 0,05$ ).

Zusammenfassend waren alle sieben dualsterischen Hybride sowie ihre korrespondierenden allosterischen Fragmente in der Lage, die Dissoziation des Radioliganden  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  zu verzögern. Wird der Parameter  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$  als Messgröße der Affinität der dualsterischen Hybride betrachtet und mit dem Wert der korrespondierenden allosterischen Fragmente verglichen, ergab sich in keinem Fall ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Affinität zum  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptor. Dies lieferte

einen Hinweis darauf, dass das allosterische Fragment in der gleichen Bindungsorientierung mit dem Rezeptorprotein interagiert, unabhängig davon ob es orthosterisch einen Iperoxo-Rest trägt.

#### 4.1.2.2 Einfluss des orthosterischen Bausteins Iperoxo auf die [ $^3\text{H}$ ]NMS-Dissoziation von $hM_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen

Redka und Mitarbeiter veröffentlichten im Jahr 2008 Daten, die eine verzögernde Wirkung des orthosterischen Vollagonisten Oxotremorin-M auf die [ $^3\text{H}$ ]NMS-Dissoziation von  $M_2$ -Rezeptoren in solubilisierten Membranen von transient transfizierten Sf9 Zellen belegen (Redka et al. 2008). Da es sich bei Iperoxo um ein Derivat dieser Substanz handelt, sollte an  $hM_1$ -Rezeptoren überprüft werden, ob Iperoxo als orthosterischer Baustein der dualsterischen Hybride dieser Arbeit, einen verzögernden Eigeneffekt auf die [ $^3\text{H}$ ]NMS-Dissoziation aufweist. Dazu wurden analog zu den unter 4.1.2.1 vorgestellten Experimenten kinetische Experimente mit drei Messzeitpunkten durchgeführt (vgl. Tab. 3.6, Kapitel 3.2.5). Wie in Abbildung 4.7 zu erkennen ist, zeigte der orthosterische Baustein keinerlei Einfluss auf die [ $^3\text{H}$ ]NMS Dissoziation, was für die hier eingesetzten Konzentrationen bis 10  $\mu\text{M}$  (d.h. der höchsten Konzentration in der die Hybridsubstanzen löslichkeitslimitiert untersuchbar waren) eine allosterische Bindung von Iperoxo unwahrscheinlich macht. Da keine messbare Verzögerung der Dissoziation des orthosterischen Liganden auftrat, konnte keine Kurvenanpassung durchgeführt werden; daher wurden die ermittelten Messwerte mit einer „Punkt-zu-Punkt“-Verbindung verbunden (vgl. Abb. 4.7).



**Abbildung 4.7: Einfluss des orthosterischen Bausteins Iperoxo auf die [ $^3\text{H}$ ]NMS-Dissoziation von  $hM_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.** Ordinate: Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  der [ $^3\text{H}$ ]NMS Dissoziation in % des Werte in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus derjenigen Konzentration der eingesetzten Testsubstanz Iperoxo. Die Radioligandkonzentration betrug 2,0 nM, die Zellzahl betrug 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28 °C. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

### 4.1.3 Bindungseigenschaften dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden an intakten CHO-*hM<sub>1</sub>*-wt-Zellen

Neben der Charakterisierung der Bindung der dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden und ihrer allosterischen Fragmente an orthosterisch besetzten *hM<sub>1</sub>*-wt-Rezeptoren, galt es erstmalig, einen Einblick in die Bindungsneigung der zu charakterisierenden Hybridsubstanzen an freien, d.h. orthosterisch unbesetzten *hM<sub>1</sub>*-wt-Rezeptoren zu erhalten. Für den muskarinischen *hM<sub>2</sub>*-Rezeptor war zuvor gezeigt worden, dass dualsterische Hybridliganden in zwei unterschiedlichen Bindungsposen mit dem Rezeptorprotein interagieren können (Bock et al. 2012). Bindet das Hybrid in der dualsterischen Pose mit dem Rezeptorprotein, so bindet der orthosterische Baustein an der orthosterischen Bindungsstelle und das allosterische Fragment im Bereich der allosterischen Bindungsstelle. Kommt es nur zu einer alleinigen Rezeptorinteraktion des Hybridliganden über sein allosterisches Fragment, bleibt die orthosterische Bindungsstelle unbesetzt. Um einen Eindruck darüber zu gewinnen, wie die Iperoxo/BQCAD-Hybride mit dem *hM<sub>1</sub>*-wt-Rezeptor interagieren, wurden Gleichgewichts-Bindungsexperimente mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS durchgeführt. Zur Analyse der mit Hilfe dieser Experimente erhaltenen Daten, wurden, auf der Basis des von Bock und Kollegen 2014a publizierten Modells drei neuartige verschiedene Analysemethoden angewendet (vgl. 3.2.4.2). Hierbei handelt es sich jeweils um Weiterentwicklungen schon bestehender Analysen, die den mechanistischen Erkenntnisgewinn bezüglich der Hybrid-Rezeptoraktion steigerten (Chen, Klöckner und Holze et al. 2015). In den nachfolgenden Kapiteln werden diese Ergebnisse im Einzelnen näher erläutert.

#### 4.1.3.1 Bestimmung der Bindungseigenschaften dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden an intakten CHO-*hM<sub>1</sub>*-wt-Zellen mit Hilfe zweier Einzelanalysen

- a. Einzelanalyse der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten von dualsterischem Hybrid und allosterischem Baustein (vgl. 3.2.4.2)

Die Ergebnisse der zuvor durchgeführten Dissoziationsexperimente legten nahe, dass die allosterischen Fragmente mit der allosterischen Bindungsstelle des *hM<sub>1</sub>*-Rezeptors interagieren. Dies begründete die Annahme, dass es zur Bildung ternärer Komplexe, bestehend aus dem Rezeptor, dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS und dem allosterischen Fragment kommen kann und zur Beschreibung dieser Interaktion das ternäre Modell allosterischer Interaktionen (z.B., Stockton et al. 1983; Ehlert 1988; Trankle et al. 2003) verwendet werden kann (vgl. Abb. 3.2). Das von Ehlert 1988 beschriebene ternäre Modell allosterischer Interaktionen wird durch eine Gleichung beschrieben, mit deren Hilfe die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_B$ ) des allosterischen Fragmentes und der Kooperativitätsfaktor ( $\alpha$ , bzw.  $\alpha'$ ) (vgl. 3.2.4.2) ermittelt werden können (Gleichung 15). Der Kooperativitätsfaktor beschreibt

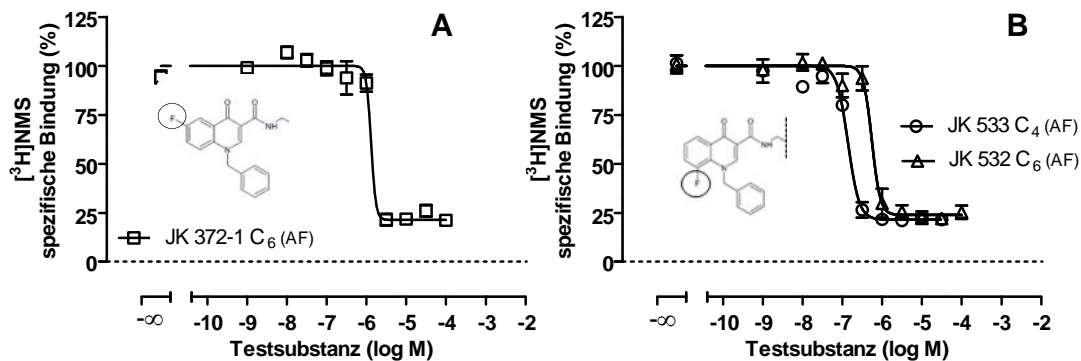
das Ausmaß der gegenseitigen Beeinflussung zwischen dem orthosterischen und dem allosterischen Bindungspartner im ternären Komplex mit dem Rezeptor, wohingegen die Dissoziationskonstante  $K_B$  ein Maß für die Affinität des zu untersuchenden allosterischen Liganden zum freien Rezeptorprotein darstellt. Die Voraussetzung der Verwendung von Gleichung 15 (vgl. 3.2.4.2) ist eine Kurvensteilheit, nicht signifikant verschieden von  $n_H = -1$ , da sie kein Steilheitsmaß enthält. Besaßen die Inhibitionskurven der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Substanzen jedoch ein Steilheitsmaß signifikant verschieden von  $n_H = -1$ , wurde eine von Tränkle und Kollegen (2003) modifizierte Gleichung (Gleichung 16)(vgl. 3.2.4.2) verwendet, die ein variables Steilheitsmaß  $n$  enthält. Die Tabellen 4.6 und 4.7 fassen die Ergebnisse zusammen.

Wie bereits erwähnt, bestand das Hauptziel dieser Gleichgewichtsbindungsexperimente in der Charakterisierung des Bindungsmodus der dualsterischen Hybridliganden. Für das Bindungsverhalten dualsterischer Liganden ist von May et al. (2007b) ein Modell entwickelt worden, das neben den vier Zuständen, die im Ehlert-Modell der allosterischen Interaktion berücksichtigt sind (vgl. 3.2.4.2), einen fünften Zustand, in dem das dualsterische Hybrid sowohl an die allosterische als auch die orthosterische Bindungsstelle gebunden ist, bedacht. Aus diesem Modell ist eine Gleichung abgeleitet worden (May et al. 2007b), mit deren Hilfe ein numerischer Schätzwert für die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_A$ ) des dualsterischen Hybrides in der dualsterischen Bindungspose ermittelt werden kann (vgl. 3.2.4.2; Gleichung 17). Diese Analyse benötigte allerdings bisher die Kenntnis der, mit Hilfe der zuvor für das allosterische Fragment beschriebenen Analyse ermittelten, Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_B$  sowie des Kooperativitätsfaktors  $\rho$  des allosterischen Fragmentes, die darin als Konstanten behandelt wurden. Der derart festgesetzte  $K_B$ -Wert dient dem Modell somit als Affinitätsgröße des dynamischen Hybridliganden in der allosterischen Rezeptorbindungspose und ermöglichte es, einen Schätzwert für die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_A$  des dualsterischen Hybrides zu bestimmen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die Analyse so zu verändern, dass zwar noch die Bindungsneigung des allosterischen Fragmentes, als Maß für die Bindung des dualsterischen Fragmentes in der allosterischen Bindungspose, nicht aber der Kooperativitätsfaktor als Konstante behandelt werden musste. Dies ermöglichte es erstmalig, neben der Bindungsneigung des dualsterischen Hybrides in der dualsterischen Bindungspose auch einen Kooperativitätsfaktor für die Interaktion zwischen dem dualsterischen Hybridliganden in der allosterischen Bindungspose, [ $^3\text{H}$ ]NMS und dem  $hM_1$ -Rezeptor zu ermitteln.

#### 1. Inhibition der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Gleichgewichtsbindung durch allosterische Fragmente an $hM_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen

In Abbildung 4.8 sind die Interaktionskurven der allosterischen Fragmente JK 372-1 ( $C_6$ ), JK 533 ( $C_4$ ) und JK 532 ( $C_6$ ) mit [ $^3\text{H}$ ]NMS dargestellt. Diese sind durch einen Fluor-Substituenten am Benzolring

gekennzeichnet (vgl. Abb. 4.1 und Formelausschnitt in Abb. 4.8), der Bestandteil des allosterischen Fragmentes ist. Die durch nichtlineare Regressionsanalyse abgeleiteten Parameterwerte der Kurven können Tabelle 4.6 entnommen werden. Die Inhibitionskurven waren signifikant steiler, als es einem Steigungsmaß  $n_H = -1$  entsprach, woraufhin zur Ermittlung der Bindungsneigung und Kooperativität Gleichung 16 (vgl. 3.2.4.2) verwendet wurde. Alle allosterischen Fragmente verhielten sich mit [ $^3\text{H}$ ]NMS am  $hM_1$ -wt-Rezeptor negativ kooperativ, es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Kooperativitätsfaktoren festgestellt werden (*one-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test*,  $p > 0,05$ ). Die Bindungsneigung der Fragmente zum freien Rezeptor unterschied sich dagegen signifikant. JK 533 ( $C_4$ ) zeigte mit  $\log K_A = -6,86 \pm 0,05$  die höchste Bindungsneigung. Das Fragment JK 532 ( $C_6$ ), welches über eine zwei Kohlenstoffatom verlängerte Zwischenkette verfügt, zeigte eine vierfach schwächere Bindungsneigung (t-Test,  $p < 0,05$ ) (vgl. Tab. 4.6).



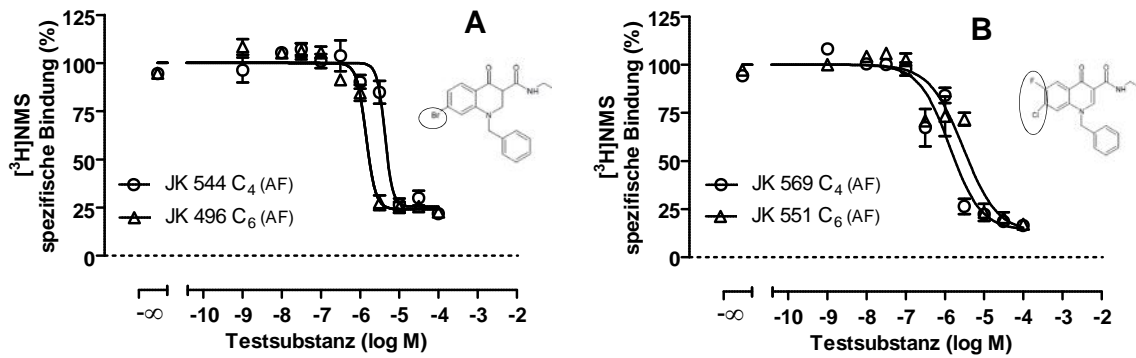
**Abbildung 4. 8: Heterologe Inhibitionsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der allosterischen Fragmente JK 372-1, JK 533 und JK 532 mit dem orthosterischen Radioantagonisten [ $^3\text{H}$ ]NMS an  $hM_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]NMS in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung in Anwesenheit von Atropin  $10 \mu\text{M}$ , 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug  $0,2 \text{ nM}$ , die Zellzahl  $75.000$  Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES ( $20 \text{ mM}$ ) Puffer (L14),  $\text{pH } 7,4$ ,  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die Formelfragmente in (A) und (B) illustrieren die jeweilige Position des Fluorsubstituenten. Kurvenanpassung: Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient  $n_H$  in Tabelle 4.6 wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Auf Grund eines Steilheitsmaßes, das signifikant verschieden von  $n_H = -1$  war, erfolgte die weitere Analyse der allosterischen Fragmente mit Hilfe von Gleichung 16. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. AF: Allosterisches Fragment plus Zwischenkette.

Logistische Gleichung (Gl.12) Tränkle et al. 2003 (Gl. 16)						
Substanz	Halogen-Substitution	Unteres Plateau (%)	$n_H$	$\log K_B$	$\log \acute{\prime}$	n
<b>JK 372-1</b> (AF/C <sub>6</sub> )	F	21 ± 1	-7,36 ± 21,48	-5,88 ± 0,36	-0,67 ± 0,01	3
<b>JK 533</b> (AF/C <sub>4</sub> )	F	22 ± 2	-3,09 ± 0,73 <sup>#</sup>	-6,86 ± 0,05	-0,67 ± 0,05	3
<b>JK 532</b> (AF/C <sub>6</sub> )	F	24 ± 2	-4,16 ± 0,97 <sup>#</sup>	-6,26 ± 0,06 <sup>**</sup>	-0,62 ± 0,04	3

**Tabelle 4. 6: Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.8 dargestellten Bindungskurven.**  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit.  $\log K_B$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Bindung des allosterischen Fragmentes.  $\log \acute{\prime}$ : Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\acute{\prime}$ . n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung (Gleichung 12) analysiert. Auf Grund eines Steilheitsmaßes, das signifikant verschieden von  $n_H = -1$  war, erfolgte die weitere Analyse der Daten mit Hilfe von Gleichung 16. AF: allosterisches Fragment plus Zwischenkette. F: Fluor-Substitution. \*\*: Wert signifikant verschieden von dem entsprechenden Parameterschätzwert des kürzeren allosterischen Fragmentes JK 533 (t-Test, \*\*p<0,01). #: Wert signifikant unterschiedlich von einer Kurvensteilheit  $n_H = -1$  (F-Test, p<0,05).

Die Ergebnisse für die allosterischen Fragmente JK 544 (C<sub>4</sub>) und JK 469 (C<sub>6</sub>), die über einen Bromsubstituenten am Benzolring des allosterischen Fragmentes verfügten, sind in Abbildung 4.9 (A) dargestellt. Die dazugehörigen Parameterwerte sind Tabelle 4.7 zu entnehmen. Die Kurvensteilheit beider Substanzen zeigte signifikant steilere Kurvenverläufe ( $n_H < -1$ , F-Test, p<0,05), weshalb zur Ermittlung der Bindungsneigung sowie Kooperativität wiederum Gleichung 16 verwendet wurde. Beide Fragmente,  $\log \acute{\prime}$  JK 544 = -0,59 ± 0,07 und  $\log \acute{\prime}$  JK 469 = -0,62 ± 0,04, zeigten keine signifikant unterschiedliche Kooperativität mit [<sup>3</sup>H]NMS (t-Test, p>0,05). Im Gegensatz zu dem bereits beschriebenen Paar allosterischer Fragmente (JK 533 (C<sub>4</sub>) und JK 532 (C<sub>6</sub>)), zeigte hier JK 469 als das allosterische Fragment mit der längeren Kohlenstoffkette, mit  $\log K_B = -5,37 ± 0,11$  die höhere Bindungsneigung zum freien hM<sub>1</sub>-Rezeptor (t-Test, p<0,05)(vgl. Tab. 4.7).

Abbildung 4.9 (B) zeigt das letzte Paar allosterischer Fragmente, welches über eine aus zwei Halogensubstituenten (F, Cl) am Benzolrings bestehende Substitution im allosterischen Fragment verfügten. Interessanterweise konnten die Inhibitionskurven dieses Fragment-Paares als einzige mit einer Kurvensteilheit von  $n_H = -1$  beschrieben werden (F-Test, p>0,05). Aus diesem Grund wurde zur weiteren Analyse Gleichung 15 verwendet. Die Ergebnisse sind Tabelle 4.7 zu entnehmen. Wie die bereits vorgestellten fünf allosterischen Fragmente, zeigten auch JK 569 (C<sub>4</sub>) und JK 551 (C<sub>6</sub>) eine negative Kooperativität gegenüber dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Fragmenten konnte diesbezüglich nicht ausgemacht werden (t-Test, p>0,05). Die Bindungsneigung von JK 569 (C<sub>4</sub>) ( $\log K_B = -5,87 ± 0,19$ ) unterschied sich nicht signifikant von derjenigen, die für JK 551 (C<sub>6</sub>) ( $\log K_B = -5,47 ± 0,19$ ) gefunden wurde (t-Test, p>0,05).



**Abbildung 4. 9:** Heterologe Inhibitionsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der allosterischen Fragmente JK 544 und JK 469 und JK 569, JK 551 mit dem orthosterischen Radioantagonisten  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  an  $h\text{M}_1$ -Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Anwesenheit von Atropin  $10\ \mu\text{M}$ , 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug  $0,2\ \text{nM}$ , die Zellzahl  $75.000$  Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES ( $20\ \text{mM}$ ) Puffer (L14), pH  $7,4$ ,  $28\ ^\circ\text{C}$ . Die Formelfragmente in (A) und (B) illustrieren die jeweilige Position des Halogensubstituenten. Kurvenanpassung: Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient  $n_{\text{H}}$  in Tabelle 4.7 wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. War das Steilheitsmaß nicht signifikant verschieden von  $n_{\text{H}} = -1$ , wurde zur weiteren Analyse Gleichung 15 verwendet. War das Steilheitsmaß signifikant verschieden von  $n_{\text{H}} = -1$ , wurde Gleichung 16 verwendet. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. AF: Allosterisches Fragment plus Zwischenkette.

Substanz	Halogen-substitution	Logistische Gleichung (Gl.12)		Tränkle et al. 2003 (Gl.16)/ Ehler Modell (Gl.15)/		
		Unteres Plateau (%)	$n_{\text{H}}$	$\log K_{\text{B}}$	$\log \hat{\nu}$	n
<b>JK 544</b> (AF/C <sub>4</sub> )	Br	$25 \pm 3$	$-4,38 \pm 2,86^{\#}$	$-5,37 \pm 0,11$	$-0,59 \pm 0,07$	3
<b>JK 469</b> (AF/C <sub>6</sub> )	Br	$24 \pm 2$	$-3,65 \pm 1,06^{\#}$	$-5,84 \pm 0,05^*$	$-0,62 \pm 0,04$	3
<b>JK 569</b> (AF/C <sub>4</sub> )	F,Cl	$14 \pm 5$	$= -1,00$	$-5,87 \pm 0,19$	$-0,85 \pm 0,28$	4
<b>JK 551</b> (AF/C <sub>6</sub> )	F,Cl	$8 \pm 10$	$= -1,00$	$-5,47 \pm 0,19$	$-1,11 \pm 0,58$	3

**Tabelle 4. 7:** Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.9 dargestellten Bindungskurven.  $n_{\text{H}}$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit.  $\log K_{\text{B}}$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des allosterischen Fragmentes.  $\log \hat{\nu}$ : Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\hat{\nu}$ . n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. Kurvenanpassung: Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. War das Steilheitsmaß nicht signifikant verschieden von  $n_{\text{H}} = -1$ , wurde zur weiteren Analyse Gleichung 15 verwendet. War das Steilheitsmaß signifikant verschieden von  $n_{\text{H}} = -1$ , wurde Gleichung 16 verwendet. AF: allosterisches Fragment plus Zwischenkette. Br: Brom; F: Fluor; Cl: Chlor - Substitution. \*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des jeweils kürzeren allosterischen Fragmentes (t-Test, \*  $p < 0,05$ ). #: Wert signifikant unterschiedlich von einer Kurvensteilheit von  $n_{\text{H}} = -1$  (F-Test,  $p < 0,05$ ).

Vergleicht man die Ergebnisse für alle sieben allosterischen Fragmente untereinander, zeigte JK 533 (C<sub>4</sub>) (F) die höchste Bindungsneigung zum freien Rezeptorprotein und JK 544 (C<sub>4</sub>) (Br) die schwächste. Ob dieses Ergebnis einen Einfluss auf die Bindungsorientierung sowie die daraus resultierende fraktionelle Rezeptorbesetzung der korrespondierenden Hybride hat, sollte nachfolgend untersucht werden.

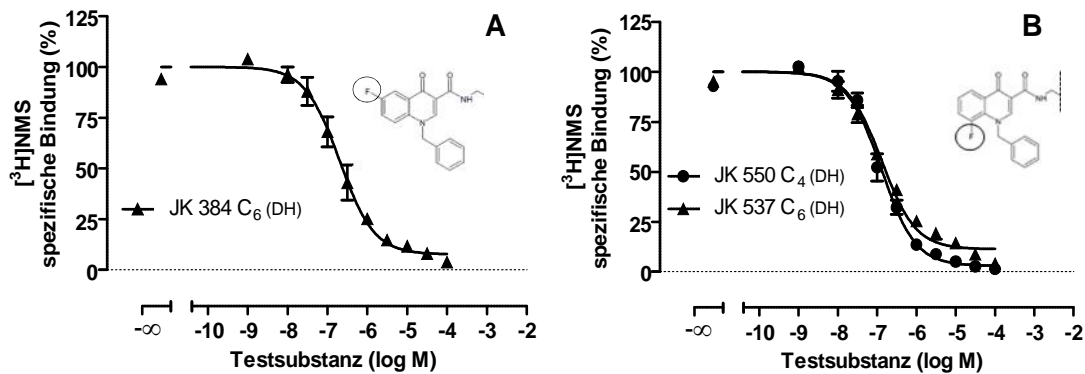
#### **b) Inhibition der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindung durch dualsterische Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden an hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen**

Wie bereits angeführt, sollte mit Hilfe der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten die Bindungsneigung der orthosterisch/allosterischen Hybridliganden zum freien Rezeptor differenziert werden: und zwar in eine Bindungskonstante, welche die Bindung des dualsterischen Liganden in der aktiven (dualsterischen) Bindungspose (K<sub>A</sub>) und in eine Bindungskonstante, welche die inaktive (allosterische) Bindungspose (K<sub>B</sub>) beschreibt. Wie bereits unter 4.1.3.1 erwähnt, war es zur Ermittlung dieser Parameterwerte mittels nichtlinearer Regressionsanalyse notwendig, die in der zuvor durchgeführten Analyse ermittelte Bindungskonstante K<sub>B</sub> des allosterischen Fragmentes, in der Analyse der Daten für das dualsterische Hybrid als Konstante zu behandeln. Aus diesem Grund, sind die für die allosterischen Fragmente ermittelten Bindungskonstanten K<sub>B</sub>, die ebenfalls als Bindungskonstanten der dualsterischen Hybridliganden für deren rein allosterischen Bindungspose dienen, in den nachfolgenden Tabellen in grau mit aufgeführt.

Abbildung 4.10 (A) zeigt die [<sup>3</sup>H]NMS-Interaktionskurven der dualsterischen Hybridliganden JK 384 (C<sub>6</sub>), JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>), deren korrespondierende allosterische Fragmente JK 372-1, JK 533 und JK 532 sind (vgl. Abb. 4.8). Die aus der jeweiligen Kurvenanalyse abgeleiteten Parameterwerte können als Zahlenwerte aus Tabelle 4.8 entnommen werden. Die Kurvensteilheit war im Unterschied zu den Kurven der allosterischen Fragmente nicht signifikant verschieden von einem Steilheitsmaß  $n_H = -1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ).

Alle drei dualsterischen Hybride verhielten sich gegenüber [<sup>3</sup>H]NMS am hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor negativ kooperativ. Die numerischen Schätzwerte der Bindungskonstante K<sub>A</sub> belegten, dass JK 384 (C<sub>6</sub>) eine neunfach stärkere Bindungsneigung in der dualsterischen (verglichen mit der allosterischen) Bindungspose aufwies. Ähnliches zeigte sich für das dualsterische Hybrid JK 537 (C<sub>6</sub>), welches eine sechsfach höhere Bindungsneigung zur dualsterischen, verglichen mit der allosterischen Bindungspose aufwies. Das Partnerhybrid JK 550, welches über eine C<sub>4</sub> Zwischenkette verfügte, wies demgegenüber eine 1,25-fach höhere Bindungsneigung zur allosterischen und damit inaktiven Bindungspose auf (vgl. Tab. 4.8).





**Abbildung 4. 10: Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der dualsterischen Hybridliganden JK 384, JK 550 und JK 537 mit dem orthosterischen Radioantagonisten  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  an  $h\text{M}_1\text{-wt}$ -Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Anwesenheit von Atropin  $10\ \mu\text{M}$ , 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug  $0,2\ \text{nM}$ , die Zellzahl  $75.000$  Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES ( $20\ \text{mM}$ ) Puffer (L14), pH  $7,4$ ,  $28\ ^\circ\text{C}$ . Die Formelfragmente in (A) und (B) illustrieren die jeweilige Position des Fluorsubstituenten. Kurvenanpassung: Der Hill-Koeffizient  $n_{\text{H}}$  in Tabelle 4.8 wurde mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Die weitere Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe von Gleichung 17 in der  $R_i$  durch Gleichung 21 ersetzt wurde (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. DH: Dualsterisches Hybrid.

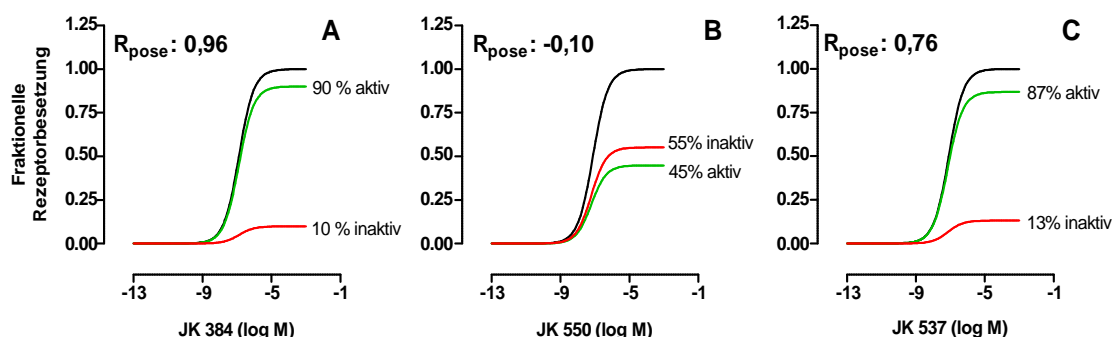
Substanz	Halogen-Substitution	$n_{\text{H}}$	$\log K_{\text{A}}$	$\log K_{\text{B}}$	$\log \hat{\prime}$	$R_{\text{pose}}$	n
JK 384 (DH/C <sub>6</sub> )	F	$= -1,00$	$-6,84 \pm 0,06$	$= -5,88$	$-0,31$ (-1,00 - - 0,05)	$0,96$	3
JK 550 (DH/C <sub>4</sub> )	F	$= -1,00$	$-6,76 \pm 0,10$	$= -6,86$	$-1,50$ (- - -1,15)	$-0,10$	3
JK 537 (DH/C <sub>6</sub> )	F	$= -1,00$	$-7,02 \pm 0,05$	$= -6,26$	$-0,37$ (-0,57 - -0,16)	$0,76$	3

**Tabelle 4. 8 Kenngrößen der in Abbildung 4.10 dargestellten Bindungskurven.**  $n_{\text{H}}$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit.  $\log K_{\text{A}}$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des dualsterischen Hybrides in dualsterischer Orientierung.  $\log K_{\text{B}}$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des allosterischen Fragmentes.  $\log \hat{\prime}$ : Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\hat{\prime}$ .  $R_{\text{pose}}$ : Negativer Logarithmus des Orientierungsverhältnisses der Bindungskonstanten der Pharmakophore für die aktive ( $K_{\text{A}}$ ) oder die inaktive ( $K_{\text{B}}$ ) Bindungspose. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes, bzw. Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle aus n unabhängigen Experimenten die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Der Hill-Koeffizient wurde mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe von Gleichung 17, in der  $R_i$  durch Gleichung 21 ersetzt wurde (vgl. 3.2.4.2). DH: Dualsterisches Hybrid; F: Fluor-Substitution.

Neben der Berechnung der Bindungsneigung, ermöglichte das allosterische Fünf-Zustandsmodell es erstmals, einen Schätzwert für den Parameter  $R_{\text{pose}}$  zu bestimmen. Dieser Parameter dient als Orientierungshilfe und wird aus dem Quotient der Bindungskonstante  $K_{\text{A}}$  des dualsterischen Hybrides für die aktive und von  $K_{\text{B}}$  für die inaktive Bindungspose berechnet. Er gibt Hinweise auf das Verhältnis zwischen dem aktiven und dem inaktiven Rezeptorensemble. Auf Grund des in der Analyse als Konstante behandelten Parameter  $K_{\text{B}}$  wies die nichtlineare Kurvenanalyse dem als „transform to report“

parallel zur Kurvenanalyse berechneten  $R_{\text{pose}}$  Wert keinen Parameterfehler zu. Über eine Signifikanz der Unterschiede zwischen den  $R_{\text{pose}}$ -Werten unterschiedlicher Hybride, ließ sich wegen dieses fehlenden Parameterfehlers folglich keine Aussage treffen. Um die ermittelten  $R_{\text{pose}}$ -Werte jedoch besser einordnen zu können, wurde mit Hilfe der Gleichungen 26 und 27, auch die maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung aktiver und inaktiver Rezeptorpopulationen konzentrationsabhängig errechnet und simuliert dargestellt (vgl. Abb. 4.11).

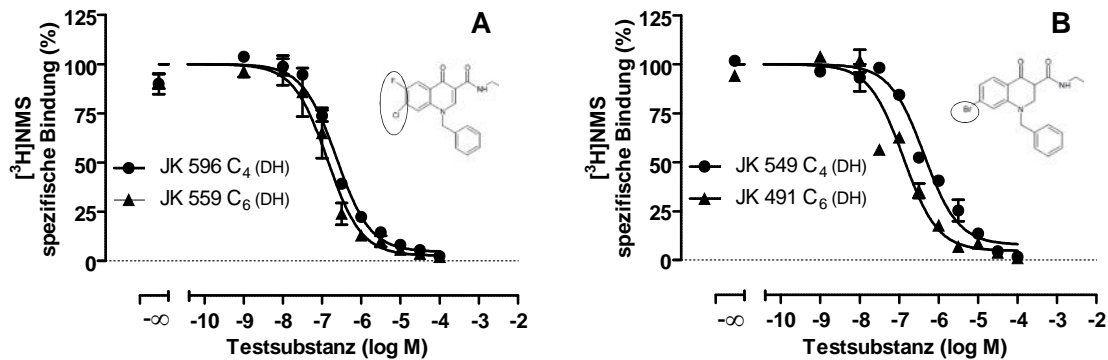
Die Ergebnisse für die drei Hybride JK 384, JK 550 und JK 537 sind in Abbildung 4.11 gegenübergestellt. Das dualsterische Hybrid JK 384 ( $C_6$ ) besaß einen  $R_{\text{pose}}$  Wert von 0,96, was sich in einer Fraktion von maximal 90% aktiver Rezeptoren widerspiegelte. Ein Vergleich mit dem Hybridpaar JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) zeigte wie bereits anhand der Unterschiede der Bindungskonstanten  $K_A$  und  $K_B$  beobachtet, interessante Unterschiede. Das längere der beiden dualsterischen Hybride JK 537 ( $C_6$ ) wies, mit einem  $R_{\text{pose}}$ -Wert von 0,76 und einer aktiven Rezeptorpopulation von maximal 87%, eine weitgehend dualsterische Interaktion mit dem Rezeptorprotein auf, wohingegen das kurze Hybrid JK 550 mit einem  $R_{\text{pose}}$  Wert von -0,10 durch das negative Vorzeichen einen ersten Hinweis darauf lieferte, das die allosterische, inaktive Bindungspose dieses dualsterischen Hybrides überwog. Die Berechnung einer maximalen fraktionellen Rezeptorbesetzung von lediglich 45% in der aktiven und 55% in der inaktiven Bindungsorientierung bestätigte diese Hypothese.



**Abbildung 4. 11: Konzentrationsabhängige maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung der dynamischen Hybridliganden JK 384 ( $C_6$ ) und dem Paar aus JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) in der aktiven und inaktiven Bindungspose am muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptor.** Grün: aktive dualsterische Rezeptorbesetzung; rot: inaktive allosterische Rezeptorbesetzung; schwarz: orientierungsunabhängige Gesamtbesetzung.  $R_{\text{pose}}$ : Negativer Logarithmus des Orientierungsverhältnisses der Bindungskonstanten der Pharmakophore für die aktive ( $K_A$ ) oder die inaktive ( $K_B$ ) Bindungspose. Die Kurven wurden unter Anwendung von Gleichung 26 und 27 in Kenntnis von  $K_A$  und  $K_B$  errechnet (vgl. Kapitel 3.2.4.2).

Nach diesem interessanten Befund sollte nachfolgend geprüft werden, ob eine solche Bevorzugung einer neuen Bindungspose durch eine geringgradige Strukturänderung des Liganden, auch „Flip-Flop“-Mechanismus genannt, auch bei den verbliebenen zwei Hybridpaaren detektiert werden konnte. Dazu wurden die vier Hybridliganden in analoger Weise untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.12 und Tabelle 4.9 dargestellt. Das obere und untere Plateau aller vier Konzentrations-Effekt-Kurven konnte auf 100%, bzw. 0% festgesetzt werden, da es sich in allen Fällen nicht signifikant von diesen

Werten unterschied (F-Test,  $p > 0,05$ ). Das Steilheitsmaß der Kurven zeigte mit Ausnahme von JK 491 ( $C_6$ ) ( $n_H = -0,72 \pm 0,07$ ) keine signifikante Abweichung der Kurvensteilheit von  $n_H = -1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ). Das Hybridpaar JK 596 ( $C_4$ ) und JK 559 ( $C_6$ ) ist in Abbildung 4.12 (A) dargestellt. Beide Hybride verfügten über ausgeprägt negative Kooperativität mit [ $^3$ H]NMS. Das längere Hybrid (JK 559) zeigte wie zuvor JK 537 eine deutlich höhere Bindungsneigung in der aktiven als in der inaktiven Bindungspose. Mit  $\log K_B = -6,91 \pm 0,05$  war die Bindungsneigung der dualsterischen Bindung 11-fach höher als die Bindungsneigung der allosterischen Bindung. Anders als bei dem bereits vorgestellten Hybridpaar, zeigte das kurze Hybrid JK 596 ( $C_4$ ) nicht wie JK 550 ( $C_4$ ) eine höhere Bindungsneigung in der allosterischen Bindungspose, sondern vielmehr eine 47-fach höhere Bindungsneigung in der dualsterischen Bindungspose (vgl. Tab. 4.8 und 4.9). Das letzte Hybridpaar, das über eine Bromsubstitution im allosterischen Molekülteil verfügte (vgl. Abb. 4.1 und Formelausschnitt in Abb. 4.12 (B)), zeigte wie die drei zuvor untersuchten dualsterischen Hybride eine stark negative Kooperativität gegenüber [ $^3$ H]NMS. Das längere der beiden Hybridliganden JK 491 wies eine 18-fach höhere Bindungsneigung zur aktiven, dualsterischen Bindungspose im Vergleich zur inaktiven, allosterischen Bindungspose auf. Das kurze Hybrid JK 549 zeigte wie das kurze Hybrid JK 596 eine ebenfalls höhere Bindungsneigung zur dualsterischen Bindungspose, die etwa einem Faktor von 20 entsprach (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Kurvensteilheit konnte mit Ausnahme der Inhibitionskurve für JK 491, die mit  $n_H = -0,72 \pm 0,07$  charakterisiert wurde, mit einem Hill-Koeffizienten von  $n_H = -1$  beschrieben werden (F-Test,  $p > 0,05$ ).

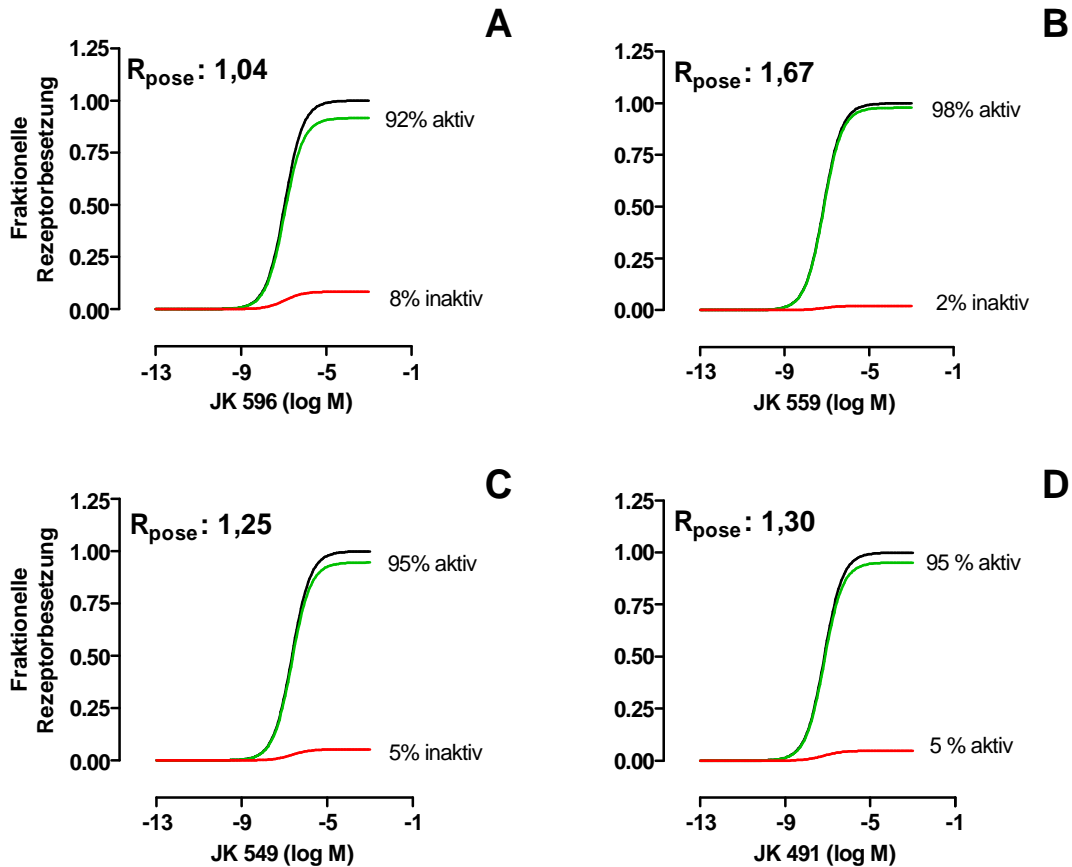


**Abbildung 4. 12: Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der dualsterischen Hybridliganden-Paare JK 596/JK 559 und JK 549/JK 491 mit dem orthosterischen Radioantagonisten [ $^3$ H]NMS an  $hM_1$ -Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [ $^3$ H]NMS in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen [ $^3$ H]NMS-Bindung in Anwesenheit von Atropin 10  $\mu$ M, 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug 0,2 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28  $^{\circ}$ C. Die Formelfragmente in (A) und (B) illustrieren die jeweilige Position des Halogensubstituenten. Kurvenanpassung: Der Hill-Koeffizient  $n_H$  in Tabelle 4.9 wurde mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Die weitere Analyse der erfolgte mit Hilfe von Gleichung 17 in der  $R_i$  durch Gleichung 21 ersetzt wurde (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. DH: Dualsterisches Hybrid.

Ein Vergleich der  $R_{\text{pose}}$ -Werte der beiden Hybride JK 596 ( $C_4$ ) und JK 559 ( $C_6$ ) zeigte, dass auch in diesem Fall das kürzere der beiden Hybride einen deutlich niedrigeren Wert besaß, jedoch zeigte sich in der Betrachtung der fraktionellen Rezeptorbesetzung, dargestellt in Abbildung 4.13, dass die Zwischenkettenverlängerung in JK 559 ( $C_6$ ) nur eine Zunahme der maximalen fraktionellen Rezeptorbesetzung des Hybrides in der aktiven Pose von 6% bedeutete. Der Vergleich der beiden Hybride JK 549 und JK 491 zeigte interessanterweise keinen Unterschied bezüglich ihrer  $R_{\text{pose}}$  Werte und der maximalen fraktionellen Rezeptorbesetzung (vgl. Abb. 4.13).

Substanz	Halogen-Substitution	$n_H$	$\log K_A$	$\log K_B$	$\log \hat{\nu}$	$R_{\text{pose}}$	n
<b>JK 596</b> (DH/ $C_4$ )	F,Cl	= -1,00	-6,91 ± 0,05	= -5,87	-0,57 (-1,38 - -0,31)	1,04	4
<b>JK 559</b> (DH/ $C_6$ )	F,Cl	= -1,00	-7,16 ± 0,08	= -5,47	-0,18 (- - 0,33)	1,69	3
<b>JK 549</b> (DH/ $C_4$ )	Br	= -1,00	-6,62 ± 0,06	= -5,37	-0,11 (-0,79 - 0,14)	1,25	4
<b>JK 491</b> (DH/ $C_6$ )	Br	-0,72 ± 0,07 <sup>#</sup>	-7,18 ± 0,07 <sup>**</sup>	= -5,84	-0,27 (- - 0,09)	1,30	3

**Tabelle 4. 9: Kenngrößen der in Abbildung 4.12 dargestellten Bindungskurven.**  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit.  $\log K_A$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des dualsterischen Hybrides in dualsterischer Orientierung.  $\log K_B$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des allosterischen Fragmentes.  $\log \hat{\nu}$ : Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\hat{\nu}$ .  $R_{\text{pose}}$ : Negativer Logarithmus des Orientierungsverhältnisses der Bindungskonstanten der Pharmakophore für die aktive ( $K_A$ ) oder die inaktive ( $K_B$ ) Bindungspose. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes, bzw. Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle aus n unabhängigen Experimenten die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Der Hill-Koeffizient wurde mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung (Gleichung 12) analysiert. Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe von Gleichung 17 in der  $R_t$  durch Gleichung 21 ersetzt wurde. DH: Dualsterisches Hybrid. Br: Brom-, F: Fluor-, Cl: Chlor-Substitution. \*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des entsprechenden kürzeren dualsterischen Hybrides (t- Test, \*\* $p < 0,01$ ). #: Wert signifikant unterschiedlich von einer Kurvensteilheit von  $n_H = -1$  (F-Test,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 4. 13: Konzentrationsabhängige maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung der dynamischen Hybridliganden JK 596 ( $C_4$ ), JK 559 ( $C_6$ ) sowie JK 549 ( $C_4$ ) und JK 491 ( $C_6$ ) in der aktiven und inaktiven Bindungspose am muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptor.** Grün: aktive dualsterische Rezeptorbesetzung; rot: inaktive allosterische Rezeptorbesetzung; schwarz: orientierungsunabhängige Gesamtbesetzung.  $R_{\text{pose}}$ : Negativer Logarithmus des Orientierungsverhältnisses der Bindungskonstanten der Pharmakophore für die aktive ( $K_A$ ) oder die inaktive ( $K_B$ ) Bindungspose. Die Kurven wurden unter Anwendung von Gleichung 26 und 27 in Kenntnis von  $K_A$  und  $K_B$  errechnet (vgl. Kapitel 3.2.4.2).

Ein Vergleich aller sieben dualsterischen Hybride in der dualsterischen Bindungspose untereinander, wies für die beiden Hybride JK 559 ( $C_6$ ) und JK 491 ( $C_6$ ) die höchste und für JK 549 ( $C_4$ ) die schwächste Bindungsneigung zum freien Rezeptorprotein auf. Alle Hybride zeigten eine ausgeprägte negative Kooperativität mit [ $^3\text{H}$ ]NMS. Des Weiteren zeigte das dualsterische Hybrid JK 559 ( $C_6$ ) mit einem  $R_{\text{pose}}$ -Wert von 1,67 und einer zu maximal 98% aktiven Rezeptorpopulation die quantitativ höchste fraktionelle Rezeptorbesetzung in der dualsterischen Bindungsorientierung, das Hybrid JK 550 ( $C_4$ ) mit einem  $R_{\text{pose}}$ -Wert von -0,10 und einer maximalen fraktionellen Rezeptorbesetzung der dualsterischen Rezeptorpopulation von 45%, die niedrigste.

#### 4.1.3.2 Bestimmung der Bindungseigenschaften dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden an $hM_1$ -Rezeptoren in intakten CHO-Zellen mit Hilfe einer globalen Analyse basierend auf Bindungsdaten

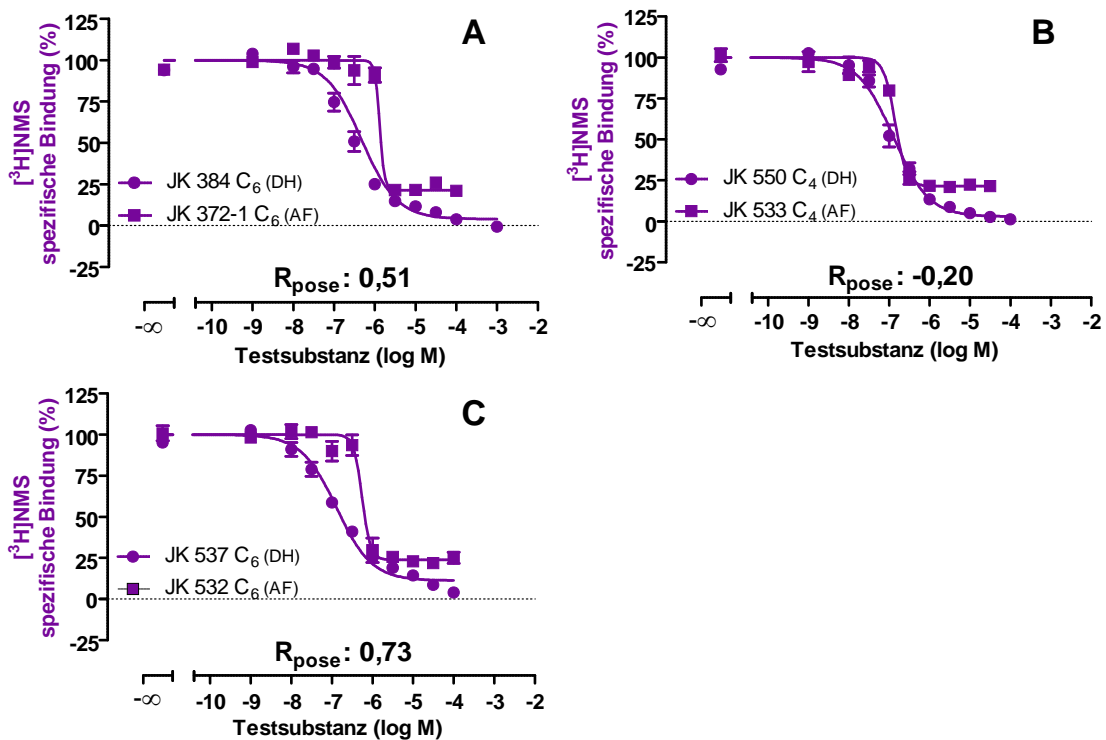
Um die im vorangegangenen Kapitel beschriebene Analyse der Bindungsneigung des dualsterischen Hybrides in der dualsterischen ( $\log K_A$ ) und der allosterischen ( $\log K_B$ ) Bindungsorientierung weiter zu vereinfachen, wurde ein globales Verfahren entwickelt, das es ermöglichen sollte, sowohl die [ $^3H$ ]NMS-Bindungsdaten für das allosterische Fragment, als auch für das korrespondierende dualsterische Hybrid simultan in einer einzelnen globalen Analyse zu analysieren. Für diese simultane Analyse wurden die bereits vorgestellten Gleichungen 16 und 22 für das allosterische Fragment und für das dualsterische Hybrid verwendet (vgl. Kapitel 3.2.4.2). Die Kombination beider Gleichungen ermöglicht es, einen Wert für  $K_B$ , also die Bindungsneigung des dualsterischen Hybridliganden in der rein allosterischen Bindungspose zwischen beiden Gleichungen zu teilen und numerische Schätzwerte zu finden, welche die Anforderungen beider Gleichungen erfüllen. Die gemeinsame Nutzung des Parameters  $K_B$  bedeutet jedoch nicht, dass dieser Parameter, wie in der ersten vorgestellten Analyse auf einen bestimmten Wert festgesetzt wird. Stattdessen wird ermöglicht, dass die Gleichgewichtsbindungsdaten des allosterischen Fragments und des dualsterischen Hybrides gemeinsam beitragen können, numerische Werte für die Bindungsneigung des dualsterischen Hybrides zur dualsterischen Bindungspose  $K_A$  und die Kooperativität ( $\alpha'$ ) des Hybridliganden mit [ $^3H$ ]NMS zu finden. Auf Grund des in dieser globalen Analyse nicht als Konstante behandelten Parameters  $K_B$ , war es zudem möglich, den Parameter  $R_{\text{pose}}$ , welcher die relative Fraktion von aktiver versus inaktiver Rezeptorpopulation darstellt, mit einem Standardfehler (SEM) zu ermitteln, wodurch erstmalig ein statistischer Vergleich von  $R_{\text{pose}}$ -Werten unter den dualsterischen Hybriden ermöglicht wurde. Die Bestimmung der fraktionellen Größen für die aktive und die inaktive Rezeptorpopulation erfolgte wie zuvor beschrieben mit Hilfe von Gleichung 26 und 27 (vgl. Kap. 3.2.4.2).

Abbildung 4.14, 4.15 sowie Tabelle 4.10 und 4.11 zeigen die Ergebnisse der globalen Analyse von in Gegenwart der dualsterischen Iperoxo/BQCAD Hybridliganden sowie ihrer korrespondierenden allosterischen Fragmente an  $hM_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen erhobenen [ $^3H$ ]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten. JK 384 ( $C_6$ ) zeigte für die Bindungskonstante  $K_B$  der allosterischen Bindungspose einen sehr hohen Standardfehler, weshalb sich die Bindungskonstanten  $K_A$  der dualsterischen und  $K_B$  der allosterischen Bindungspose nicht signifikant unterschieden (t-Test,  $p > 0,05$ ). Sowohl die Bindung von JK 384 und seines allosterischen Bausteines, zeigte negative Kooperativität mit [ $^3H$ ]NMS.

Im Zusammenhang mit den beiden Hybriden JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) sollte überprüft werden, ob die globale Analyse in der Lage war, den zuvor beobachteten Orientierungswechsel („Flip-Flop“-Mechanismus) dieses Hybridpaares zu bestätigen (vgl. 4.1.3.1). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.14 (B) und (C) dargestellt sowie in Tabelle 4.10 zusammengefasst. Die negative Kooperativität  $\log \alpha'_{\text{Hybrid}}$

von JK 550 mit [ $^3\text{H}$ ]NMS unterschied sich nicht signifikant von der Kooperativität  $\log\alpha'_{\text{Fragment}}$  seines Bausteines (t-Test,  $p>0,05$ ). Das Hybrid JK 537 ( $\text{C}_6$ ) zeigte eine sechsfach höhere Bindungsneigung in der dualsterischen als in der allosterischen Bindungspose. Die negative Kooperativität des Hybrides mit [ $^3\text{H}$ ]NMS war um den Faktor drei größer als die des Bausteines (t-Test,  $p<0,05$ ).

Wie bereits erwähnt, erlaubte es die globale Datenanalyse erstmalig, einen Parameterfehler für  $R_{\text{pose}}$  zu ermitteln, mit dessen Hilfe eine statistische Überprüfung von Unterschieden zwischen den Hybriden ermöglicht wurde. Der Wert  $R_{\text{pose}} = -0,20 \pm 0,17$  für JK 550 bestätigte das in den Einzelanalysen ermittelte Ergebnis und erwies sich gegenüber JK 537 ( $R_{\text{pose}} = 0,73 \pm 0,09$ ) als hoch signifikant (t-Test,  $p<0,05$ ). Die Rezeptorfraction der aktiven Pose stieg somit von 39% für JK 550 auf 84% für JK 537 an. Dementsprechend sank die Rezeptorfraction der inaktiven Pose von 61% (JK 550) auf 16% (JK 537) durch die Verlängerung der Zwischenkette um zwei Kohlenstoffatome.



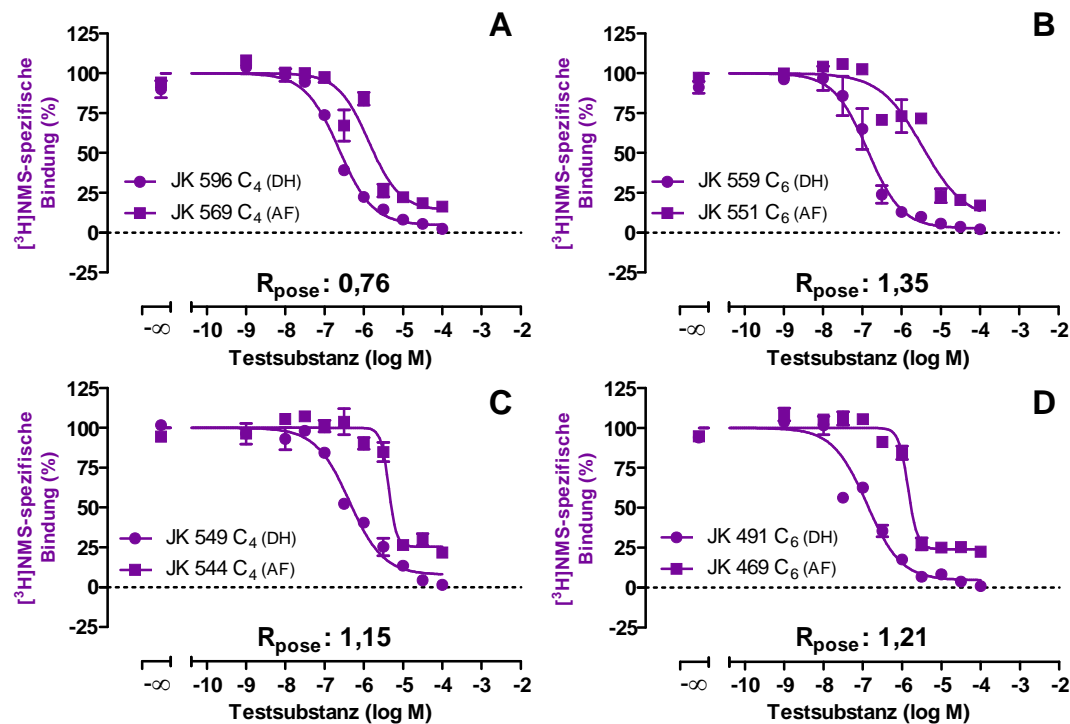
**Abbildung 4. 14:** Ergebnisse der globalen Analyse der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten in Gegenwart der Fragmente JK 372-1, JK 533 und JK 532 und der Hybride JK 384, JK 550 und JK 537 basierend auf dem Bindungsmodell für dualsterische Hybridliganden und dem ternären Modell allosterischer Interaktionen an  $h\text{M}_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus zwei Kurven (dualsterisches Hybrid (DH) und allosterisches Fragment plus Zwischenkette (AF)), vgl. Kapitel 3.2.4.2. Ordinate: spezifische [ $^3\text{H}$ ]NMS Bindung in Ab- und Anwesenheit des dualsterischen Hybrides und des korrespondierenden allosterischen Bausteines in Prozent an  $h\text{M}_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.  $R_{\text{pose}}$ : Negativer Logarithmus des Orientierungsverhältnisses der Bindungskonstanten der Pharmakophore für die aktive ( $K_A$ ) oder die inaktive ( $K_B$ ) Bindungspose.

Substanz	log K <sub>A</sub>	log K <sub>B</sub>	log $\alpha$ (Fragment)	log $\alpha$ (Hybrid)	R <sub>pose</sub>	dual (%)	allo (%)
<b>JK 384</b> (DH/C <sub>4</sub> )	-6,42 ± 0,28	-5,90 ± 0,84	-0,85 ± 0,01	-0,98 ± 0,85	0,51 ± 1,10	77	23
<b>JK 550</b> (DH/C <sub>4</sub> )	-6,72 ± 0,15	-6,92 ± 0,04	-0,86 ± 0,05	-1,56 ± 0,34 <sup>§</sup>	-0,20 ± 0,17	39	61
<b>JK 537</b> (DH/C <sub>6</sub> )	-7,03 ± 0,07	-6,30 ± 0,06 <sup>***###</sup>	-0,81 ± 0,04	-0,36 ± 0,13 <sup>§§§##</sup>	0,73 ± 0,09 <sup>###</sup>	84	16

**Tabelle 4. 10: Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.14 dargestellten Bindungskurven.** logK<sub>A</sub>: Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der dynamischen Hybridliganden für die dualsterische, aktive Rezeptorbindungspose. logK<sub>B</sub>: Gleichgewichtsdissoziationskonstante des allosterischen Molekülbausteins am unbesetzten hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor und damit der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der dynamischen Hybridliganden in ihrer allosterischen Rezeptorbindungspose. log  $\alpha$  (Fragment): Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$  des allosterischen Bausteines mit [<sup>3</sup>H]NMS. log  $\alpha$  (Hybrid): Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$  des dualsterischen Hybrides in der allosterischen Bindungspose mit [<sup>3</sup>H]NMS. R<sub>pose</sub>: Negativer Logarithmus des Orientierungsverhältnisses der Bindungskonstanten des Hybrides in der aktiven (K<sub>A</sub>) oder der inaktiven (K<sub>B</sub>) Bindungspose. dual/ allo: Konzentrationsabhängige maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch das Hybrid in der aktiven (dual) und inaktiven (allo) Bindungspose. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Kurvenanalyse: globale Analyse des allosterischen Fragments Gleichung (16) und des dualsterischen Hybrides Gleichung (17 in Verbindung mit 21)(vgl. 3.2.4.2). DH: dualsterisches Hybrid. \*\*\*: Wert signifikant verschieden zum Parameterwert log K<sub>A</sub> des gleichen dualsterischen Hybrides (t-Test, \*\*\* p<0,001), ###: Wert signifikant unterschiedlich von dem entsprechenden Parameterwert des kürzeren dualsterischen Hybrides (t-Test, ## p<0,01, ### p<0,001). §,§§§: Wert signifikant unterschiedlich von dem entsprechenden Wert der Kooperativität des jeweiligen allosterischen Fragmentes ( $\alpha$  (Fragment))(t-Test, §p<0,05, §§§p<0,001).

Das dualsterische Hybrid JK 596 (C<sub>4</sub>) besaß eine sechsfach, das längere Hybrid JK 559 (C<sub>6</sub>) eine sogar 22-fach höhere Bindungsneigung in der dualsterischen als in der allosterischen Bindungspose (vgl. Abb. 4.15 (A und B) und Tab. 4.11). Die Bindungskonstanten für die dualsterische Bindungspose unterschieden sich zwischen den Hybriden JK 596 und 559 nicht signifikant (t-Test, p>0,05), wohingegen die Bindungskonstante logK<sub>B</sub> = -6,04 ± 0,07 der allosterischen Bindungspose für das kürzere Hybrid JK 596 signifikant niedriger war als logK<sub>B</sub> = -5,72 ± 0,13 für JK 559 (t-Test, p<0,05). Die negative Kooperativität beider Hybride mit [<sup>3</sup>H]NMS wies keinen signifikanten Unterschied von derjenigen der jeweiligen allosterischen Bausteine auf (t-Test, p>0,05). Der Wert R<sub>pose</sub> = 0,76 ± 0,11 des kürzeren Hybrides JK 596 war signifikant geringer als R<sub>pose</sub> = 1,35 ± 0,16 des längeren Hybrides JK 559. Der Maximalwert der fraktionellen Rezeptorbesetzungen in der aktiven Pose stieg von 85% für JK 596 auf 96% für JK 559 an. Dementsprechend sank die maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung in der inaktiven Rezeptorpose von 15% für JK 596 auf 4% für JK 559.





**Abbildung 4. 15:** Ergebnisse der globalen Analyse der  $[^3\text{H}]$ NMS Gleichgewichtsbindungsdaten in Gegenwart der Fragmente JK 569, JK 551, JK 544 und JK 469 sowie ihrer dualsterischen Hybride JK 596, JK 559, JK 549 und JK 491 basierend auf dem Bindungsmodell für dualsterische Hybridliganden und dem ternären Modell allosterischer Interaktionen an  $hM_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus zwei Kurven (dualsterisches Hybrid (DH) und allosterisches Fragment plus Zwischenkette (AF)), vgl. Kapitel 3.2.4.2. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]$ NMS Bindung in Ab- und Anwesenheit des dualsterischen Hybrides und des korrespondierenden allosterischen Bausteines in Prozent an  $hM_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.  $R_{\text{pose}}$ : Negativer Logarithmus des Orientierungsverhältnisses der Bindungskonstanten der Pharmakophore für die aktive ( $K_A$ ) oder die inaktive ( $K_B$ ) Bindungspose.

Das dritte Hybridpaar, dessen Bindungsdaten in Abbildung 4.15 (C und D) dargestellt und dessen Ergebnisse in Tabelle 4.11 zusammengestellt sind, zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede hinsichtlich der Bindungsneigung zu  $hM_1$ -wt-Rezeptoren. Das dualsterische Hybrid JK 549 ( $C_4$ ) besaß eine 14-fach höhere, das längere Hybrid JK 491 eine 16-fach höherer Bindungsneigung in der dualsterischen als in der allosterischen Bindungspose (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Bindungskonstanten für die dualsterische Bindungspose differierten, anders als für das Hybridpaar JK 596 und 559, zwischen den Hybriden JK 596 und 559 signifikant. Das längere Hybrid JK 491 zeigte mit einem  $\log K_A = -7,10 \pm 0,07$  eine dreifach höhere Bindungsneigung für die dualsterische Bindungspose auf, als das kürzere Hybrid JK 549 (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Bindungskonstante  $\log K_B = -5,89 \pm 0,05$  der allosterischen Bindungspose für das längere Hybrid JK 491 ( $C_6$ ) war ebenfalls dreifach niedriger, als für JK 549 ( $C_4$ ) (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die negative Kooperativität von JK 549 mit  $[^3\text{H}]$ NMS war mit einem  $\log \hat{\nu}_{(\text{Hybrid})}$  von  $-0,15 \pm 0,19$  vierfach höher als die des Bausteines. Auch das längere Hybrid zeigte mit einem  $\log \hat{\nu}_{(\text{Hybrid})}$

von  $-0,32 \pm 0,25$  eine Zunahme der Kooperativität. Die dualsterischen Hybride JK 549 und JK 491 unterschieden sich hinsichtlich ihrer  $R_{\text{pose}}$ -Werte nicht signifikant voneinander ( $R_{\text{pose, JK549}} = 1,15 \pm 0,09$  versus  $R_{\text{pose, JK491}} = 1,21 \pm 0,08$  (t-Test,  $p > 0,05$ ). Der Maximalwert der fraktionellen Rezeptorbesetzungen in der aktiven Pose betrug für JK 549 93%, für JK 491 94%, für JK 596 85% und für JK 559 96%. Dementsprechend betrug die maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung der inaktiven Pose für JK 549 7%, für JK 491 6%, für JK 596 15% und für JK 559 4%.

Substanz	$\log K_A$	$\log K_B$	$\log \hat{\phantom{K}}$ (Fragment)	$\log \hat{\phantom{K}}$ (Hybrid)	$R_{\text{pose}}$	dual %	allo %
<b>JK 596</b> (DH/C <sub>4</sub> )	$-6,80 \pm 0,08$	$-6,04 \pm 0,07^{***}$	$-1,05 \pm 0,13$	$-0,76 \pm 0,11$	$0,76 \pm 0,11$	85	15
<b>JK 559</b> (DH/C <sub>6</sub> )	$-7,07 \pm 0,09$	$-5,72 \pm 0,13^{***\#}$	$-1,31 \pm 0,53$	$-0,44 \pm 0,54$	$1,35 \pm 0,16^{\#\#}$	96	4
<b>JK 549</b> (DH/C <sub>4</sub> )	$-6,56 \pm 0,06$	$-5,41 \pm 0,07^{***}$	$-0,77 \pm 0,06$	$-0,15 \pm 0,19^{\#\#}$	$1,15 \pm 0,09$	93	7
<b>JK 491</b> (DH/C <sub>6</sub> )	$-7,10 \pm 0,07^{\#\#}$	$-5,89 \pm 0,05^{***\#\#}$	$-0,79 \pm 0,05$	$-0,32 \pm 0,25$	$1,21 \pm 0,08$	94	6

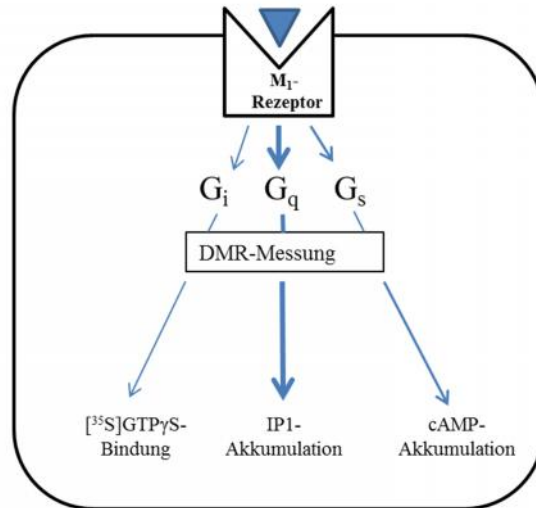
**Tabelle 4. 11: Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.15 dargestellten Bindungskurven.**  $\log K_A$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der dynamischen Hybridliganden für die dualsterische, aktive Rezeptorbindungspose.  $\log K_B$ : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des allosterischen Molekülbausteins am unbesetzten  $hM_1$ -Rezeptor und damit der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der dynamischen Hybridliganden in ihrer allosterischen Rezeptorbindungspose.  $\log \hat{\phantom{K}}$  (Fragment): Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\hat{\phantom{K}}$  des allosterischen Bausteins mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ .  $\log \hat{\phantom{K}}$  (Hybrid): Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\hat{\phantom{K}}$  des dualsterischen Hybrides in der allosterischen Bindungspose mit  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ .  $R_{\text{pose}}$ : Negativer Logarithmus des Orientierungsverhältnisses der Bindungskonstanten des Hybrides in der aktiven ( $K_A$ ) oder der inaktiven ( $K_B$ ) Bindungspose. dual/ allo: Konzentrationsabhängige maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch das Hybrid in der aktiven (dual) und inaktiven (allo) Bindungspose. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Kurvenanalyse: globale Analyse des allosterischen Fragments Gleichung (16) und des dualsterischen Hybrides Gleichung (17 in Verbindung mit 21)(vgl. 3.2.4.2). \*\*\*: Wert signifikant verschieden zum Parameterwert  $\log K_A$  des gleichen dualsterischen Hybrides (t-Test, \*\*\*  $p < 0,001$ ), #, ##, ###: Wert signifikant unterschiedlich von der entsprechenden Bindungskonstante des kürzeren dualsterischen Hybrides (t-Test, #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ ). §§: Wert signifikant unterschiedlich von dem entsprechenden Wert der Kooperativität des jeweiligen allosterischen Fragmentes ( $\hat{\phantom{K}}$  (Fragment))(t-Test, §§  $p < 0,01$ ).

Zusammenfassend bestätigt die globale Analyse die Ergebnisse der zuvor angewendeten Analyseergebnisse aus Einzelkurven. Die mit Hilfe der globalen Analyse ermittelten Standardfehler (SEM) für numerische Parameter von  $R_{\text{pose}}$  erlauben zudem erstmalig einen statistischen Vergleich der durch die dualsterischen Hybridliganden induzierten Verhältnisse ihrer Bindungsorientierungen. Die Verlängerung der Zwischenkette des Hybrides JK 550 (C<sub>4</sub>) um zwei Methylengruppen zeigte in JK 537 (C<sub>6</sub>) eine signifikante Zunahme dualsterischen Bindungsorientierung um 55% (von 39 auf 84%). Das in analoger Weise verlängerte Hybrid JK 559 (C<sub>6</sub>) zeigte eine signifikante Zunahme der dualsterischen Bindungsorientierung um 11%, wohingegen das strukturanalog veränderte Hybridpaar JK 549/ JK 491 interessanterweise keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Bindungsorientierung aufwies – ein Grund hierfür mag sein, dass das kürzere JK 549 bereits zu 93% eine dualsterische Rezeptorbindungsorientierung einzunehmen vermag. Um einen Eindruck darüber zu gewinnen, inwiefern die Bindungsorientierung einen Einfluss auf die Hybrid-induzierte Signalwegsaktivierung

besitzt, wurden unterschiedliche funktionelle pharmakologische Experimente durchgeführt. Die daraus resultierenden Ergebnisse sollen im Folgenden vorgestellt werden.

### 4.1.4 Dualsterische Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden induzieren Voll- bzw. Partialagonismus

Kommt es nach der Rezeptoraktivierung durch einen Liganden zu einer Konformationsänderung und nachfolgender Interaktion des Rezeptorproteins mit einem heterotrimeren G Protein, stellt dieses Phänomen den Beginn einer Signaltransduktion dar, die es der Zelle ermöglicht, extrazelluläre Stimuli in das Zellinnere zu übertragen (Pierce et al. 2002; Lefkowitz 2004; Rasmussen et al. 2011b; Kruse et al. 2013). Der muskarinische  $M_1$ -Rezeptor zählt zu den präferenziell  $G_q$ -gekoppelten Rezeptoren, ist aber ebenfalls in der Lage, mit Proteinen der  $G_i$  und  $G_s$ -Familie zu interagieren (Offermanns et al. 1994; Burford und Nahorski 1996; Akam et al. 2001). Im Feld der GPCR-Forschung gibt es gegenwärtig eine große Anzahl von Techniken, die zur Detektion unterschiedlicher, nachgeschalteter Signalwege der Rezeptoraktivierung eingesetzt werden. In Abbildung 4.16 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten experimentellen Verfahren dargestellt, die verwendet wurden, um drei der durch G Proteine induzierten Signalwege zu detektieren und quantifizieren. Die Messung des sekundären Botenstoffes Inositol-1,4,5 Triphosphat ( $IP_3$ ) bzw.  $IP_1$  diente der Messung und Quantifizierung des  $G_q$ -Signalweges - wohingegen die Messung der Akkumulation von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) als Messung und Quantifizierung des durch  $G_s$  Proteine aktivierten Signalweg diente. [ $^{35}S$ ]GTPS- -S-Bindungsexperimente dienten im Rahmen dieser Arbeit zum Nachweis der Aktivierung inhibitorischer  $G_i$  Proteine. Eine vierte Variante zur Detektion Ligand-induzierter Signalwegsaktivierung stellte eine markierungsfreie (engl. „*label free*“)-Methode dar. Mit Hilfe des Epic<sup>®</sup>-Biosensor Systems war es möglich, die dynamische Massenumverteilung in der Zelle als Antwort auf eine Ligand-Rezeptor-Interaktion zu messen. Das Besondere an diesen Experimenten ist es, eine Rezeptoraktivierung an lebenden Zellen in Echtzeit zu untersuchen. Bei dem detektierten Signal handelt es sich um ein Mischsignal unterschiedlicher Signalwege (Fang et al. 2006; Fang et al. 2007; Schroder et al. 2010; Schröder et al. 2011).



**Abbildung 4. 16:** Schematische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Messmethoden für die nach  $M_1$ -Rezeptoraktivierung durch unterschiedliche G Proteine induzierten Signalwege. Zur Detektion der präferenziellen  $G_q$  Protein-Kopplung dienten IP1-Akkumulations-Experimente (vgl. 3.3.2). Die Kopplung an  $G_s$  Proteine wurde mit Hilfe der cAMP-Akkumulation untersucht (vgl. 3.3.3). Zur Detektion und Quantifizierung der  $G_i$  Protein-Kopplung dient  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindungsexperimente (vgl. 3.3.1). Die Messung der dynamischen Massenumverteilung innerhalb einer Zelle stellt ein Mischsignal unterschiedlicher Signalwege dar (vgl. 3.3.4).

Im Rahmen einer vorangegangenen Arbeit (Holze, Masterarbeit 2013) konnte mit Hilfe der dynamischen Massenumverteilung (DMR) bereits gezeigt werden, dass es sich bei den zu charakterisierenden dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden um partialagonistisch wirkende Agonisten an  $hM_1$ -wt-Rezeptoren handelt, die in der höchsten einsetzbaren Konzentration einen Maximaleffekt  $E_{\max}$  von 55-80% zeigten. Des Weiteren konnte aus diesen Experimenten abgeleitet werden, dass sowohl die Zwischenkettenlänge als auch das Substitutionsmuster im allosterischen Baustein einen Einfluss auf die Wirkstärke und den Maximaleffekt der Hybridsubstanzen besitzt. Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Signalwegs-Hemmstoffe konnte zudem gezeigt werden, dass alle untersuchten Substanzen in dem verwendeten Zellsystem ihre Signalwege maßgeblich über die Aktivierung von  $G_q$  Proteinen vermitteln. Da es sich bei der DMR-Messung um eine Agonist induzierte Umverteilung intrazellulärer Massen handelt, der eine Reihe von verschiedenen Signalen zugrunde liegt, sollten im Rahmen dieser Arbeit die früheren DMR-Ergebnisse hinsichtlich der einzelnen Signalwege näher untersucht werden. Zur besseren Übersicht wurden die Hybride, nach ihrer Halogensubstitution differenziert, nacheinander aufgeführt. Die Daten aller funktionellen Experimente dienten im weiteren Verlauf dieser Arbeit zur Analyse der funktionellen Affinität  $K_A$  und der Kopplungseffizienz mit Hilfe des „Operational Model of agonism“ (Black und Leff 1983)(vgl. 4.1.5), zur Analyse und Quantifizierung einer durch die Iperoxo/BQCAD-Hybride induzierte Signalwegsbevorzugung („Ligand-Bias“)(vgl. 4.1.6), sowie zu einer neuen, globalen Analyse (vgl. 4.1.9), die einen tieferen Einblick in die Rezeptoraktivierung bietet (Bock et al. 2014a; Chen, Klöckner und Holze et al. 2015).

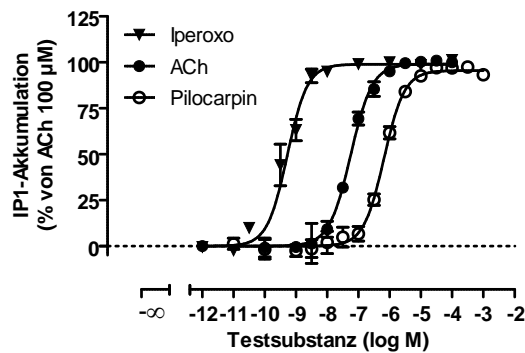
#### 4.1.4.1 Charakterisierung der durch dualsterische Iperoxo/BQCAAd-Hybridliganden induzierten $G_q$ -Signalwegaktivierung

Nach der Aktivierung des  $M_1$ -Rezeptors durch einen Liganden, kommt es vornehmlich zur Aktivierung des Enzyms Phospholipase C , welches wiederum zur Katalyse des Phosphatidylinositolbisphosphates in Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) führt. Die Messung dieses sekundären Botenstoffes, ist auf Grund einer sehr geringen Halbwertszeit nicht möglich, weshalb das durch Dephosphorylierung entstandene und akkumulierte Inositol-1-Phosphat (IP1) als Nachweis für die  $G_q$ -Signalwegaktivierung herangezogen wird (Prinzip und Durchführung, vgl. 3.3.2). Nachfolgend wurden die sieben dualsterischen Iperoxo/BQCAAd Hybridliganden hinsichtlich ihrer Fähigkeit geprüft, den  $G_q$ -Signalweg zu aktivieren (vgl. 4.1.4.1.2). Untersucht wurden ebenfalls die zwei Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo, sowie der Partialagonist Pilocarpin (vgl. 4.1.4.1.1). Die Durchführung und Auswertung erfolgte wie unter 3.3.2.2 und 3.3.2.3 beschrieben.

##### 4.1.4.1.1 Einfluss unterschiedlicher Agonisten auf die IP1-Akkumulation in intakten CHO- $hM_1$ -wt-Zellen

Da es sich bei Acetylcholin (ACh) zum einen um den endogenen Neurotransmitter an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren, zum anderen um einen klassischen Vollagonisten handelt, stellte ACh im Rahmen dieser Arbeit den Referenzagonisten für weiterführende Datenanalysen dar. Bei Iperoxo handelt es sich um den orthosterischen Molekülteil der dualsterischen Hybridliganden, weshalb es wichtig erschien, die Wirkstärke und den Maximaleffekt in allen funktionellen Experimenten zum Zwecke eines Vergleiches gegenüber der Hybridliganden mitzubestimmen. Darüber hinaus diente auch Iperoxo als Referenzagonist in der Berechnung des „Ligand-Bias“ (vgl. Kapitel 4.1.6). Da bereits Hinweise auf ein partialagonistisches Verhalten der Iperoxo/BQCAAd-Hybride vorlagen (s.o.), wurde ergänzend auch Pilocarpin als charakteristischer Partialagonist in dieser Arbeit mitgeführt. In Abbildung 4.17 sind die Ergebnisse der IP1 Akkumulationsexperimente mit Acetylcholin, Iperoxo sowie mit Pilocarpin, Tabelle 4.12 zusammengefasst. Alle Kurven besaßen eine Kurvensteilheit, die nicht verschieden von  $n_H = 1$  war (F-Test,  $p > 0,05$ ). Das untere Plateau („bottom“) unterschied sich nicht signifikant von Null und wurde deshalb auf „bottom“ = 0% festgelegt (F-Test,  $p > 0,05$ ). Die oberen Plateaus der Kurven für ACh und Iperoxo zeigten keinen signifikanten Unterschied von 100% (F-Test,  $p > 0,05$ ). Der  $hM_1$  Vollagonist Iperoxo ist bekannt dafür, am muskarinischen  $M_2$  Rezeptor als sogenannter Superagonist zu fungieren (Schrage et al. 2013). Dieses Verhalten konnte am  $hM_1$ -wt-Rezeptor im Rahmen der Messung der IP1-Akkumulation nicht detektiert werden. Die Wirkstärke ( $EC_{50}$ ) von Iperoxo war 100-fach stärker als die des endogenen Agonisten Acetylcholin (t-Test,  $p < 0,05$ ) (vgl. Tab. 4.12). Für Pilocarpin konnte ein Maximaleffekt  $E_{max} = 96 \pm 2\%$  detektiert werden, der

nicht signifikant verschieden war von  $E_{\max} = 100\%$  (F-Test,  $p > 0,05$ ). Dieser Vollagonismus des Pilocarpin könnte das Resultat einer in diesem Expressionssystem hohen Rezeptorreserve sein (Rajagopal et al. 2011; Langmead und Christopoulos 2013; Shonberg et al. 2014). Eine weitere Möglichkeit des vollagonistischen Verhaltens des Partialagonisten könnte ebenfalls eine bei der selektiven Messung sekundärer Botenstoffe häufig beobachtete Signalamplifikation sein (Sykes et al. 2009). Einen ähnlichen Vollagonismus von  $E_{\max, IP1} = 98 \pm 1\%$  konnte auch L.Vogel für Pilocarpin in IP1-Akkumulationsversuchen an CHO-M<sub>3</sub>-Rezeptoren nachweisen (Vogel, Dissertationsschrift 2015). Die Wirkstärke  $\log EC_{50} = -6,18 \pm 0,04$  von Pilocarpin an hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren war zwölfmal schwächer als diejenige von ACh und sogar 1000-fach schwächer als Iperoxo (vgl. Abb. 4.17 und Tab. 4.12).



**Abbildung 4. 17: Agonist-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-hM<sub>1</sub>-wt-Zellen.** Ordinate: IP1-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (induziert durch 100 µM Acetylcholin). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des jeweiligen Agonisten. Die Zellzahl betrug 100.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	$\log EC_{50}$	$E_{\max}$ (%)	$n_H$	n
ACh	$-7,25 \pm 0,03$	$99 \pm 2$	$= 1,00$	3
Iperoxo	$-9,32 \pm 0,05^{***}$	$99 \pm 2$	$= 1,00$	4
Pilocarpin	$-6,18 \pm 0,04^{***}$	$96 \pm 2$	$= 1,00$	3

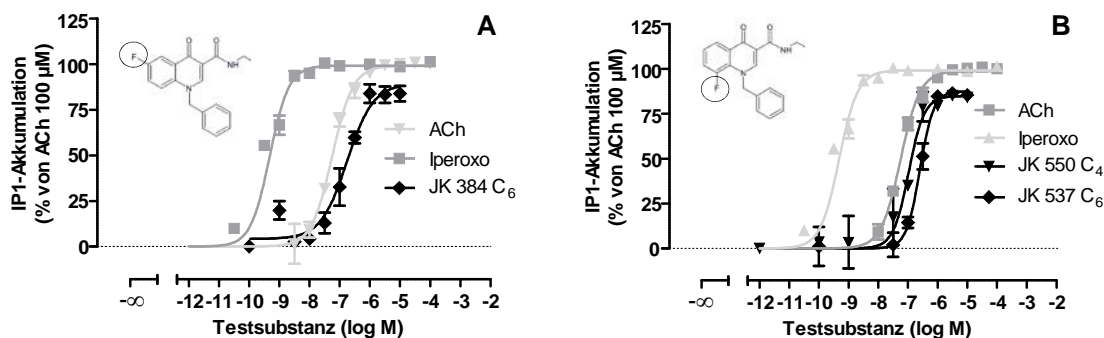
**Tabelle 4. 12: Kenngrößen der in Abbildung 4.17 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der Agonist-induzierten IP1-Akkumulation.**  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $E_{\max}$ : Maximale IP1-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit; wenn nicht verschieden von  $n_H = 1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ), wurde die Wirkstärke  $\log EC_{50}$  mit  $n_H = 1$  konstant ermittelt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden ACh-Kenngröße (t-Test; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.1.4.1.2 Einfluss dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden auf die IP1-Akkumulation in CHO-hM<sub>1</sub>-wt-Zellen

Die Abbildungen 4.18 und 4.19 zeigen die durch Iperoxo/BQCAD-Hybride-induzierten Konzentrations-Effekt-Kurven für die Akkumulation von IP1. Dargestellt sind jeweils Mittelwertskurven, die an drei bis vier unabhängigen Versuchstagen erhoben worden waren. Die Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo wurden den dualsterischen Hybridliganden zum besseren Vergleich immer gegenübergestellt, diese Kurven und Kenngrößen (in grau dargestellt) entsprechen den bereits in Abbildung 4.17 gezeigten Ergebnissen.

Abbildung 4.18 (A) zeigt die Ergebnisse der IP1-Akkumulation für das dualsterische Hybrid JK 384 (C<sub>6</sub>). Die Konzentrations-Effekt-Kurve zeigte ein oberes Plateau von durchschnittlich  $E_{\max} = 89 \pm 4\%$ , das verglichen mit dem endogenen Agonisten Acetylcholin und dem Vollagonisten und orthosterischen Molekülbaustein Iperoxo, signifikant niedriger war (t-Test,  $p < 0,05$ ; vgl. Tab. 4.13). Die Steilheit der Kurve war nicht signifikant verschieden von  $n_H = 1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ). Der Wendepunkt und damit die Wirkstärke des dualsterischen Hybrides JK 384 (C<sub>6</sub>) betrug  $\log EC_{50} = -6,77 \pm 0,11$ . Verglichen mit dem endogenen Vollagonisten ACh wies JK 384 eine dreifach geringere Wirkstärke, gegenüber Iperoxo und damit seinem orthosterischen Baustein sogar eine um den Faktor 355 geringere Wirkstärke auf (t-Test,  $p < 0,05$ ).

Die Ergebnisse des Hybridpaares JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) sind in Abbildung 4.18 (B) dargestellt und ihre Ergebnisse in Tabelle 4.13 zusammengefasst. Auf Grund des für dieses Hybridpaar beobachteten Wechsels der Bindungsorientierung („*Flip-Flop*“-Mechanismus), sollte überprüft werden, ob sich die Bevorzugung der allosterische Bindungspose, die zuvor (vgl. Tab. 4.10) für das längere Hybrid JK 537 (C<sub>6</sub>) gezeigt werden konnte, sich auch in einer ausgeprägteren Signalwegaktivierung wiederfinden lässt. Interessanterweise zeigten die Hybride einen Maximaleffekt von  $85 \pm 4\%$  (JK 550) und  $87 \pm 3\%$  (JK 537). Im Gegensatz zu JK 537 konnte für das kürzere Hybrid JK 550 kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Wirkstärke, verglichen mit ACh detektiert werden (t-Test,  $p > 0,05$ ). Gegenüber Iperoxo zeigte es aber dennoch eine um den Faktor 224 schwächere Wirkstärke. Die Wirksamkeit von JK 537 war interessanterweise sogar 525-fach schwächer gegenüber seinem orthosterischen Fragment Iperoxo (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Kurvensteilheit beider Hybride war mit einem Hill-Koeffizienten von JK 550,  $n_H = 1,67 \pm 0,44$ ; und JK 537,  $n_H = 1,90 \pm 0,31$  signifikant verschieden von  $n_H = 1$  (F-Test,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 4.18: Durch die Hybride JK 384, JK 550 und JK 537 induzierte IP1-Akkumulation in CHO- $hM_1$ -wt-Zellen.** Ordinate: IP1-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (in Gegenwart von Acetylcholin 100  $\mu$ M). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des jeweiligen Hybrides. Die Zellzahl betrug 100.000 Zellen pro Vertiefung. Die Formelfragmente in (A) und (B) illustrieren die jeweilige Position des Fluorsubstituenten. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	log EC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)	n <sub>H</sub>	n
ACh	-7,25 $\pm$ 0,03	99 $\pm$ 2	= 1,00	3
Iperoxo	-9,32 $\pm$ 0,05	99 $\pm$ 2	= 1,00	4
JK 384 (C <sub>6</sub> )	-6,77 $\pm$ 0,11 <sup>***##</sup>	89 $\pm$ 4	= 1,00	3
JK 550 (C <sub>4</sub> )	-6,97 $\pm$ 0,08 <sup>###</sup>	85 $\pm$ 4	1,67 $\pm$ 0,40 <sup>+</sup>	4
JK 537 (C <sub>6</sub> )	-6,60 $\pm$ 0,04 <sup>***##§§</sup>	87 $\pm$ 3	1,90 $\pm$ 0,31 <sup>+</sup>	4

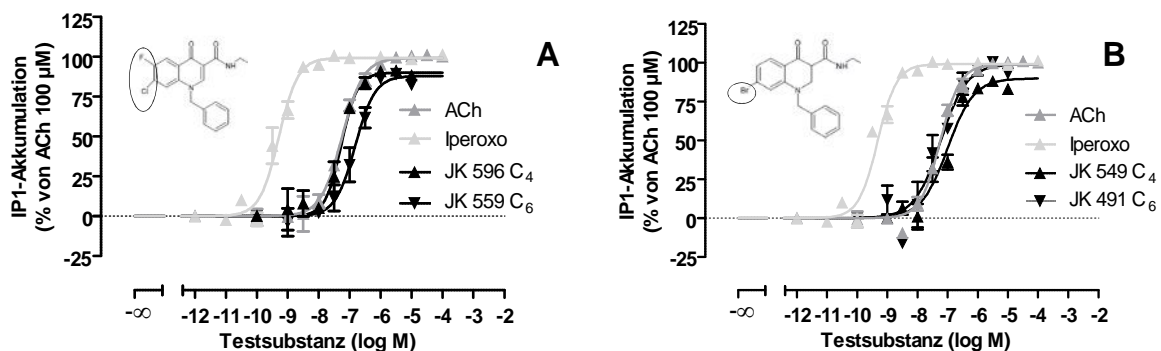
**Tabelle 4.13: Kenngrößen der in Abbildung 4.18 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 384, JK 550 und JK 537 induzierten IP1-Akkumulation.** logEC<sub>50</sub>: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. E<sub>max</sub>: Maximale IP1-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungskurve). n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit; wenn nicht verschieden von n<sub>H</sub> = 1 (F-Test, p>0,05), wurden die Wirkstärke logEC<sub>50</sub> mit n<sub>H</sub> = 1 konstant ermittelt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*,\*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße für ACh (t-Test; \*\*p < 0,01,\*\*\* p<0,001). ###: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße für Iperoxo (t-Test; ### p<0,001). §§: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße des jeweiligen kürzeren dualsterischen Hybrides (t-Test; §§ p<0,01). +: Wert signifikant unterschiedlich zu einer Kurvensteilheit von n<sub>H</sub> = -1 (F-Test, p<0,05).

Die Konzentrations-Effekt-Kurven der Hybride JK 596 (C<sub>4</sub>) und JK 559 (C<sub>6</sub>) sind in Abbildung 4.19 (A) dargestellt, die zugehörigen pharmakologischen Kenngrößen sind Tabelle 4.14 zu entnehmen. Die durch das dualsterische Hybrid JK 596 (C<sub>4</sub>) maximal induzierte G<sub>q</sub>-Signalantwort erreichte ein Niveau von 90  $\pm$  3%, das von JK 559 92  $\pm$  4% der durch Acetylcholin (100  $\mu$ M) induzierten Systemantwort. Damit wies das längere Hybrid JK 559 hinsichtlich seines Maximaleffektes weder einen signifikanten Unterschied gegenüber dem Vollagonisten ACh, noch seinem orthosterischen Bausteins Iperoxo auf (t-Test; p>0,05). Der Vergleich der Wirkstärke anhand von EC<sub>50</sub>-Werten ergab, dass JK 596 (C<sub>4</sub>) keinen signifikanten Unterschied zu Acetylcholin aufwies (t-Test, p>0,05), wohingegen es im Vergleich zu



Iperoxo 112-fach geringer wirksam war. Für das längere Hybrid JK 559 ( $C_6$ ) konnte  $\log EC_{50} = -6,78 \pm 0,10$  ermittelt und damit eine signifikant geringere Wirkstärke im Vergleich zu ACh und Iperoxo detektiert werden (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Wirkstärke von JK 596 ( $C_4$ ) und JK 559 ( $C_6$ ) waren nicht signifikant verschieden voneinander (t-Test,  $p > 0,05$ ).

Die Ergebnisse des letzten Hybridpaares, das über einen Brom-Substituenten im allosterischen Fragment verfügt (vgl. Abb. 4.1 und Formelausschnitt in Abb. 4.19 (B)), sind in Abbildung 4.19 (B) dargestellt und die Parameterschätzwerte in Tabelle 4.14 zusammengefasst. Der Maximaleffekt für JK 549 ( $C_4$ ) betrug  $E_{\max} = 90 \pm 3 \%$ , für das längere der beiden Hybride, JK 491 ( $C_6$ ) wurde  $E_{\max} = 99 \pm 5\%$  ermittelt, wobei JK 491 nicht signifikant verschieden von  $E_{\max} = 100\%$  war (t-Test;  $p > 0,05$ ). Die  $\log EC_{50}$ -Werte des Hybridpaares differierten nicht signifikant voneinander. Gegenüber dem endogenen Agonisten Acetylcholin zeigte JK 491 ( $C_6$ ) keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Wirkstärke (t-Test,  $p > 0,05$ ). Im Vergleich zu seinem orthosterischen Baustein wies es jedoch eine 123-fach geringere Wirkstärke auf. Das kürzere der beiden Hybride, JK 549 ( $C_4$ ), zeigte sowohl eine gegenüber ACh als auch gegenüber Iperoxo signifikant geringere Wirkstärke (t-Test,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 4.19: Durch die Hybride JK 596, JK 559, JK 549 und JK 491 induzierte IP1-Akkumulation in CHO- $hM_{1L1}$ -wt-Zellen.** Ordinate: IP1-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  Acetylcholin). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz. Die Zellzahl betrug 100.000 Zellen pro Vertiefung. Die Formelfragmente in (A) und (B) illustrieren die jeweilige Position des Halogensubstituenten. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	log EC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)	n <sub>H</sub>	n
JK 596 (C <sub>4</sub> )	-7,27 ± 0,05 <sup>###</sup>	90 ± 3	1,68 ± 0,28 <sup>+</sup>	3
JK 559 (C <sub>6</sub> )	-6,78 ± 0,10 <sup>**###§§</sup>	92 ± 4	= 1,00	3
JK 549 (C <sub>4</sub> )	-7,00 ± 0,08 <sup>###</sup>	90 ± 3	= 1,00	4
JK 491 (C <sub>6</sub> )	-7,23 ± 0,10 <sup>###</sup>	99 ± 5 <sup>§</sup>	= 1,00	3

**Tabelle 4. 14: Kenngrößen der in Abbildung 4.19 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 596, JK 559, JK 549 und JK 491 induzierten IP1-Akkumulation.** logEC<sub>50</sub>: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. E<sub>max</sub>: Maximale IP1-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungskurve). n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit; wenn nicht verschieden von n<sub>H</sub> = 1 (F-Test, p>0,05), wurden die Wirkstärke logEC<sub>50</sub> mit n<sub>H</sub> = 1 konstant ermittelt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden ACh-Kenngröße in Tab. 4.13 (t- Test; \*\*p<0,01). ###: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Iperoxo-Kenngröße in Tab. 4.13 (t- Test; ###p<0,001). §§: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße des kürzeren dualsterischen Hybrides (t-Test; §§p<0,01). +: Wert signifikant unterschiedlich zu einer Kurvensteilheit von n<sub>H</sub> = -1 (F-Test, p<0,05).

#### 4.1.4.2 Charakterisierung der durch dualsterische Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden induzierten G<sub>s</sub>-Signalwegaktivierung

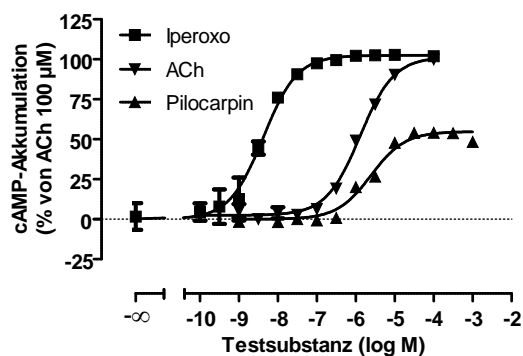
Wie bereits erwähnt, zeigten sich in bereits durchgeführten DMR-Experimenten (Holze, Masterarbeit 2013) Hinweise darauf, dass die dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybride ebenfalls in der Lage sind, den G<sub>s</sub>-Signalweg zu aktivieren. Zur Bestätigung und weiteren Untersuchung dieses Befundes, wurde die Produktion des sekundären Botenstoff cAMP mit Hilfe eines kompetitiven „Immunoassays“, dessen Messprinzip auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) basiert, ermittelt (vgl. 3.3.3). Wie schon im Falle der Messung der IP1-Akkumulation, wurde mit der Charakterisierung der Agonisten Acetylcholin, Iperoxo und Pilocarpin begonnen. Danach erfolgte die Messung der sieben dualsterischen Hybridliganden.

##### 4.1.4.2.1 Einfluss unterschiedlicher Agonisten auf die cAMP-Akkumulation in CHO-hM<sub>1</sub>-wt-Zellen

Zunächst wurden die Agonisten Acetylcholin, Iperoxo und Pilocarpin in dem zuvor erörterten Messsystem hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Aktivierung des G<sub>s</sub>-Signalweges untersucht. Ihre Mittelwertskurven sind in Abbildung 4.20 wiedergegeben. Die numerischen Schätzwerte der Kurvenparameter der in Abbildung 4.20 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Tabelle 4.15 aufgeführt.

Die Agonisten Acetylcholin und Iperoxo zeigten eine maximale Systemantwort von 100%, während Pilocarpin einen Maximaleffekt von 55 ± 2% besaß, und sich damit signifikant von Acetylcholin und Iperoxo unterschied (t-Test, p<0,05). Wie bereits auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg, zeigte Iperoxo mit einem logEC<sub>50</sub> = -8,37 ± 0,08 auch auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg eine 301-fach höhere Wirkstärke als der endogene Agonist Acetylcholin und eine 575-fach höhere als der Partialagonist Pilocarpin (t-Test; p<0,05). Die

Wirkstärke von Pilocarpin war zudem zweifach schwächer als der Vollagonist Acetylcholin (t-Test;  $p < 0,05$ ). Alle drei Kurven konnten mit einer Kurvensteilheit, die nicht signifikant verschieden von  $n_H = 1$  war, beschrieben werden (F-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4.20: Agonist-induzierte cAMP-Akkumulation in CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen.** Ordinate: cAMP-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale cAMP-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (in Gegenwart von 100  $\mu$ M Acetylcholin). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz. Die Zellzahl betrug 50.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	log EC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)	n <sub>H</sub>	n
ACh	-5,89 $\pm$ 0,04	102 $\pm$ 2	1,00	3
Iperoxo	-8,37 $\pm$ 0,08 <sup>***</sup>	103 $\pm$ 2	1,00	3
Pilocarpin	-5,61 $\pm$ 0,08 <sup>###</sup>	55 $\pm$ 2 <sup>#####</sup>	1,00	3

**Tabelle 4.15: Kenngrößen der in Abbildung 4.20 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der Agonist-induzierten cAMP-Akkumulation.** logEC<sub>50</sub>: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. E<sub>max</sub>: Maximale cAMP-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve). n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit; wenn nicht verschieden von n<sub>H</sub> = 1 (F-Test,  $p > 0,05$ ), wurden die Wirkstärke logEC<sub>50</sub> mit n<sub>H</sub> = 1 konstant ermittelt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*,\*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden ACh-Kenngröße (t-Test; \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). ###: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Iperoxo-Kenngröße (t-Test; ### $p < 0,001$ ).

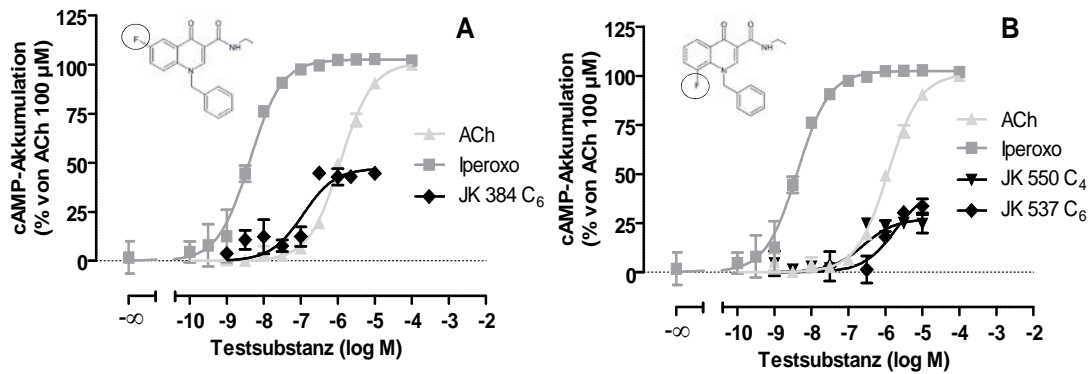
#### 4.1.4.2.2 Einfluss dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden auf die cAMP-Akkumulation in CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen

Zunächst wurden die durch eine alleinige Fluor-Substitution (vgl. Abb. 4.1 und Formelausschnitt in Abbildung 4.21) im allosterischen Molekülteil gekennzeichneten Hybridsubstanzen JK 384 (C<sub>6</sub>), JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) erstmalig hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, den G<sub>s</sub>-Signalweg zu aktivieren. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.21 (A und B) dargestellt, ihre Analyseparameter in Tabelle 4.16 zusammengefasst. Für JK 384 (C<sub>6</sub>) wurde logEC<sub>50</sub> = -6,94  $\pm$  0,17 ermittelt, worin eine 27-fach

geringere Wirkstärke gegenüber Iperoxo zum Ausdruck kam. Verglichen mit ACh wies JK 384 aber interessanterweise eine 11-fach größere Wirkstärke auf (t-Test;  $p < 0,05$ ). Der Maximaleffekt des dualsterischen Liganden JK 384 betrug  $E_{\max} = 47 \pm 4\%$  und zeigte damit ein partialagonistisches Verhalten auf dem  $G_s$ -Signalweg.

Die durch die Hybride JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) vermittelte  $G_s$ -Aktivierung erreichte mit Werten von  $E_{\max} = 27 \pm 3\%$  (JK 550) und  $E_{\max} = 43 \pm 10\%$  (JK 537) gegenüber Iperoxo und Acetylcholin signifikant geringere Maximaleffekte (t-Test;  $p < 0,05$ ). Das längere Hybrid JK 537, für welches eine höhere dualsterische Bindung wahrscheinlich gemacht werden konnte (vgl. 4.1.3.2), erreichte am muskarinischen  $hM_1$ -wt-Rezeptor eine Wirksamkeit von  $\log EC_{50} = -5,73 \pm 0,31$  und unterschied sich damit nicht signifikant von derjenigen für Acetylcholin und Pilocarpin (t-Test;  $p > 0,05$ ). Verglichen mit Iperoxo, zeigte es eine 437-fach schwächere Wirkstärke (t-Test,  $p < 0,05$ ). Das dualsterische Hybrid JK 550, für welches eine signifikante Bevorzugung einer allosterischen Bindungsorientierung am  $hM_1$ -Rezeptor postuliert werden konnte (vgl. 4.1.3.2), zeigte gegenüber seinem orthosterischen Baustein Iperoxo eine 59-fach und gegenüber Acetylcholin eine fünffach geringere Wirkstärke. Gegenüber Pilocarpin zeigte es sogar eine zehnfach höhere Wirksamkeit (t-Test;  $p < 0,05$ ). Der Vergleich der Hybride dieses Paares führte zu dem Ergebnis, das JK 550 siebenfach stärker wirksam war als JK 537. Auf Grund des hohen Standardfehlers war dieses Ergebnis jedoch nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ). Da zuvor in Bindungsexperimenten gezeigt werden konnte (vgl. 4.1.3.2), dass JK 550 die aktive und dualsterische Rezeptororientierung offenbar nur zu maximal 39% einnimmt, das längere JK 537 aber zu maximal 84%, hätte daraus eine höhere Wirkstärke für JK 537 resultieren können. Das war nicht der Fall. Dies spricht für unterschiedliche Fähigkeiten von JK 537 und JK 550 nach erfolgter Rezeptorbesetzung, den  $hM_1$ -Rezeptor zu aktivieren. Diese Hypothese wird ausführlich unter 4.1.9.2 untersucht.

Werden alle drei dualsterischen Hybridliganden, die über einen Fluorsubstituenten im allosterischen Molekülbaustein verfügten verglichen, so konnte kein signifikanter Unterschied ihrer intrinsischen Aktivität ( $E_{\max}$ ) festgestellt werden (*one-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test*,  $p > 0,05$ ). Ein Vergleich der Wirkstärken ( $EC_{50}$ ) belegte für JK 384 ( $C_6$ ) eine 16-fach höhere Wirksamkeit im Vergleich zu JK 537 ( $C_6$ ). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bereits in vorangegangenen DMR-Experimenten (JK 384  $\log EC_{50} = -7,23 \pm 0,09$ ; JK537  $EC_{50} = -6,75 \pm 0,09$ ), in denen ebenfalls JK 384 eine signifikant höhere Wirksamkeit gegenüber JK 537 zeigte (t-Test,  $p < 0,05$ ) (vgl. Holze, Masterarbeit 2013).



**Abbildung 4. 21:** Durch die Hybride JK 384, JK 550 und JK 537 induzierte cAMP-Akkumulation in CHO- $hM_1$ -wt-Zellen. Ordinate: cAMP-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale cAMP-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (in Gegenwart von 100  $\mu$ M Acetylcholin). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz. Die Zellzahl betrug 50.000 Zellen pro Vertiefung. Die Formelfragmente in (A) und (B) illustrieren die jeweilige Position des Fluorsubstituenten. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

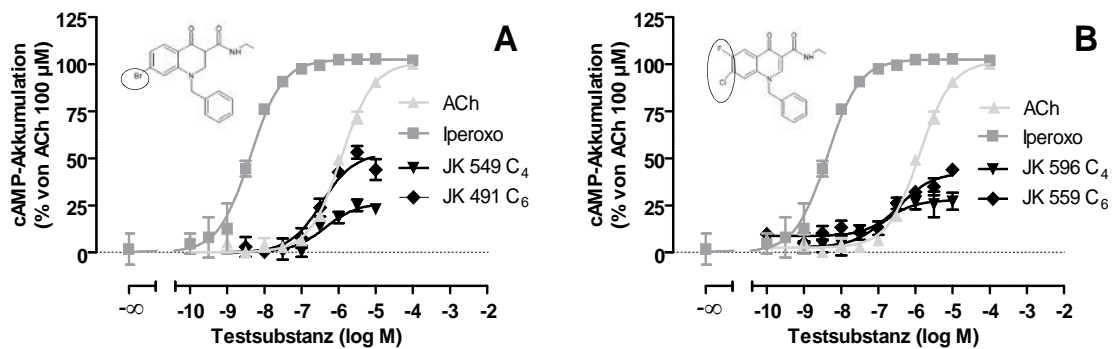
Substanz	log EC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)	n <sub>H</sub>	n
<b>JK 384</b> (C <sub>6</sub> )	-6,94 $\pm$ 0,17 <sup>***§§</sup>	47 $\pm$ 4 <sup>***###</sup>	= 1,00	3
<b>JK 550</b> (C <sub>4</sub> )	-6,60 $\pm$ 0,22 <sup>###§</sup>	27 $\pm$ 3 <sup>***###§§§</sup>	= 1,00	3
<b>JK 537</b> (C <sub>6</sub> )	-5,73 $\pm$ 0,31 <sup>####</sup>	43 $\pm$ 10 <sup>**##</sup>	= 1,00	3

**Tabelle 4. 16: Kenngrößen der in Abbildung 4.21 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 384, JK 550 und JK 537 induzierten cAMP-Akkumulation.** logEC<sub>50</sub>: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. E<sub>max</sub>: Maximale cAMP-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve). n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit; wenn nicht verschieden von n<sub>H</sub> = 1 (F-Test, p>0,05), wurden die Wirkstärke logEC<sub>50</sub> mit n<sub>H</sub> = 1 konstant ermittelt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant verschieden zu der korrespondierenden ACh-Kenngröße in Tab. 4.15 (t-Test, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001). ###, ####: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Iperoxo-Kenngröße in Tab. 4.15 (t-Test, ##p<0,01, ###p<0,001). §§, §§§, §§§§: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Pilocarpin-Kenngröße in Tab. 4.15 (t-Test, §p>0,05, §§p<0,01, §§§p<0,001).

Das nächste Paar dualsterischer Hybride JK 549 (C<sub>4</sub>) und JK 491 (C<sub>6</sub>), dargestellt in Abbildung 4.22 (A), gekennzeichnet durch eine Bromsubstitution innerhalb des allosterischen Molekülbausteins (vgl. Abb. 4.1 und Formelausschnitt in Abb. 4.22(A)), zeigte wie die bereits vorgestellten Hybride mit E<sub>max</sub> = 26  $\pm$  2% (JK 549) und E<sub>max</sub> = 53  $\pm$  4% (JK 491) partialagonistisches Verhalten auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg. Von dem Partialagonisten Pilocarpin unterschied sich nur das kürzere Hybrid JK 549 durch einen signifikant geringeren Maximaleffekt (t-Test; p<0,05). Die Verlängerung der Zwischenkette in JK 491 bewirkte keine Veränderung hinsichtlich der Wirkstärke im Vergleich zu JK 549. Im Vergleich zu ihrem orthosterischen Baustein Iperoxo zeigten beide Hybridliganden einen Verlust der Wirkstärke (logEC<sub>50</sub>) von fast zwei Dekaden. Ein Vergleich der Wirkstärke von JK 491 und JK 549 mit

dem endogenen Muskarinrezeptor-Liganden Acetylcholin und dem Partialagonisten Pilocarpin, ergab eine signifikante Zunahme der Wirkstärke (t-Test;  $p < 0,05$ ).

Die beiden Hybride JK 596 ( $C_4$ ) und JK 559 ( $C_6$ ), die eine Fluor und eine Chlor-Substitution im allosterischen Fragment besitzen (vgl. Abb. 4.1 und Formelausschnitt in Abb. 4.22 (B)) sind in Abbildung 4.22 (B) dargestellt. Beide Hybride wiesen zwar ein Unterschied hinsichtlich der Wirkstärke ( $\log EC_{50}$ ) auf, jedoch unterschieden sich diese auf Grund der hohen Standardfehler nicht signifikant (t-Test;  $p > 0,05$ ). Diese hohen Standardfehler resultierten u.a. aus den geringen Maximaleffekten, welche die Hybridliganden induzierten und dem daraus resultierenden (zu) kleinen Signal, aus dem die nichtlineare Kurvenanalyse (dann in nur beschränktem Maße) valide numerische Parameterschätzwerte ableitete.



**Abbildung 4. 22: Durch die Hybride JK 549, JK 491, JK 596 und JK 559 induzierte cAMP-Akkumulation in CHO- $hM_1$ -wt-Zellen.** Ordinate: cAMP-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale cAMP-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (in Gegenwart von 100  $\mu$ M Acetylcholin). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz. Die Zellzahl betrug 50.000 Zellen pro Vertiefung. Die Formelfragmente in (A) und (B) illustrieren die jeweilige Position des Halogensubstituenten. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	$\log EC_{50}$	$E_{max}$ (%)	$n_H$	n
JK 549 ( $C_4$ )	$-6,36 \pm 0,16^{*###\S\S}$	$26 \pm 2^{\S\S}$	= 1,00	3
JK 491 ( $C_6$ )	$-6,45 \pm 0,13^{*###\S\S}$	$53 \pm 4$	= 1,00	3
JK 596 ( $C_4$ )	$-6,92 \pm 0,27^*$	$28 \pm 3$	= 1,00	6
JK 559 ( $C_6$ )	$-6,39 \pm 0,20$	$42 \pm 3$	= 1,00	5

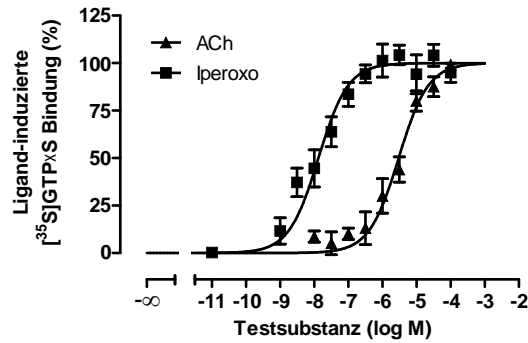
**Tabelle 4. 17: Kenngrößen der in Abbildung 4.22 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 549, JK 491, JK 596 und JK 559 induzierten cAMP-Akkumulation.**  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $E_{max}$ : Maximale cAMP-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit; wenn nicht verschieden von  $n_H = 1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ), wurden die Wirkstärke  $\log EC_{50}$  mit  $n_H = 1$  konstant ermittelt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden ACh-Kenngröße in Tab. 4.15 (t-Test,  $*p < 0,05$ ). ###: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Iperoxo-Kenngröße in Tab. 4.15 (t-Test,  $###p < 0,001$ ).  $\S\S$ : Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Pilocarpin-Kenngröße in Tab. 4.15 (t-Test,  $\S\S p < 0,01$ ).

#### 4.1.4.3 Charakterisierung der durch dualsterische Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden induzierten G<sub>i</sub>-Signalwegaktivierung

Nach systematischer Charakterisierung des G<sub>q</sub>- und G<sub>s</sub>-Signalweges, sollten die dualsterischen Hybride anschließend hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht werden, den G<sub>i</sub>-Signalweg zu aktivieren. Dafür dienten [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsexperimente an Membranhomogenaten aus CHO-*hM<sub>1</sub>*-wt-Zellen, die freundlicherweise mit der Unterstützung von Frau Mechthild Kepe durchgeführt wurden. Bei dieser Art Experiment, handelt es sich um eine Messmethode, die es ermöglicht, den ersten Schritt nach der Aktivierung eines G Protein-gekoppelten Rezeptors zu untersuchen. Aufgrund einer niedrigen basalen Bindung sowie eines großen Messfensters eignet sich diese Methode jedoch besonders für die Untersuchung präferenziell G<sub>i</sub>-gekoppelter Rezeptoren, was bei dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *hM<sub>1</sub>*-Rezeptor nicht der Fall war. Dennoch sollten die Versuche einen Einblick in eine mögliche G<sub>i</sub>-Proteinaktivierung liefern. Zunächst wurden wie in den zuvor durchgeführten funktionellen Experimenten Acetylcholin sowie Iperoxo eingesetzt. Die Normierung der Effekte aller untersuchten Substanzen erfolgte auf den Effekt von stets an jedem Versuchstag mitgeführtem Acetylcholin in einer Konzentration von 100 μM. Bei allen [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsexperimenten wurden Membranhomogenate und keine lebenden Zellen verwendet. Die Proteinkonzentration im Reaktionsansatz betrug 20 μg/ml in Hepes-Puffer (L9), die Inkubationszeit betrug 1h bei 30°C. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12).

##### 4.1.4.3.1 Einfluss von ACh und Iperoxo auf die [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindung an *hM<sub>1</sub>*-wt-Rezeptoren in Membransuspensionen aus CHO-Zellen

Zu Beginn wurde der endogene Neurotransmitter cholinergere Rezeptoren Acetylcholin sowie der in allen dualsterischen Hybriden als orthosterischer Baustein enthaltene Agonist Iperoxo in [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsexperimenten untersucht. Die Mittelwertskurven beider Agonisten sind in Abbildung 4.23 dargestellt und die Parameterschätzwerte sind in Tabelle 4.18 aufgelistet. Sowohl für Acetylcholin als auch für Iperoxo zeigte sich ein vollagonistisches Verhalten mit einem oberen Plateau der Konzentrations-Wirkungskurve, das nicht signifikant verschieden war von 100% (F-Test,  $p > 0,05$ ). Die Wirkstärke von ACh betrug  $\log EC_{50} = -5,52 \pm 0,06$  und war damit 229-fach schwächer als Iperoxo ( $\log EC_{50} = -7,88 \pm 0,08$ ). Die Steilheit der Kurven für ACh und Iperoxo war nicht signifikant verschieden von  $n_H = 1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4.23: Agonist-induzierte  $[^{35}\text{S}]$ GTP S-Bindung an  $h\text{M}_1$ -wt-Rezeptoren in Membransuspensionen aus CHO-Zellen.** Ordinate: Prozentuale Agonist-induzierte  $[^{35}\text{S}]$ GTP S-Bindung. 0% entspricht dem unteren Plateau der Kurve (basale  $[^{35}\text{S}]$ GTP S-Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz), 100% entspricht der  $[^{35}\text{S}]$ GTP S-Bindung in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  ACh. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus fünf unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	$\log \text{EC}_{50}$	$E_{\max}$ (%)	$n_H$	n
ACh	$-5,52 \pm 0,06$	$99 \pm 4$	$= 1,00$	5
Iperoxo	$-7,88 \pm 0,08^{***}$	$99 \pm 3$	$= 1,00$	5

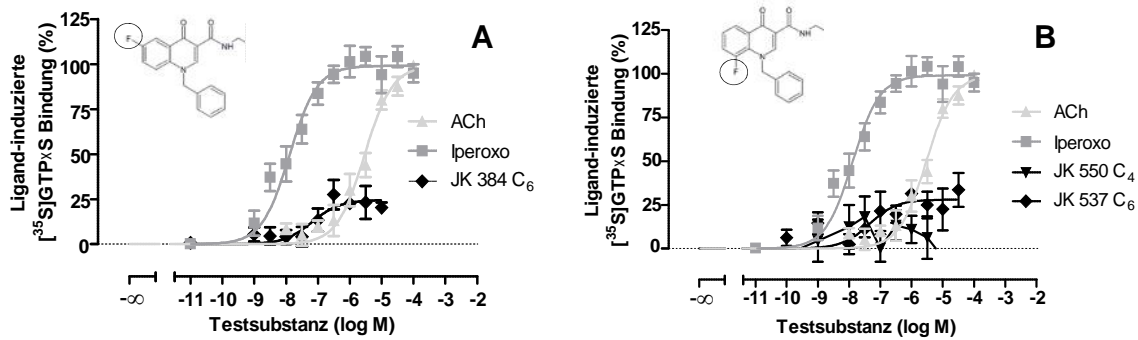
**Tabelle 4.18: Kenngrößen der in Abbildung 4.23 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der Agonist-induzierten  $[^{35}\text{S}]$ GTP S-Bindung.**  $\log \text{EC}_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $E_{\max}$ : Maximale  $[^{35}\text{S}]$ GTP S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit; wenn nicht verschieden von  $n_H = 1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ), wurden die Wirkstärke  $\log \text{EC}_{50}$  mit  $n_H = 1$  konstant ermittelt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*\*: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden ACh-Kenngröße (t-Test,  $***p < 0,001$ ).

#### 4.1.4.3.2 Einfluss dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden auf die $[^{35}\text{S}]$ GTP S-Bindung an $h\text{M}_1$ -wt-Rezeptoren in Membransuspensionen aus CHO-Zellen

Die bereits vorgestellten dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden wurden erstmalig hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, den  $G_i$ -Signalweg zu aktivieren. Die Effekte der dualsterischen Hybridliganden mit Fluorsubstitutionen im allosterischen Baustein sind in Abbildung 4.24 dargestellt, die zugehörigen Parameterwerte finden sich in Tabelle 4.19. Das dualsterische Hybrid JK 384 ( $C_6$ ) zeigte eine konzentrationsabhängige Förderung der  $[^{35}\text{S}]$ GTP S-Bindung, mit einem maximalen Effekt von  $E_{\max} = 25 \pm 3\%$ . Die Wirkstärke bemaß sich mit  $\log \text{EC}_{50} = -7,19 \pm 0,29$  und war somit 46-fach größer, als die des endogenen Liganden Acetylcholin, aber fünffach geringer als diejenige von Iperoxo (vgl. Tab. 4.19)(t-Test,  $p < 0,05$ ). Für das dualsterische Hybrid JK 550, für welches als einziges Hybrid in Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen mit  $[^3\text{H}]$ NMS eine inaktive dualsterische Rezeptorfraction von über 60% postuliert werden konnte (vgl. 4.1.3.2), wurde interessanterweise keine  $G_i$ -Aktivierung festgestellt, die sich signifikant von 0% unterschied (vgl. Abb. 4.24) (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Konzentrations-Wirkungs-Kurve für JK 537 hingegen zeigte ein oberes Plateau von  $E_{\max} = 28 \pm 3\%$  und



somit die intrinsische Aktivität eines schwachen Partialagonisten. Die Wirkstärke von JK 537 ( $C_6$ ) war gekennzeichnet durch  $\log EC_{50} = -7,35 \pm 0,33$  und somit 66-fach stärker als die des endogenen Agonisten Acetylcholin und nur dreifach schwächer als die seines orthosterischen Bausteines Iperoxo (t-Test;  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 4. 24: Durch die Hybride JK 384, JK 550 und JK 537 induzierte Förderung der  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindung an  $hM_1$ -wt-Rezeptoren in Membranen aus CHO-Zellen.** Ordinate: Prozentuale Hybrid-induzierte  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindung. 0% entspricht dem unteren Plateau der Kurve (basale  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz), 100% entspricht der  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindung in Gegenwart von  $100 \mu\text{M}$  ACh. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz. Die Formelfragmente in (A) und (B) illustrieren die jeweilige Position des Fluorsubstituenten. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

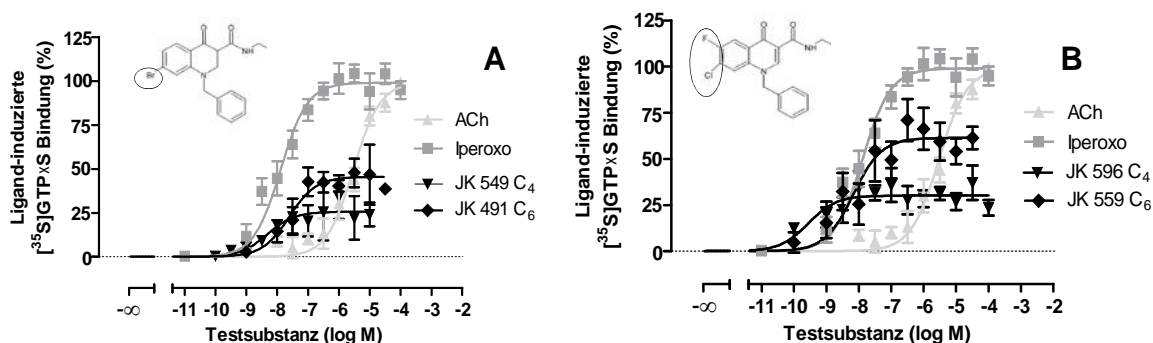
Substanz	$\log EC_{50}$	$E_{\max}$ (%)	$n_H$	n
<b>JK 384 (<math>C_6</math>)</b>	$-7,19 \pm 0,29$ ***###	$25 \pm 3$	$= 1,00$	4
<b>JK 550 (<math>C_4</math>)</b>	-	-	-	3
<b>JK 537 (<math>C_6</math>)</b>	$-7,35 \pm 0,33$ ***###	$28 \pm 3$	$= 1,00$	3

**Tabelle 4. 19: Kenngrößen der in Abbildung 4.24 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 384, JK 550 und JK 537 induzierten  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindung.**  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $E_{\max}$ : Maximale  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit; wenn nicht verschieden von  $n_H = 1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ), wurden die Wirkstärke  $\log EC_{50}$  mit  $n_H = 1$  konstant ermittelt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße für ACh in Tab. 4.18 (t-Test; \*\*\* $p < 0,001$ ), ###: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Iperoxo-Kenngröße in Tab. 4.18 (t-Test; ### $p < 0,001$ ).

Die Ergebnisse der  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindungsexperimente der Hybride JK 549 und JK 491, die durch eine Bromsubstitution im allosterischen Baustein gekennzeichnet sind, werden in Abbildung 4.25 (A) und Tabelle 4.20 wiedergegeben. Im Gegensatz zu JK 550, welches ebenfalls über eine  $C_4$ -Zwischenkette verfügt, konnte für JK 549 eine konzentrationsabhängige  $G_i$ -Aktivierung detektiert werden. Das obere Plateau  $E_{\max} = 26 \pm 4\%$  deutete auf einen schwachen Partialagonismus von JK 549. Die Wirkstärke dieses Hybrides war signifikant größer als die von Acetylcholin (t-Test,  $p < 0,05$ ) aber nicht signifikant größer als die von Iperoxo (t-Test,  $p > 0,05$ ) (vgl. Tab. 4.20). Das längere dualsterische Hybrid JK 491

wies mit  $E_{\max} = 45 \pm 3\%$  eine gegenüber JK 549 ( $C_4$ ) signifikant höhere intrinsische Aktivität auf (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Wirkstärke der beiden Hybride unterschied sich nicht signifikant voneinander, allerdings zeigte JK 491 wie JK 549 eine signifikante Steigerung der Wirkstärke im Vergleich zu Acetylcholin (t-Test,  $p < 0,05$ ).

Die Ergebnisse des letzten Paares der in dieser Arbeit untersuchten dualsterischen Hybride, die durch zwei unterschiedliche Halogensubstituenten im allosterischen Fragment gekennzeichnet sind, finden sich in Abbildung 4.25 (B) und in Tabelle 4.20 zusammengefasst. JK 596 zeigte mit einem oberen Kurvenplateau von  $E_{\max} = 30 \pm 2\%$  ein schwach partialagonistisches Verhalten. Interessanterweise zeigte dieses kurze Hybrid eine gegenüber Acetylcholin 10.000-fach höhere Wirkstärke, die durch  $\log EC_{50} = -9,56 \pm 0,33$  charakterisiert war; sogar gegenüber seinem orthosterischen Baustein Iperoxo zeigte es eine 47-fach höhere Wirksamkeit (t-Test,  $p < 0,05$ ). Das Hybrid JK 559 ( $C_6$ ) erreichte ein gegenüber JK 596 signifikant höheres oberes Kurvenplateau von  $E_{\max} = 61 \pm 4\%$ , was für eine höhere intrinsische Aktivität zeugte. Die Wirkstärke  $\log EC_{50} = -8,17 \pm 0,21$  von JK 559 und war 437-fach größer, als die des endogenen Agonisten Acetylcholin (t-Test;  $p < 0,05$ ) und nicht signifikant größer als diejenige von Iperoxo (t-Test;  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4. 25: Durch die Hybride JK 549, JK 491, JK 596 und JK 559 induzierte Förderung der  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S-Bindung}$  an  $h\text{M}_1\text{-wt-Rezeptoren}$  in Membranen aus CHO-Zellen.** Ordinate: Prozentuale Hybrid-induzierte  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S-Bindung}$ . 0% entspricht dem unteren Plateau der Kurve (basale  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S-Bindung}$  in Abwesenheit einer Testsubstanz), 100% entspricht der  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S-Bindung}$  in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  ACh. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz. Die Formelfragmente in (A) und (B) illustrieren die jeweilige Position des Halogensubstituenten. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis sechs unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	log EC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)	n <sub>H</sub>	n
JK 549 (C <sub>4</sub> )	-8,32 ± 0,38 <sup>***</sup>	26 ± 4 <sup>***###</sup>	= 1,00	5
JK 491 (C <sub>6</sub> )	-7,61 ± 0,81 <sup>**</sup>	45 ± 3 <sup>***###§</sup>	= 1,00	3
JK 596 (C <sub>4</sub> )	-9,56 ± 0,33 <sup>***##</sup>	30 ± 2 <sup>***###</sup>	= 1,00	5
JK 559 (C <sub>6</sub> )	-8,17 ± 0,21 <sup>***§</sup>	61 ± 4 <sup>***###§§§</sup>	= 1,00	6

**Tabelle 4. 20 Kenngrößen der in Abbildung 4.25 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 549, JK 491, JK 596 und JK 559 induzierten [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindung.** logEC<sub>50</sub>: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. E<sub>max</sub>: Maximale [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindung (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve). n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit; wenn nicht verschieden von n<sub>H</sub> = 1 (F-Test, p>0,05), wurden die Wirkstärke logEC<sub>50</sub> mit n<sub>H</sub> = 1 konstant ermittelt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*,\*\*\*: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden ACh-Kenngröße in Tab. 4.18 (t-Test; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).##,###: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Iperoxo-Kenngröße in Tab. 4.18 (t-Test; ##p<0,01, ###p<0,001). § §§§: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kürzeren dualsterischen Hybrides (t-Test; §p<0,05; §§§p<0,001).

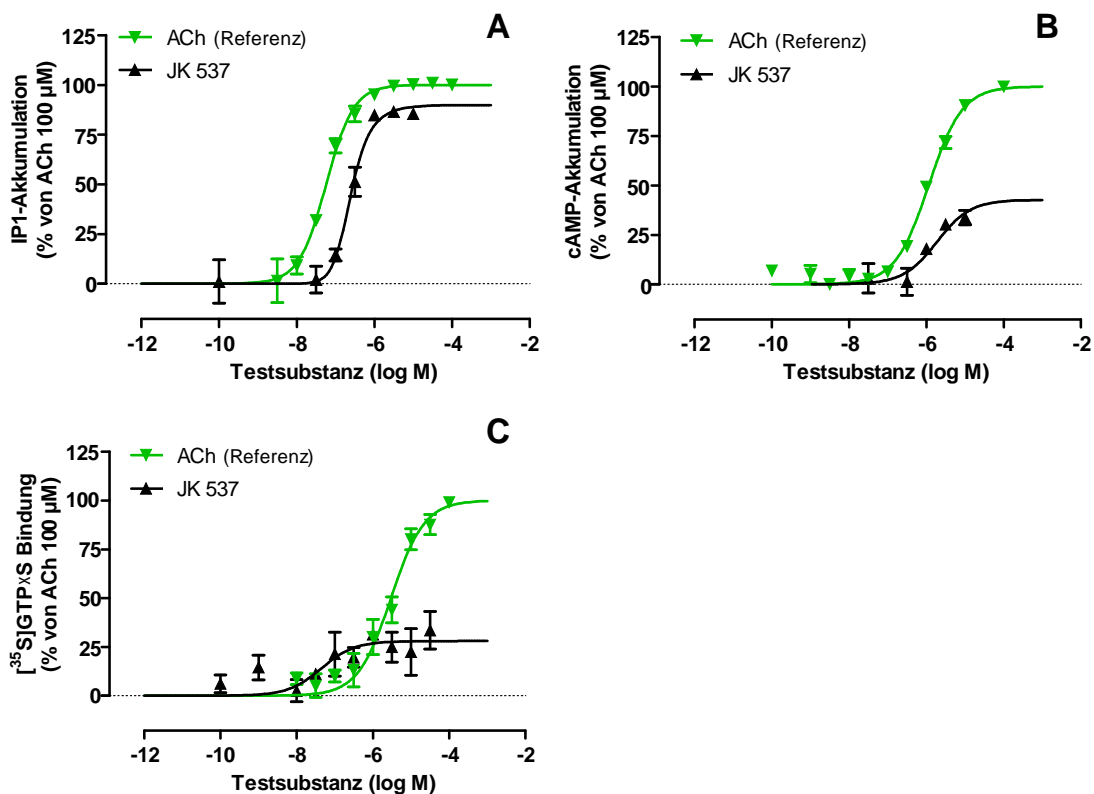
#### 4.1.5 Funktionelle Affinität und Kopplungseffizienz dualsterischer Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden auf unterschiedlichen Signalwegen

Die bisher gezeigten Auswertungen, aller mit Agonisten durchgeführten funktionellen Experimente dieser Arbeit, wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) durchgeführt und lieferten modellunabhängige Schätzwerte für den Parameter logEC<sub>50</sub>, der ein Maß für die Wirkstärke (= Potenz) der Testsubstanz ist sowie für E<sub>max</sub>, der den Maximaleffekt einer Testsubstanz charakterisiert. Auf der Basis dieser Ergebnisse ergaben sich mehrere Fragen:

Warum zeigte sich für JK 550, das die geringste Neigung hatte, in einer aktiven dualsterischen Orientierung mit den hM<sub>1</sub> Rezeptoren zu interagieren (39%, vgl. 4.1.3.2), sowohl hinsichtlich der drei untersuchten Signalwege, als auch in den zuvor durchgeführten DMR-Experimenten, kein erkennbarer Unterschied hinsichtlich des induzierten Maximaleffektes (vgl. 4.1.4.1.2; 4.1.4.2.2; 4.1.4.3.3 und Holze, Masterarbeit, 2013). Eine weitere Frage stellte sich im Zusammenhang mit den für manche Hybride beobachteten signifikant höheren Wirksamkeiten logEC<sub>50</sub> auf dem G<sub>s</sub>- und G<sub>i</sub>-Signalweg, gegenüber dem für den vom M<sub>1</sub>-Rezeptor üblicherweise präferentiell induzierten G<sub>q</sub>-Signalweg (Caulfield 1993) (Felder 1995). Zur Klärung dieser Fragen wurden die funktionellen Daten zusätzlich mit Hilfe des „Operational Model Of Agonism“ (Black und Leff 1983) analysiert. Diese Analyse erlaubt es, für den Agonisten sowohl Parameterwerte für die Kopplungseffizienz ( ) des Rezeptors, als auch eine funktionelle Affinität (K<sub>A</sub>) zu ermitteln. Mit dem Wissen, dass sich der EC<sub>50</sub>-Wert eines funktionellen Liganden, der mit Hilfe eines standardisierten Konzentrations-Wirkungs-Modells (d.h. der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12)) analysiert wurde, sowohl durch seine funktionelle Affinität (K<sub>A</sub>) zum Rezeptor, als auch durch die Kopplungseffizienz τ beeinflusst wird, erschien es

interessant, mit Hilfe dieser Parameter weitere Hinweise über die Fähigkeit der Rezeptoraktivierung durch die Hybride zu erhalten.

Um die partialagonistischen Konzentrations-Effekt-Kurven der dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (vgl. 3.4) auszuwerten zu können, musste zusätzlich ein Vollagonist als Referenz zur Definition des Maximaleffektes des Systems verwendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierzu der endogene Agonist Acetylcholin eingesetzt. Die Ergebnisse sind, repräsentativ für das dualsterische Hybrid JK 537 ( $C_6$ ), in Abbildung 4.26 für alle drei untersuchten Signalwege dargestellt. Die Auswertung der weiteren Hybride erfolgte analog zu dieser Vorgehensweise. Die mit Hilfe dieses Modells ermittelten Parameter  $K_A$  und  $\tau$  sind für alle drei Hybridpaare in Tabelle 4.21 zusammengefasst.

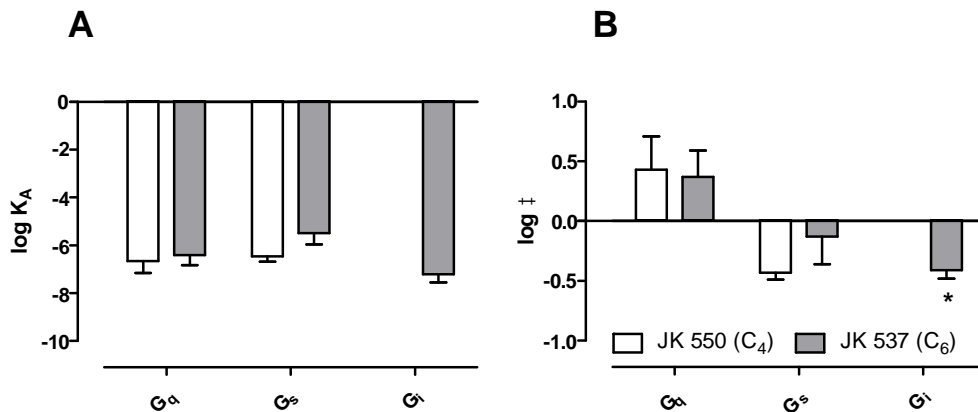


**Abbildung 4.26: Ergebnisse der Anwendung des „Operational Model of Agonism“ auf die Fähigkeit des dualsterischen Hybrides JK 537 zur  $hM_1$ -wt-Rezeptor vermittelten (A) IP1-Akkumulation, (B) cAMP-Akkumulation und (C) Förderung der  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S-Bindung}$ .** Ordinate: (A) IP1-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (in Gegenwart von 100 µM ACh). (B) cAMP-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale cAMP-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (in Gegenwart von 100 µM ACh). (C) Prozentuale Testsubstanz-induzierte  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S-Bindung}$ . 0% entspricht dem unteren Plateau (basale  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S-Bindung}$  in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% entspricht dem oberen Plateau (in Gegenwart von 100 µM ACh). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des Hybrid- oder Referenzagonisten. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (Gleichung 36) nach Black und Leff 1983. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Die Ergebnisse des ersten Hybridpaares wurden in Abbildung 4.27 (A und B) dargestellt und die Parameterwerte in Tabelle 4.21 zusammengestellt. Sowohl das dualsterische Hybrid JK 550 (C<sub>4</sub>) als auch das Hybrid JK 537 (C<sub>6</sub>) zeigten auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg mit einem log<sub>10</sub>-Wert von log<sub>10</sub> JK 550 = 0,43 ± 0,28/ log<sub>10</sub> JK 537 = 0,37 ± 0,22 eine ähnliche Kopplungseffizienzen, die einen deutlichen Partialagonismus widerspiegeln. JK 550 (C<sub>4</sub>) musste nachweisbar 37%, JK 537 (C<sub>6</sub>) 43 % der Rezeptoren aktivieren, um einen halbmaximalen Effekt zu erzielen. Die funktionelle Affinität logK<sub>A</sub> unterschied sich nicht signifikant zwischen beiden Hybrididen (t-Test, p>0,05). Die Kopplungseffizienz für den G<sub>s</sub>-Signalweg zeigte einen signifikanten Abfall in den negativen Bereich (vgl. Tab. 4.21). Die negativen log τ-Werte lieferten einen eindeutigen Hinweis darauf, dass mehr als 100% der Rezeptoren besetzt sein mussten, damit der betreffende Ligand einen halbmaximalen Effekt erzielen konnte. Die nur schwache Zellantwort kommt auch durch die auf diesen Signalweg ermittelten niedrigen E<sub>max</sub>-Werte von unter 50% zum Ausdruck (E<sub>max,JK 550</sub> = 27%; E<sub>max,JK 537</sub> = 43%)(vgl. 4.1.4.2.2). Auf dem G<sub>i</sub>-Signalweg zeigte sich anhand eines log<sub>10</sub> von -0,41 ± 0,07 für JK 537 (C<sub>6</sub>) ebenfalls eine sehr geringe Kopplungseffizienz. Für JK 550 (C<sub>4</sub>) konnte auf Grund des in diesem Signalweg nicht detektierten Signals keine Aussage getroffen werden. Werden die Kopplungseffizienzen der beiden Hybride untereinander verglichen, zeigte sich im Falle der G<sub>q</sub>- und der G<sub>s</sub>-Signalwegsaktivierung kein signifikanter Unterschied (t-Test, p>0,05). Ein Vergleich auf dem G<sub>i</sub>-Weg war nicht durchführbar. JK 537 (C<sub>6</sub>) wies gegenüber dem G<sub>i</sub>-Signalweg eine sechsfach schwächere Kopplungseffizienz auf als gegenüber dem G<sub>q</sub>-Signalweg (t-Test, p<0,05). Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der funktionellen Affinität konnte für JK 537 auf Grund der hohen Standardfehler auf keinem Signalweg detektiert werden (t-Test, p>0,05).

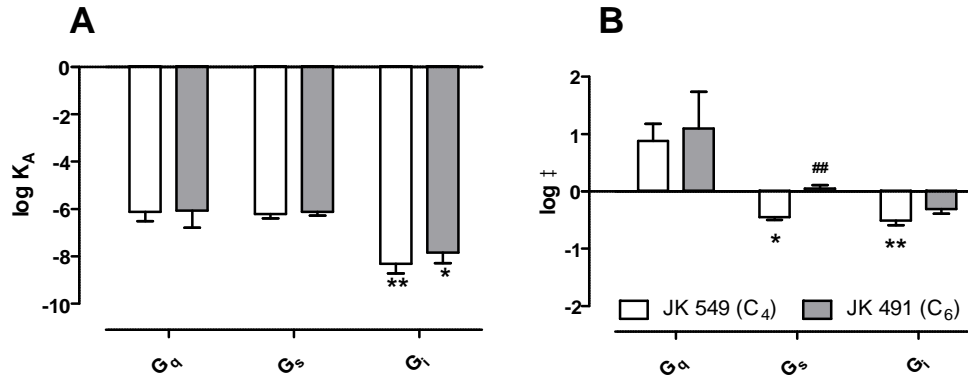
	Substanz	C	log K <sub>A</sub>	log		n
G <sub>q</sub>	JK 550	4	-6,66 ± 0,49	0,43 ± 0,28	2,69	4
	JK 537	6	-6,41 ± 0,42	0,37 ± 0,22	2,34	4
G <sub>s</sub>	JK 550	4	-6,46 ± 0,23	-0,43 ± 0,06	0,37	3
	JK 537	6	-5,49 ± 0,47	-0,13 ± 0,23	0,74	3
G <sub>f</sub>	JK 550	4	n.d.	n.d.	n.d.	3
	JK 537	6	-7,21 ± 0,34	-0,41 ± 0,07*	0,39	3
	Substanz		log K <sub>A</sub>	log		n
G <sub>q</sub>	JK 549	4	-6,12 ± 0,39	0,88 ± 0,30	7,59	4
	JK 491	6	-6,07 ± 0,72	1,10 ± 0,64	12,59	3
G <sub>s</sub>	JK 549	4	-6,22 ± 0,17	-0,45 ± 0,05*	0,35	3
	JK 491	6	-6,12 ± 0,15	0,05 ± 0,06 <sup>##</sup>	1,12	3
G <sub>f</sub>	JK 549	4	-8,32 ± 0,41 <sup>**</sup>	-0,51 ± 0,08 <sup>**</sup>	0,31	5
	JK 491	6	-7,84 ± 0,44*	-0,31 ± 0,08	0,49	3
	Substanz		log K <sub>A</sub>	log		n
G <sub>q</sub>	JK 596	4	-6,97 ± 0,46	0,45 ± 0,27	2,81	3
	JK 559	6	-6,12 ± 0,52	0,71 ± 0,38	5,13	3
G <sub>s</sub>	JK 596	4	-6,93 ± 0,22	-0,42 ± 0,05 <sup>**</sup>	0,38	6
	JK 559	6	-6,64 ± 0,17	-0,19 ± 0,05 <sup>**</sup>	0,65	5
G <sub>f</sub>	JK 596	4	-9,40 ± 0,34 <sup>**</sup>	-0,37 ± 0,04 <sup>**</sup>	0,43	5
	JK 559	6	-7,76 ± 0,24 <sup>###</sup>	0,20 ± 0,08 <sup>###</sup>	1,58	6

**Tabelle 4. 21: Kenngrößen der mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ ermittelten Kenngrößen log K<sub>A</sub> und log τ.**  
 C: Anzahl der Kohlenstoffatome in der Zwischenkette der dualsterischen Hybride. logK<sub>A</sub>: Dekadischer Logarithmus der funktionellen Affinität K<sub>A</sub>. Log : Dekadischer Logarithmus der Kopplungseffizienz . n: Anzahl unabhängiger Experimente. Die Kenngrößen basieren auf dem in Abb. 4.27. 4.28 und 4.29 dargestellten Balkendiagramm. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983) (Gleichung 36) (vgl. 3.4) <sup>#</sup>, <sup>##</sup>, <sup>###</sup>: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße des kürzeren dualsterischen Hybrides innerhalb des zu vergleichenden Paares (t- Test, <sup>#</sup>p<0,05, <sup>##</sup>p<0,01, <sup>###</sup>p<0,001). \*,<sup>\*\*</sup>: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg (t- Test, \*p<0,05, \*\* p<0,01).



**Abbildung 4.27: Graphische Darstellung der funktionellen Affinität und der Kopplungseffizienz des Hybridpaares JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) auf dem G<sub>q</sub>-, G<sub>s</sub>- und dem G<sub>i</sub>-Signalweg.** Die Werte für logK<sub>A</sub> (funktionelle Affinität) und log (Kopplungseffizienz) wurden mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff, 1983) (Gleichung 36) (vgl. 3.4) ermittelt. Der endogene Vollagonist Acetylcholin diente als Referenzagonist. Dargestellt sind die in Tabelle 4.21 aufgeführten Mittelwerte ± Standardfehler. \*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg (t-Test, \*p<0,05).

Für die dualsterischen Hybride JK 549 (C<sub>4</sub>) und JK 491 (C<sub>6</sub>), gegenübergestellt in Abbildung 4.28 (A und B), konnte auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg die höchste Kopplungseffizienz ermittelt werden. JK 549 musste 13% ( $\tau = 7,89$ ), JK 491 nur 8% ( $\tau = 12,59$ ) der Rezeptoren aktivieren, um einen halbmaximalen Effekt zu erzielen. Diese Werte spiegeln deutlich den in diesem Signalweg detektierten Vollagonismus des dualsterischen Hybrides JK 491 (C<sub>6</sub>) wider. Auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg zeigte das Hybrid JK 491 ( $\tau = 1,12$ ) ebenfalls eine gegenüber JK 549 ( $\tau = 0,35$ ) signifikant höhere Kopplungseffizienz. Dennoch musste JK 491 89% der Rezeptoren besetzen, um einen halbmaximalen Effekt auszulösen. Im Falle von JK 549 waren es über 100% der Rezeptoren. Auf dem G<sub>i</sub>-Signalweg zeigte sich für beide Hybriden eine sehr schwache Kopplungseffizienz ( $\log_{JK549} = -0,51 \pm 0,08$ ,  $\log_{JK491} = -0,31 \pm 0,08$ ), die sich nicht signifikant unterschied (t-Test, p>0,05). Wird die Kopplungseffizienz der beiden Hybride zwischen den drei Signalwegen verglichen, so zeigte JK 549 (C<sub>4</sub>) auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg eine 21-fach und auf dem G<sub>i</sub>-Signalweg eine 25-fach schwächere Kopplungseffizienz als auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg (t-Test, p<0,05). Die Kopplungseffizienz von JK 491 (C<sub>6</sub>) auf dem G<sub>i</sub>-Weg wies auf Grund eines sehr hohen Standardfehlers keine signifikanten Unterschiede zu derjenigen der übrigen untersuchten Signalwege auf (t-Test, p>0,05). Beide Hybride besaßen die gleiche funktionelle Affinität auf dem G<sub>q</sub>- und dem G<sub>s</sub>-Signalweg und die stärkste auf dem G<sub>i</sub>-Signalweg (t-Test, p<0,05). Für JK 491 konnte auf dem G<sub>i</sub>-Signalweg  $\log K_A = -7,84 \pm 0,44$ , für JK 549  $\log K_A = -8,32 \pm 0,41$  detektiert werden, womit JK 491 verglichen mit dem G<sub>q</sub>-Signalweg eine 59-fach und JK 549 sogar eine 158-fach höhere funktionelle Affinität zum G<sub>i</sub>-Signalweg aufwies (t-Test, p<0,05).



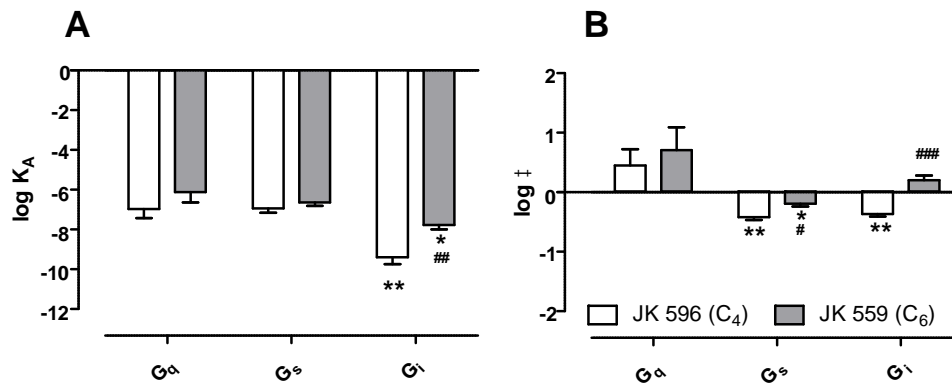
**Abbildung 4.28: Graphische Darstellung der funktionellen Affinität und der Kopplungseffizienz des Hybridpaares JK 549 (C<sub>4</sub>) und JK 491 (C<sub>6</sub>) auf dem G<sub>q</sub>-, G<sub>s</sub>- und dem G<sub>i</sub>-Signalweg.** Die Werte für logK<sub>A</sub> (funktionelle Affinität) und log  $\tau$  (Kopplungseffizienz) wurden mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983) (Gleichung 36) (vgl. 3.4) ermittelt. Der endogene Vollagonist Acetylcholin diente als Referenzagonist. Dargestellt sind die in Tabelle 4.21 aufgeführten Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. ##: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße des kürzeren dualsterischen Hybrides innerhalb des zu vergleichenden Paares (t-Test, ## p<0,01). \*, \*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg (t-Test, \* p<0,05, \*\* p<0,01).

Die Ergebnisse für das Hybridpaar JK 596 (C<sub>4</sub>) und JK 559 (C<sub>6</sub>) wurden in Abbildung 4.29 (A und B) dargestellt. Die Parameterwerte sind in Tabelle 4.21 zusammengefasst. Beide Hybride zeigten auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg die höchste Kopplungseffizienz verglichen mit dem G<sub>s</sub>- und G<sub>i</sub>-Signalweg. JK 596 (C<sub>4</sub>) benötigte 36% ( $\tau = 2,81$ ), das um zwei Kohlenstoffatome längere Hybrid JK 559 (C<sub>6</sub>) 21% ( $\tau = 5,13$ ) Rezeptorbesetzung, um einen halbmaximalen Effekt auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg zu erzielen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den log  $\tau$ -Werten beider Hybride lag nicht vor (t-Test, p>0,05). Auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg zeigten beide Hybridliganden eine negative Kopplungseffizienz, was im Vergleich zum G<sub>q</sub>-Signalweg für einen sehr schwachen Partialagonismus sprach. Das kurze Hybrid JK 596 zeigte mit einem log  $\tau$ -Wert von  $-0,42 \pm 0,05$  eine siebenfach und JK 559 mit einem log  $\tau$  von  $-0,19 \pm 0,05$  eine achtfach schwächere Kopplungseffizienz, vergleichen mit dem G<sub>q</sub>-Signalweg (t-Test, p<0,05). Zudem wies das längere Hybrid eine zweifach höhere Kopplungseffizienz auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg auf als das kurze Hybrid JK 596 (t-Test, p<0,05). Auf dem G<sub>i</sub>-Signalweg, besaß das längere der beiden Hybride JK 559 (C<sub>6</sub>) eine vierfach höhere Kopplungseffizienz als das dualsterische Hybrid JK 596 (C<sub>4</sub>). Es musste 63% ( $\tau = 1,58$ ) der Rezeptoren aktivieren, um einen halbmaximalen Effekt zu erzielen, JK 596 (C<sub>4</sub>) sogar über 100%. Die nur geringgradige Zellantwort kommt auch in den auf diesem Signalweg ermittelten niedrigen E<sub>max</sub>-Werten (E<sub>max,JK596</sub> =  $30 \pm 2\%$ , E<sub>max,JK559</sub> =  $61 \pm 4\%$ ) zum Ausdruck.

Wie schon zuvor gezeigt, wies auch dieses Hybridpaar auf dem G<sub>i</sub>-Signalweg die höchste funktionelle Affinität auf (t-Test, p<0,05). Das kürzere Hybrid JK 596 (C<sub>4</sub>) wies, verglichen mit dem G<sub>q</sub>-Signalweg, eine 269-fach und JK 559 eine 44-fach höhere Affinität zum G<sub>i</sub>-Signalweg auf (t-Test, p<0,05). Ein Vergleich der beiden Hybride zeigte, dass das dualsterische Hybrid JK 596 (C<sub>4</sub>), verglichen mit dem längeren Hybrid JK 559 interessanterweise eine 44-fach höhere funktionelle Affinität aufwies (t-Test, p<0,05).



Ein Vergleich beider Hybride, hinsichtlich ihrer funktionellen Affinität zeigte zwischen dem  $G_q$ - und dem  $G_s$ -Signalweg keine signifikanten Unterschiede (t-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4.29: Graphische Darstellung der funktionellen Affinität und der Kopplungseffizienz des Hybridpaares JK 596 (C<sub>4</sub>) und JK 559 (C<sub>6</sub>) auf dem  $G_q$ -,  $G_s$ - und dem  $G_i$ -Signalweg.** Die Werte für  $\log K_A$  (funktionelle Affinität) und  $\log \tau$  (Kopplungseffizienz) wurden mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff, 1983) (Gleichung 36) (vgl. 3.4) ermittelt. Der endogene Vollagonist Acetylcholin diente als Referenzagonist. Dargestellt sind die in Tabelle 4.21 aufgeführten Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. #, ##, ###: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße des kürzeren dualsterischen Hybridens innerhalb des zu vergleichenden Paares (t-Test, #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$ ). \*, \*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße auf dem  $G_q$ -Signalweg (t-Test, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

#### 4.1.6 Quantifizierung eines durch dualsterische Hybridliganden induzierten „Ligand-Bias“

Eine Schlüsselcharakteristik G Protein-gekoppelter Rezeptoren besteht darin, dass sie in der Lage sind, eine Fülle unterschiedlicher Signalwege zu aktivieren (Gregory et al. 2012). Frühe Modelle über das Signalverhalten von GPCR deuteten darauf hin, dass Rezeptoren in einem Gleichgewicht zwischen „on“ und „off“-Zuständen vorliegen können und sich so in der Fähigkeit unterscheiden, nachgeschaltete Zellantworten auszulösen (Costa und Herz 1989; Schütz und Freissmuth 1992; Samama et al. 1993; Lefkowitz et al. 1993; Samama et al. 1994; Kenakin 1994; Bond et al. 1995). Dieser Gedanke rührt daher, dass lange angenommen wurde, alle Agonisten aktivieren Rezeptoren durch die Stabilisierung einer einzelnen aktiven Konformation des Rezeptors. Neuste Erkenntnisse konnten aber zeigen, dass GPCRs in der Lage sind, spezielle Ligand-induzierte Konformationen zu induzieren, was zu unterschiedlichen aktiven Zuständen führen kann (Kenakin 2005; Violin und Lefkowitz 2007; Reiter et al. 2012). Dies wiederum erlaubt den Ligand-induzierten aktiven Konformationen die Kontaktaufnahme mit unterschiedlichen Signalpartnern, was sich in der Literatur in den Begriffen „funktionelle Selektivität“ oder „Ligand Bias“ widerspiegelt (Kenakin und Christopoulos 2013a). In den letzten Jahren konnten eine Vielzahl an Liganden beschrieben werden, die vornehmlich den G Protein Weg vor dem -Arrestin Weg aktivieren, oder aber auch Liganden, die sich hinsichtlich ihrer Kopplung an

einzelne G-Proteine unterscheiden (Kenakin und Miller 2010; Rajagopal et al. 2010; Reiter et al. 2012). Manche im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Hybridliganden, wie beispielsweise JK 596 und JK 559, zeigten große Unterschiede im Bereich der Wirkstärke für die jeweiligen Signalwege, was ein Hinweis darauf sein kann, dass die Beschaffenheit der Rezeptor-Effektor-Komplexe die relative Affinität der Substanzen für eine spezifische Rezeptor Konformation beeinflusst (van der Westhuizen et al. 2014). Unterschiede zwischen den im vorherigen Kapitel dieser Arbeit dargestellten Kopplungseffizienzen und funktionellen Affinitäten untermauerten den Verdacht, dass manche dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden eine funktionelle Selektivität hinsichtlich eines Signalweges gegenüber einem anderen induzieren könnten. Um die unterschiedlichen Agonist-Profile zu vergleichen und um eine mögliche Signalwegbevorzugung aufzudecken, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine von Shonberg et al. 2014 abgewandelte Gleichung des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983) verwendet. Mit diesem Verfahren wird der gemessene Agonismus mit Hilfe eines systemunabhängigen Parameters quantifiziert, welcher die beiden zuvor beschriebenen Parameter  $\tau$  und  $K_A$  (funktionelle Affinität) enthält. Ausgedrückt wird dies in Form des sogenannten „Transduktionskoeffizienten“:  $\tau/K_A$  (im Rahmen dieser Arbeit bestimmt als  $\log(\tau/K_A)$ ), wobei  $\tau$  die Agonist „efficacy“, Rezeptordichte und die Systemkopplung einbringt und die Dissoziationskonstante  $K_A$  den Kehrwert der „conditional affinity“ des Agonisten in einem funktionellen System darstellt (Kenakin 2013). Dieser einzelne numerische Schätzwert kann dann dazu verwendet werden, Liganden unter verschiedenen „readouts“ zu vergleichen und zu bestimmen, ob und in welchem Ausmaß sie eine bevorzugte Signalwegaktivierung bzw. einen „Ligand-Bias“ aufweisen (Kenakin et al. 2012; Kenakin und Christopoulos 2013b). Die Bestimmung der  $\log(\tau/K_A)$ -Werte mit Hilfe der von Shonberg et al. 2014 modifizierten Gleichung des „Operational Model of Agonism“ erforderte - wie das im vorherigen Abschnitt verwendete genuine „Operational Model of Agonism“ (nach Black und Leff 1983) - den Vergleich mit einem Referenzagonisten zur Definition des Maximaleffektes des Systems. Neben dem im vorherigen Abschnitt verwendeten Referenzagonisten ACh, wurde mit Blick auf die „Bias“-Berechnung alternativ auch der Vollagonist Iperoxo als Referenzagonist verwendet. Dieses Vorgehen sollte es ermöglichen, am Ende Rückschlüsse ziehen und Empfehlungen über die Wahl des geeigneten Referenzagonisten geben zu können. Nachfolgend werden demnach sowohl die „Bias“-Berechnung für den endogenen Agonisten Acetylcholin, als auch des Vollagonisten Iperoxo, der sich als orthosterischer Bausteinen in den Hybriden wiederfindet, als Referenzagonist dargestellt.

Alle sieben Iperoxo/BQCAD-Hybride (Substanzserie 1) wurden hinsichtlich einer möglichen Signalwegselektivität gegenüber drei verschiedenen Signalwegen überprüft, darunter der  $G_q$ -Signalweg (Daten der IP1-Akkumulation), der  $G_s$ -Signalweg (Daten der cAMP-Akkumulation) und der  $G_i$ -Signalweg (Daten der [ $^{35}$ S]GTP- $\gamma$ -S-Bindungsexperimente). Da in einer vorherigen Arbeit (Holze, Masterarbeit 2013) mit Hilfe von DMR-Experimenten in Anwesenheit spezifisch wirkender Toxine gezeigt werden konnte, dass die Hybrid-induzierten Signale in intakten CHO-*hM<sub>1</sub>*-wt-Zellen, hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, eine  $G_q$ -Signalwegsaktivierung widerspiegeln, wurden im

Rahmen der „Bias“-Berechnung auch diese Daten in den Vergleich mit einbezogen. Es sollte geprüft werden, ob und inwieweit sich die „Bias“-Faktoren der DMR-Experimente (Daten entnommen aus Holze, Masterarbeit, 2013) von denen der  $G_q$ -Signalwegaktivierung im IP1 Versuchsansatz unterscheiden. Da es sich bei DMR Messungen um Mischsignale aus allen der Zelle möglichen Signalwegen handeln kann, war diese „Bias“-Berechnung von nachrangiger Bedeutung und findet sich daher im Anhang der vorliegenden Arbeit (vgl. Anhang, Kapitel 9.6).

Die unter Verwendung der einzelnen funktionellen Experimente ermittelten Transduktionskoeffizienten für den  $G_q$ , den  $G_s$  und den  $G_i$  Signalweg, sind in Abbildung 4.30 (A-C) für den Referenzagonisten ACh gegenübergestellt. Die zugehörigen logarithmierten Zahlenwerte sind in den Tabellen 4.22 – 4.24 sowohl für den Referenzagonisten ACh als auch für Iperoxo aufgeführt.

IP1-Akkumulation ( $G_q$ -Signalwegaktivierung)				
Referenzagonist ACh			Referenzagonist Iperoxo	
Substanz	Substitution	$\log(\tau/K_A)$	$\log(\tau/K_A)$	n
ACh	-	7,25 ± 0,04	7,26 ± 0,05 <sup>***</sup>	3
Iperoxo	-	9,31 ± 0,04 <sup>***</sup>	9,27 ± 0,04	4
Pilocarpin	-	6,17 ± 0,05 <sup>***</sup>	6,17 ± 0,06 <sup>***</sup>	3
JK 384 (C <sub>6</sub> )	F	6,92 ± 0,07 <sup>*</sup>	6,85 ± 0,07 <sup>***</sup>	3
JK 550 (C <sub>4</sub> )	F	6,96 ± 0,09 <sup>*</sup>	7,00 ± 0,12 <sup>***</sup>	4
JK 537 (C <sub>6</sub> )	F	6,62 ± 0,05 <sup>***</sup>	6,48 ± 0,05 <sup>***</sup>	4
JK 549 (C <sub>4</sub> )	Br	6,51 ± 0,09 <sup>**</sup>	6,54 ± 0,11 <sup>***</sup>	3
JK 491 (C <sub>6</sub> )	Br	7,15 ± 0,05	7,11 ± 0,05 <sup>***</sup>	3
JK 596 (C <sub>4</sub> )	F,Cl	7,25 ± 0,05	7,29 ± 0,06 <sup>***</sup>	3
JK 559 (C <sub>6</sub> )	F,Cl	6,92 ± 0,07 <sup>*</sup>	6,85 ± 0,08 <sup>***</sup>	3

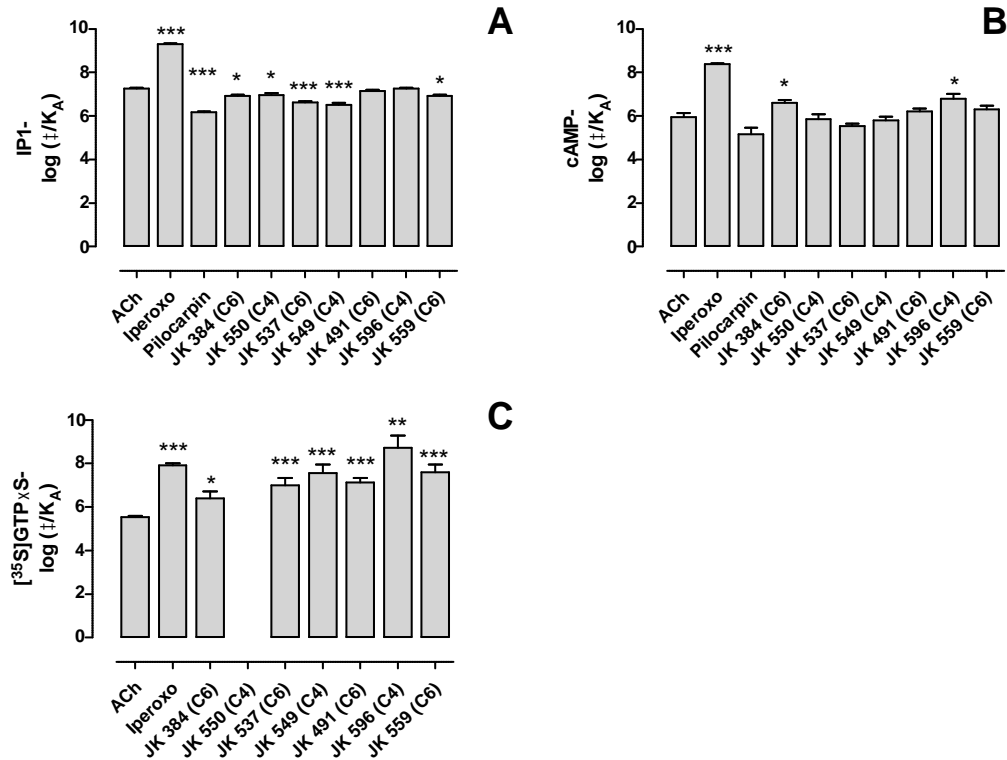
**Tabelle 4. 22: Transduktionskoeffizienten ermittelt nach Shonberg et al. 2014 von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridsubstanzen (Substanzserie 1) auf der Basis von IP1-Akkumulationsdaten ( $G_q$ - Signalweg) am  $hM_1$ -wt-Rezeptor unter Verwendung des Referenzagonisten ACh (links) oder Iperoxo (rechts).** F/Cl/Br: Fluor-, Chlor-, Brom-Substitution.  $\log(\tau/K_A)$ : Transduktionskoeffizienten nach Kenakin et al. 2012 ermittelt aus „gepoolten“ Datensätzen. n: Anzahl der Einzelerperimente. Die Transduktionskoeffizienten wurden durch globale Regressionsanalyse mit Hilfe von Gleichung 37 ermittelt. Dabei wurden die Parameter „bottom“ = konstant = 0 % und der Maximaleffekt  $E_{\max}$ , definiert durch 100  $\mu$ M Acetylcholin, als  $E_{\max} = 100$  % = konstant behandelt. Die  $\log(\tau/K_A)$ -Werte der als Referenz verwendeten Agonisten wurden jeweils hervorgehoben. \*,\*\*,\*\*\*: Wert signifikant unterschiedlich zum Transduktionskoeffizienten ( $\log(\tau/K_A)$ ) des jeweiligen Referenzagonisten (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

cAMP-Akkumulation (G <sub>s</sub> -Signalwegaktivierung)				
		Referenzagonist ACh	Referenzagonist Iperoxo	
Substanz	Substitution	log( /K <sub>A</sub> )	log( /K <sub>A</sub> )	n
ACh	-	5,95 ± 0,18	5,95 ± 0,18 <sup>**</sup>	3
Iperoxo	-	8,38 ± 0,05 <sup>***</sup>	8,37 ± 0,29	3
Pilocarpin	-	5,17 ± 0,30	5,17 ± 0,30 <sup>**</sup>	3
JK 384 (C <sub>6</sub> )	F	6,60 ± 0,14 <sup>*</sup>	6,71 ± 0,16 <sup>**</sup>	3
JK 550 (C <sub>4</sub> )	F	5,85 ± 0,24	5,99 ± 0,31 <sup>**</sup>	3
JK 537 (C <sub>6</sub> )	F	5,53 ± 0,12	5,62 ± 0,17 <sup>**</sup>	3
JK 549 (C <sub>4</sub> )	Br	5,80 ± 0,18	5,95 ± 0,25 <sup>**</sup>	3
JK 491 (C <sub>6</sub> )	Br	6,22 ± 0,12	6,32 ± 0,14 <sup>**</sup>	3
JK 596 (C <sub>4</sub> )	F,Cl	6,80 ± 0,21 <sup>*</sup>	6,82 ± 0,28 <sup>*</sup>	5
JK 559 (C <sub>6</sub> )	F,Cl	6,30 ± 0,17	6,41 ± 0,23 <sup>**</sup>	3

Tabelle 4. 23: Transduktionskoeffizienten ermittelt nach Shonberg et al. 2014 von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybrids-substanzen (Substanzserie 1) auf der Basis von cAMP-Akkumulationsdaten (G<sub>s</sub>- Signalweg) am hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor. F/Cl/Br: Fluor-, Chlor-, Brom-Substitution. log( /K<sub>A</sub>): Transduktionskoeffizienten nach Kenakin et al. 2012 ermittelt aus „gepoolten“ Datensätzen. n: Anzahl der Einzelexperimente. Die Transduktionskoeffizienten wurden durch globale Regressionsanalyse mit Hilfe von Gleichung 37 ermittelt. Dabei wurden die Parameter „bottom“ = konstant = 0 % und der Maximaleffekt Effekt<sub>max</sub>, definiert durch 100 µM Acetylcholin, als E<sub>max</sub> = 100 % = konstant behandelt. Die log( /K<sub>A</sub>)-Werte der als Referenz verwendeten Agonisten, wurden jeweils hervorgehoben. \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant unterschiedlich zum Transduktionskoeffizienten (log( /K<sub>A</sub>)) des jeweiligen Referenzagonisten (t-Test, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).

[ <sup>35</sup> S]GTP S-Bindung (G <sub>i</sub> -Signalwegaktivierung)				
		Referenzagonist ACh	Referenzagonist Iperoxo	
Substanz	Substitution	log( /K <sub>A</sub> )	log( /K <sub>A</sub> )	n
ACh	-	5,53 ± 0,07	5,59 ± 0,18 <sup>***</sup>	5
Iperoxo	-	7,91 ± 0,09 <sup>***</sup>	7,92 ± 0,09	5
JK 384 (C <sub>6</sub> )	F	6,39 ± 0,34 <sup>*</sup>	5,84 ± 0,38 <sup>***</sup>	4
JK 550 (C <sub>4</sub> )	F	n.d.	n.d.	3
JK 537 (C <sub>6</sub> )	F	7,00 ± 0,34 <sup>**</sup>	6,72 ± 0,46 <sup>*</sup>	3
JK 549 (C <sub>4</sub> )	Br	7,57 ± 0,38 <sup>***</sup>	7,43 ± 0,42	5
JK 491 (C <sub>6</sub> )	Br	7,13 ± 0,21 <sup>***</sup>	7,04 ± 0,25 <sup>**</sup>	3
JK 596 (C <sub>4</sub> )	F,Cl	8,73 ± 0,56 <sup>***</sup>	8,77 ± 0,58	5
JK 559 (C <sub>6</sub> )	F,Cl	7,61 ± 0,34 <sup>***</sup>	7,71 ± 0,25	5

Tabelle 4. 24: Transduktionskoeffizienten ermittelt nach Shonberg et al. 2014 von ACh, Iperoxo sowie der sieben dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybrids-substanzen (Substanzserie 1) ermittelt auf der Basis von [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsdaten (G<sub>i</sub>- Signalweg) am hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor. F/Cl/Br: Fluor-, Chlor-, Brom-Substitution. log( /K<sub>A</sub>): Transduktionskoeffizienten nach Kenakin et al. 2012 ermittelt aus „gepoolten“ Datensätzen. n: Anzahl der Einzelexperimente. Die Transduktionskoeffizienten wurden durch globale Regressionsanalyse mit Hilfe von Gleichungen 37 ermittelt. Dabei wurden die Parameter „bottom“ = konstant = 0 % und der Maximaleffekt Effekt<sub>max</sub>, definiert durch 100 µM Acetylcholin, als E<sub>max</sub> = 100 % = konstant behandelt. Die log( /K<sub>A</sub>)-Werte der als Referenz verwendeten Agonisten wurden jeweils hervorgehoben. \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant unterschiedlich zum Transduktionskoeffizienten (log(τ/K<sub>A</sub>)) des jeweiligen Referenzagonisten (t-Test, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).



**Abbildung 4.30:** Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Hybridsubstanzen (Substanzserie 1) ermittelt auf der Basis von IP1-Akkumulations- ( $G_q$ ), cAMP-Akkumulations- ( $G_s$ ), und GTP S-Bindungs- ( $G_i$ ) Daten.  $\log(\pm/K_A)$ : Transduktionskoeffizienten nach Kenakin et al. 2012, ermittelt aus „gepoolt“ ausgewerteten Versuchstagen. Die Transduktionskoeffizienten wurden durch globale Regressionsanalyse mit Hilfe von Gleichungen 37 ermittelt. Dabei wurden die Parameter „bottom“ = konstant = 0 % und der Maximaleffekt  $\text{Effekt}_{\max}$ , definiert durch 100  $\mu\text{M}$  Acetylcholin, als  $E_{\max} = 100\%$  = konstant behandelt. Dargestellt sind die in Tabelle 4.22, 4.23 und 4.24 aufgeführten Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. \* \*\* \*\*\*: Wert signifikant unterschiedlich zum Transduktionskoeffizienten  $\log(\pm/K_A)$  des Referenzagonisten (ACh) (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

Die Beobachtung, dass manche Testsubstanzen auf einzelnen Signalwegen einen höheren Transduktionskoeffizienten aufwiesen, als auf einem anderen Signalweg (vgl. Abb. 4.30), kann auf eine Beeinflussung durch einen „System Bias“ zurückzuführen sein. Diese Art von „Bias“ stellt ein vom „Ligand-Bias“ unabhängiges Ereignis dar (Bock et al. 2012; Kenakin und Christopoulos 2013b). Ein etwaiger „System Bias“ erlaubt keine eindeutige Aussage über eine durch den Liganden (d.h. die Testsubstanz) eindeutig induzierte Signalwegsbevorzugung (Kenakin und Christopoulos 2013b). Aus diesem Grund wurde in einem nachfolgenden Schritt die systemabhängige Bevorzugung durch eine Normalisierung des Transduktionskoeffizienten mit Hilfe des Referenzagonisten eliminiert. Dafür wurde für jeden der untersuchten Signalwege der Transduktionskoeffizient für den Referenzagonisten von dem Transduktionskoeffizienten der Testsubstanz subtrahiert (vgl. 3.5 Gleichung (38)). Diese Differenz ist sowohl für die Verwendung des Referenzagonisten ACh (vgl. Abb. 4.31), als auch für Iperoxo in den nachfolgenden Tabellen 4.25 – 4.27, ausgedrückt als  $\log(\pm/K_A)$ , wiedergegeben.

<b>IP1-Akkumulation (G<sub>q</sub>-Signalwegaktivierung)</b>			
<b>Referenzagonist ACh</b>		<b>Referenzagonist Iperoxo</b>	
<b>Substanz</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>
<b>ACh</b>	<b>0,00 ± 0,07</b>	-2,01 ± 0,06 <sup>***</sup>	3
<b>Iperoxo</b>	2,06 ± 0,06 <sup>***</sup>	<b>0,00 ± 0,06</b>	3
<b>Pilocarpin</b>	-1,08 ± 0,06 <sup>***</sup>	-3,10 ± 0,07 <sup>***</sup>	3
<b>JK 384 (C<sub>6</sub>)</b>	-0,33 ± 0,08 <sup>*</sup>	-2,42 ± 0,08 <sup>***</sup>	3
<b>JK 550 (C<sub>4</sub>)</b>	-0,29 ± 0,10	-2,27 ± 0,13 <sup>***</sup>	4
<b>JK 537 (C<sub>6</sub>)</b>	-0,63 ± 0,06 <sup>**</sup>	-2,79 ± 0,06 <sup>***</sup>	4
<b>JK 549 (C<sub>4</sub>)</b>	-0,74 ± 0,10 <sup>**</sup>	-2,73 ± 0,12 <sup>***</sup>	3
<b>JK 491 (C<sub>6</sub>)</b>	-0,10 ± 0,06	-2,16 ± 0,06 <sup>***</sup>	3
<b>JK 596 (C<sub>4</sub>)</b>	0,00 ± 0,06	-1,98 ± 0,07 <sup>***</sup>	3
<b>JK 559 (C<sub>6</sub>)</b>	-0,33 ± 0,08 <sup>*</sup>	-2,42 ± 0,09 <sup>***</sup>	3

**Tabelle 4. 25: Normalisierte Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridsstoffen (Substanzserie 1) auf der Basis von IP1-Akkumulationsdaten (G<sub>q</sub>-Signalweg) am hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor.** log( /K<sub>A</sub>): normalisierte Transduktionskoeffizienten nach Kenakin et al. 2012 ermittelt aus „gepoolten“ Daten aller Versuchstage. n: Anzahl der Einzelexperimente; die Werte wurden mit Hilfe von Gleichung 38 ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 errechnet. Die log( /K<sub>A</sub>)-Werte der jeweils als Referenz verwendeten Agonisten wurden hervorgehoben. \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant unterschiedlich zum Transduktionskoeffizienten ( log(τ/K<sub>A</sub>)) des jeweiligen Referenzagonisten (t-test, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).

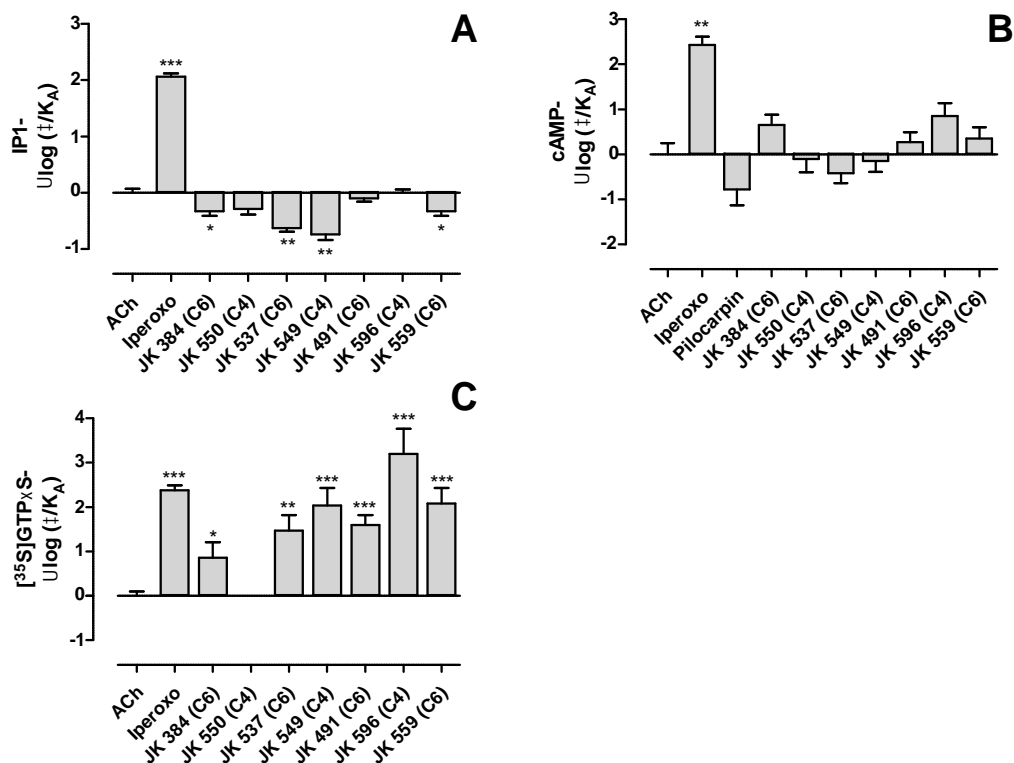
<b>cAMP-Akkumulation (G<sub>s</sub>-Signalwegaktivierung)</b>			
<b>Referenzagonist ACh</b>		<b>Referenzagonist Iperoxo</b>	
<b>Substanz</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>
<b>ACh</b>	<b>0,00 ± 0,25</b>	-2,42 ± 0,34 <sup>*</sup>	3
<b>Iperoxo</b>	2,43 ± 0,19 <sup>**</sup>	<b>0,00 ± 0,41</b>	3
<b>Pilocarpin</b>	-0,78 ± 0,35	-3,20 ± 0,42 <sup>**</sup>	3
<b>JK 384 (C<sub>6</sub>)</b>	0,65 ± 0,23	-1,66 ± 0,39 <sup>*</sup>	3
<b>JK 550 (C<sub>4</sub>)</b>	-0,10 ± 0,30	-2,38 ± 0,40 <sup>*</sup>	3
<b>JK 537 (C<sub>6</sub>)</b>	-0,42 ± 0,22	-2,75 ± 0,34 <sup>**</sup>	3
<b>JK 549 (C<sub>4</sub>)</b>	-0,15 ± 0,24	-2,42 ± 0,38 <sup>*</sup>	3
<b>JK 491 (C<sub>6</sub>)</b>	0,27 ± 0,22	-2,05 ± 0,32 <sup>*</sup>	3
<b>JK 596 (C<sub>4</sub>)</b>	0,85 ± 0,28	-1,55 ± 0,30 <sup>*</sup>	5
<b>JK 559 (C<sub>6</sub>)</b>	0,35 ± 0,25	-1,93 ± 0,37 <sup>*</sup>	3

**Tabelle 4. 26: Normalisierte Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Hybridsstoffen (Substanzserie 1) auf Basis von cAMP-Akkumulationsdaten (G<sub>s</sub>-Signalweg) am hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor.** log( /K<sub>A</sub>): normalisierte Transduktionskoeffizienten nach Kenakin et al. 2012 ermittelt aus „gepoolten“ Daten aller Versuchstage. n: Anzahl der Einzelexperimente; die Werte wurden mit Hilfe von Gleichung 38 ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 errechnet. Die log( /K<sub>A</sub>)-Werte der jeweils als Referenz verwendeten Agonisten wurden hervorgehoben. \*, \*\*: Wert signifikant unterschiedlich zum Transduktionskoeffizienten ( log(τ/K<sub>A</sub>)) des jeweiligen Referenzagonisten (t-Test, \*p<0,05, \*\*p<0,01).

<b>[<sup>35</sup>S]GTP S-Bindung (G<sub>i</sub>-Signalwegaktivierung)</b>			
	<b>Referenzagonist ACh</b>	<b>Referenzagonist Iperoxo</b>	
<b>Substanz</b>	<b>log( <math>\tau/K_A</math> )</b>	<b>log( <math>\tau/K_A</math> )</b>	<b>n</b>
<b>ACh</b>	<b>0,00 ± 0,10</b>	-2,33 ± 0,20 <sup>***</sup>	5
<b>Iperoxo</b>	2,38 ± 0,11 <sup>***</sup>	<b>0,00 ± 0,13</b>	5
<b>JK 384 (C<sub>6</sub>)</b>	0,86 ± 0,35 <sup>*</sup>	-2,08 ± 0,42 <sup>***</sup>	4
<b>JK 550 (C<sub>4</sub>)</b>	n.d.	n.d.	3
<b>JK 537 (C<sub>6</sub>)</b>	1,47 ± 0,35 <sup>**</sup>	-1,20 ± 0,47 <sup>*</sup>	3
<b>JK 549 (C<sub>4</sub>)</b>	2,04 ± 0,39 <sup>***</sup>	-0,49 ± 0,39	5
<b>JK 491 (C<sub>6</sub>)</b>	1,60 ± 0,22 <sup>***</sup>	-0,88 ± 0,27 <sup>*</sup>	3
<b>JK 596 (C<sub>4</sub>)</b>	3,20 ± 0,56 <sup>***</sup>	0,85 ± 0,59	5
<b>JK 559 (C<sub>6</sub>)</b>	2,08 ± 0,35 <sup>***</sup>	0,09 ± 0,27	5

**Tabelle 4. 27: Normalisierte Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo sowie der sieben dualsterischen Hybridsubstanzen (Substanzserie 1) auf Basis von [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsdaten (G<sub>i</sub>-Signalweg) am hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor.**

log(  $\tau/K_A$  ): normalisierte Transduktionskoeffizienten nach Kenakin et al. 2012 ermittelt aus „gepoolten“ Daten aller Versuchstage. n: Anzahl der Einzelexperimente; die Werte wurden mit Hilfe von Gleichung 38 ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 errechnet. Die log(  $\tau/K_A$  )-Werte der jeweils als Referenz verwendeten Agonisten wurden hervorgehoben. \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant unterschiedlich zum Transduktionskoeffizienten ( log(  $\tau/K_A$  ) ) des jeweiligen Referenzagonisten (t-Test, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).



**Abbildung 4. 31:** Normalisierte Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Hybridsubstanzen (Substanzserie 1) ermittelt auf der Basis von IP1-Akkumulations- ( $G_q$ ), cAMP-Akkumulations- ( $G_s$ ) und [ $^{35}$ S]GTP S-Bindungs- ( $G_i$ ) Daten.  $\log(\tau/K_A)$ : normalisierter Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  der zu untersuchenden Substanzen nach Kenakin et al. 2012, die Werte wurden mit Hilfe von Gleichung 38 ermittelt. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 errechnet. Dargestellt sind die in Tabelle 4.25, 4.26 und 4.27 aufgeführten Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant unterschiedlich zum Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  des Referenzagonisten (ACh)(t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

In den nachfolgenden Tabellen (Tab. 4.28-4.30) sowie in Abbildung 4.32 (A-F) sind die Ergebnisse der „Bias“-Berechnungen dargestellt. Verglichen wurde der in vielen Zelltypen und Geweben vom  $hM_1$ -Rezeptor hauptsächlich bevorzugten  $G_q$ -Signalweg, mit dem  $G_s$ -Signalweg (vgl. Abb. 4.32 (A,B)) einerseits und dem  $G_i$ -Signalweg (vgl. Abb. 4.32 (C,D)) andererseits sowie zwischen dem  $G_s$ - und dem  $G_i$  Signalweg (vgl. Abb. 4.32 (E,F)).

Die Ligand-spezifische Bevorzugung eines Signalweges wurde durch die Differenzbildung zweier Signalwege quantifiziert (Shonberg et al. 2014). So lieferte die Subtraktion der  $\log(\tau/K_A)$ -Werte, die beispielsweise für den  $G_s$ -Signalweg ermittelt wurden, von  $\log(\tau/K_A)$ -Werten die für den  $G_q$ -Signalweg ermittelt wurden einen  $\log(\tau/K_A)_{G_q-G_s}$ -Wert, der einen direkten Vergleich zwischen den dualsterischen Iperoxo/BQCAd-Hybriden hinsichtlich ihrer Bevorzugung eines Signalweges ermöglichte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.28 und Abbildung 4. 32 (A,B) sowohl für den Referenzagonisten ACh als auch für Iperoxo zusammengefasst. Liegt kein „Ligand-Bias“ und somit keine funktionelle Selektivität vor, unterscheidet sich der zwischen zwei untersuchten Signalwegen



ermittelte  $\log(\tau/K_A)$ -Wert nicht signifikant von 1, bzw. im Falle der logarithmierten Werte nicht signifikant von 0.

Gegenüber dem Referenzagonisten ACh zeigte eines der dualsterischen Hybride (JK 384) eine Bevorzugung des  $G_s$ -Signalweges, das sich in einer signifikanten Abweichung der entsprechenden  $\log(1/K_A)G_q$ - $G_s$ -Werte von der Nulllinie, definiert durch den Referenzagonisten, unterschied (vgl. Abb. 4.32 (A)). Ein Vergleich der delogarithmierten  $\log(1/K_A)G_q$ - $G_s$ -Werte ( $10^{\log(\tau/K_A)}$ ), die auch als „Bias“-Faktoren bezeichnet werden, zeigte für dieses Hybrid eine zehnfach, höhere Neigung den  $G_s$ -Signalweg zu aktivieren als der Referenzagonist ACh (t-Test,  $p < 0,05$ ). Gegenüber dem Referenzagonisten Iperoxo zeigte keines der untersuchten Hybride eine Bevorzugung eines Signalweges (vgl. Abb. 4.32 (B)).

IP1-Akkumulation ( $G_q$ -Signalwegaktivierung) – cAMP-Akkumulation ( $G_s$ -Signalwegaktivierung)					
Referenzagonist ACh			Referenzagonist Iperoxo		
Substanz	$\log(1/K_A)$	$10^{\log(1/K_A)}$	$\log(1/K_A)$	$10^{\log(1/K_A)}$	n
ACh	<b>0,00 ± 0,26</b>	1,00	0,41 ± 0,35	2,57	6
Iperoxo	-0,37 ± 0,20	0,43	<b>0,00 ± 0,42</b>	1,00	6
Pilocarpin	-0,30 ± 0,36	0,50	0,10 ± 0,43	1,26	6
JK 384	-0,98 ± 0,24*	0,10	-0,76 ± 0,40	0,17	6
JK 550	-0,19 ± 0,32	0,65	0,11 ± 0,58	1,29	7
JK 537	-0,21 ± 0,23	0,62	0,04 ± 0,35	1,10	7
JK 549	-0,59 ± 0,26	0,26	-0,31 ± 0,40	0,49	6
JK 491	-0,37 ± 0,22	0,43	-0,11 ± 0,33	0,78	6
JK 596	-0,85 ± 0,29	0,14	-0,43 ± 0,31	0,37	8
JK 559	-0,68 ± 0,26	0,21	-0,49 ± 0,38	0,32	6

**Tabelle 4. 28:**  $\log(1/K_A)$ -Werte ermittelt durch Differenzbildung zwischen normalisierten Transduktionskoeffizienten  $\log(1/K_A)$  der IP1-Akkumulation ( $G_q$ -Signalweg) und der cAMP-Akkumulation ( $G_s$ -Signalweg) von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben Hybridsubstanzen (Substanzserie 1).  $\log(1/K_A)$ : Differenz der normalisierte Transduktionskoeffizienten nach Kenakin et al. 2012 ermittelt aus „gepoolten“ Daten aller Versuchstage der IP1-Akkumulation und cAMP-Akkumulation. n: Anzahl der Einzelexperimente; die Werte wurden mit Hilfe von Gleichung 39 ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 41 errechnet. Die  $\log(1/K_A)$ -Werte der jeweils als Referenz verwendeten Agonisten wurden hervorgehoben.\*:  $\log(1/K_A)$ -Wert signifikant unterschiedlich vom  $\log(1/K_A)$ -Wert des jeweiligen Referenzagonisten (t-Test,  $*p < 0,05$ ).

Die Subtraktion des  $\log(1/K_A)$ -Wertes des  $G_i$ - vom  $\log(1/K_A)$ -Wert des  $G_q$ -Signalweges führte bei sechs der dualsterischen Hybridliganden zu  $\log(1/K_A)$ -Werten, die sich signifikant von der Nulllinie, definiert durch den Referenzagonisten ACh, unterschieden (vgl. Abb. 4.32 (C)). Alle Hybride, mit Ausnahme von JK 550, induzierten demnach gegenüber dem Referenzagonisten ACh eine Bevorzugung des  $G_i$ -Signalweges. Bezogen auf den Referenzagonisten Iperoxo, zeigte JK 491 eine 20-fach ( $10^{\log(1/K_A)} = 0,05$ ), JK 537 eine 33-fach ( $10^{\log(1/K_A)} = 0,03$ ), JK 549 eine 167-fach ( $10^{\log(1/K_A)} = 0,006$ ), JK 559 eine 333-fach ( $10^{\log(1/K_A)} = 0,003$ ) und JK 596 sogar eine 1000-fach ( $10^{\log(1/K_A)} =$

0,001 signifikant höhere Neigung den  $G_i$ -Signalweg zu aktivieren als der Referenzagonist Iperoxo (vgl. Tab. 4.29 und Abb. 4.32 (D)).

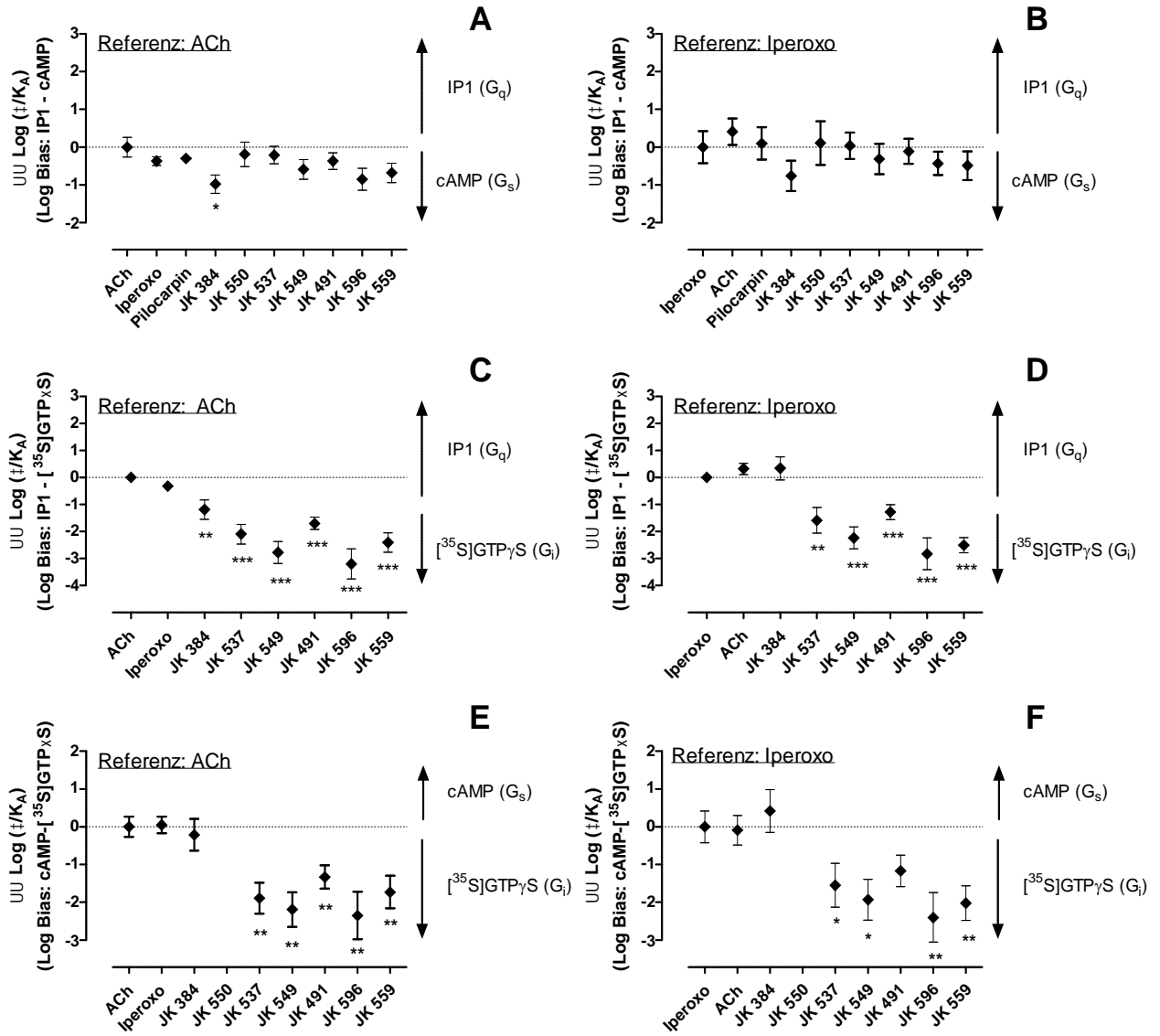
IP1-Akkumulation ( $G_q$ -Signalwegaktivierung) - [ $^{35}$ S]GTP S-Bindung ( $G_i$ -Signalwegaktivierung)					
Referenzagonist ACh			Referenzagonist Iperoxo		
Substanz	$\log(1/K_A)$	$10^{\log(1/K_A)}$	$\log(1/K_A)$	$10^{\log(1/K_A)}$	n
<b>ACh</b>	<b>0,00 ± 0,12</b>	1,00	0,32 ± 0,21	2,09	8
<b>Iperoxo</b>	-0,32 ± 0,13	0,48	<b>0,00 ± 0,14</b>	1,00	8
<b>JK 384</b>	-1,19 ± 0,36**	0,06	0,34 ± 0,43	2,19	7
<b>JK 550</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7
<b>JK 537</b>	-2,10 ± 0,36***	0,008	-1,59 ± 0,47**	0,03	7
<b>JK 549</b>	-2,78 ± 0,40***	0,002	-2,24 ± 0,41***	0,006	8
<b>JK 491</b>	-1,70 ± 0,23***	0,02	-1,28 ± 0,28***	0,05	6
<b>JK 596</b>	-3,20 ± 0,56***	0,0006	-2,83 ± 0,59***	0,001	8
<b>JK 559</b>	-2,41 ± 0,36***	0,004	-2,51 ± 0,28***	0,003	8

**Tabelle 4. 29:**  $\log(1/K_A)$ -Werte ermittelt durch Differenzbildung zwischen normalisierten Transduktionskoeffizienten  $\log(1/K_A)$  der IP1-Akkumulation ( $G_q$ -Signalweg) und der Förderung der [ $^{35}$ S]GTP S-Bindung ( $G_i$ -Signalweg) von ACh, Iperoxo sowie der sieben Hybridsubstanzen (Substanzserie 1).  $\log(1/K_A)$ : Differenz der normalisierte Transduktionskoeffizienten nach Kenakin et al. 2012 ermittelt aus „gepoolten“ Daten aller Versuchstage der IP1-Akkumulation und [ $^{35}$ S]GTP S-Bindung. n: Anzahl der Einzelexperimente; die Werte wurden mit Hilfe von Gleichung 39 ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 41 errechnet. Die  $\log(1/K_A)$ -Werte der jeweils als Referenz verwendeten Agonisten wurden rot hervorgehoben. \*\*,\*\*\*:  $\log(1/K_A)$ -Wert signifikant unterschiedlich vom  $\log(1/K_A)$ -Wert des jeweiligen Referenzagonisten (t-Test, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).

Auch die Subtraktion des  $\log(1/K_A)$ -Wertes des  $G_s$ - vom  $\log(1/K_A)$ -Wert des  $G_i$ -Signalweges führte bei fünf der dualsterischen Hybridliganden zu  $\log(1/K_A)$ -Werten, die sich signifikant von der Nulllinie, definiert durch den Referenzagonisten ACh, unterschieden (vgl. Tab. 4.30 und Abb. 4.32 (E)). Diese Hybride, mit Ausnahme von JK 550 und JK 384, induzierten demnach gegenüber beiden Referenzagonisten ACh eine Bevorzugung des  $G_i$ -Signalweges gegenüber dem  $G_s$ -Signalweg. Bezogen auf den Referenzagonisten Iperoxo, zeigte JK 537 eine 33-fach ( $10^{\log(1/K_A)} = 0,03$ ), JK 549 und JK 559 eine 100-fach ( $10^{\log(1/K_A)} = 0,01$ ) und JK 596 sogar eine 250-fach ( $10^{\log(1/K_A)} = 0,004$ ) signifikant höhere Neigung den  $G_i$ -Signalweg zu aktivieren als der Referenzagonist Iperoxo (vgl. Tab. 4.30 und Abb. 4.32 (F)).

cAMP-Akkumulation ( $G_s$ -Signalwegaktivierung) - [ $^{35}$ S]GTP S-Bindung ( $G_i$ -Signalwegaktivierung)					
Substanz	Referenzagonist ACh		Referenzagonist Iperoxo		n
	$\log( /K_A)$	$10^{\log( /K_A)}$	$\log( /K_A)$	$10^{\log( /K_A)}$	
<b>ACh</b>	<b>0,00 ± 0,27</b>	1,00	-0,09 ± 0,39	0,81	8
<b>Iperoxo</b>	0,05 ± 0,22	1,12	<b>0,00 ± 0,42</b>	1,00	8
<b>JK 384</b>	-0,21 ± 0,42	0,62	0,42 ± 0,57	2,63	7
<b>JK 550</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6
<b>JK 537</b>	-1,89 ± 0,41**	0,01	-1,55 ± 0,58*	0,03	6
<b>JK 549</b>	-2,19 ± 0,46**	0,006	-1,93 ± 0,54*	0,01	8
<b>JK 491</b>	-1,33 ± 0,31**	0,05	-1,17 ± 0,42	0,07	6
<b>JK 596</b>	-2,35 ± 0,63**	0,004	-2,40 ± 0,66**	0,004	8
<b>JK 559</b>	-1,73 ± 0,43**	0,02	-2,02 ± 0,46**	0,01	8

**Tabelle 4. 30:**  $\log( /K_A)$ -Werte ermittelt durch Differenzbildung zwischen den normalisierten Transduktionskoeffizienten  $\log( /K_A)$  der cAMP-Akkumulation ( $G_s$ -Signalweg) und der Förderung der [ $^{35}$ S]GTP S-Bindung ( $G_i$ -Signalweg) von ACh, Iperoxo sowie der sieben Hybridsubstanzen (Substanzserie 1).  $\log( /K_A)$ : Differenz der normalisierte Transduktionskoeffizienten nach Kenakin et al. 2012 ermittelt aus „gepoolten“ Daten aller Versuchstage der cAMP-Akkumulation und der [ $^{35}$ S]GTP S-Bindung. n: Anzahl der Einzelexperimente; die Werte wurden mit Hilfe von Gleichung 39 ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde mit Hilfe von Gleichung 41 errechnet. Die  $\log( /K_A)$ -Werte der als Referenz verwendeten Agonisten wurden jeweils rot hervorgehoben. \*,\*\*:  $\log( /K_A)$ -Wert signifikant unterschiedlich vom  $\log( /K_A)$ -Wert des jeweiligen Referenzagonisten (t-Test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

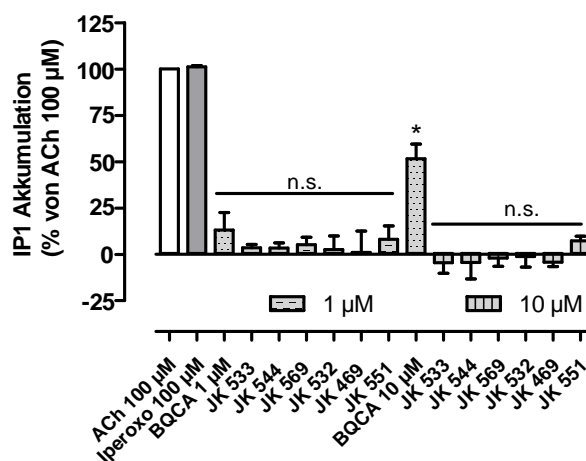


**Abbildung 4. 32:** Graphische Darstellung der  $\log(1/K_A)$ -Werte zur Ermittlung eines etwaigen „Ligand-Bias“ zwischen dem (A,B)  $G_q$ - und  $G_s$ -Signalweg, (C,D)  $G_q$  und  $G_i$ -Signalweg und (E,F)  $G_s$  und  $G_i$ -Signalweg, induziert durch die Iperoxo/BQCAD Hybridliganden an  $hM_1$ -wt-Rezeptoren in CHO-Zellen. (A): Differenz der auf den Referenzagonisten ACh normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$  und  $G_s$ -Signalwegaktivierung, dargestellt für Iperoxo, Pilocarpin und die dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden. (B): Differenz der auf den Referenzagonisten Iperoxo normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$  und  $G_s$ -Signalwegsaktivierung, dargestellt für ACh, Pilocarpin und die dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden. (C): Differenz der auf den Referenzagonisten ACh normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$  und  $G_i$ -Signalwegaktivierung, dargestellt für Iperoxo und die dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden. (D): Differenz der auf den Referenzagonisten Iperoxo normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$  und  $G_i$ -Signalwegsaktivierung, dargestellt für ACh und die dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden. (E): Differenz der auf den Referenzagonisten ACh normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_s$  und  $G_i$ -Signalwegaktivierung, dargestellt für Iperoxo, und die dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden. (F): Differenz der auf den Referenzagonisten Iperoxo normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_s$  und  $G_i$ -Signalwegsaktivierung, dargestellt für ACh und die dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden. Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 39 ermittelt. Die Fehlerfortpflanzung wurde mit Hilfe von Gleichung 41 berechnet. Dargestellt sind die in Tabelle 4.28, 4.29 und 4.30 aufgeführten Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. \* \*\* \*\*\*:  $\log(1/K_A)$ -Wert signifikant unterschiedlich vom  $\log(1/K_A)$ -Wert des jeweiligen Referenzagonisten (t-Test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### 4.1.7 Charakterisierung der allosterischen Fragmente der dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybride hinsichtlich möglicher agonistische Effekte an $hM_1$ -wt-Rezeptoren

Der positive allosterische Modulator BQCA verfügt neben der Fähigkeit einer Steigerung der ACh und CCh-induzierten Signalwegsaktivierung auch über die Fähigkeit ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  den  $hM_1$ -Rezeptor ohne Anwesenheit eines orthosterischen Liganden zu aktivieren (Shirey et al. 2009; Ma et al. 2009; Canals et al. 2012; Mistry et al. 2013; Yeatman et al. 2014). Um sicherzustellen, dass die dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden die Aktivierung des  $hM_1$ -Rezeptors allein durch ihren orthosterischen Baustein auslösen, sollte überprüft werden, ob die allosterischen Fragmente (allosterische Fragmente plus Zwischenkette), so wie BQCA über die Fähigkeit verfügen, den Rezeptor ohne Bindung eines orthosterisch gebundenen Agonisten zu aktivieren. Dazu wurden alle Fragmente (BQCAD) in den Konzentrationen 1 und 10  $\mu\text{M}$  mit Hilfe von IP1-Akkumulationversuchen hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, einen  $G_q$ -vermittelten Effekt auszulösen. Als Kontrolle dienten zum einen die beiden Agonisten Acetylcholin und Iperoxo sowie der allosterische Modulator BQCA. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.33 dargestellt. Die entsprechenden Parameterwerte sind in Tabelle 4.31 zusammengefasst.

Alle untersuchten allosterischen Fragmente zeigten weder bei einer eingesetzten Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ , noch bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  einen von Null signifikant unterschiedlichen Effekt (t-Test,  $p > 0,05$ ). BQCA zeigte bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  ebenfalls kein von Null abweichendes Signal, wohingegen eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  zu einem Maximaleffekt von  $52 \pm 8\%$  führte und damit zu einer Positivkontrolle bezüglich seiner literaturbekannten allosterisch agonistischen  $hM_1$ -Rezeptoreigenwirkung.



**Abbildung 4. 33: Graphische Darstellung der IP1-Akkumulation, induziert durch die allosterischen Fragmente (BQCAD) der dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden.** Abgebildet sind die durch ACh (100  $\mu\text{M}$ ), Iperoxo (100  $\mu\text{M}$ ), BQCA (1, 10  $\mu\text{M}$ ) und den entsprechenden allosterischen Fragmenten (BQCAD) (1, 10  $\mu\text{M}$ ) induzierte IP1-Akkumulation. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. \*: Wert signifikant unterschiedlich von 0% (Einstichproben t-Test,  $p < 0,05$ ), n.s.: nicht signifikant unterschiedlich von 0% (Einstichproben t-Test,  $p > 0,05$ ). Für weitere Informationen, vgl. Text.

Substanz	Substitution	$E_{\max}$ (%) (1 $\mu$ M)	$E_{\max}$ (%) (10 $\mu$ M)	$E_{\max}$ (%) (100 $\mu$ M)	n
ACh		-	-	100 $\pm$ 0	4
Iperoxo		-	-	101 $\pm$ 1	3
BQCA		13 $\pm$ 9	52 $\pm$ 8	-	4-5
JK 533 (C <sub>4</sub> )	F	-5 $\pm$ 6	3 $\pm$ 2	-	3
JK 532 (C <sub>6</sub> )	F	-1 $\pm$ 6	3 $\pm$ 7	-	3
JK 544 (C <sub>4</sub> )	Br	-4 $\pm$ 9	3 $\pm$ 3	-	4
JK 469 (C <sub>6</sub> )	Br	-4 $\pm$ 2	1 $\pm$ 12	-	4
JK 596 (C <sub>4</sub> )	F,Cl	-2 $\pm$ 4	5 $\pm$ 4	-	3
JK 551 (C <sub>6</sub> )	F,Cl	7 $\pm$ 3	8 $\pm$ 7	-	4

**Tabelle 4. 31: Kenngrößen des in Abbildung 4. 33 dargestellten Balkendiagramms.** F/Cl/Br: Fluor-, Chlor-, Brom-Substitution.  $E_{\max}$ : Maximale IP1-Akkumulation in %. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Mit Hilfe der IP1-Akkumulationsexperimente konnte der allosterische Effekt des Modulators BQCA bestätigt werden. Eine agonistische Wirkung der allosterischen Fragmente der Test-Hybride dieser Arbeit, die sich von der Stammverbindung BQCA ableiten, konnte somit nicht detektiert werden.

#### 4.1.8 Charakterisierung eines möglichen PAM-Effektes der allosterischen Bausteine (BQCA<sub>d</sub>) auf die Bindung orthosterischer Agonisten an *hM<sub>1</sub>*-wt-Rezeptoren

Sowohl in DMR-(Holze, Masterarbeit 2013), als auch in IP1-Akkumulationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die allosterischen Bausteine der dualsterischen Hybridliganden keinen agonistischen Effekt aufwiesen, wohingegen der orthosterische Baustein Iperoxo ein vollagonistisches Verhalten hinsichtlich aller untersuchter Signalwege zeigte (vgl. 4.1.4). In einem weiteren Schritt sollte zudem untersucht werden, ob die allosterischen Fragmente, wie ihre Muttersubstanz BQCA, die Bindungsaffinität orthosterischer Liganden positiv beeinflussen können. Da bekannt ist, dass allosterische Modulatoren sich in ihrem Verhalten Ligand-spezifisch unterscheiden können (Wooten et al. 2013), wurde zum einen der allosterische Effekt auf den endogenen Neurotransmitter Acetylcholin, zum anderen ein möglicher allosterischer Effekt auf die Bindung des orthosterischen Bausteines Iperoxo untersucht. Zur Überprüfung der Modulation der allosterischen Fragmente hinsichtlich der Bindung des endogenen Neurotransmitter Acetylcholin, wurden heterologe Konkurrenzexperimente mit dem Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS und steigenden Konzentrationen des endogenen Agonisten Acetylcholin in An- und Abwesenheit einer Konzentration des jeweiligen allosterischen Bausteins durchgeführt, welche die spezifische [<sup>3</sup>H]NMS Gleichgewichtsbindung an *hM<sub>1</sub>*-wt-Rezeptoren um 75% reduzierte. Um auch den Einfluss der dualsterischen Hybridliganden auf die Acetylcholin-Bindung zu untersuchen, wurde diese Art von Experimenten ebenfalls mit einer analog gewählten Konzentration der dualsterischen Hybride ausgeführt. Exemplarisch wurden diese Versuche für das dualsterische Hybridpaar JK 550 und

JK 537, sowie für ihre allosterischen Fragmente JK 533 und JK 532 unternommen. Zur Überprüfung des Einflusses auf die Bindung des orthosterischen Agonisten Iperoxo, stand der Radioligand [<sup>3</sup>H]Iperoxo (Schrage et al. 2014) zu Verfügung. Die Ergebnisse beider Vorgehensweisen sollen im Folgenden einzeln vorgestellt werden.

#### ***4.1.8.1 Allosterische Hybridbausteine induzieren keine Bindungsförderung des endogenen Liganden ACh an hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren***

Die Ergebnisse heterologer [<sup>3</sup>H]NMS Interaktionsexperimente mit steigenden Konzentrationen des endogenen Agonisten Acetylcholin in An- und Abwesenheit der allosterischen Fragmente JK 533 (C<sub>4</sub>) und JK 532 (C<sub>6</sub>) sowie der korrespondierenden dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537 sind in Abbildung 4.34 (A-D) gezeigt; die numerischen Schätzwerte der Parameter sind in Tabelle 4.32 zusammengefasst. Als fixe Konzentration in Abbildung 4.34 (A) und (B) beider allosterischen Fragmente wurde 30 µM gewählt, die eine etwa 75% Hemmung der spezifischen [<sup>3</sup>H]NMS Gleichgewichtsbindung durch die jeweilige Substanz (vgl. Abb. 4.8 (B)) bewirkte.

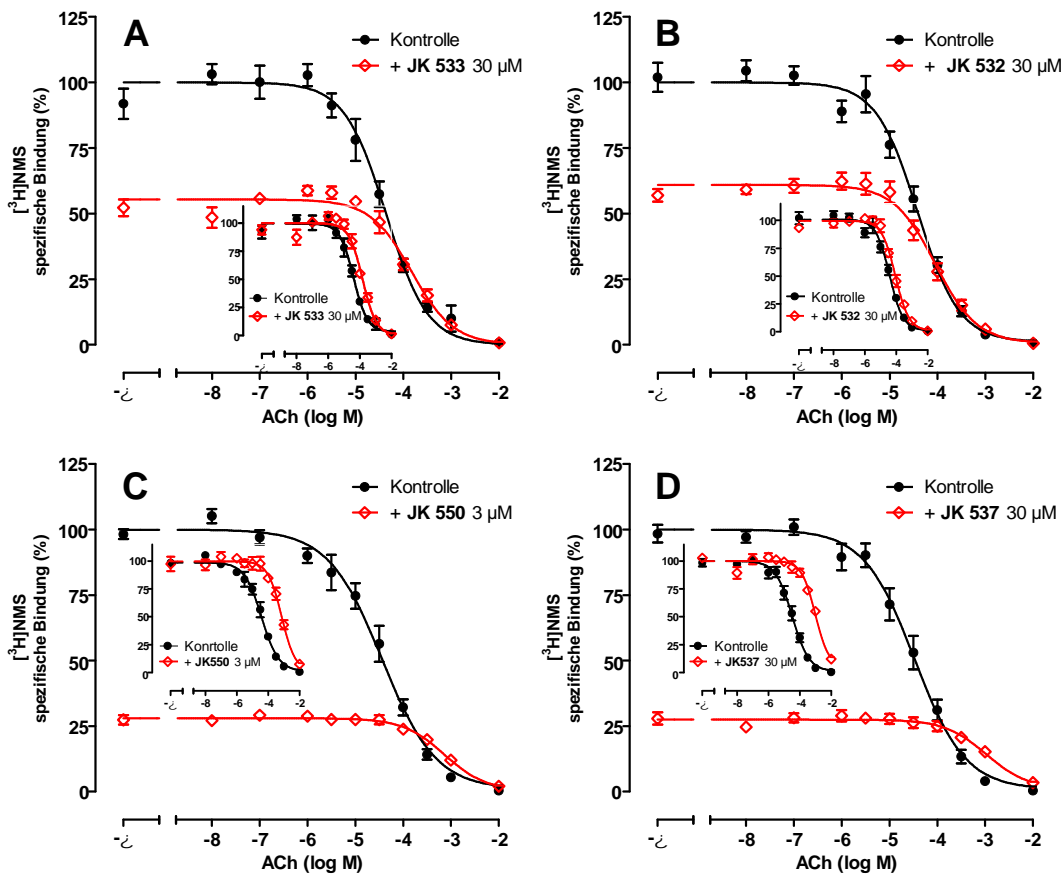
Die fixe Konzentration der allosterischen Fragmente führte zu einer signifikanten Senkung der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindung. Die oberen Kurvenplateaus von JK 533 (C<sub>4</sub>) und JK 532 (C<sub>6</sub>) betragen  $55 \pm 1\%$  bzw.  $61 \pm 1\%$ . Alle Kurven zeigten eine nicht signifikant von  $n_H = -1$  verschiedene Kurvensteilheit (F-Test,  $p > 0,05$ ). Zur besseren Prüfung hinsichtlich einer Verschiebung der Acetylcholin Inhibitionskurve in Anwesenheit der allosterischen Fragmente wurde ihr inhibitorischer Effekt auf die [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Abwesenheit von Acetylcholin auf 100% normiert (vgl. Insets in Abb. 4.34). Das allosterische Fragment JK 533 (C<sub>4</sub>) induzierte eine signifikante Rechtsverschiebung der Kurve ( $\log IC_{50} = -4,04 \pm 0,03$ ) im Vergleich zur Kontrollkurve ( $\log IC_{50} = -4,40 \pm 0,04$ ) (t-Test,  $p < 0,05$ ). Auch JK 532, welches über eine C<sub>6</sub>-Kette verfügt, bewirkte eine signifikante Rechtsverschiebung gegenüber der Kontrollkurve ( $\log IC_{50} = -4,36 \pm 0,05$ ) um den Faktor 0,5 ( $\log IC_{50} = -3,82 \pm 0,04$ ) (t-Test,  $p < 0,05$ ).

Der Einfluss der beiden dualsterischen Hybride JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) auf die Acetylcholin-Bindung ist in Abbildung 4.34 (C) und (D) dargestellt. Für beide Hybride wurden ebenfalls fixe Konzentrationen gewählt, welche die [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindung um etwa 75% reduzierten (vgl. Abb. 4.10 (B)). Folglich wurde für das kürzere Hybrid JK 550 (C<sub>4</sub>) eine Konzentration von 3 µM und für JK 537 (C<sub>6</sub>) eine Konzentration von 30 µM gewählt.

Die fixen Konzentrationen beider Hybride führten erwartungsgemäß zu einer Absenkung des oberen Plateaus der Inhibitionskurven auf unter 30% sowie zu einer signifikanten Rechtsverschiebung der Inhibitionskurve für Acetylcholin unter Kontrollbedingungen. In Anwesenheit des kurzen Hybrid JK 550 kam es zu einer 16-fachen Abnahme der Bindungsneigung von Acetylcholin zum hM<sub>1</sub>-Rezeptor, in Anwesenheit von JK 537 sogar zu einer 34-fachen Abnahme (t-Test,  $p < 0,05$ ). In Abbildung 4.34 (C)

konnten beide Kurven mit einer Steilheit, die nicht verschieden von  $n_H = -1$  war, beschrieben werden (F-Test,  $p > 0,05$ ); in Abbildung 4.34 (D) zeigten die Kontroll- und die Interventionskurve signifikant geringere Kurvensteilheiten, die sich untereinander jedoch nicht unterschieden (vgl. Tab. 4.32; t-Test,  $p > 0,05$ ).

Zusammenfassend belegen die durchgeführten Bindungsexperimente, dass weder die allosterischen Bausteine, noch die dualsterischen Hybride eine Linksverschiebung des inhibitorischen Effektes von Acetylcholin auf die spezifische [ $^3$ H]NMS-Gleichgewichtsbindung eine positiv kooperative Wirkung besaßen. Vielmehr konnte für alle Testsubstanzen eine signifikante Rechtsverschiebung im Sinne einer negativen Kooperativität mit Acetylcholin festgestellt werden.



**Abbildung 4. 34: Effekt einer festgelegten Konzentration der allosterischen Fragmente JK 532 ( $C_4$ ) und JK 533 ( $C_6$ ) sowie der korrespondierenden Hybridliganden JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) auf die Inhibition der [ $^3$ H]NMS-Gleichgewichtsbindung durch ACh zur Ermittlung der Kooperativität der Testsubstanzen mit ACh.** Ordinate: spezifische [ $^3$ H]NMS-Bindung in % der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz und ACh. Abszisse: Dekadischer Logarithmus von ACh. Inset: Effekte der Testsubstanzen JK 533, JK 532, JK 550 und JK 537 in den aufgeführten Konzentrationen nach Normierung ihres Eigeneffektes auf die [ $^3$ H]NMS-Gleichgewichtsbindung auf 100%. Die Radioligandkonzentration betrug 0.2 nM, die Inkubationszeit 3h in HEPES (12,5  $\mu$ M) Puffer (L9) pH 7,4, 30°C; die verwendete Proteinmenge der Membranhomogenate betrug 40 $\mu$ g Protein pro Vertiefung. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10  $\mu$ M Atropin bestimmt. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.



Substanz	log IC <sub>50</sub>	log IC <sub>50</sub>	n <sub>H</sub>
<b>ACh</b>	-4,33 ± 0,03	-	-1,00
JK 550 (C <sub>4</sub> )	-3,13 ± 0,05*	1,2	-1,00
<b>ACh</b>	-4,40 ± 0,04	-	-1,00
JK 533 (C <sub>4</sub> )	-4,04 ± 0,03*	0,36	-1,00
<b>ACh</b>	-4,45 ± 0,04	-	-0,83 <sup>#</sup>
JK 537 (C <sub>6</sub> )	-2,92 ± 0,05*	1,53	-0,83 <sup>#</sup>
<b>ACh</b>	-4,36 ± 0,05	-	-1,00
JK 532 (C <sub>6</sub> )	-3,82 ± 0,04*	0,54	-1,00

**Tabelle 4. 32: Zusammenfassung der pharmakologischen Parameter aus den Insets von Abbildung 4.34, die den Effekt der untersuchten Substanzen auf die Acetylcholin-Bindung an Membranen aus CHO-hM<sub>1</sub>-wt-Zellen wiedergeben.** logIC<sub>50</sub>: Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt auf die [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindung ausübt. logIC<sub>50</sub>: Differenz zwischen dem logIC<sub>50</sub> von ACh in An- und Abwesenheit der entsprechenden Testsubstanz; positive Werte zeigen negative Kooperativität der Testsubstanzen mit ACh an. n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. \*: Wert ist signifikant unterschiedlich von dem jeweiligen Kontrollwert für ACh (t-Test, \*p<0,05). #: Wert signifikant verschieden von einer Kurvensteilheit n<sub>H</sub> = -1 (F-Test, p<0,05).

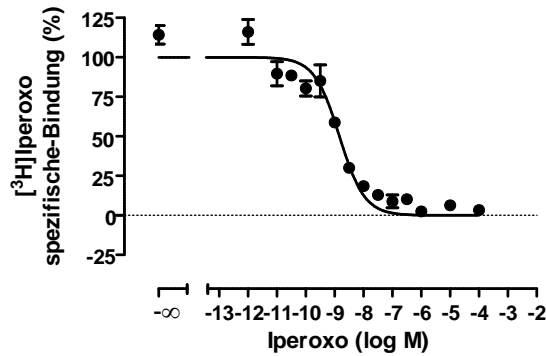
#### 4.1.8.2 Inhibitionsexperimente mit dem Radioagonisten [<sup>3</sup>H]Iperoxo an hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren

Mit Hilfe des Radioagonisten [<sup>3</sup>H]Iperoxo ergab sich die Möglichkeit, den Einfluss unterschiedlicher Testsubstanzen auf die Bindung des Agonisten Iperoxo in heterologen Inhibitionsexperimenten zu untersuchen. Die Ergebnisse sollen nachfolgend vorgestellt werden. Alle durchgeführten [<sup>3</sup>H]Iperoxo Bindungsexperimente wurden an Membranpräparationen aus CHO-hM<sub>1</sub>-wt-Zellen durchgeführt. Die eingesetzte Proteinmenge betrug 40µg/Vertiefung. Die Durchführung der Experimente folgte wie unter 3.2.4.2 beschrieben.

##### 4.1.8.2.1 Charakterisierung der Bindungseigenschaften von [<sup>3</sup>H]Iperoxo in Membranhomogenaten aus stabil transfizierten CHO-hM<sub>1</sub>-wt-Zellen

Zur Anwendung des von Ehlert beschriebenen ternären Modells allosterischer Interaktionen (Ehlert 1988), das es erlaubt, die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K<sub>A</sub>) des allosterischen Fragmentes sowie, über den Kooperativitätsfaktor  $\alpha$ , dessen allosterische Interaktion mit [<sup>3</sup>H]Iperoxo zu quantifizieren, war es zuvor notwendig, die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K<sub>D</sub> von [<sup>3</sup>H]Iperoxo mit Hilfe homologer Kompetitionen zu ermitteln. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.35 dargestellt. Durch Anwendung einer nichtlinearen Regressionsanalyse konnte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) ein sigmoidaler Kurvenverlauf ermittelt werden. Das obere Plateau der Kurve wurde durch die Gesamtbindung des Radioliganden B<sub>0</sub> in Abwesenheit des unmarkierten Kompetitors Iperoxo beschrieben. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10 µM Carbachol bestimmt und definiert das untere Plateau der Kurve. Die spezifische Bindung errechnete sich aus der Differenz von Gesamt- und unspezifischer Bindung. Der Wendepunkt der Inhibitionskurve lieferte den IC<sub>50</sub> Wert. In Kenntnis der Werte für B<sub>0</sub> und IC<sub>50</sub> wurde nach DeBlasi,

1989 die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  und die Gesamtzahl der Bindungsstellen  $B_{\max}$  errechnet (mit Gl. 8 und 11, vgl. auch 3.2.4.1). Tabelle 4.33 führt die Mittelwerte der charakteristischen Kenngrößen der ermittelten Parameter  $K_D$  und  $B_{\max}$  auf. Der  $\log K_D$  Wert betrug  $-8,89 \pm 0,11$  und korrespondierte hinlänglich mit zuvor von Schrage et al. 2014 veröffentlichten Befunden, der  $B_{\max}$ -Wert wurde mit  $1,67 \pm 0,10$  pmol pro Milliliter ermittelt.



**Abbildung 4.35: Homologe Konkurrenz zwischen  $[^3\text{H}]$ Iperoxo und Iperoxo an Membransuspensionen aus CHO- $hM_1$ -wt-Zellen.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden  $[^3\text{H}]$ Iperoxo in Prozent des Wertes in Abwesenheit von nicht markiertem Iperoxo. 0% entspricht der unspezifischen  $[^3\text{H}]$ Iperoxo-Bindung (in Anwesenheit von  $10 \mu\text{M}$  Carbachol), 100% entspricht der  $[^3\text{H}]$ Iperoxo Bindung in Abwesenheit von Iperoxo. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des eingesetzten unmarkierten Kompetitors Iperoxo. Die Radioligandkonzentration betrug  $0,2 \text{ nM}$ , die Inkubationszeit 3h in HEPES Puffer (L9), pH 7,4, bei  $30^\circ\text{C}$ . Die verwendete Proteinmenge der Membransuspensionen betrug  $30\text{-}40 \mu\text{g}$  Protein pro Vertiefung. Die nichtlineare Kurvenanpassung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Rezeptor	$\log K_D$	$B_{\max}$ (pmol/ml)	$n_H$	n
$hM_1$ -wt	$-8,89 \pm 0,11$	$1,67 \pm 0,10$	-1,00	3

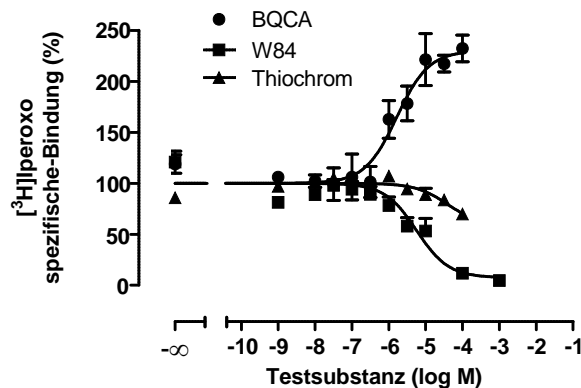
**Tabelle 4.33: Kenngrößen der in Abbildung 4.35 dargestellten homologen Konkurrenz mit dem Radioagonisten  $[^3\text{H}]$ Iperoxo an Membransuspensionen aus CHO- $hM_1$ -wt-Zellen.**  $\log K_D$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante von  $[^3\text{H}]$ Iperoxo.  $B_{\max}$ : Anzahl der spezifischen Bindungsstellen für Iperoxo.  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12).

#### 4.1.8.2.2 Der allosterische Modulator BQCA führt zu einer Affinitätssteigerung des Radioagonisten $[^3\text{H}]$ Iperoxo am $hM_1$ -wt-Rezeptor

Als Kontrolle und zur validierenden Charakterisierung der  $[^3\text{H}]$ Iperoxo Bindung wurden vor der Untersuchung der allosterischen Fragmente hinsichtlich etwaiger positiver Kooperativität mit dem Radioliganden, die drei bekannten allosterischen Modulatoren W84, Thiochrom und BQCA in heterologen Gleichgewichtsbindungsexperimenten untersucht. Bei W84 handelt es sich um einen subtypselektiven allosterischen Modulator mit einer Prävalenz für den muskarinischen  $M_2$ -Rezeptor (Tränkle et al. 1998). Der allosterische Modulator Thiochrom ist ein Oxidationsprodukt und Metabolit

von Thiamin. Es ist bekannt, dass Thiochrom die Affinität des endogenen Agonisten Acetylcholin an muskarinischen  $M_4$ -Rezeptor steigert, wohingegen es an  $M_1$ ,  $M_3$  und  $M_5$ -Rezeptoren keinen Effekt auf die Affinität zeigt (Lazareno et al. 2004). Somit nahmen wir an, dass es auch gegenüber dem Vollagonisten Iperoxo am muskarinischen  $M_1$ -Rezeptor keine Bindungsförderung entfalten würde. Als dritter Modulator wurde der bereits vorgestellte positiv allosterische Modulator BQCA gewählt. Da von BQCA bekannt ist, dass es sowohl die Bindung des endogenen Agonisten Acetylcholin als auch des Agonisten Carbachol erhöht (Shirey et al. 2009; Ma et al. 2009; Canals et al. 2012; Mistry et al. 2013; Yeatman et al. 2014), sollte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig untersucht werden, ob sich dieser Effekt auch auf Iperoxo übertragen lässt.

Abbildung 4.36 zeigt den Effekt der drei vorgestellten allosterischen Modulatoren auf die [ $^3$ H]Iperoxo Gleichgewichtsbindung. Die Ergebnisse können Tabelle 4.34 entnommen werden. Alle drei Bindungskurven konnten mit einer Kurvensteilheit von  $n_H = -1$  beschrieben werden (F-Test,  $p > 0,05$ ). Die Interaktionsexperimente des Modulators W84 zeigten eine ausgeprägte Inhibition der Radioligandbindung mit einem unteren Plateau der Konzentrations-Bindungs-Kurve, das sich nicht signifikant von Null unterschied (F-Test,  $p > 0,05$ ). Unter Anwendung des ternären Modells allosterischer Interaktion wurde eine stark ausgeprägte negative Kooperativität  $\log \sigma = -1,18 \pm 0,40$  mit dem Radioliganden [ $^3$ H]Iperoxo ermittelt. Der Modulator Thiochrom zeigte eine unvollständige Inhibition der Radioligandbindung, die sich in einem Kooperativitätsfaktor  $\log \sigma = -0,25 \pm 0,10$  äußerte.



**Abbildung 4. 36: Effekt verschiedener allosterischer Modulatoren auf die [ $^3$ H]Iperoxo-Gleichgewichtsbindung an Membranhomogenaten aus CHO- $hM_1$ -wt-Zellen.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [ $^3$ H]Iperoxo in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen [ $^3$ H]Iperoxo Bindung (in Anwesenheit von 10  $\mu$ M Carbachol), 100% entspricht der [ $^3$ H]Iperoxo Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des jeweils eingesetzten allosterischen Modulators (BQCA, W84, Thiochrom. Die Radioligandkonzentration betrug 0,2 nM, die Proteinmenge 40  $\mu$ g pro Vertiefung in HEPES (12,5 nM)-Puffer (L9), pH 7,4, 30  $^{\circ}$ C. Kurvenanpassung: Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient  $n_H$  in Tabelle 4.34 wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Auf Grund eines Steilheitsmaßes von  $n_H = -1$ , erfolgte die weitere Analyse der allosterischen Fragmente mit Hilfe von Gleichung 15. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Der  $M_1$ -hochselektive allosterische Modulator BQCA zeigte als einziger Modulator eine Förderung der [ $^3$ H]Iperoxo-Bindung, die sich in einem positiven Kooperativitätsfaktor  $\log \sigma = 0,46 \pm 0,03$

wiederfinden ließ. Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass BQCA nicht nur die Bindung des endogenen Agonisten Acetylcholin und es Agonisten Carbachol (Shirey et al. 2009; Ma et al. 2009; Canals et al. 2012; Mistry et al. 2013; Yeatman et al. 2014) fördert, sondern auch die Bindung des muskarinischen Agonisten Iperoxo.

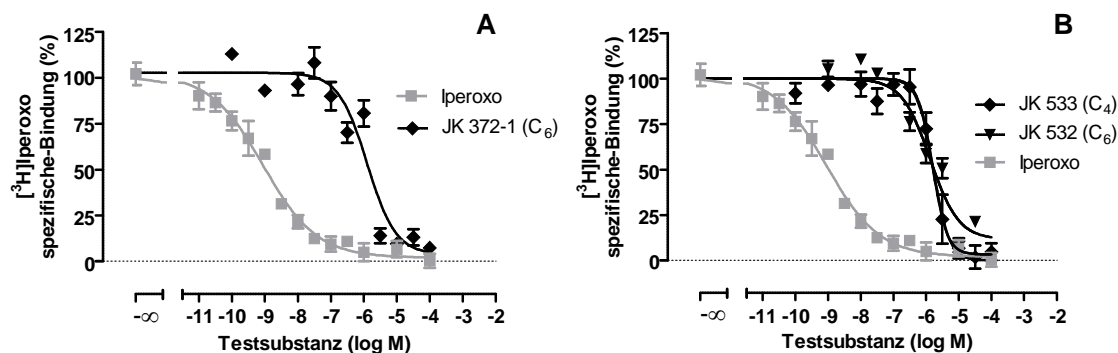
Substanz	Logistische Gleichung (Gl.12)			Ehler Modell (Gl.15)		
	$E_{\min} (\%)$	$E_{\max} (\%)$	$n_H$	$\log K_A$	$\log \rho$	$n$
<b>W84</b>	= 0	= 100	-1,00	$-5,30 \pm 0,14$	$-1,18 \pm 0,40$	3
<b>Thiochrom</b>	= 0	= 100	-1,00	$-4,43 \pm 0,33$	$-0,25 \pm 0,10$	3
<b>BQCA</b>	= 100	$230 \pm 12$	-1,00	$-5,68 \pm 0,17$	$0,46 \pm 0,03$	3

**Tabelle 4. 34: Kenngrößen der in Abbildung 4.36 dargestellten Bindungskurven.**  $E_{\min} \%$ : unteres Plateau der Kurve.  $E_{\max} \%$ : oberes Plateau der Kurve.  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit.  $\log K_A$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung der Testsubstanz.  $\log \rho$ : Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\rho$ , mit  $\log \rho < 0$ ,  $\log \rho = 0$ ,  $\log \rho > 0$  für negative, neutrale und positive Kooperativität.  $n$ : Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus  $n$  unabhängigen Experimenten, die in Form einer Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Die erweiterte Analyse der Daten der Modulatoren erfolgte mit Hilfe des ternären Modells allosterischer Modulation unter Anwendung von Gleichung 15.

*4.1.8.2.3 Die allosterischen Fragmente der Iperoxo/BQCA-Hybride (Substanzserie 1) zeigen keine positive Beeinflussung der [<sup>3</sup>H]Iperoxo-Bindung an hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren*

Nachdem in Gleichgewichtsbindungsexperimenten mit dem Radioagonisten [<sup>3</sup>H]Iperoxo für BQCA eine Förderung der Gleichgewichtsbindung des Radioagonisten detektiert werden konnte, sollten die allosterischen Fragmente (BQCA) hinsichtlich dieser Eigenschaft untersucht werden.

Die [<sup>3</sup>H]Iperoxo Gleichgewichtsbindung in Gegenwart von allosterischen Fragmenten, die über einen Fluorsubstituenten in unterschiedlicher Position des Benzolrings verfügen, sind in Abbildung 4.37 (A) und (B) dargestellt. Die zugehörigen Parameterwerte können Tabelle 4.35 entnommen werden. Die Inhibitionskurven der allosterischen Fragmente JK 372-1, JK 533 und JK 532 konnten unter Anwendung von Gleichung 12 mit einer Kurvensteilheit von  $n_H = -1$  beschrieben werden (F-Test,  $p > 0,05$ ), weshalb nachfolgend die Parameter  $\log K_A$  und  $\log \rho$  mit der Analyse nach Ehler (Gleichung 15 (vgl. 3.2.4.2)) ermittelt werden konnten. Die negative Kooperativität aller drei allosterischen Fragmente mit [<sup>3</sup>H]Iperoxo äußerte sich durch negative  $\log \rho$ -Werte (vgl. Tab. 4.35). Die Fragmente JK 372-1 (C<sub>6</sub>) und JK 532 (C<sub>6</sub>) wiesen eine im Vergleich zu JK 533 (C<sub>4</sub>) signifikant stärkere negative Kooperativität auf (t-Test,  $p < 0,05$ ). Verglichen mit BQCA zeigte keines der allosterischen Fragmente einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_A$  (t-Test,  $p > 0,05$ ).



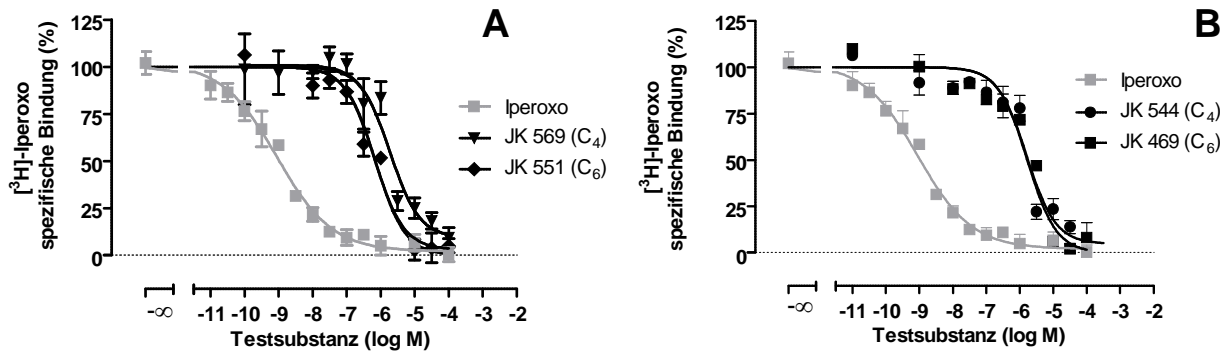
**Abbildung 4. 37: Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der allosterischen Fragmente JK 372-1, JK 533 und JK 532 mit dem orthosterischen Radioagonisten  $[^3\text{H}]$ Iperoxo.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden  $[^3\text{H}]$ Iperoxo in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen  $[^3\text{H}]$ Iperoxo Bindung (in Anwesenheit von  $10\ \mu\text{M}$  Carbachol), 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug  $0,2\ \text{nM}$ , die Proteinmenge  $40\ \mu\text{g}$  pro Vertiefung in HEPES ( $12,5\ \text{mM}$ ) Puffer (L9), pH 7,4,  $30\ ^\circ\text{C}$ . Kurvenanpassung: Der Hill-Koeffizient  $n_{\text{H}}$  in Tabelle 4.35 wurde mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Die weitere Analyse der Bindungsdaten in Gegenwart der allosterischen Fragmente erfolgte mit Hilfe von Gleichung 15. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier bis sieben unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	$\log K_{\text{A}}$	$\log \rho$	$n_{\text{H}}$	n
<b>JK 372-1</b> ( $\text{C}_6$ )	$-5,86 \pm 0,11$	$-1,45 \pm 0,05$	-1,00	4
<b>JK 533</b> ( $\text{C}_4$ )	$-5,80 \pm 0,07$	$-1,48 \pm 0,05$	-1,00	7
<b>JK 532</b> ( $\text{C}_6$ )	$-5,88 \pm 0,10$	$-0,93 \pm 0,05^{***}$	-1,00	4

**Tabelle 4. 35: Kenngrößen der in Abbildung 4.37 dargestellten Gleichgewichtsbindungskurven für die allosterischen Fragmente JK 372-1, JK 533 und JK 532.**  $\log K_{\text{A}}$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Bindung des allosterischen Fragmentes.  $\log \rho$ : Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\rho$ , mit  $\log \rho < 0$ ,  $\log \rho = 0$ ,  $\log \rho > 0$  für negative, neutrale und positive Kooperativität.  $n_{\text{H}}$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Der Hill-Koeffizient wurde mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Die weitere Analyse der Bindungsdaten für die allosterischen Fragmente erfolgte mit Hilfe von Gleichung 15. \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kürzeren allosterischen Fragmentes (t-Test, \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Die [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo Gleichgewichtsbindung in Gegenwart von JK 569 und JK 551 ist in Abbildung 4.38 dargestellt. Wie in Gegenwart der drei zuvor beschriebenen Fragmente zeigten beide eine negative Kooperativität mit Radioagonisten [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo. Das längere allosterische Fragment JK 551 ( $\text{C}_6$ ) wies, wie zuvor schon für die längeren allosterischen Fragmente (JK 372-1 und JK 532) gefunden, mit  $\log \sigma = -1,53 \pm 0,04$  eine signifikant stärkere negative Kooperativität mit dem Radioliganden auf als das kürzere Fragment JK 569 ( $\log \sigma = -1,04 \pm 0,06$ ). Ebenso zeigte das längere Fragment JK 551 ( $\text{C}_6$ ) eine dreifach stärkere Bindungsneigung zum Rezeptor, ausgedrückt als  $\log K_A$ , als JK 569 ( $\text{C}_4$ ) (t-Test,  $p < 0,05$ ). Verglichen mit BQCA (vgl. Tab. 4.34), zeigte JK 569 keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich  $\log K_A$ . Das längere Hybrid JK 551 dagegen wies mit  $\log K_A = -6,16 \pm 0,08$  eine vierfach stärkere Bindungsneigung auf als seine Muttersubstanz BQCA (t-Test,  $p < 0,05$ ).

Wie in Abbildung 4.38 zu erkennen ist, zeigte auch das letzte Paar allosterischer Fragmente negative Kooperativität mit dem Radioagonisten [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo. Wurden die in Tabelle 4.36 aufgeführten Parameter miteinander verglichen, bestätigte sich auch hier das zuvor beobachtete Muster. Auch bei diesem Paar zeigte das längere allosterische Fragment (JK 469) mit  $\log \sigma = -1,86 \pm 0,06$  eine signifikant stärkere negative Kooperativität als das kurze Fragment (JK 544) mit  $\log \sigma = -1,33 \pm 0,05$  (t-Test,  $p < 0,05$ ). Ein Unterschied hinsichtlich der Bindungskonstante  $K_A$  zeigte sich weder zwischen beiden Fragmenten, noch im Vergleich zur Bindungskonstante  $K_A$  von BQCA (vgl. Tab. 4.34, t-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4. 38: Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der allosterischen Fragmente JK 596, JK 559, JK 544 und JK 469 mit dem orthosterischen Radioagonisten [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo Bindung (in Anwesenheit von  $10 \mu\text{M}$  Carbachol), 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug  $0,2 \text{ nM}$ , die Proteinmenge  $40 \mu\text{g}$  pro Vertiefung in HEPES ( $12,5 \text{ mM}$ ) Puffer (L9), pH  $7,4$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Der Hill-Koeffizient  $n_H$  in Tabelle 4.36 wurde mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Die weitere Analyse der Bindungsdaten der allosterischen Fragmente erfolgte mit Hilfe von Gleichung 15. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	log $K_A$	log $\rho$	$n_H$	n
JK 569 (C <sub>4</sub> )	-5,72 ± 0,14	-1,04 ± 0,06	-1,00	4
JK 551 (C <sub>6</sub> )	-6,19 ± 0,08*	-1,53 ± 0,04***	-1,00	3
JK 544 (C <sub>4</sub> )	-5,80 ± 0,10	-1,33 ± 0,05	-1,00	5
JK 469 (C <sub>6</sub> )	-5,67 ± 0,11	-1,86 ± 0,06***	-1,00	3

**Tabelle 4. 36: Kenngrößen der in Abbildung 4.38 dargestellten Gleichgewichtsbindungskurven für die allosterischen Fragmente JK 569, JK 551, JK 544 und JK 469.** log $K_A$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Bindung des allosterischen Fragmentes. log  $\rho$ : Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\rho$ , mit log  $\rho < 0$ , log  $\rho = 0$ , log  $\rho > 0$  für negative, neutrale und positive Kooperativität.  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. Der Hill-Koeffizient wurde mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Die weitere Analyse der Bindungsdaten für die allosterischen Fragmente erfolgte mit Hilfe von Gleichung 15. \*,\*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kürzeren allosterischen Fragmentes (t-Test, \*p<0,05, \*\*\*p<0,001).

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass alle allosterischen Fragmente, im Gegensatz zu BQCA, eine negative Kooperativität mit dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]Iperoxo aufwiesen. Interessanterweise zeigte sich, dass diejenigen allosterischen Fragmente, die über eine C<sub>6</sub>-Kohlenstoffkette verfügten, eine stärkere negative Kooperativität aufwiesen, als die Fragmente, die eine C<sub>4</sub>-Kohlenstoffzwischenkette besaßen. Hinsichtlich der Bindungskonstanten  $K_A$  zeigte sich, bis auf JK 551, welches eine signifikant höhere Bindungsneigung aufwies, weder ein signifikanter Unterschied unter den Fragmenten, noch im Vergleich zu BQCA.

Die Ergebnisse der IP1-Akkumulationsversuche, in denen keine agonistischen Effekte der allosterischen Fragmente detektiert werden konnten und dieser heterologen Gleichgewichtsbindungsexperimenten mit dem Radioagonisten [<sup>3</sup>H]Iperoxo, die keinen PAM Effekt anzeigten, bildeten die Voraussetzung zur nachfolgenden Anwendung des „Operational Model of Agonism for dualsteric Ligands“ (Bock et al. 2014a). Diese Analyse erlaubte es, die Rolle von  $R_{pose}$  und den damit verbundenen dynamischen Wechsel eines Liganden zwischen der aktiven und der inaktiven Bindungsorientierung am Rezeptor, in die Analyse einzubeziehen (Bock et al. 2014a). Diese Ergebnisse sollen im nächsten Kapitel vorgestellt werden.

#### 4.1.9 Globale Analyse der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungs- sowie der Funktionsdaten dualsterischer Iperoxo/BQCA-Hybridliganden zur Identifizierung ihres Orientungsverhältnisses $R_{pose}$ , der maximalen fraktionellen Rezeptorbesetzung in der aktiven und inaktiven Rezeptorbindungsorientierung sowie der systemunabhängigen maximalen Wirksamkeit $max$ für unterschiedliche Rezeptorsignalwege

Als dritte Methode zur Untersuchung der Rezeptorinteraktion dualsterischer Hybridliganden (vgl. 3.2.4.2), entwickelten wir eine globale, nichtlineare Analyse (Chen, Klöckner und Holze et al. 2015) zur Anwendung des von Bock et al. 2014 entwickelten „Operational Model of dualsteric binding“. Das Besondere an dieser Methode ist die simultane Analyse von Bindungsdaten des dualsterischen

Hybrides, des korrespondierenden allosterischen Fragmentes sowie von Daten aus funktionellen Experimenten des dualsterischen Hybrides und eines Referenzagonisten. Diese Kombination aus Bindungs- und Funktionsdaten ermöglicht es, mit einer einzigen Analyse genaue Schätzwerte für die Bindungskonstanten  $K_A$  und  $K_B$  zu erhalten, ohne die Bindungskonstante für  $K_B$  kennen und als Konstante behandeln zu müssen, wie dies zuvor der Fall war (Bock et al. 2014a). Bock und Kollegen (2014) ermöglichten es durch eine Modifizierung des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983), die Rolle von  $R_{pose}$  und dem damit verbundenen dynamischen Wechsel eines Liganden zwischen der aktiven (dualsterischen) und der inaktiven (allosterischen) Rezeptorbindungsorientierung in die Analyse einzubeziehen. Dies ermöglichte es, neben der Information über die mutmaßliche Bindungsorientierung der dualsterischen Hybridliganden am Rezeptorprotein, auch einen Schätzwert für  $\tau_{dyn}$  zu erhalten. Bei diesem Parameter handelt es sich um den dynamischen Transduktionskoeffizienten eines Liganden, der sich aus dem Produkt von  $\tau_{max}$  und der Fraktion der Ligand-Rezeptor Komplexe in der aktiven Bindungspose ergibt. Bei  $\tau_{max}$  handelt es sich wiederum um den maximalen Transduktionskoeffizienten, der sich aus der 100%igen Besetzung des Rezeptors durch den Hybridliganden in der aktiven dualsterischen Pose ergibt (Bock et al. 2014a). Die Bestimmung dieser Parameter erforderte bisher eine sequentielle Analyse in vier aufeinander folgenden Schritten. Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die nichtlineare Analyse zu globalisieren und so zu verändern, dass es möglich war, neben Schätzwerten für die Parameter  $K_A$ ,  $K_B$  und  $R_{pose}$  auch den Parameter für den dynamischen Transduktionskoeffizienten ( $\tau_{dyn}$ ) simultan während eines einzigen Analyseschrittes zu erhalten. Auf Grund der Tatsache, dass die Signalinduktion dualsterischer Liganden nicht nur von der Bindungswahrscheinlichkeit in der dualsterischen und damit aktiven Rezeptorkonformation abhängig ist, sondern auch von der intrinsischen Aktivität, die durch den Liganden in der dualsterischen Bindungsorientierung generiert wird, sollte der Mechanismus des durch die dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybride induzierten Partialagonismus noch weiter differenzierter werden. Dazu wurde der Parameter  $\tau_{dyn}$  aufgelöst in die system-unabhängige maximale intrinsische Aktivität des dynamischen Liganden bei 100%iger Besetzung in der dualsterischen Pose ( $\tau_{max}$ ) und die system-abhängigen Komponente  $R_t/K_E$  (vgl. 3.2.4.2), welche die Rezeptorreserve darstellt. Da die im Rahmen dieser Analyse verwendeten Zellen sowie Versuchsbedingungen gleich blieben, entschieden wir uns, zur Berechnung der systemunabhängigen maximalen intrinsischen Aktivität  $\tau_{max}$ , den Quotienten  $R_t/K_E$  auf einen gemeinsamen Wert festzusetzen (vgl. 3.2.4.2). Somit wurde für die Analyse und Berechnung des Parameters  $\tau_{max}$  der Quotient  $R_t/K_E$  als eine einzelne Variable betrachtet und auf einen Wert  $R_t/K_E = 1$  festgesetzt. Durch dieses Vorgehen konnte erstmalig der Parameter  $\tau_{max}^*$  berechnet werden, ein Parameter, der in der Abwesenheit einer Rezeptorreserve (d.h.  $R_t/K_E = 1$ ) dem Parameter  $\tau_{max}$  entspricht. Dieser erstmals numerisch bestimmte Parameter erlaubte es, die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden hinsichtlich ihrer systemunabhängigen, maximalen intrinsischen Aktivität des dualsterischen Hybrides bei 100%iger



Rezeptorbesetzung in der dualsterischen Bindungsorientierung zu vergleichen (Chen, Klöckner und Holze et al. 2015).

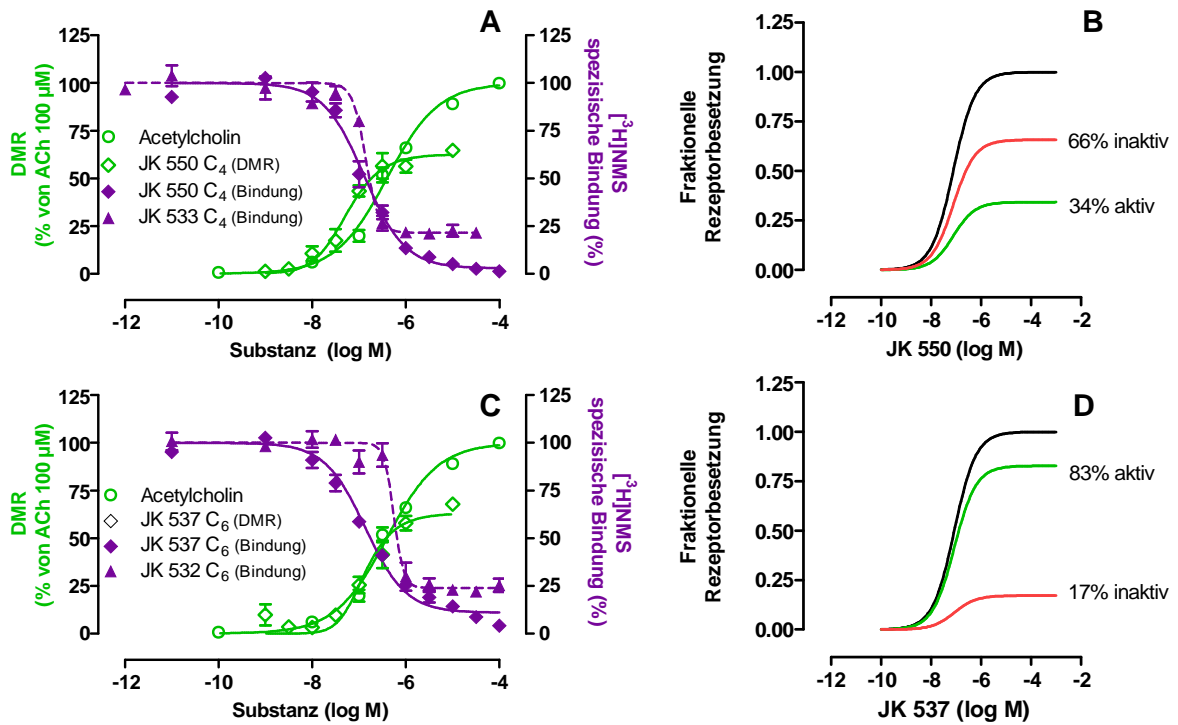
Als funktionelle Komponenten dieser Analyse dienten entweder die Daten der IP1-Akkumulation (vgl. 4.1.4.1) zur Ermittlung der  $G_q$ -Signalwegaktivierung, Daten der cAMP-Akkumulation (vgl. 4.1.4.2) für die  $G_s$ -Signalwegaktivierung oder Daten aus [ $^{35}$ S]GTP S-Bindungsexperimenten, die eine  $G_i$ -Signalwegaktivierung abbildeten (vgl. 4.1.4.3). Zusätzlich wurden funktionelle Daten, die mit Hilfe der dynamischen Massenumverteilung in einer vorangegangenen Arbeit (Holze, Masterarbeit 2013) erhoben worden waren, mit Hilfe der neuen globalen Analyse untersucht. In den nachfolgenden vier Abbildungen sind die Ergebnisse der globalen Analyse für JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) unter Verwendung der vier unterschiedlichen funktionellen Datensätze für die jeweiligen Signalwege dargestellt. Die Kurvensets bestehen neben den zwei Gleichgewichtsbindungskurven für das Hybrid und das Fragment zudem aus zwei Kurven, welche die Funktionen von Acetylcholin und dem Hybrid repräsentieren. Ebenfalls dargestellt, sind die aus den Bindungskontanten  $K_A$  und  $K_B$  ermittelten Kurven, für die fraktionelle Rezeptorbesetzung (Gleichungen 26 und 27, vgl. 3.2.4.2). Die ermittelten Parameterschätzwerte für beide Hybride wurden in den anschließenden Tabellen aufgeführt. Zum graphischen Vergleich der Parameter  $\text{dyn}$ ,  $\text{max}^*$  und  $R_{\text{pose}}$ , diente jeweils ein zusätzliches Balkendiagramm. Die entsprechenden Kurvensets der Hybridpaare JK 596/JK 559 und JK 549/JK 491 finden sich im Anhang dieser Arbeit (vgl. Anhang, Kapitel 9.7; Abb. 9.10 – 9.17). Die mit Hilfe der globalen Analyse ermittelten Parameterschätzwerte werden jedoch nachfolgend an das Hybridpaar JK 550/JK 537 in den Tabellen 4.39-4.42 dargestellt und beschrieben.

***4.1.9.1 Neue Globale Analyse der [ $^3$ H]NMS Gleichgewichtsbindungs- sowie der Funktionsdaten unterschiedlicher Signalwege von JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) belegen einen durch Verlängerung der Zwischenkette induzierten Wechsel der Rezeptorbindungsorientierung mit einer Bevorzugung der aktiven Bindungspose***

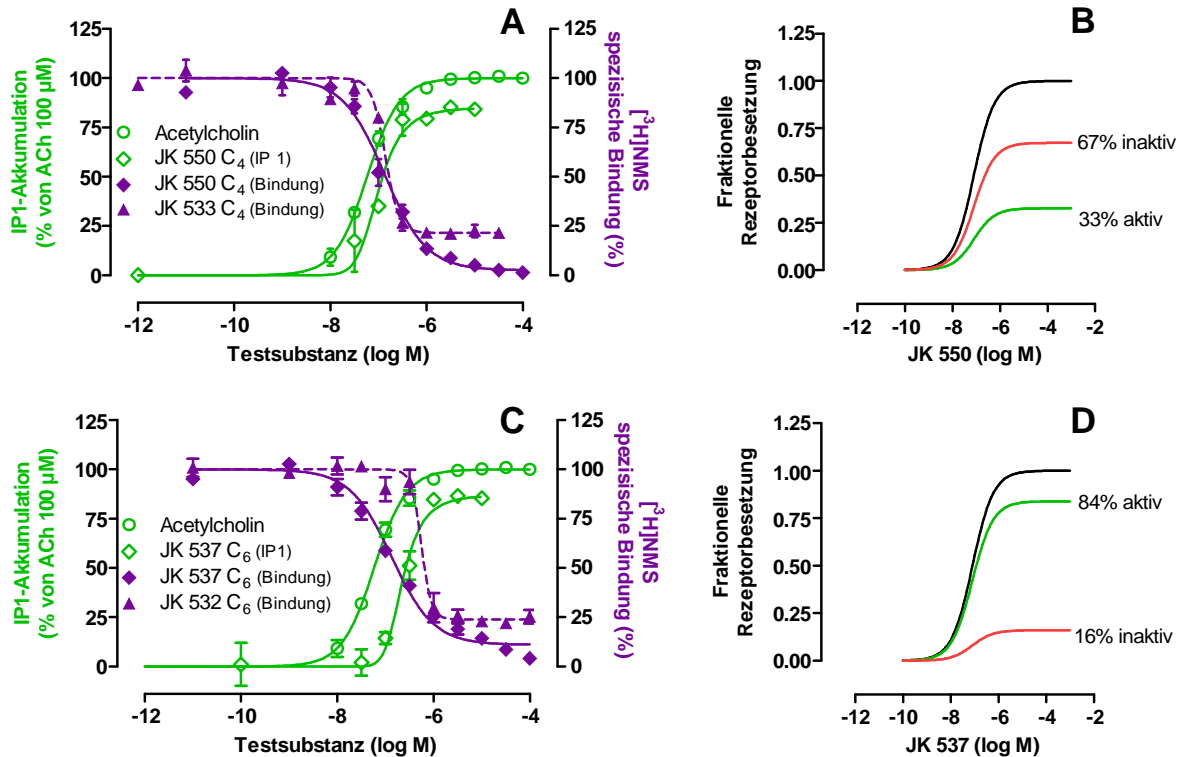
Als erstes Paar dualsterischer Hybridliganden wurden JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ), gekennzeichnet durch eine Fluorsubstitution im allosterischen Fragment, mit der neuen Analysemethode verglichen. Wie bereits mit Hilfe der zuvor beschriebenen Analysen (Analyse a und b) gezeigt werden konnte, wies das längere dualsterische Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) eine im Vergleich zu seinem kürzeren Pendant JK 550 ( $C_4$ ) mit 84 % eine signifikant höhere dualsterische Bindungsneigung auf (4.1.3.2, Tab. 4.10). Die Verwendung der globalen Analyse der [ $^3$ H]NMS Gleichgewichtsbindungsdaten unter Hinzunahme von Funktionsdaten sollte zeigen, ob sich diese Befunde bestätigen und tiefere Einblicke in funktionelle Analyseparameter des Modells bringen (vgl. 4.1.9).

In den Abbildungen 4.39 – 4.42 sind die Ergebnisse der globalen Analyse des dualsterischen Hybrides JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) unter Verwendung funktioneller Daten für die DMR (Holze, Masterarbeit 2013), die IP1-Akkumulation (4.1.4.1.2), die cAMP-Akkumulation (4.1.4.2.2) und die Förderung der

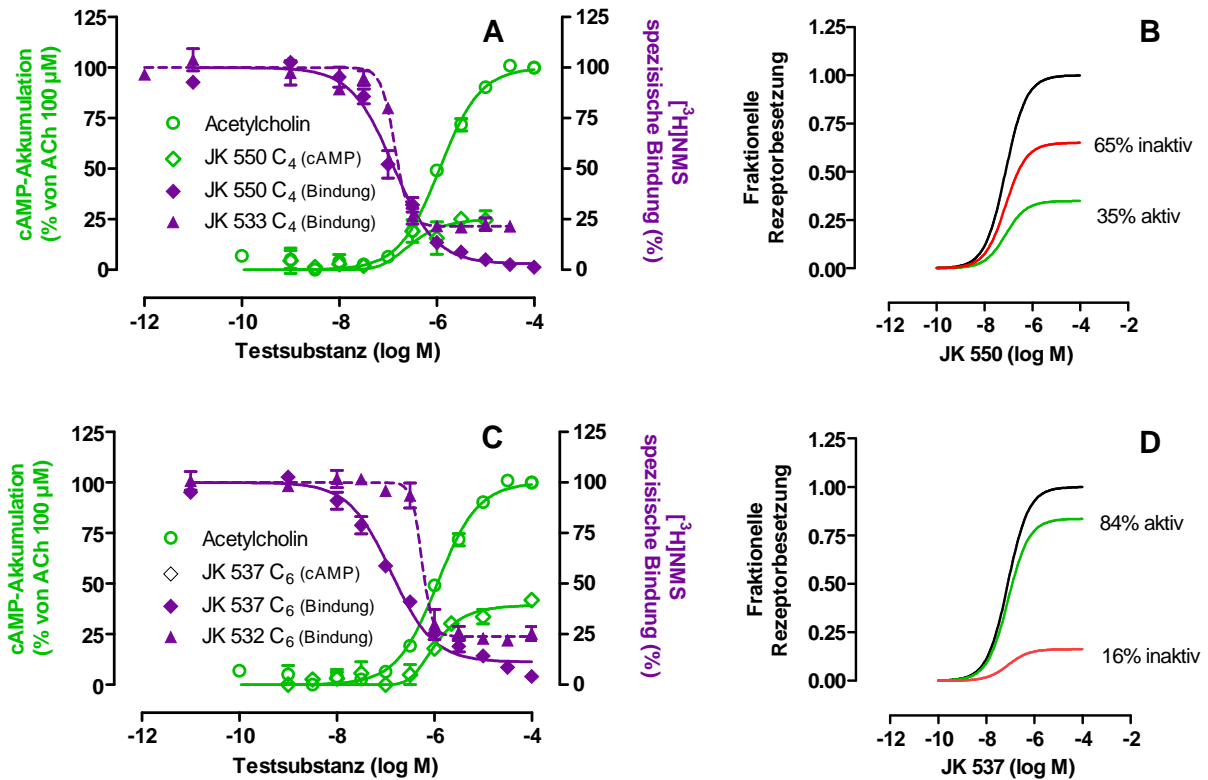
[<sup>35</sup>S]-GTP S-Bindung (4.1.4.3.2) am *hM<sub>1</sub>-wt*-Rezeptor in CHO-Zellen dargestellt. Die jeweils ermittelten Bindungskonstanten für das dualsterische Hybrid ( $K_A$ ) und das allosterische Fragment ( $K_B$ ) sowie die  $R_{\text{pose}}$ -Werte sind in Tabelle 4.37 zusammengefasst. Ein Vergleich der mit Hilfe von unterschiedlichen funktionellen Daten ermittelten Schätzwerte für  $K_A$  und  $K_B$  zeigten keinen signifikanten Unterschied dahingehend, welche funktionellen Daten für die globale Analyse verwendet wurden (Tab. 4.37)(t-Test,  $p > 0,05$ ). Gleiches wurde bei Betrachtung von  $R_{\text{pose}}$  (t-Test,  $p > 0,05$ ) und die der maximalen, fraktionellen Rezeptorbesetzung (vgl. Tab. 4.37) gefunden. Ein Vergleich der Parameterschätzwerte für  $K_A$  und  $K_B$  unter den beiden dualsterischen Hybriden zeigte, dass JK 537 ( $C_6$ ) sowohl bei Verwendung der  $G_q$ - ,  $G_s$ - als auch der  $G_i$ -Daten eine dreifach höhere Bindungsneigung zur dualsterischen Bindungspose ( $K_A$ ), jedoch eine vierfach schwächere Bindungsneigung zur allosterischen Bindungspose aufwies, als das kürzere Hybrid JK 550 ( $C_4$ )(t-Test,  $p < 0,05$ ). Das längere Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) zeigte unter Verwendung aller vier unterschiedlichen funktionellen Datensätzen einen um den Faktor Neun höheren  $R_{\text{pose}}$ -Wert, der sich in einer deutlich größeren aktiven Rezeptorfraction im Vergleich zum kürzeren Hybrid widerspiegelte. Die unter Verwendung der Gleichung 26 und 27 ermittelten maximalen fraktionellen Rezeptorbesetzungen zeigten im Falle der unterschiedlichen funktionellen Daten nur geringe Änderungen, deren biologische Bedeutung auf Grund der nicht signifikanten Veränderungen der  $R_{\text{pose}}$ -Werte bezweifelt werden kann. Im Durchschnitt konnte das Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) eine maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung in der dualsterischen aktiven Rezeptorbindungsorientierung von 84% induzieren, wohingegen JK 550 ( $C_4$ ) mit 35% eine um fast 50% niedrigere fraktionelle Rezeptorbesetzung in der aktiven Orientierung verursachte. Somit bestätigten sowohl die  $R_{\text{pose}}$ -Werte dieser Hybride, als auch ihre maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung das schon zuvor detektierte Bild, dass JK 537 mit einer Kettenlänge von sechs Kohlenstoffatomen eine höhere Bindungsaffinität in der dualsterischen Bindungspose aufweist, als das um zwei Kohlenstoffatom kürzere Hybrid JK 550. Mit anderen Worten besitzen (hinsichtlich dieser zwei Bindungsparameter) offensichtlich die Gleichgewichtsbindungskurven in Gegenwart des Hybrid und des Bausteines einen vorherrschenden Einfluss auf das Ergebnis der globalen Analyse aller vier Kurven. Wie bei Betrachtung von Gleichung 23 (vgl. 3.2.4.2) ersichtlich wird, müssen für eine sichere Abschätzung der funktionellen Parameter  $\tau_{\text{dyn}}$  (auch von  $\tau_{\text{max}}$  und  $\varepsilon_{\text{max}}$ \*) jedoch vorher die Werte von  $K_A$  und  $K_B$  mit kleinem analytischen Fehler bestimmt werden, um etwaige Unterschiede funktioneller Analyseparameter zwischen den Hybriden detektieren zu (vgl. auch das nächste Kapitel 4.1.9.2). Deshalb stellt die aus vier Kurven bestehende globale Analyse für alle ermittelten Parameterschätzwerte einen Fortschritt dar und erweitert die Untersuchungsmöglichkeiten funktioneller Rezeptoreigenschaften dualsterischer Hybride (vgl. Kapitel 4.1.9.2).



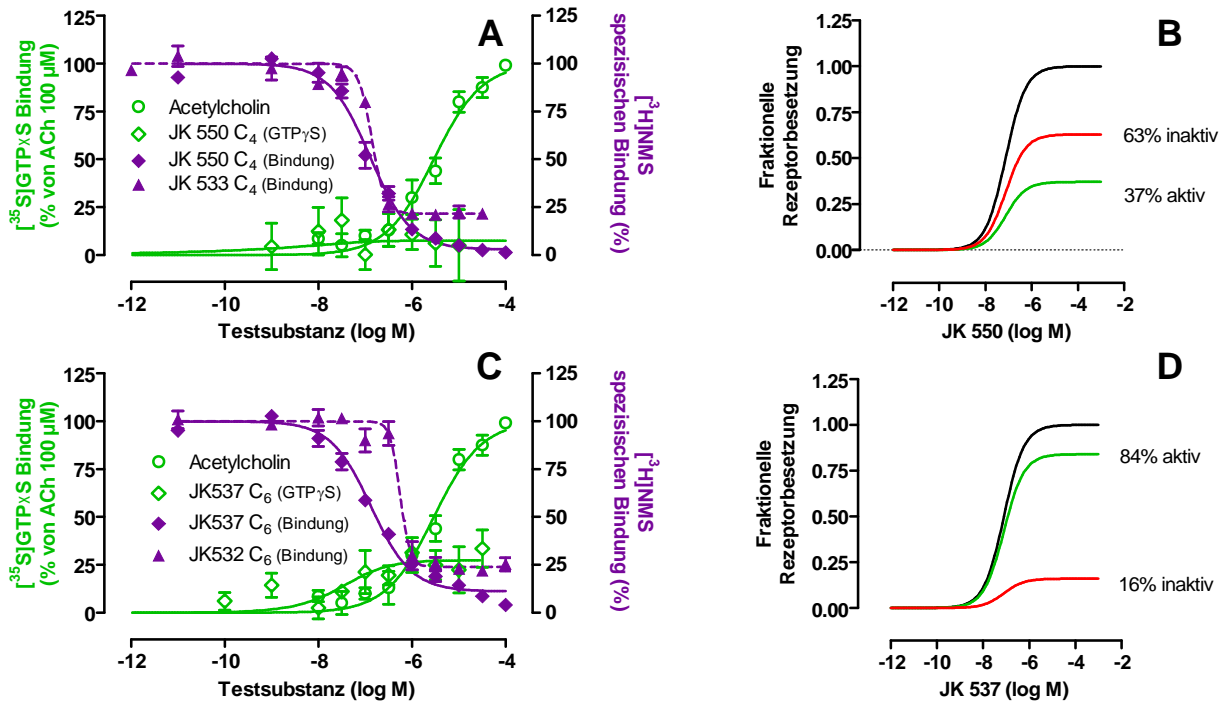
**Abbildung 4.39:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von DMR- und  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 550 ( $\text{C}_4$ ), JK 537 ( $\text{C}_6$ ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 533 ( $\text{C}_4$ ) und JK 532 ( $\text{C}_6$ ) an CHO- $h\text{M}_1$ -wt-Zellen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven (DMR: Referenzagonist ACh, dualsterisches Hybrid; Bindungsdaten: dualsterisches Hybrid und allosterisches Fragment), Ordinate: Durch ACh und Hybrid-induzierter Effekt der dynamischen Massenumverteilung (DMR) in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung des dualsterischen Hybrides und seines allosterischen Bausteins in Prozent der Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz an intakten CHO- $h\text{M}_1$ -wt-Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung von Gleichungen 20, 17 (mit 21) und 22 für Details vgl. 3.2.4.2. (B,D) Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichungen 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Drei- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.



**Abbildung 4. 40:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1-Akkumulations- und  $[^3\text{H}]$ NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 550 (C<sub>4</sub>), JK 537 (C<sub>6</sub>) sowie ihre allosterischen Fragmente JK 533 (C<sub>4</sub>) und JK 532 (C<sub>6</sub>) an CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven (IP1-Akkumulation: Referenzagonist ACh, dualsterisches Hybrid; Bindungsdaten: dualsterisches Hybrid und allosterisches Fragment), Ordinate: Durch ACh und Hybrid induzierte IP1-Akkumulation in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3\text{H}]$ NMS-Gleichgewichtsbindung des dualsterischen Hybrides und seines allosterischen Bausteins in Prozent der Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz an intakten CHO-Flp-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven Sets unter Verwendung der Gleichungen 20, 17 (mit 21) und 22 für Details vgl. 3.2.4.2. (B,D) Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors in der aktiven und der inaktiven Bindungspose ermittelt mit Hilfe der Gleichungen 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.



**Abbildung 4. 41:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von cAMP-Akkumulation- und  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 550 ( $\text{C}_4$ ), JK 537 ( $\text{C}_6$ ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 533 ( $\text{C}_4$ ) und JK 532 ( $\text{C}_6$ ) an CHO- $h\text{M}_1$ -wt-Zellen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven (cAMP-Akkumulation: Referenzagonist ACh, dualsterisches Hybrid; Bindungsdaten: dualsterisches Hybrid und allosterisches Fragment), Ordinate: Durch ACh und Hybridinduzierte-cAMP-Akkumulation in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung des dualsterischen Hybrides und seines allosterischen Bausteines in Prozent der Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz an intakten CHO- $h\text{M}_1$ -wt-Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung der Gleichungen 20, 17 (mit 21) und 22 für Details vgl. 3.2.4.2. (B,D) Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors in der aktiven und der inaktiven Bindungspose ermittelt mit Hilfe der Gleichungen 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.



**Abbildung 4.42:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ - und  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 550 (C<sub>4</sub>), JK 537 (C<sub>6</sub>) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 533 (C<sub>4</sub>) und JK 532 (C<sub>6</sub>) an CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen/-Membranen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven ( $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindung: Referenzagonist ACh, dualsterisches Hybrid; Bindungsdaten: dualsterisches Hybrid und allosterisches Fragment), Ordinate: Durch ACh und Hybrid induzierte-Förderung der  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindung in Prozent der Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung des dualsterischen Hybrides und seines allosterischen Bausteines in Prozent an intakten CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung der Gleichungen 20, 17 (mit 21) und 22, für Details vgl. 3.2.4.2. (B,D) Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors in der aktiven und der inaktiven Bindungspose ermittelt mit Hilfe der Gleichungen 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

	Substanz	Substitution	log K <sub>A</sub>	log K <sub>B</sub>	R <sub>pose</sub>	dual (%)	allo (%)
DMR	JK 550 (C <sub>4</sub> )	F	-6,64 ± 0,16	-6,93 ± 0,05	-0,28 ± 0,19	34	66
	JK 537 (C <sub>6</sub> )	F	-6,99 ± 0,07 <sup>#</sup>	-6,30 ± 0,06 <sup>#####</sup>	0,68 ± 0,09 <sup>###</sup>	83	17
IP1	JK 550 (C <sub>4</sub> )	F	-6,61 ± 0,28	-6,92 ± 0,08	-0,31 ± 0,33	33	67
	JK 537 (C <sub>6</sub> )	F	-7,01 ± 0,08	-6,30 ± 0,07 <sup>#####</sup>	0,71 ± 0,11 <sup>###</sup>	84	16
cAMP	JK 550 (C <sub>4</sub> )	F	-6,68 ± 0,15	-6,92 ± 0,05	-0,24 ± 0,18	35	65
	JK 537 (C <sub>6</sub> )	F	-7,03 ± 0,06 <sup>#</sup>	-6,30 ± 0,04 <sup>#####</sup>	0,73 ± 0,08 <sup>###</sup>	84	16
GTP S	JK 550 (C <sub>4</sub> )	F	-6,69 ± 0,30	-6,92 ± 0,10	-0,24 ± 0,36	37	63
	JK 537 (C <sub>6</sub> )	F	-7,02 ± 0,10	-6,30 ± 0,08 <sup>#####</sup>	0,72 ± 0,14 <sup>###</sup>	84	16

**Tabelle 4. 37: Zusammenfassung der mit Hilfe globaler, simultaner Analyse von Funktions- und Bindungsdaten ermittelten Bindungsparameter für das Hybridpaar JK 550 und JK 537.** F: Fluor-Substitution des allosterischen Fragmentes. logK<sub>A</sub>: Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der dynamischen Hybridliganden in der aktiven Rezeptorbindungspose. logK<sub>B</sub>: entspricht der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K<sub>B</sub>, des allosterischen Molekülbausteins am freien hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor und damit der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des jeweiligen dynamischen Hybridliganden in der allosterischen Rezeptorbindungspose. R<sub>pose</sub>: Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Rezeptorbindungsorientierung des Hybrides (R<sub>pose</sub> = -log (K<sub>A</sub>/K<sub>B</sub>)). Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der globalen Kurvenanalyse von Sets aus jeweils vier Kurven unter Verwendung von Gleichungen 20, 17 (mit 21) und 22, für Details vgl. 3.2.4.2. dual: Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung durch das Hybrid in der aktiven Bindungspose errechnet mit Hilfe von Gleichung 26; allo: Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung durch das Hybrid in der inaktiven Bindungspose errechnet mit Hilfe von Gleichung 27. #, ##, ###: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 550 des gleichen Signalweges (t-Test, # p<0,05, ## p<0,01, ### p<0,001). \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der Kenngröße logK<sub>A</sub> desselben dualsterischen Hybrides für den gleichen Signalweg (t-Test, \*\*\* p<0,001).

#### 4.1.9.2 Die intrinsische Rezeptoraktivität in der dualsterischen aktiven Rezeptorbindungspose in Verbindung mit der Fraktionsgröße der aktiven Pose regelt den ausgelösten Maximaleffekt E<sub>max</sub> der dualsterischen Hybridliganden JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>)

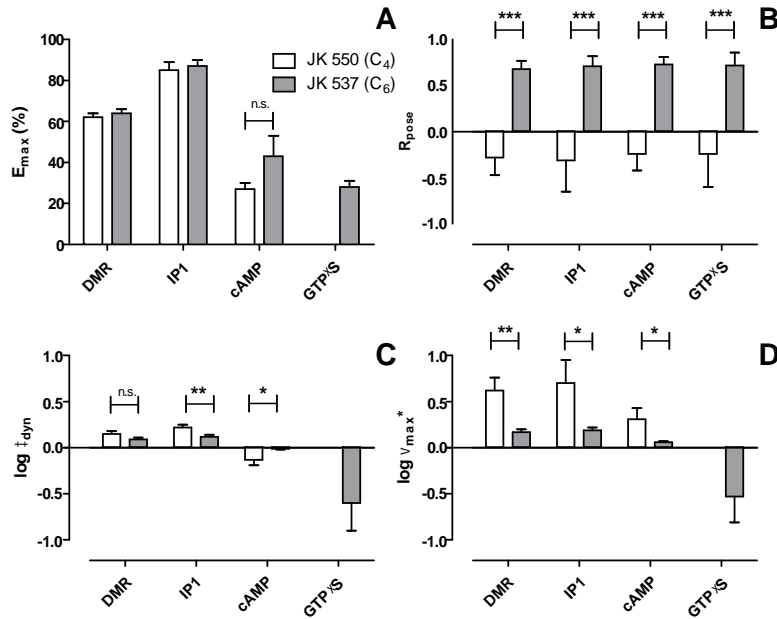
Auf den Signalwegen G<sub>q</sub> (vgl. 4.1.4.1.2, Tab. 4.13), G<sub>s</sub> (vgl. 4.1.4.2.2, Tab. 4.16), und auch in den zuvor durchgeführten DMR-Experimenten (Holze, Masterarbeit 2013, Chen, Klöckner, Holze et al. 2015 sowie 4.1.9.1, Tab. 4.37) generierten die dualsterischen Hybride JK 550 und JK 537 Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen ohne erkennbare Unterschiede hinsichtlich des durch sie induzierten Maximaleffektes E<sub>max</sub> (vgl. Abb. 4.43). Auch die mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983) ermittelten Kopplungseffizienzen (log ) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Hybridliganden (vgl. 4.1.5, Tab. 4.21). Auf Grund der mit allen drei im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Analysemethoden (vgl. 3.2.4.2) bestätigten, signifikant unterschiedlichen und numerisch fast identischen R<sub>pose</sub>-Werten sowie der maximalen fraktionellen Rezeptorbesetzungen in der aktiven und inaktiven Bindungspose der Hybride JK 550 und JK 537 (vgl. 4.1.3.1, 4.1.3.2 und

4.1.9.1 sowie Tab. 4.37), stellte sich nachfolgend die Frage, ob der dynamische Transduktionskoeffizient  $\tau_{\text{dyn}}$  einen Ansatz zur Erklärung der Gleichheit der Maximaleffekte ( $E_{\text{max}}$ ) liefern kann. Der dynamische Transduktionskoeffizient des (Hybrid)liganden  $\tau_{\text{dyn}}$  (vgl. 3.2.4.2, Gl. 23) setzt sich zusammen aus dem maximalen Transduktionskoeffizient  $\tau_{\text{max}}$  multipliziert mit der Fraktion des dualsterischen Liganden in der aktiven dualsterischen Bindungspose.  $\tau_{\text{max}}$  wiederum setzt sich zusammen aus der System-unabhängigen maximalen intrinsischen Wirksamkeit des dynamischen Liganden bei 100% Besetzung der Rezeptoren in der dualsterischen aktiven Bindungsorientierung  $\tau_{\text{max}}$  sowie der system-abhängigen Komponente  $R_T/K_E$ , die als ein Maß für die Rezeptorreserve gilt (Bock et al. 2014a). Der Parameter  $\tau_{\text{max}}$  erlaubt Vergleiche zwischen den Hybriden hinsichtlich ihrer maximalen rezeptorvermittelten intrinsischen Wirksamkeit. Die Parameter  $\tau_{\text{dyn}}$  und  $\tau_{\text{max}}$  sollten einen Erklärungsansatz dafür liefern, warum das dualsterische Hybrid JK 537 - trotz des hohen Prozentsatzes von ca. 84% in der dualsterischen aktiven Pose an  $hM_1$ -Rezeptoren zu binden - lediglich den gleichen Maximaleffekt und die gleiche Kopplungseffizienz  $\tau$  (nach Black und Leff, 1983) induziert, wie das kürzere Hybrid JK 550 mit einer dualsterischen Bindungsneigung von ca. 34%.

In Abbildung 4.43 sind mit Hilfe der globalen Analyse ermittelten Parameterschätzwerte für  $\log \tau_{\text{dyn}}$  und  $\tau_{\text{max}}^*$  dargestellt. Um eine bessere Vergleichbarkeit und Interpretation zu erreichen, wurden die für die jeweiligen Signalwege durch die Hybridliganden induzierten Maximaleffekte  $E_{\text{max}}$  sowie die ermittelten  $R_{\text{pose}}$ -Werte mit in die Abbildung integriert. Die numerischen Werte sind in Tab. 4.38 ( $E_{\text{max}}$ ,  $\log \tau_{\text{dyn}}$  und  $\tau_{\text{max}}^*$ ) und in Tab. 4.37 ( $R_{\text{pose}}$ ) aufgeführt.

Die DMR-Daten (Daten entnommen aus Holze, Masterarbeit, 2013) wiesen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des JK 550 und JK 537 induzierten Maximaleffekts auf. Auch die  $\log \tau_{\text{dyn}}$ -Werte unterschieden sich nicht (t-Test,  $p > 0,05$ ). Im Gegensatz dazu, unterschied sich  $\tau_{\text{max}}^*$  signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ). JK 550 ( $C_4$ ) zeigte eine dreifach höhere maximale rezeptorvermittelte intrinsische Aktivität bei 100%iger Besetzung des Rezeptors in dualsterischer Bindungspose, als das dualsterische Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) (t-Test,  $p < 0,05$ ). Dieses Ergebnis lieferte erstmalig eine Antwort darauf, warum beide Hybride trotz unterschiedlicher  $R_{\text{pose}}$ -Werte über gleiche  $E_{\text{max}}$ -Werte, verfügten (Chen, Klöckner und Holze et al. 2015). Da es sich bei den DMR-Daten um ein Mischsignal aus allen drei Signalwegen handelt, wurden nachfolgend alle drei Signalwege einzeln bezüglich der Parameter  $\log \tau_{\text{dyn}}$  und  $\tau_{\text{max}}^*$  betrachtet





**Abbildung 4. 43:** Graphische Darstellung der mit Hilfe globaler Analyse von Bindung und Funktion ermittelten funktionellen Parameter  $R_{pose}$ ,  $\tau_{dyn}$  und  $\log v_{max}^*$  unter Verwendung der Daten aus DMR-, IP1-Akkumulations-, cAMP-Akkumulations- und [ $^{35}$ S]GTP S-Bindungsexperimenten sowie der Hybrid induzierten Maximaleffekte  $E_{max}$  des Hybridpaares JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ). (A-D) Gegenüberstellung der Parameter (A)  $E_{max}$ : Hybrid-induzierter Maximaleffekt, Einzelkurvenanalysen (Gleichung 12). (B)  $R_{pose}$ : Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Rezeptorbindungsorientierung,  $R_{pose} = -\log(K_A/K_B)$ . (C)  $\log \tau_{dyn}$ : dynamische Transduktionskoeffizient des Hybrides und (D)  $\log v_{max}^*$ : system-unabhängige maximale intrinsische Wirksamkeit, in Abwesenheit einer Rezeptorreserve der Hybride JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) unter Verwendung der DMR-, IP1-Akkumulation, cAMP-Akkumulation- und [ $^{35}$ S]GTP S-Bindungsdaten. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der globalen Kurvenanalyse von Sets aus jeweils vier Kurven, für Details vgl. 3.2.4.2. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 550 des gleichen Signalweges (t-Test, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , n.s.: Wert nicht signifikant unterschiedlich  $p > 0,05$ ).

	Substanz	Substitution	$E_{max}$ (%)	$\log \tau_{dyn}$	$\log v_{max}^*$
DMR	JK 550 ( $C_4$ )	F	$62 \pm 2$	$0,15 \pm 0,03$	$0,62 \pm 0,14$
	JK 537 ( $C_6$ )	F	$64 \pm 2$	$0,09 \pm 0,02$	$0,17 \pm 0,03^{###}$
IP1	JK 550 ( $C_4$ )	F	$85 \pm 4$	$0,22 \pm 0,03$	$0,70 \pm 0,24$
	JK 537 ( $C_6$ )	F	$87 \pm 3$	$0,12 \pm 0,02^{##}$	$0,19 \pm 0,03^{\#}$
cAMP	JK 550 ( $C_4$ )	F	$27 \pm 3$	$-0,13 \pm 0,06^{***}$	$0,31 \pm 0,12$
	JK 537 ( $C_6$ )	F	$43 \pm 10$	$-0,01 \pm 0,01^{***\#}$	$0,06 \pm 0,01^{\#}$
GTP	JK 550 ( $C_4$ )	F	n.d.	n.d.	n.d.
	JK 537 ( $C_6$ )	F	$28 \pm 3$	$-0,60 \pm 0,30^{***}$	$-0,53 \pm 0,28$

**Tabelle 4. 38:** Zusammenfassung der mit Hilfe der globalen Analyse von Bindungs- und Funktionsdaten ermittelten funktionellen Parameter  $\tau_{dyn}$  und  $\log v_{max}^*$  unter Verwendung der funktionellen DMR-, IP1-Akkumulations-, cAMP-Akkumulations- und [ $^{35}$ S]GTP S-Bindungsdaten sowie der Hybrid-induzierten Maximaleffekte ( $E_{max}$ ) des Hybridpaares JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ). F: Fluor-Substitution im allosterischen Fragment.  $E_{max}$ : Hybrid-induzierter Maximaleffekt in % bei Einzelkurvenanalyse (Gleichung 12).  $\log \tau_{dyn}$ : dynamischer Transduktionskoeffizient des Hybridliganden.  $\log v_{max}^*$ : system-unabhängige, maximale rezeptorvermittelte intrinsische Wirksamkeit bei 100% dualsterischer Rezeptorbesetzung in Abwesenheit einer Rezeptorreserve. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der globalen Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven, für Details vgl. 3.2.4.2. \*\*\*, #: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des entsprechenden Hybrides auf dem  $G_q$ -Signalweg (IP1-Akkumulation). (t-Test, \*\*\*  $p < 0,001$ ). #, ##: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kurzen Hybrid JK 550 des gleichen Signalweges (t-Test, #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$ ).

Für den  $G_q$ -Signalweg zeigte sich ebenfalls ein unter beiden Hybriden gleich großer Maximizeffekt (vgl. Tab. 4.38). Das Hybrid JK 550 wies mit einem  $\log_{\text{dyn}} = 0,22 \pm 0,03$  einen geringen, aber signifikant höheren dynamischen Transduktionskoeffizienten auf, als das längere Hybrid JK 537 mit einem Wert von  $\log_{\text{dyn}} = 0,12 \pm 0,02$  (t-Test,  $p < 0,05$ ). Zudem zeigte die maximale rezeptorvermittelte intrinsische Aktivität des dualsterischen Hybridliganden JK 550 ( $C_4$ ) einen dreifach höheren Wert als das dualsterische Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) (t-Test,  $p < 0,05$ ). Für den  $G_s$ -Signalweg konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Hybrid induzierten Maximizeffekte ermittelt werden. Interessanterweise zeigte das kurze Hybrid JK 550 hier einen ebenfalls nur geringen, aber signifikant kleineren dynamischen Transduktionskoeffizienten  $\tau_{\text{dyn}}$  als das längere Hybrid JK 537. Dagegen zeigte es aber eine zweifach höhere maximale, rezeptorvermittelte intrinsische Aktivität als das Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) (t-Test,  $p < 0,05$ ). Auf dem  $G_i$ -Signalweg konnte für JK 550 kein signifikantes Signal detektiert werden, wodurch weitergehende vergleichende Analysen nicht möglich waren.

#### 4.1.9.3 Die globale Analyse der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindungs- und Funktionsdaten von JK 549 ( $C_4$ ) und JK 491 ( $C_6$ ) unter Einbeziehung unterschiedlicher Signalwege belegen keine Veränderung hinsichtlich der Bindungsorientierung durch Verlängerung der Zwischenkette

In Tabelle 4.39 sind die mit Hilfe der globalen Analyse für JK 549 ( $C_4$ ) und JK 491 ( $C_6$ ) ermittelten Parameterwerte aufgeführt. Die diesbezüglichen Abbildungen finden sich im Anhang (vgl. Anhang, Kapitel 9.7) dieser Arbeit (vgl. Abb. 9.14 – 9.17).

	Substanz	Substitution	$\log K_A$	$\log K_B$	$R_{\text{pose}}$	dual (%)	allo (%)
DMR	JK 549 ( $C_4$ )	Br	$-6,54 \pm 0,06$	$-5,40 \pm 0,06^{***}$	$1,14 \pm 0,09$	93	7
	JK 491 ( $C_6$ )	Br	$-7,09 \pm 0,06^{###}$	$-5,89 \pm 0,05^{***###}$	$1,21 \pm 0,08$	94	6
IPI	JK 549 ( $C_4$ )	Br	$-6,52 \pm 0,06$	$-5,40 \pm 0,07^{***}$	$1,11 \pm 0,09$	93	7
	JK 491 ( $C_6$ )	Br	$-7,07 \pm 0,06^{###}$	$-5,89 \pm 0,05^{***###}$	$1,18 \pm 0,08$	94	6
cAM	JK 549 ( $C_4$ )	Br	$-6,54 \pm 0,05$	$-5,40 \pm 0,06^{***}$	$1,14 \pm 0,08$	93	7
	JK 491 ( $C_6$ )	Br	$-7,10 \pm 0,06^{###}$	$-5,89 \pm 0,04^{***###}$	$1,21 \pm 0,07$	94	6
GTP	JK 549 ( $C_4$ )	Br	$-6,56 \pm 0,09$	$-5,40 \pm 0,10^{***}$	$1,15 \pm 0,15$	93	7
	JK 491 ( $C_6$ )	Br	$-7,11 \pm 0,08^{###}$	$-5,89 \pm 0,06^{***###}$	$1,22 \pm 0,11$	94	6

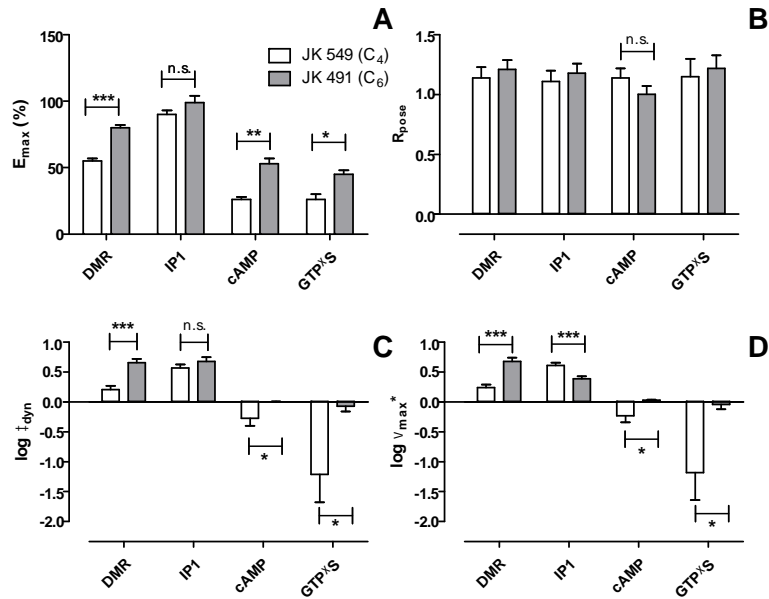
**Tabelle 4. 39: Zusammenfassung der mit Hilfe globaler, simultaner Analyse von Funktions- und Bindungsdaten ermittelten Bindungsparameter für das Hybridpaar JK 549 und JK 491.** Br: Brom-Substitution des allosterischen Fragmentes.  $\log K_A$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der dynamischen Hybridliganden in der aktiven Rezeptorbindungspose.  $\log K_B$ : entspricht der Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $\log K_B$ , des allosterischen Molekülbausteins am freien  $hM_1$ -wt-Rezeptor und damit der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der dynamischen Hybridliganden in der allosterischen Rezeptorbindungspose;  $R_{\text{pose}}$ : Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Rezeptorpopulation des Hybrides ( $R_{\text{pose}} = -\log(K_A/K_B)$ ). Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der globalen Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung der Gleichungen 20, 17 (mit 21) und 22, für Details vgl. 3.2.4.2. dual: Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Hybrides in der aktiven Bindungspose errechnet mit Hilfe von Gleichung 26; allo: Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung durch das Hybrid in der inaktiven Bindungspose ermittelt mit Hilfe von Gleichung 27. ###: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 549 des gleichen Signalweges (t-Test,  $### p < 0,001$ ). \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der Kenngröße  $\log K_A$  desselben dualsterischen Hybrides des gleichen Signalweges (t-Test,  $*** p < 0,001$ ).

Die Bindungskonstanten  $K_A$  und  $K_B$  waren für jedes der beide Hybride, bezüglich aller untersuchten Messsignale gleich (t-Test,  $p > 0,05$ ). Für jeden der funktionellen Datensätzen ergab sich für JK 549 ( $C_4$ ) eine 14-fach höhere Rezeptorbindungsneigung in der dualsterischen, im Vergleich zur allosterischen Bindungspose. Das längere Hybrid JK 491 ( $C_6$ ) wies sogar eine 16-fach höhere Bindungsneigung auf (t-Test,  $p < 0,05$ ). Ein Vergleich beider Hybride untereinander ergab, dass das längere Hybrid JK 491 eine vierfach höhere Bindungsneigung in der dualsterischen Rezeptorbindungspose besaß als das kürzere Hybrid JK 549, demgegenüber aber auch eine dreifach höhere Bindungsneigung zur allosterischen Bindungspose als JK 549 (t-Test,  $p < 0,05$ ) (vgl. Tab. 4.39). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den  $R_{\text{pose}}$ -Werten der beiden Hybriden (t-Test,  $p > 0,05$ ). Für das kürzere Hybrid JK 549 konnte unabhängig vom betrachteten funktionellen Datensatz, stets eine aktive Rezeptorfraction von 93%, für das längere Hybrid JK 491 eine aktive Rezeptorfraction von 94% ermittelt werden. Demnach erfolgte durch die Verlängerung der Zwischenkette von JK 549 keine Änderung der Bindungspose am  $hM_1$ -wt-Rezeptorprotein.

***4.1.9.4 Die intrinsische Rezeptoraktivität in der dualsterischen aktiven Rezeptorbindungspose in Verbindung mit der Fraktionsgröße der aktiven Pose regelt den ausgelösten Maximaleffekt  $E_{\text{max}}$  der dualsterischen Hybridliganden JK 549 ( $C_4$ ) und JK 491 ( $C_6$ )***

Die Ergebnisse der globalen Analyse für die Hybride JK 549 und JK 491 faßt Abbildung 4.44 zusammen, in Tabelle 4.40 sind die Parameterschätzwerte aufgeführt.

Anders als bei den Hybridliganden JK 550 und JK 537 konnte für dieses Hybridpaar kein signifikanter Wechsel hinsichtlich der Bindungsorientierung festgestellt werden (t-Test,  $p > 0,05$ ) (vgl. Tab. 4.39). Die in DMR-Experimenten (Daten entnommen aus Holze, Masterarbeit, 2013) ermittelten Maximaleffekte unterschieden sich signifikant voneinander (Abb. 4.44 (A)), ebenso wie der mit Hilfe der globalen Analyse ermittelte dynamische Transduktionskoeffizient  $\log_{\text{dyn}}$  (Abb. 4.44 (C)). Das längere Hybrid JK 491 ( $\log_{\text{dyn}} = 0,21 \pm 0,06$ ) besaß einen dreifach höheren Wert als das kürzere Hybrid JK 549 ( $\log_{\text{dyn}} = 0,66 \pm 0,06$ ). Ein qualitativ identisches Ergebnis lieferte die maximale rezeptorvermittelt intrinsische Wirksamkeit  $\varepsilon_{\text{max}}^*$  (Tab. 4.40, t-Test,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 4. 44:** Graphische Darstellung der mit Hilfe globaler Analyse von Bindung und Funktion ermittelten Parameter  $R_{pose}$ ,  $\tau_{dyn}$  und  $\log v_{max}^*$  unter Verwendung der DMR-, IP1-Akkumulations-, cAMP-Akkumulations- und  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindungsdaten sowie der Hybrid-induzierten Maximaleffekte ( $E_{max}$ ) des Hybridpaares JK 549 (C<sub>4</sub>) und JK 491 (C<sub>6</sub>). (A-D) Gegenüberstellung der Parameter (A)  $E_{max}$ : Hybrid-induzierter Maximaleffekt (B)  $R_{pose}$ : Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Rezeptorbindungspopulation ( $R_{pose} = -\log(K_A/K_B)$ ), (C)  $\log \tau_{dyn}$ : dynamische Transduktionskoeffizient des Hybrides und (D)  $\log v_{max}^*$ : system-unabhängige, maximale rezeptorvermittelte intrinsische Wirksamkeit bei 100% dualsterischer Rezeptorbesetzung, in Abwesenheit einer Rezeptorreserve der Hybride JK 549 (C<sub>4</sub>) und JK 491 (C<sub>6</sub>) unter Verwendung der DMR-, IP1-Akkumulation, cAMP-Akkumulation- und  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindungsdaten. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der globalen Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven, für Details 3.2.4.2 Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 549 des gleichen Signalweges (t-Test, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , n.s.: Wert nicht signifikant unterschiedlich  $p > 0,05$ ).

Substanz		Substitution	$E_{max}$ (%)	$\log \tau_{dyn}$	$\log v_{max}^*$
DMR	JK 549 (C <sub>4</sub> )	Br	55 $\pm$ 2	0,21 $\pm$ 0,06	0,24 $\pm$ 0,05
	JK 491 (C <sub>6</sub> )	Br	80 $\pm$ 2 <sup>***</sup>	0,66 $\pm$ 0,06 <sup>***</sup>	0,68 $\pm$ 0,06 <sup>***</sup>
IP1	JK 549 (C <sub>4</sub> )	Br	90 $\pm$ 3	0,57 $\pm$ 0,06	0,61 $\pm$ 0,05
	JK 491 (C <sub>6</sub> )	Br	99 $\pm$ 5	0,68 $\pm$ 0,07	0,39 $\pm$ 0,04 <sup>***</sup>
cAMP	JK 549 (C <sub>4</sub> )	Br	26 $\pm$ 2	-0,27 $\pm$ 0,13	-0,23 $\pm$ 0,11
	JK 491 (C <sub>6</sub> )	Br	53 $\pm$ 4 <sup>**</sup>	0,001 $\pm$ 0,01 <sup>*</sup>	0,03 $\pm$ 0,01 <sup>*</sup>
GTP	JK 549 (C <sub>4</sub> )	Br	26 $\pm$ 4	-1,21 $\pm$ 0,47	-1,18 $\pm$ 0,46
	JK 491 (C <sub>6</sub> )	Br	45 $\pm$ 3 <sup>*</sup>	-0,07 $\pm$ 0,09 <sup>*</sup>	-0,04 $\pm$ 0,08 <sup>*</sup>

**Tabelle 4. 40:** Zusammenfassung der mit Hilfe globaler Analyse von Funktions- und Bindungsdaten ermittelten Parameter  $\tau_{dyn}$  und  $\log v_{max}^*$  unter Verwendung der DMR-, IP1-Akkumulations-, cAMP-Akkumulations- und  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindungsdaten sowie der Hybrid induzierten Maximaleffekte  $E_{max}$  des Hybridpaares JK 549 (C<sub>4</sub>) und JK 491 (C<sub>6</sub>). Br: Brom-Substitution im allosterischen Fragment.  $E_{max}$ : Hybrid-induzierter Maximaleffekt in % bei Einzelkurvenanalyse (Gleichung 12).  $\log \tau_{dyn}$ : dynamischer Transduktionskoeffizient des Hybridliganden.  $\log v_{max}^*$ : system-unabhängige, maximale rezeptorvermittelte intrinsische Wirksamkeit bei 100% dualsterischer Rezeptorbesetzung in Abwesenheit einer Rezeptorreserve. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der globalen Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven, für Details vgl. 3.2.4.2. \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kurzen Hybrides JK 549 im gleichen Signalweg (t-Test, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Für den  $G_q$ -Signalweg zeigten beide Hybride interessanterweise ebenfalls keine signifikant verschiedenen Maximaleffekte (t-Test,  $p > 0,05$ ). Auch die dynamischen Transduktionskoeffizienten  $\tau_{\text{dyn}}$  wiesen keinen signifikanten Unterschied auf (t-Test,  $p > 0,05$ ). Die maximale, rezeptorvermittelte intrinsische Aktivität  $\epsilon_{\text{max}}^*$  war für JK 549 fast zweifach höher als für das längere Hybrid JK 491 (t-Test,  $p < 0,05$ ). Für den  $G_s$ -Signalweg zeigten die Hybride wieder einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der dort erzielten Maximaleffekte (vgl. Abb. 4.44 und Tab. 4.40). Das kürzere Hybrid JK 549 ( $C_4$ ) wies mit  $E_{\text{max}} = 26 \pm 2\%$  einen deutlich schwächeren partialagonistischen Effekt auf als JK 491 mit  $E_{\text{max}} = 53 \pm 4\%$ . Sowohl der dynamische Transduktionskoeffizient  $\tau_{\text{dyn}}$ , als auch die maximale rezeptorvermittelte intrinsische Aktivität  $\epsilon_{\text{max}}^*$  waren für das längere Hybrid JK 491 ( $C_6$ ) doppelt so groß wie für das kürzere Hybrid JK 549 (t-Test,  $p < 0,05$ ). Auf dem  $G_i$ -Signalweg konnte das dualsterische Hybrid JK 491 mit  $E_{\text{max}} = 45 \pm 3\%$  den höheren Maximaleffekt erzielen, was sich sowohl im dynamischen Transduktionskoeffizienten  $\tau_{\text{dyn}}$ , als auch in der maximalen, rezeptorvermittelten intrinsischen Aktivität  $\epsilon_{\text{max}}^*$  widerspiegelte. JK 491 zeigte gegenüber JK 549 eine 14-fach höhere dynamische Kopplungseffizienz  $\tau_{\text{dyn}}$  und ebenfalls eine 14-fach höhere rezeptorvermittelte intrinsische Aktivität  $\epsilon_{\text{max}}^*$  (t-Test,  $p < 0,05$ ). Schlussfolgernd bleibt festzuhalten, dass die uniformen  $R_{\text{pose}}$ -Werte (Abb. 4.44 (B)) es ermöglichten, dieses Hybridpaar - mit Blick auf die Signale DMR, IP1, cAMP und GTP S Bindung - als ein Beispiel dafür anzusehen, dass die Vergrößerung des Maximaleffektes  $E_{\text{max}}$  im Zuge der Verlängerung der Zwischenkette (Abb. 4.44 (A)) letztlich auf eine Zunahme von  $\epsilon_{\text{max}}^*$  für das längere Hybrid JK 491 zurückzuführen ist (Abb. 4.44 (C) und (D)).

#### ***4.1.9.5 Die globale Analyse der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindungs- und Funktionsdaten der Hybridliganden JK 596 ( $C_4$ ) und JK 559 ( $C_6$ ) unter Einbeziehung unterschiedlicher Signalwege belegen einen geringen Einfluß der Zwischenkettenlänge auf die Rezeptorbindungsorientierung***

Die Ergebnisse der globalen Analyse für die dualsterischen Hybride JK 596 ( $C_4$ ) und JK 559 ( $C_6$ ) unter Verwendung der DMR- (Holze, Masterarbeit 2013), IP1-Akkumulations (4.1.4.1), cAMP-Akkumulations (4.1.4.2) und [ $^{35}\text{S}$ ]GTP S-Bindungsdaten (4.1.4.3) an  $hM_1$ -wt-Rezeptoren sind in Tabelle 4.41 zusammengefasst. Die korrespondierenden Kurvenanalysen sind im Anhang (vgl. Anhang, Kapitel 9.7) dieser Arbeit zu finden (vgl. Abb. 9.10 – 9.13).

	Substanz	Substitution	log K <sub>A</sub>	log K <sub>B</sub>	R <sub>pose</sub>	dual (%)	allo (%)
DMR	JK 596 (C <sub>4</sub> )	F, Cl	-6,83 ± 0,05	-5,87 ± 0,03 <sup>***</sup>	0,96 ± 0,06	90	10
	JK 559 (C <sub>6</sub> )	F, Cl	-7,07 ± 0,07 <sup>##</sup>	-5,72 ± 0,11 <sup>***</sup>	1,35 ± 0,13 <sup>##</sup>	96	4
IP1	JK 596 (C <sub>4</sub> )	F, Cl	-6,83 ± 0,05	-5,87 ± 0,03 <sup>***</sup>	0,96 ± 0,06	90	10
	JK 559 (C <sub>6</sub> )	F, Cl	-7,05 ± 0,08 <sup>#</sup>	-5,72 ± 0,12 <sup>***</sup>	1,33 ± 0,15 <sup>#</sup>	96	4
cAM	JK 596 (C <sub>4</sub> )	F, Cl	-6,81 ± 0,05	-5,87 ± 0,03 <sup>***</sup>	0,94 ± 0,06	90	10
	JK 559 (C <sub>6</sub> )	F, Cl	-7,04 ± 0,08 <sup>#</sup>	-5,72 ± 0,11 <sup>***</sup>	1,32 ± 0,14 <sup>#</sup>	95	5
GTP	JK 596 (C <sub>4</sub> )	F, Cl	-6,84 ± 0,08	-5,87 ± 0,05 <sup>***</sup>	0,97 ± 0,10	90	10
	JK 559 (C <sub>6</sub> )	F, Cl	-7,08 ± 0,13	-5,72 ± 0,20 <sup>***</sup>	1,36 ± 0,25	96	4

**Tabelle 4. 41: Zusammenfassung der mit Hilfe globaler, simultaner Analyse von Funktions- und Bindungsdaten ermittelten Bindungsparameter des Hybridpaares JK 596 und JK 559.** F: Fluor, Cl: Chlor-Substitution im allosterischen Fragment. logK<sub>A</sub>: Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der dynamischen Hybridliganden in der aktiven Rezeptorbindungspose. logK<sub>B</sub>: entspricht der Gleichgewichtsdissoziationskonstante logK<sub>B</sub>, des allosterischen Molekülbausteins am freien hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor und damit der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der dynamischen Hybridliganden in der allosterischen Rezeptorbindungspose; R<sub>pose</sub>: Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Rezeptorpopulation des Hybrides (R<sub>pose</sub> = -log (K<sub>A</sub>/K<sub>B</sub>)). Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der globalen Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung der Gleichungen 20, 17 (mit 21) und 22, für Details vgl. 3.2.4.2. dual: Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Hybrides in der aktiven Bindungspose errechnet mit Hilfe von Gleichung 26; allo: Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung durch das Hybrid in der inaktiven Bindungspose ermittelt mit Hilfe von Gleichung 27. #, ## signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kurzen Hybrid JK 596 im gleichen Signalweg (t-Test, # p<0,05, ## p<0,01). \*\*\*: signifikant verschieden zu der Kenngröße logK<sub>B</sub> des gleichen dualsterischen Hybrides im gleichen Signalweg (t-Test, \*\*\* p <0,001).

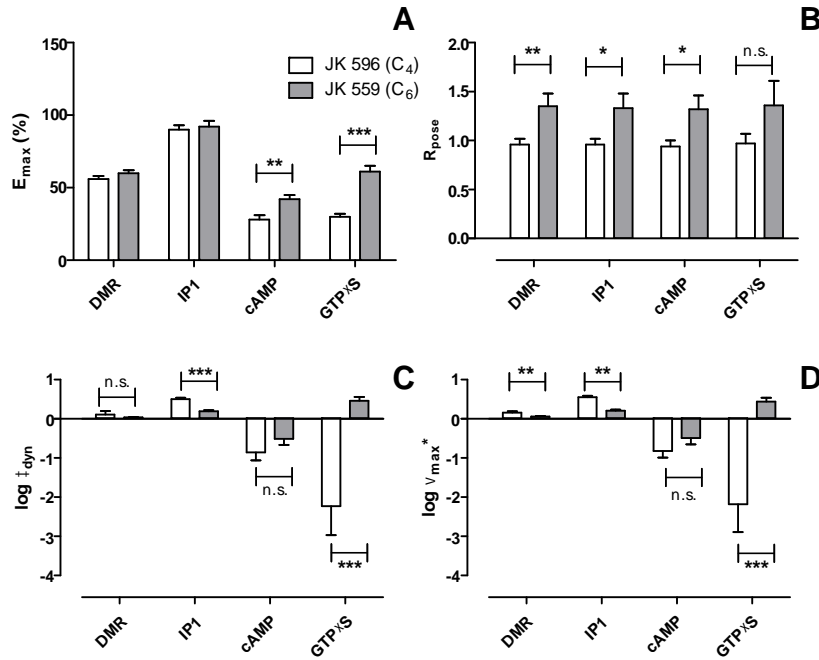
Ein Vergleich der mit Hilfe unterschiedlicher funktioneller Daten ermittelten Schätzwerte für logK<sub>A</sub>, logK<sub>B</sub> und R<sub>pose</sub> zeigte, wie bereits für die zuvor beschriebenen Hybridpaare, keinen signifikanten Unterschied dahingehend, welche funktionellen Daten für die globale simultane Analyse der Bindungs- und Funktionsdaten verwendet wurden (Tab. 4.41, t-Test, p>0,05). Ein Vergleich der ermittelten Parameterschätzwerte für logK<sub>A</sub> und logK<sub>B</sub> zwischen den Hybriden zeigte, dass JK 596 (C<sub>4</sub>) sowohl bei Verwendung des G<sub>q</sub>-, G<sub>s</sub>- als auch des G<sub>i</sub>-Datensatzes eine neunfach höhere Bindungsneigung in der dualsterischen Bindungspose (log K<sub>A</sub>) aufwies, als in der allosterischen Bindungspose. Das längere Hybrid JK 559 wies im Vergleich zur allosterischen Bindungspose eine sogar 22-fach höhere Bindungsneigung in der dualsterischen Bindungspose auf.

Eine Gegenüberstellung zeigte, dass die mit Hilfe der DMR-, IP1-Akkumulations- und cAMP-Akkumulationsdaten ermittelten Bindungskonstanten K<sub>A</sub>, für das längere Hybrid JK 559 eine gegenüber JK 596 zweifach höhere Bindungsneigung in der dualsterischen Bindungspose dokumentierten (t-Test, p<0,05). Der analoge Vergleich auf der Basis der [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsdaten ergab keine Signifikanz (t-Test, p>0,05). Dies war allerdings nicht auf eine Veränderung der numerischen Werte, sondern auf einen größeren Standardfehler zurückzuführen, der analysetechnisch auf das niedrige obere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve der Hybride in den [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsexperimenten zurückzuführen war. Hinsichtlich der Affinität zur allosterischen Bindungspose zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Hybriden. Das längere Hybrid JK 559 (C<sub>6</sub>) zeigte unter Verwendung der DMR, IP1-

Akkumulations- und cAMP-Akkumulationsdaten einen zweifach höheren  $R_{\text{pose}}$ -Wert (t-Test,  $p < 0,05$ ). Wie schon für die Parameter  $\log K_A$  und  $\log K_B$  beobachtet, wiesen die  $R_{\text{pose}}$ -Werte beider Hybride unter Verwendung der [ $^{35}\text{S}$ ]GTP S-Bindungsdaten keine signifikanten Unterschiede mehr auf (t-Test,  $p > 0,05$ ). Die fraktionelle Rezeptorbesetzung zeigte bezüglich der unterschiedlichen Quellen der funktionellen Daten keine oder nur eine sehr geringe Differenz. Im Durchschnitt konnte das Hybrid JK 596 ( $C_4$ ) eine maximale aktive Fraktion von 90% dualsterischer Rezeptorbindungsbesetzung induzieren, für JK 559 ( $C_6$ ) war diese Fraktion mit 96% noch größer.

***4.1.9.6 Die intrinsische Rezeptoraktivität in der dualsterischen aktiven Rezeptorbindungspose in Verbindung mit der Fraktionsgröße der aktiven Pose hat Einfluss auf den ausgelösten Maximaleffekt  $E_{\text{max}}$  der dualsterischen Hybridliganden JK 596 ( $C_4$ ) und JK 559 ( $C_6$ )***

Die mit Hilfe der globalen Analyse der Bindungs- und Funktionsdaten ermittelten funktionellen Parameter der dualsterischen Hybride JK 596 ( $C_4$ ) und JK 559 ( $C_6$ ) sind in Abbildung 4.45 (A-E) dargestellt und in Tabelle 4.42 zusammengefasst. Wie im Fall der zuvor untersuchten dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537 (vgl. 4.1.9.1) konnte für JK 596 und JK 559 ebenfalls ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Bindungsorientierung - ausgedrückt als  $R_{\text{pose}}$  (Abb. 4.45 (B)) - festgestellt werden. Anders als bei diesem Hybridpaar, kam es jedoch nicht zu einem „Flip-Flop“ im Sinne eines kompletten Umschlagens und eines quantitativen Überwiegens ( $> 50\%$ ) nur jeweils einer Rezeptorbindungsorientierung (vgl. Tab. 4.37), sondern lediglich zu einer leichten Veränderung des Anteiles der aktiven, bzw. der inaktiven fraktionellen Rezeptorbesetzung.



**Abbildung 4.45: Graphische Darstellung der mit Hilfe globaler Analyse der Bindungs- und Funktionsdaten ermittelten Parameter  $R_{\text{pose}}$ ,  $\tau_{\text{dyn}}$  und  $\max^*$  unter Verwendung der DMR-, IP1-Akkumulations, cAMP-Akkumulations- und [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsdaten sowie der Hybrid induzierten Maximaleffekte ( $E_{\text{max}}$ ) des Hybridpaares JK 596 (C<sub>4</sub>) und JK 559 (C<sub>6</sub>).** (A-D) Gegenüberstellung der Parameter (A)  $E_{\text{max}}$ : Hybrid-induzierter Maximaleffekt (B)  $R_{\text{pose}}$ : Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Rezeptorbindungspopulation ( $R_{\text{pose}} = -\log(K_A/K_B)$ ), (C)  $\log \tau_{\text{dyn}}$ : dynamische Transduktionskoeffizient des Hybrides und (D)  $\log v_{\text{max}}^*$ : system-unabhängige, maximale rezeptorvermittelte intrinsische Wirksamkeit bei 100% dualsterischer Rezeptorbesetzung, in Abwesenheit einer Rezeptorreserve der Hybride JK 596 (C<sub>4</sub>) und JK 559 (C<sub>6</sub>) unter Verwendung der DMR-, IP1-Akkumulation, cAMP-Akkumulation- und [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsdaten. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der globalen Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven, für Details 3.2.4.2 Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. \*\*, \*\*\*: signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kurzen Hybrides JK 596 (t-Test, \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Wie im Fall der zuvor beschriebenen Hybridpaare, zeigten auch JK 596 und JK 559 in DMR-Experimenten keinen signifikanten Unterschied im ermittelten Maximaleffekt (Abb. 4.45 (A)). Der dynamischen Transduktionskoeffizient  $\log \tau_{\text{dyn}}$  wies ebenfalls keine signifikanten Unterschiede auf (t-Test,  $p > 0,05$ ). Wird jedoch die systemunabhängige, maximale rezeptorvermittelte intrinsische Wirksamkeit bei 100% dualsterischer Rezeptorbesetzung betrachtet, zeigte das kürzere Hybrid JK 596 mit  $\max^* = 0,16 \pm 0,03$  einen signifikant höheren Wert (t-Test,  $p < 0,05$ ). Folglich verhält sich dieses Hybridpaar mit Blick auf das DMR-Signal ähnlich wie das Paar JK 550/JK 537, indem gleiche Maximaleffekte ( $E_{\text{max}}$ ) (4.45 (A)) bei unterschiedlichen  $R_{\text{pose}}$  Werten (Abb. 4.45 (B)) letztlich auf eine Zunahme von  $\varepsilon_{\text{max}}^*$  für das kürzere Hybrid JK 596 zurückzuführen sind (Abb. 4.45 (C) und (D)).



	Substanz	Substitution	$E_{\max}$ (%)	$\log \tau_{\text{dyn}}$	$\log \max^*$
DMR	JK 596 (C <sub>4</sub> )	F, Cl	56 ± 2	0,11 ± 0,09	0,16 ± 0,03
	JK 559 (C <sub>6</sub> )	F, Cl	60 ± 2	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,01**
IP1	JK 596 (C <sub>4</sub> )	F, Cl	90 ± 3	0,50 ± 0,04	0,55 ± 0,04
	JK 559 (C <sub>6</sub> )	F, Cl	92 ± 4	0,19 ± 0,03***	0,21 ± 0,03**
cAMP	JK 596 (C <sub>4</sub> )	F, Cl	28 ± 3	-0,86 ± 0,20	-0,82 ± 0,17
	JK 559 (C <sub>6</sub> )	F, Cl	42 ± 3**	-0,51 ± 0,16	-0,49 ± 0,16
GTP S	JK 596 (C <sub>4</sub> )	F, Cl	30 ± 2	-2,23 ± 0,74	-2,18 ± 0,71
	JK 559 (C <sub>6</sub> )	F, Cl	61 ± 4***	0,46 ± 0,10***	0,44 ± 0,10***

**Tabelle 4. 42:** Zusammenfassung der mit Hilfe globaler Analyse der Bindungs- und Funktionsdaten ermittelten Parameter  $\tau_{\text{dyn}}$  und  $\max^*$  unter Verwendung der DMR-, IP1-Akkumulations-, cAMP-Akkumulations- und [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsdaten sowie der Hybrid induzierten Maximaleffekte ( $E_{\max}$ ) des Hybridpaares JK 596 (C<sub>4</sub>) und JK 559 (C<sub>6</sub>). F: Fluor, Cl: Chlor-Substitution im allosterischen Fragment;  $E_{\max}$ : Hybrid-induzierter Maximaleffekt in % bei Einzelkurvenanalyse (Gleichung 12).  $\log \tau_{\text{dyn}}$ : dynamischer Transduktionskoeffizient des Hybridliganden.  $\log \max^*$ : system-unabhängige, maximale rezeptorvermittelte intrinsische Wirksamkeit bei 100% dualsterischer Rezeptorbesetzung in Abwesenheit einer Rezeptorreserve. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der globalen Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven, für Details vgl. 3.2.4.2. \*\*,\*\*\*: signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kurzen Hybrides JK 596 für den gleichen Signalweg (t-Test, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001).

Auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg zeigten beide Hybride ebenfalls keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des von ihnen vermittelten Maximaleffektes  $E_{\max}$ . Anders als unter Verwendung der DMR-Daten, führten die IP1-Akkumulationsdaten, die den G<sub>q</sub>-Signalweg widerspiegeln zu signifikant zweifach größeren Werten  $\tau_{\text{dyn}}$  und  $\max^*$  für das kürzere Hybrid JK 596 (t-Test, p<0,05). Die höheren Werte beider Parameter des kürzeren JK 596 für diesen Signalweg erklären, wie es trotz des kleineren  $R_{\text{pose}}$  Wertes gegenüber JK 559 zu identischen  $E_{\max}$  Werten kam (Abb. 4.45 (A)). Auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg zeigte das längere Hybrid JK 559 einen 14% höheren Maximaleffekt als das kürzere Hybrid JK 596 (Abb. 4.45 (A)). Interessanterweise ergab sich für die Parameterwerte  $\log \tau_{\text{dyn}}$  und  $\log \max^*$  kein signifikanter Unterschied (t-Test, p>0,05). Für diesen Signalweg erlauben es deshalb die höheren  $R_{\text{pose}}$ -Werte des längeren Hybrides JK 559 zu erklären, wie dieses im Vergleich zu JK 596 einen höheren Maximaleffekt  $E_{\max}$  (Abb. 4.45 (A)) auslösen kann.

Auf dem G<sub>i</sub>-Signalweg konnte das längere dualsterische Hybrid JK 559 ebenfalls einen um 31% höheren Maximaleffekt  $E_{\max}$  (Abb. 4.45 (A)) hervorrufen als JK 596. Anders als für den G<sub>s</sub>-Signalweg konnte hier ein signifikanter Unterschied zwischen den  $\log \tau_{\text{dyn}}$  und  $\log \max^*$  beider Hybride detektiert werden. Der dynamische Transduktionskoeffizient  $\tau_{\text{dyn}}$  des Hybrides JK 559 war 490-fach größer als der für JK 596,  $\max^*$  besaß einen 417-fach größeren Wert (t-Test, p<0,05). Für diesen Signalweg erklären deshalb die höheren  $R_{\text{pose}}$ -Werte in Kombination mit kleineren  $\log \tau_{\text{dyn}}$  und  $\log \max^*$ -Werten des längeren Hybrides JK 559, wie dieses im Vergleich zu JK 596 einen höheren Maximaleffekt  $E_{\max}$  (Abb. 4.45 (A)) hervorrufen kann.

## 4.2. Einfluss putativ allosterischer Mutationen des humanen M<sub>1</sub>-Rezeptors auf die Bindungseigenschaften und die Signalwegaktivierung dualsterischer Hybridliganden

In diesem Kapitel wurde erstmals der Einfluss unterschiedlicher Mutationen im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstelle des humanen M<sub>1</sub>-Rezeptors (*hM<sub>1</sub>*), in Bezug auf die Bindung und die Signalwegaktivierung orthosterischer Vollagonisten, wie z.B. Acetylcholin und Iperoxo sowie dualsterischer Hybridliganden untersucht. Zu Beginn wurden vier verschiedene Mutationen ausgewählt, die entweder im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle oder im Bereich des allosterischen Bindungsareals des *hM<sub>1</sub>*-Rezeptors lokalisiert sind. Als orthosterische Mutation diente der Austausch der unter den fünf Subtypen konservierten Aminosäure Tyrosin 106 zu Alanin, die in der Transmembrandomäne III (TM3) lokalisiert ist. Die dieser Mutation in der orthosterischen Bindungsstelle zugrundeliegende Hypothese lautete, dass sie die Bindungsneigung der orthosterischen Hybridligandkomponente Iperoxo reduziert und sich in Folge auch die Fraktion der durch die Hybridliganden bevorzugte dualsterische Bindungspose verändern, bzw. reduzieren würde. Des Weiteren sollte diese Mutation Hinweise über den Einfluss der allosterischen Fragmente auf die Bindung der Hybride an muskarinische *hM<sub>1</sub>*-Rezeptoren geben. Als allosterische Einzelort-Mutationen wurden Rezeptormutanten eingesetzt, die einen Austausch der Aminosäuren Tyrosin 179, Tryptophan 400 und Glutaminsäure 401 zu Alanin aufwiesen. Alle drei dieser Epitope konnten am M<sub>2</sub>-Rezeptor als Aminosäuren identifiziert werden, die an der Bindung „typischer“ allosterischer Modulatoren beteiligt sind (Buller et al. 2002; Voigtlander et al. 2003; Prilla et al. 2006). Ferner sind diese drei Aminosäuren an *hM<sub>1</sub>*-Rezeptoren nachweislich an der Bindung und der Vermittlung von Kooperativität mit orthosterischen Liganden des M<sub>1</sub>-hochselektiven positiv allosterischen Modulators BQCA beteiligt (Ma et al. 2009; Abdul-Ridha et al. 2014a; Abdul-Ridha et al. 2014b). Da es sich bei einigen der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten allosterischen Hybridfragmente um Derivate dieses M<sub>1</sub>-selektiven Liganden handelt (BQCAd), wurden die korrespondierenden *hM<sub>1</sub>*-Rezeptor-Mutationen zur Charakterisierung der dualsterischen Hybridliganden und ihrer allosterischen Bausteine am *hM<sub>1</sub>*-Rezeptor gewählt. Bei Tyrosin 179 handelt es sich um eine nicht zwischen den Subtypen konservierte Aminosäure, die in der zweiten extrazellulären Schleife (ECL2) des M<sub>1</sub>-Rezeptorproteins lokalisiert ist und vermutlich an der Signalwegaktivierung beteiligt ist (Keov et al. 2014). Tryptophan 400 ist eine unter allen fünf Muskarinrezeptorsubtypen konservierte Aminosäure, die im oberen Teil von Transmembrandomäne VII (TM7) lokalisiert ist. Für den muskarinischen M<sub>2</sub>-Rezeptor konnte bereits gezeigt werden, dass diese Mutationen Einfluss auf die Wirksamkeit von Vollagonisten hat (Jager et al. 2007). Des Weiteren ist bekannt, dass diese Aminosäure eine Schlüsselrolle in der prototypischen, allosterischen Gallamin-Bindungsstelle muskarinischer Acetylcholinrezeptoren besitzt (Matsui et al. 1995; Prilla et al. 2006). Die dritte Mutation befindet sich ebenfalls in der Transmembrandomäne VII (TM7) und stellt eine nicht konservierte Aminosäure dar. Ein Merkmal dieser Aminosäure ist ihre negative Ladung, wodurch sie an dieser Position des *hM<sub>1</sub>*-Rezeptors - verglichen mit den anderen vier Rezeptorsubtypen - eine Einzigartigkeit darstellt. Eine Übersicht über die Lokalisation der Aminosäuren findet sich in Abbildung

5.20 (vgl. Kapitel 5.4). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden diese drei Mutationen des  $hM_1$ -Rezeptors als Epitope des putativ allosterischen Bindungsareals bezeichnet. Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mutationen wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Arthur Christopoulos, Monash University, Melbourne, Australien, zur Verfügung gestellt, und lagen bereits stabil transfiziert in einem CHO-Flp-In<sup>TM</sup>-Expressionssystem vor (vgl. 2.6.2.2). In der vorliegenden Arbeit werden diese Zellen im weiteren Verlauf als CHO-Flp- $hM_1$ -wt, CHO-Flp- $M_1^{106}$ Tyr Ala, CHO-Flp- $M_1^{179}$ Tyr Ala, CHO-Flp- $M_1^{400}$ Trp Ala und CHO-Flp- $M_1^{401}$ Glu Ala bezeichnet.

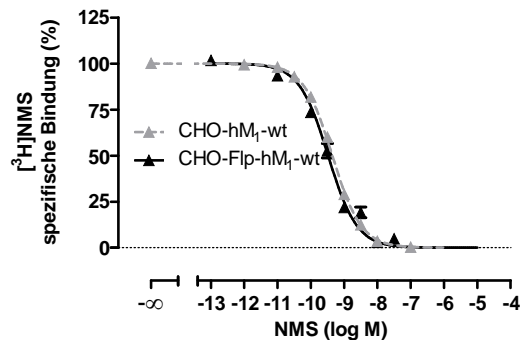
#### 4.2.1 Charakterisierung der [<sup>3</sup>H]NMS-Bindungseigenschaften und der Rezeptorexpression unterschiedlicher CHO-Flp- $hM_1$ -Rezeptormutationen

Vor der weiteren Charakterisierung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten neuen Testsubstanzen sollte der Einfluß verschiedener Punktmutationen der orthosterischen und des putativ allosterischen Bindungsbereiches des humanen muskarinischen  $M_1$ -Rezeptors auf die Bindung des verwendeten Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS untersucht werden. Zur Charakterisierung der [<sup>3</sup>H]NMS-Bindungseigenschaften der jeweiligen Rezeptoren wurden zum einen homologe Konkurrenzexperimente auf deren Basis die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_D$ ) und die Gesamtzahl der Bindungsstellen  $B_{max}$  ermittelt wurden (vgl. Kapitel 3.2.4.1), als auch Dissoziationsexperimente (vgl. Kapitel 3.2.5.2) zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  ( $\text{min}^{-1}$ ) der [<sup>3</sup>H]NMS Dissoziation durchgeführt. Auf Grund einer besseren Vergleichbarkeit zwischen Bindungsdaten und funktionellen Daten wurden alle in dem vorliegenden Kapitel durchgeführten Bindungsexperimente, wie bereits im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben, an lebenden, intakten CHO-Flp-Zellen durchgeführt, die stabil transfiziert waren mit den Rezeptoren  $hM_1$ -wt,  $M_1^{106}$ Tyr Ala,  $M_1^{179}$ Tyr Ala,  $M_1^{400}$ Trp Ala oder  $M_1^{401}$ Glu Ala.

##### 4.2.1.1 Vergleich der zwei stabilen CHO- $hM_1$ -Expressionszelllinien CHO- $hM_1$ -wt und CHO-Flp- $hM_1$ -wt

Um eventuelle Unterschiede bezüglich der  $K_D$ - oder  $B_{max}$ -Werte zwischen den CHO-Flp- $hM_1$ -Zellen und den bereits im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit vorgestellten CHO- $hM_1$ -Zellen (vgl. Kapitel 4.1.1.1) aufdecken zu können, wurden die Ergebnisse der homologen Konkurrenzexperimente mit diesen Zelllinien verglichen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die bereits unter 4.1.1.1 (Abbildung 4.2) gezeigte Mittelwertskurve der an CHO- $hM_1$ -wt-Zellen erhaltenen homologen [<sup>3</sup>H]NMS-Kompetitionen mit in Abbildung 4.46 aufgenommen. Die verwendete Zellzahl lag bei jeweils bei

75.000 Zellen pro Vertiefung. Die Inkubationszeit betrug 3 Stunden bei 28°C. Das Ergebnis der durchgeführten Experimente ist in Abbildung 4.46 dargestellt.



**Abbildung 4. 46: Homologe Konkurrenz zwischen [<sup>3</sup>H]NMS und NMS an Flp-*hM*<sub>1</sub>-wt und *hM*<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren in lebenden CHO-Zellen.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der spezifischen [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Anwesenheit von 10 μM Atropin, 100% entspricht der spezifischen [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des eingesetzten unmarkierten Kompetitors NMS. Die Radioligandkonzentration betrug 0.2 nM, die Inkubationszeit 3h in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28°C. Die Zellzahl betrug 75.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Keine der in Abbildung 4.46 gezeigten Konzentrations-Effekt-Kurven zeigte eine signifikante Abweichung des oberen- bzw. unteren Plateaus von 100% bzw. 0% (F-Test,  $p > 0,05$ ), woraufhin diese Parameter auf den jeweiligen Wert festgesetzt wurden. Das Steilheitsmaß  $n_H$  beider Kurven unterschied sich nicht signifikant von  $n_H = -1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ). Die Parameter  $\log K_D$  und  $B_{max}$  für beide Expressionssysteme sind in Tabelle 4.43 gegenübergestellt. Beide  $\log K_D$ -Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander, ein Befund, der für den *M*<sub>2</sub>-Rezeptor zuvor von A. Kebig in ihrer Arbeit (Kebig, Dissertationsschrift 2010) für die Zelllinien CHO-*M*<sub>2</sub>-wt und CHO-Flp-*M*<sub>2</sub>-wt erhalten wurde (t-Test,  $p > 0,05$ ).

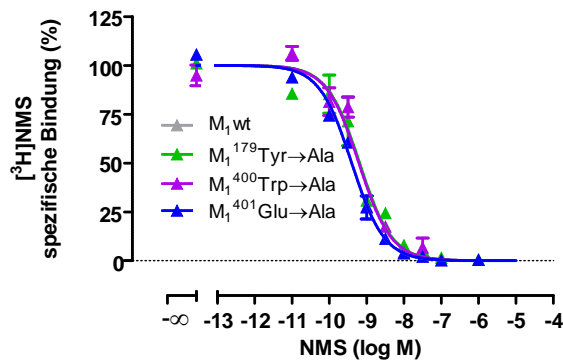
Rezeptor	$\log K_D$	$B_{max}$ (pmol/ml)	$B_{max}$ (Teilchen/Zelle)	n
CHO- <i>hM</i> <sub>1</sub> -wt	-9,72 ± 0,06	0,043 ± 0,004	144000 ± 14800	5
CHO-Flp- <i>hM</i> <sub>1</sub> -wt	-10,10 ± 0,15	0,013 ± 0,002	51800 ± 9520***	4

**Tabelle 4. 43: Kenngrößen der in Abbildung 4.46 dargestellten homologen Konkurrenzen mit [<sup>3</sup>H]NMS an CHO-Flp-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen und CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen.**  $\log K_D$ : Dekadischer Logarithmus der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsdissoziationskonstante.  $B_{max}$ : Anzahl der spezifischen Bindungsstellen für [<sup>3</sup>H]NMS. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. \*\*\*: Wert ist signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße für den *hM*<sub>1</sub>-Wildtyp-Rezeptor (CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt) (t-Test, \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Die ermittelten  $B_{max}$ -Werte sind in Rezeptor/Zelle angegeben, da - wie bereits beschrieben - alle Bindungsexperimente mit ganzen, intakten Zellen und nicht an Membranhomogenaten durchgeführt wurden. Der Vergleich der  $B_{max}$ -Werte zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Expressionssystemen. Die Rezeptorexpression in den CHO-Flp-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen war mit 51800 ± 9520 signifikant geringer, als die Rezeptorexpression in den CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen (144000 ± 14800)(t-Test,  $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften und der Rezeptorexpression unterschiedlicher CHO-Flp-hM<sub>1</sub>-Rezeptormutationen

Zur Prüfung auf mögliche Änderungen in den Bindungseigenschaften für [<sup>3</sup>H]NMS an CHO-Flp-M<sub>1</sub>-Zellen, welche die unter 4.2 beschriebenen Rezeptorpunktmutationen im Bereich der orthosterischen bzw. der allosterischen Bindungsstelle aufwiesen, wurden ebenfalls homologe Konkurrenzexperimente durchgeführt. Die Ergebnisse für die einzelnen Rezeptormutationen sind in Abbildung 4.47 zusammengefasst.



**Abbildung 4. 47: Homologe Konkurrenz zwischen [<sup>3</sup>H]NMS und NMS an CHO-Flp-Zellen, die stabil transfiziert wurden mit dem hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor bzw. hM<sub>1</sub>-Rezeptoren mit unterschiedlichen Punktmutationen im allosterischen Bindungsareal.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der spezifischen [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Anwesenheit von 10 μM Atropin, 100% entspricht der spezifischen [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des eingesetzten unmarkierten Kompetitors NMS. Die Radioligandkonzentration betrug 0.2 nM, die Inkubationszeit 3h in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28°C. Die Zellzahl betrug 75.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Jede der dargestellten Kurven besaß einen „Hillslope“ ( $n_H$ ) nicht unterschiedlich von  $n_H = -1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ), was darauf hindeutete, dass es auch an Rezeptoren mit Punktmutationen in den postulierten allosterischen Bindungsarealen zu einer 1:1 Interaktion zwischen NMS und dem Rezeptorprotein kam. Die Punktmutation M<sub>1</sub><sup>106</sup>Tyr → Ala in der orthosterischen Bindungsstelle zeigte ein so starkes Absinken der Affinität, dass auch nach einer Erhöhung der Radioligand-Konzentration (von 0,2 nM auf 1 oder 2nM) sowie einer Erhöhung der eingesetzten Zellzahl (auf 100.000 oder 150.000 Zellen) keine spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung darstellbar war. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Untersuchungen auf diese M<sub>1</sub>-Mutation verzichtet.

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_D$  und die Gesamtrezeptorzahl  $B_{max}$  für [<sup>3</sup>H]NMS an Rezeptoren, die Mutationen im Bereich des putativ allosterischen Bindungsareals des muskarinischen hM<sub>1</sub>-Rezeptors aufwiesen, sind in Tabelle 4.44 im Vergleich zu den Daten des Rezeptorwildtyps zusammengefasst. Bei einem Vergleich der  $\log K_D$ -Werte fiel auf, dass die Mutation des Epitops Tyrosin 179 zu Alanin eine geringe, aber signifikante Abnahme der Bindungskonstante von NMS ( $\log K_D = -9,05 \pm 0,32$ ) im Vergleich zum Wildtyp Rezeptor ( $\log K_D = -10,1 \pm 0,15$ ) zeigte (t-Test,  $p < 0,05$ ). Eine

ähnliche Tendenz konnte auch S. Prilla in ihrer Arbeit an Membranhomogenaten für den  $hM_2$ -Rezeptor zeigen ( $\log K_D$ :  $M_2$ -wt =  $-10,13 \pm 0,21$  und  $\log K_D$ :  $M_2^{177}\text{Tyr Gln}$  =  $-9,33 \pm 0,20$ ) (Prilla, Dissertationsschrift 2007). Die Bindungskonstanten  $\log K_D$  der Mutationen  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  und  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$  zeigten keine signifikanten Unterschiede gegenüber  $hM_1$ -Wildtyp-Rezeptoren (t-Test,  $p > 0,05$ ).

Rezeptor	$\log K_D$	$B_{\max}$ (pmol/ml)	$B_{\max}$ (Teilchen/Zelle)	n
CHO-Flp- $hM_1$ -wt	$-10,1 \pm 0,15$	$0,013 \pm 0,002$	$51800 \pm 9520^{###}$	4
CHO-Flp- $M_1^{106}\text{Tyr Ala}$	-	-	-	3
CHO-Flp- $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$	$-9,05 \pm 0,32^*$	$0,010 \pm 0,003$	$38900 \pm 11100^{###}$	4
CHO-Flp- $M_1^{400}\text{Trp Ala}$	$-9,43 \pm 0,08$	$0,006 \pm 0,0003$	$17300 \pm 1500^{###}$	3
CHO-Flp- $M_1^{401}\text{Glu Ala}$	$-9,69 \pm 0,10$	$0,004 \pm 0,0004$	$25500 \pm 1290^{###}$	3

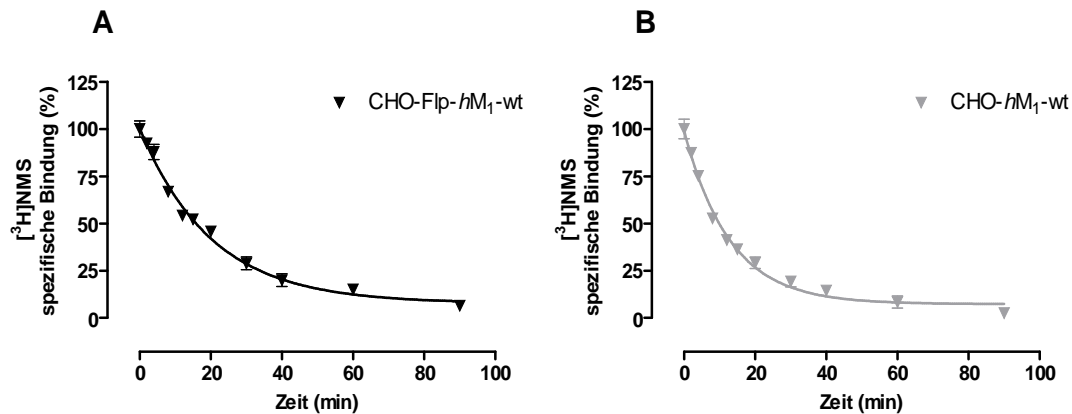
**Tabelle 4. 44: Kenngrößen der in Abbildung 4.47 dargestellten homologen Kompetitionen mit [ $^3\text{H}$ ]NMS an CHO-Flp-Zellen stabil transfiziert mit dem  $hM_1$ -wt-Rezeptor bzw.  $hM_1$ -Rezeptoren mit unterschiedlichen Punktmutationen im allosterischen Bindungsareal.**  $\log K_D$ : Dekadischer Logarithmus der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Gleichgewichtsdissoziationskonstante.  $B_{\max}$ : Anzahl der spezifischen Bindungsstellen für [ $^3\text{H}$ ]NMS. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. \*: Wert signifikant verschieden im Vergleich zur gleichnamigen Kenngröße des CHO-Flp- $hM_1$ -Wildtypes (CHO-Flp- $hM_1$ -wt)(t-Test,  $*p < 0,05$ ). ###: Wert hochsignifikant verschieden zur gleichnamigen Kenngröße des CHO- $hM_1$ -Wildtypes (CHO- $hM_1$ -wt) (t-Test,  $###p < 0,001$ ).

Die Expressionslevel der drei  $M_1$ -Rezeptormutanten variierten deutlich, aber nicht signifikant (*one-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test*,  $p > 0,05$ ) und reichten von  $17300 \pm 1500$  (CHO-Flp- $M_1^{400}\text{Trp Ala}$ ) bis zu  $51800 \pm 9520$  (CHO-Flp- $hM_1$ -wt) Rezeptoren pro Zelle. Die drei CHO-Flp- $M_1$ -Zelllinien mit Punktmutationen im allosterischen Bereich, wiesen wie der CHO-Flp- $hM_1$ -Wildtyprezeptor eine signifikant schwächere Rezeptorexpression auf als die im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit verwendeten CHO- $hM_1$ -wt-Zellen (vgl. Tab. 4.1 und 4.2) (t-Test,  $p < 0,05$ ).

## 4.2.2 Charakterisierung der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Dissoziation von stabil transfizierten muskarinischen $hM_1$ -Rezeptoren in CHO- und CHO-Flp-Zellen

### 4.2.2.1 Vergleich der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Dissoziation von CHO- $hM_1$ -wt-Zellen und CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Zellen

Um etwaige Unterschiede im Zeitverlauf der Dissoziation des Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]NMS von in unterschiedlichen Vektorsystemen stabil transfizierten  $hM_1$ -Rezeptoren aufzudecken, wurden vollständige Dissoziationsexperimente mit den beiden Ziellinien durchgeführt. Wie bereits erwähnt, wurden auch bei diesen Experimenten auf Grund einer besseren Vergleichbarkeit mit den funktionellen Versuchen (vgl. 4.2.5) alle Versuche an lebenden, intakten CHO-Zellen durchgeführt. Wie im Falle der homologen Kompetitionen, wurde auch in den Dissoziationsexperimenten eine Zellzahl von 75.000 Zellen pro Vertiefung verwendet. Das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes mit jeweils einem kompletten Dissoziationsverlauf ist in Abbildung 4.48 dargestellt.



**Abbildung 4. 48: Kinetik der Dissoziation von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  von  $h\text{M}_1\text{-wt}$ -Rezeptoren in CHO- und CHO-Flp-Zellen.** Dargestellt ist das Ergebnis jeweils eines repräsentativen Experimentes. Ordinate: spezifische Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  in %. Abszisse: Zeit in Minuten (min). Die Konzentration des Radioliganden betrug 2,0 nM mit einer Zellzahl von 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28°C. Die Datenpunkte wurden signifikant besser durch einen monophasischen als durch einen biphasischen Dissoziationsverlauf beschrieben (F-Test,  $p > 0,05$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler einer Vierfachbestimmung jeweils eines repräsentativen Experimentes, das zwei bis dreimal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde (vgl. Tab. 4.45).

Beide Expressionssysteme zeigten einen Dissoziationsverlauf des Radioliganden, der in allen Experimenten signifikant besser mit einer monophasischen als mit einer biphasischen Funktion beschrieben werden konnte (F-Test,  $p > 0,05$ ). Die Dissoziationshalbwertszeit der  $h\text{M}_1\text{-wt}$ -Rezeptoren in den CHO-Flp-Zellen lag im Mittel bei  $12,5 \pm 1,5$  Minuten ( $n=3$ ), die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante bei  $k_1 = 0,06 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$  (vgl. Tab. 4.45). Verglichen mit den bereits im ersten Kapitel dieser Arbeit aufgeführten Dissoziationshalbwertszeit der CHO- $h\text{M}_1\text{-wt}$ -Zellen ( $11,3 \pm 1,2$  Min) zeigte sich kein signifikanter Unterschied (t-Test,  $p > 0,05$ ). Somit konnte geschlussfolgert werden, dass in Bezug auf die  $h\text{M}_1\text{-wt}$ -Rezeptor-vermittelte  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation kein Unterschied hinsichtlich der verwendeten Expressionssysteme vorlag (vgl. Tab. 4.45).

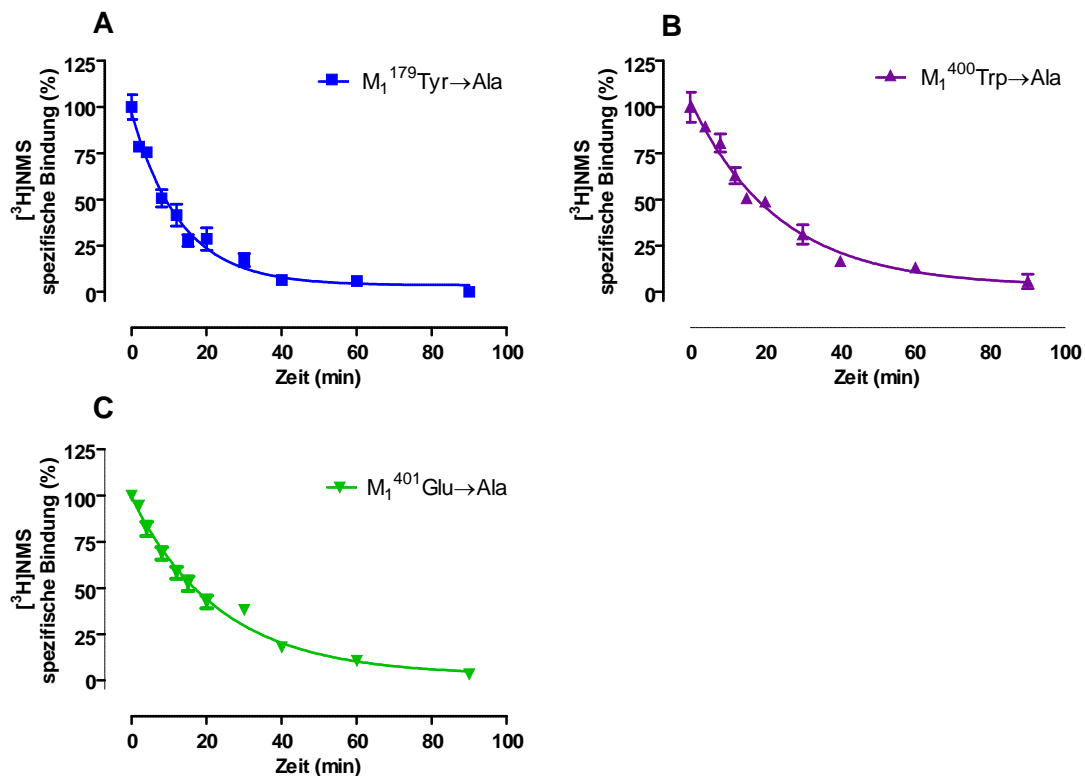
Rezeptor	$t_{0,5, \text{Diss}}$ (min)	$k_1$ ( $\text{min}^{-1}$ )	n
CHO- $h\text{M}_1\text{-wt}$	$11,3 \pm 1,2$	$0,05 \pm 0,003$	4
CHO-Flp- $h\text{M}_1\text{-wt}$	$12,5 \pm 1,5$	$0,06 \pm 0,01$	3

**Tabelle 4. 45: Halbwertszeiten der Dissoziation des Radioliganden  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  von  $h\text{M}_1\text{-wt}$ -Rezeptoren in intakten CHO- und CHO-Flp-Zellen.**  $t_{0,5, \text{Diss}}$ : Halbwertszeit der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation in Minuten (min).  $k_1$ : Geschwindigkeitskonstante der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation ( $\text{min}^{-1}$ ). n: Anzahl der durchgeführten Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

#### 4.2.2.2 Beeinflussung der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation durch Mutation unterschiedlicher Epitope im allosterischen Bindungsareal des $h\text{M}_1$ -Rezeptors

Im Folgenden sollte überprüft werden, welchen Einfluss die Mutation bestimmter konservierter, bzw. nicht konservierter Aminosäuren im potenziell allosterischen Bindungsareal des  $h\text{M}_1$ -Rezeptors auf die  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation ausübt. Die Ergebnisse eines jeweils repräsentativen Ergebnisses einer kompletten Dissoziation sind in Abbildung 4.49 dargestellt. Der Zeitverlauf der Dissoziation aller drei

Rezeptormutationen ließ sich signifikant besser mit Hilfe eines monophasischen als mit einem biphasischen Kurvenverlauf beschreiben (F-Test,  $p > 0,05$ ). Die ermittelten Halbwertszeiten sind in Tabelle 4.46 aufgeführt. Für die  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$ -Rezeptormutante betrug die gemittelte Dissoziationshalbwertszeit  $9,6 \pm 1,3$  Minuten ( $n=3$ ), die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1} = 0,07 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$ . Damit zeigte sich keine signifikante Änderung gegenüber dem  $hM_1\text{-Flp-wt}$ -Rezeptor (t-Test,  $p > 0,05$ ). Eine deutliche Verlängerung und signifikante Zunahme der Dissoziationshalbwertszeit mit  $20,5 \pm 1,6$  Minuten sowie Abnahme der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{-1} = 0,03 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$  zeigte die Rezeptormutation  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  ( $n=3$ ) (t-Test,  $p < 0,05$ ). Dieses Ergebnis zeigt Übereinstimmungen mit der von Matsui et al. (1995) an Membranhomogenaten gefundenen Halbwertszeit von  $21,2 \pm 1,3$  Minuten. Am muskarinischen  $M_2$ -Rezeptorsubtyp zeigte sich bei der korrespondierenden Mutation am  $M_2^{422}\text{Trp Ala}$ -Rezeptor ebenfalls eine Verdopplung der Halbwertszeit (Vogel, Dissertationsschrift 2015).



**Abbildung 4.49: Kinetik der Dissoziation von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  von  $hM_1$ -Rezeptoren mit Punktmutationen im allosterischen Bindungsareal stabil transfizierter CHO-Flp-Zellen.** Dargestellt ist jeweils das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes. Ordinate: Spezifische Bindung von  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  in % des Wertes unter Kontrollbedingungen. Abszisse: Zeit in Minuten (min). Die Konzentration des Radioliganden betrug 2,0 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28°C. Die Datenpunkte wurden signifikant besser durch einen monophasischen als durch einen biphasischen Dissoziationsverlauf beschrieben (F-Test,  $p > 0,05$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler einer Vierfachbestimmung jeweils eines repräsentativen Experimentes, das zweimal mit gleichartigen Ergebnissen wiederholt wurde (vgl. Tab. 4.46).

Die Dritte Mutation  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$  zeigte mit einer Halbwertszeit von  $t_{0,5, \text{Diss}} = 18,2 \pm 1,3 \text{ min}$  ( $n=3$ ) ebenfalls eine deutliche langsamere  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Dissoziation vom Rezeptorprotein im Vergleich zum  $hM_1$ -Wildtyp; der Unterschied von fast 6 Minuten war signifikant (t-Test,  $p < 0,05$ ).



Rezeptor	$t_{0,5, \text{Diss}}$ (min)	$t_{0,5, \text{Diss}}$ (min)	$k_{-1}$ (min <sup>-1</sup> )	n
CHO-Flp- <i>hM</i> <sub>1</sub> -wt	12,5 ± 1,5	-	0,06 ± 0,01	3
CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	9,7 ± 1,4	2,8	0,07 ± 0,01	3
CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	20,6 ± 1,6*	-8,1	0,03 ± 0,003*	3
CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	18,3 ± 1,3*	-5,8	0,04 ± 0,003	3

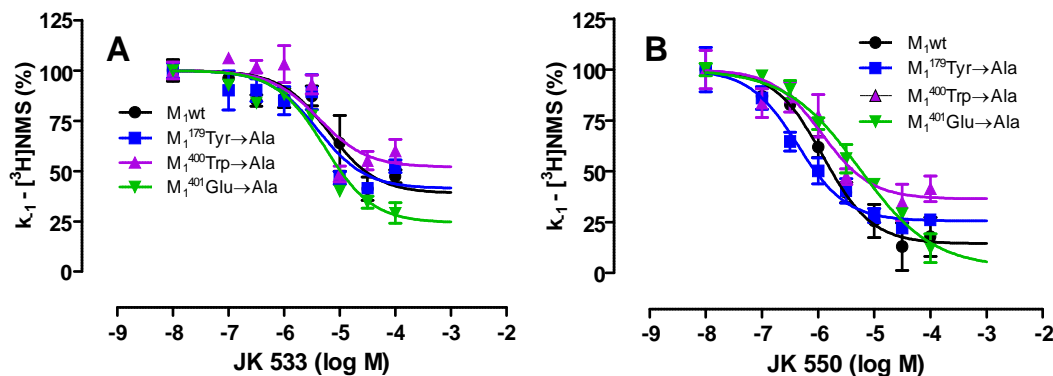
**Tabelle 4. 46: Kenngrößen der Dissoziation des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS von Wildtyp und punktmutierten *hM*<sub>1</sub>-Rezeptoren in CHO-Flp-Zellen.**  $t_{0,5, \text{Diss}}$ : Halbwertszeit der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation in Minuten.  $t_{0,5, \text{Diss}}$ : Differenz zwischen Wildtyp (wt) und der jeweiligen Rezeptormutante.  $k_{-1}$ : Geschwindigkeitskonstante der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation (min<sup>-1</sup>). n: Anzahl der durchgeführten Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurde. \*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße für den CHO-Flp-M<sub>1</sub>-wt-Rezeptor (t-Test, p<0,05).

#### 4.2.3 Einfluss von Rezeptormutationen im putativ allosterischen Bindungsareal des *hM*<sub>1</sub>-Rezeptors auf die Eigenschaften dualsterischer Hybridliganden und ihrer allosterischen Bausteine die [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation zu verzögern

Dualsterische Hybridliganden sind in der Lage in zwei unterschiedlichen Orientierungen mit dem Rezeptorprotein zu interagieren: in der dualsterischen Pose, in dem sich das Hybrid mit seinem orthosterischen Baustein an der orthosterischen und mit seinem allosterischen Baustein im Bereich der allosterischen Bindungsstelle bindet und in der allosterischen Pose, in der nur der allosterische Baustein mit der allosterischen Bindungsstelle interagiert (Antony et al. 2009; Mohr et al. 2010; Valant et al. 2012; Bock et al. 2014a; Bock et al. 2016). Um einen genaueren Einblick in das Bindungsverhalten dualsterischen Hybridliganden (Substanzserie 1)(2.11.5) sowie der hierzu gehörenden allosterischen Bausteine zu erhalten, wurde der Einfluss allosterischer Rezeptormutationen auf die Eigenschaften von zwei ausgewählten dualsterischen Hybridliganden, die Dissoziation von [<sup>3</sup>H]NMS zu verzögern, erstmalig untersucht. Aufgrund eines sogenannten Umklappmechanismus („*Flip-Flop*“ Mechanismus, Bock et al. 2014a), der im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit für das Hybridpaar JK 550 und JK 537 detektiert werden konnte (vgl. 4.1.3.2 und 4.1.9.1)(Chen, Klöckner und Holze et al. 2015), schien es interessant, sich auf dieses Paar dualsterischer Hybridliganden zu fokussieren. Beide Hybride verfügen über die gleiche Fluorsubstitution im allosterischen Baustein, unterscheiden sich jedoch durch die Zwischenkette, die das allosterische und das orthosterische Fragment miteinander verbindet. Im Falle von JK 550 liegt eine Zwischenkette aus vier Kohlenstoffatomen vor (C<sub>4</sub>), das Hybrid JK 537 verfügt dagegen über eine zwei Kohlenstoffatom längere C<sub>6</sub>-Zwischenkette.

Im Rahmen dieser Dissoziationsexperimente stellte sich zum einen die Frage, ob und welchen Einfluß die Mutationen der allosterischen Rezeptorepitope auf die Hybridbindung in der rein allosterischen Bindungspose und auf die Bindung der allosterischen Fragmente nehmen. Zum anderen erschien es interessant zu untersuchen, ob die Hybride sowie ihre allosterischen Fragmente eine ähnliche Epitopabhängigkeit aufwiesen, wie bereits bekannte allosterische Modulatoren des M<sub>1</sub>-Rezeptors (Ma et al. 2009; Abdul-Ridha et al. 2014a; Abdul-Ridha et al. 2014b).

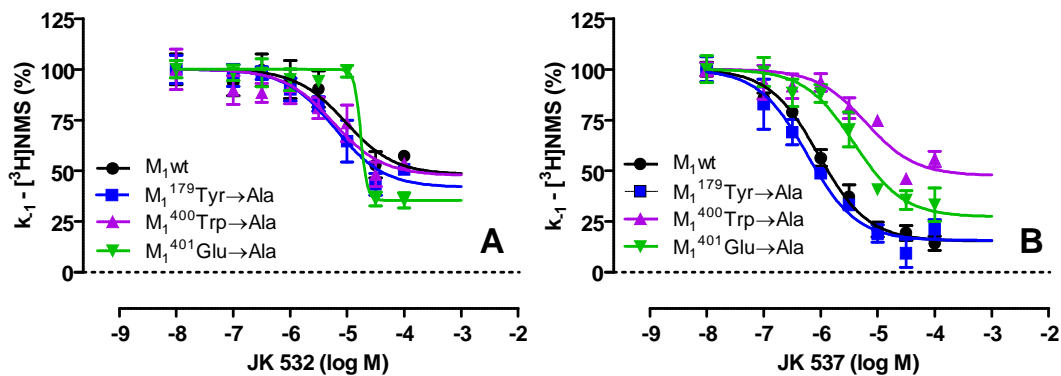
Als Maß für die Affinität der dualsterischen Hybridsubstanzen zu mit [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten Rezeptoren dienten „Drei-Punkt“-kinetische Experimente mit deren Hilfe der  $\log\text{EC}_{0,5, \text{Diss}}$ -Wert bestimmt werden konnte (vgl. 3.2.5.2). Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven des dualsterischen Liganden JK 550 ( $\text{C}_4$ ) sowie des dazugehörigen allosterischen Bausteins JK 533 ( $\text{C}_4$ ) für die Verminderung der [ $^3\text{H}$ ]NMS Dissoziation sind in Abbildung 4.50 dargestellt. Die pharmakologischen Kenngrößen des jeweiligen dualsterischen Liganden sowie seines allosterischen Fragmentes sind in Tabelle 4.47 aufgeführt. Das allosterische Fragment JK 533 ( $\text{C}_4$ ) des dualsterischen Liganden JK 550 ( $\text{C}_4$ ) zeigte bei keiner der untersuchten Mutation der putativ allosterischen Bindungsstelle des  $h\text{M}_1$ -Rezeptors einen Affinitätsverlust gegenüber  $h\text{M}_1$ -Wildtyprezeptoren (t-Test,  $p > 0,05$ ). Der Austausch der Aminosäure  $\text{M}_1^{400}\text{Trp}$  Ala führte zu einem erkennbaren Anstieg des unteren Plateaus (von  $39 \pm 7\%$   $h\text{M}_1$ -wt zu  $52 \pm 5\%$   $\text{M}_1^{400}\text{Trp}$  Ala), wohingegen der Austausch der Aminosäure  $^{401}\text{Glu}$  Ala zu einem deutlichen Abfall des unteren Plateaus führte (von  $39 \pm 7\%$   $h\text{M}_1$ -wt zu  $24 \pm 3\%$ ). Auf Grund des hohen Standardfehler erwiesen sich diese Ergebnisse jedoch als nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ). Die Kurvensteilheit aller vier in Abbildung 4.50 (A) gezeigter Hybridkurven war nicht signifikant verschieden von  $n_{\text{H}} = -1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4. 50: Interaktion von JK 533 (allosterisches Fragment) und JK 550 (dualsterisches Hybrid) mit den aufgeführten orthosterisch durch [ $^3\text{H}$ ]NMS-besetzten  $h\text{M}_1$ -Rezeptoren mit Punktmutationen im Bereich des putativ allosterischen Bindungsareal.** Ordinate: Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Dissoziation in % des Werte in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug 2,0 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28 °C. Kurvenanpassung: Die nichtlineare Datenanalyse erfolgt mit Hilfe einer „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Das dualsterische Hybrid JK 550, welches über eine C<sub>4</sub>-Zwischenkette verfügt, zeigte ebenfalls bei keiner der untersuchten Mutationen einen signifikanten Unterschied im logEC<sub>0,5, Diss</sub> Wert am [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptor im Vergleich zum hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor (vgl. Tabelle 4.47) (t-Test, p>0,05). Das untere Kurvenplateau der Kurve für die Rezeptormutation M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala war nicht verschieden von Null (t-Test, p>0,05). Wie bereits für seinen Baustein JK 533 beobachtet, kam es auch bei dem dualsterischen Hybrid JK 550 an der Mutation M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala zu einem Anstieg des unteren Plateaus (von 14 ± 4 % 5 auf 36 ± 6%) im Vergleich zum hM<sub>1</sub>-Wildtyp-Rezeptor, der im Gegensatz zu dem des allosterischen Fragmentes signifikant war (t-Test, p<0,05). Mit Ausnahme der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala (n<sub>H</sub> = -0,67 ± 0,11) konnten alle Kurven signifikant besser mit einer Kurvensteilheit von n<sub>H</sub> = -1 beschrieben werden (F-Test, p<0,05).

Die Ergebnisse für das dualsterische Hybrid JK 537, welches über eine C<sub>6</sub> Zwischenkette verfügt, sowie des zugehörigen allosterischen Fragmentes JK 532 sind in Abbildung 4.51, bzw. Tabelle 4.47 gegenübergestellt. Wie bereits für das kürzere allosterische Fragment JK 533 (C<sub>4</sub>) gezeigt (vgl. Abb. 4.50 (A)), waren auch für das um zwei C-Atome verlängerte Fragment JK 532 (C<sub>6</sub>) keine signifikanten Unterschiede zwischen den logEC<sub>0,5, Diss</sub>-Werten der untersuchten Punktmutationen in der putativ allosterischen Bindungsstelle feststellbar. Das untere Plateau der vier für JK 532 (C<sub>6</sub>) in Abbildung 4.51 (A) gezeigten Kurven unterschied sich nicht signifikant von derjenigen für den hM<sub>1</sub>-Wildtyp (t-Test, p>0,05). Alle in Abbildung 4.51 gezeigten Kurven mit Ausnahme derjenigen für M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala (n<sub>H</sub> = -7,62 ± 8,61) zeigten eine Kurvensteilheit nicht unterschiedlich von n<sub>H</sub> = -1,00 (F-Test, p>0,05).



**Abbildung 4. 51: Interaktion von JK 532 (allosterisches Fragment) und JK 537 (dualsterisches Hybrid) mit den aufgeführten orthosterisch durch [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten hM<sub>1</sub>-Rezeptoren mit Punktmutationen im Bereich des putativ allosterischen Bindungsareal.** Ordinate: Geschwindigkeitskonstante k<sub>1</sub> der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation in % des Werte in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug 2,0 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28 °C. Kurvenanpassung: Die nichtlineare Datenanalyse erfolgt mit Hilfe einer „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Das dualsterische Hybrid JK 537 (C<sub>6</sub>) zeigt im Gegensatz zu seinem kürzeren Fragment JK 550 (C<sub>4</sub>) hinsichtlich der EC<sub>0,5, Diss</sub> Werte an den untersuchten [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptoren einige signifikante Unterschiede (Abbildung 4.51 (B)). Verglichen mit dem Wildtyp-Rezeptor (logEC<sub>0,5, Diss</sub> = -6,03 ± 0,06) waren die logEC<sub>0,5, Diss</sub>-Werte der beiden Punktmutationen M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala (logEC<sub>0,5, Diss</sub> = -5,21 ± 0,17) und M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala (logEC<sub>0,5, Diss</sub> = -5,42 ± 0,14) signifikant größer (Tabelle 4.47); dieser Befund spricht für eine Beteiligung dieser Aminosäuren an der Rezeptorinteraktion in der allosterischen Bindungspose von JK 537. Zusätzlich zeigte sich eine signifikante Zunahme des unteren Plateaus in Gegenwart der Mutation M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala (48 ± 5%) im Sinne einer Abnahme seiner maximalen dissoziationsverzögernden Wirkung, verglichen mit dem hM<sub>1</sub>-Wildtyp.

Substanz	Rezeptor	Unteres Plateau (%)	logEC <sub>0,5, Diss</sub>	log EC <sub>0,5, Diss</sub>	k <sub>-1</sub> (min <sup>-1</sup> )	n <sub>H</sub>	n
<b>JK 533</b> (AF/C <sub>4</sub> )	M <sub>1</sub> -wt	39 ± 7	-5,20 ± 0,18 <sup>§</sup>	-	0,07 ± 0,01	= -1,00	4
	M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	41 ± 6	-5,40 ± 0,20	0,20	0,09 ± 0,01	= -1,00	3
	M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	52 ± 5	-5,37 ± 0,24	0,17	0,04 ± 0,01	= -1,00	3
	M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	24 ± 3	-5,28 ± 0,09	0,08	0,04 ± 0,004 <sup>*</sup>	= -1,00	4
<b>JK 550</b> (DH/C <sub>4</sub> )	M <sub>1</sub> -wt	14 ± 4	-5,91 ± 0,11	-	0,07 ± 0,01	= -1,00	3
	M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	26 ± 3	-6,36 ± 0,10 <sup>§</sup>	0,45	0,09 ± 0,01	= -1,00	3
	M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	36 ± 6 <sup>*</sup>	-5,93 ± 0,18	0,02	0,05 ± 0,002	= -1,00	4
	M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	3 ± 10	-5,26 ± 0,19	-0,65	0,04 ± 0,002 <sup>*</sup>	-0,67 ± 0,11	3
<b>JK 532</b> (AF/C <sub>6</sub> )	M <sub>1</sub> -wt	48 ± 9	-5,03 ± 0,31	-	0,06 ± 0,01	= -1,00	4
	M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	42 ± 6	-5,22 ± 0,17	0,19	0,08 ± 0,01	= -1,00	5
	M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	48 ± 7	-5,25 ± 0,22	0,22	0,05 ± 0,002	= -1,00	4
	M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	35 ± 7	-4,76 ± 0,28	-0,27	0,04 ± 0,004	-7,62 ± 8,61	3
<b>JK 537</b> (DH/C <sub>6</sub> )	M <sub>1</sub> -wt	15 ± 2	-6,03 ± 0,06 <sup>§</sup>	-	0,08 ± 0,01	= -1,00	4
	M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	16 ± 4	-6,23 ± 0,10 <sup>§§§</sup>	0,20	0,10 ± 0,01	= -1,00	3
	M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	48 ± 5 <sup>**</sup>	-5,21 ± 0,17 <sup>**</sup>	-0,82	0,05 ± 0,01	= -1,00	3
	M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	27 ± 6	-5,42 ± 0,14 <sup>*</sup>	-0,61	0,04 ± 0,004 <sup>**</sup>	= -1,00	4

**Tabelle 4. 47: Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.50 und 4.51 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven.** AF: allosterisches Fragment plus Zwischenkette. DH: dualsterisches Hybrid. logEC<sub>0,5, Diss</sub>: Dekadischer Logarithmus derjenigen Konzentration der Testsubstanz, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation führt. logEC<sub>0,5, Diss</sub>: Differenz zwischen dem logEC<sub>0,5, Diss</sub>-Wert an der jeweiligen M<sub>1</sub>-Rezeptormutante und dem logEC<sub>0,5, Diss</sub>-Wert am hM<sub>1</sub>-Wildtyprezeptor. K<sub>-1</sub>: Geschwindigkeitskonstante der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation (min<sup>-1</sup>). n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl durchgeführter Versuche. Dargestellt sind die Datenpunkte als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer "Vier-Parameter-logistischen-Gleichung" (Gleichung 12).\*,\*\*,: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des CHO-Flp-hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptors (t-Test, \*p<0,05, \*\*p<0,01); §: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des jeweiligen allosterischen Fragmentes (t-Test, §p<0,05, §§§p<0,001).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ein Austausch der Aminosäure  $M_1^{179}\text{Tyr}$  Ala weder die Bindung der allosterischen Fragmente, noch die der dualsterischen Hybride zu NMS besetzten  $M_1$ -Rezeptoren ändert. Ebenfalls lässt sich feststellen, dass eine annähernd vollständige Dissoziationshemmung nur in Gegenwart der Mutation  $M_1^{401}\text{Glu}$  Ala im Falle des dualsterischen Hybridliganden JK 550 ( $C_4$ ) zu beobachten ist. Ein kompletter Verlust der Bindungsneigung der untersuchten Substanzen konnte bei keiner der Mutationen detektiert werden.

#### **4.2.4 Einfluss putativer allosterischer Punktmutationen auf die [ $^3\text{H}$ ]NMS-Gleichgewichtsbindung dualsterischer Hybridliganden am muskarinischen $hM_1$ -Rezeptor**

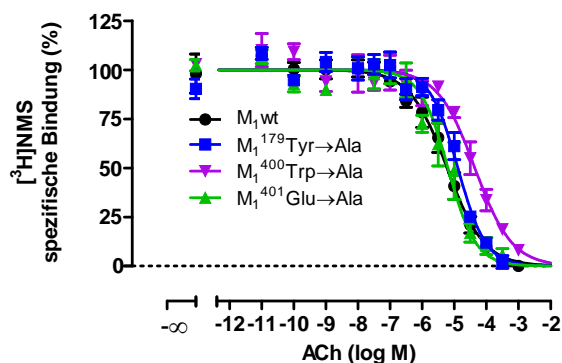
Ein Ziel dieser Arbeit war es, einen Einblick sowohl in die Bindungsorientierung als auch in die Bindungstopographie der zu untersuchenden dualsterischen Hybridliganden zu erhalten. Wie bereits in Kapitel 4.1 der vorliegenden Arbeit gezeigt, konnten mit Hilfe von Daten aus Radioligand-Bindungsuntersuchungen Einblicke in die bevorzugte Bindungspose der unterschiedlichen Substanzen getroffen werden (vgl. 4.1.3 und 4.1.9). Mit Hilfe der zur Verfügung stehenden CHO-Flp- $hM_1$ -Rezeptor-Mutanten sollte erstmals Erkenntnis darüber erlangt werden, welche Epitope die dualsterischen Hybridliganden für ihre Interaktion mit dem CHO- $hM_1$ -Rezeptorprotein nutzen. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob sich durch unterschiedliche Mutationen im allosterischen Bereich des  $hM_1$ -Rezeptors eine Änderung der Bindungspose der Hybride feststellen lässt, um so eine Erkenntnis über die an der Bindungsorientierung beteiligten Aminosäuren zu erhalten. Zur Erlangung dieser Informationen wurden Bindungsexperimente mit dem Radioantagonisten [ $^3\text{H}$ ]NMS an lebenden, intakten Zellen unter Gleichgewichtsbedingungen durchgeführt. Da bekannt war, dass Mutationen an korrespondierenden Aminosäuren des  $hM_2$ -Rezeptors zu erheblichen Affinitätsverlusten orthosterischer Agonisten führen, wurden neben den dualsterischen Hybridliganden JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) ebenfalls der endogene Vollagonist Acetylcholin, sowie der Vollagonist Iperoxo an den drei CHO-Flp- $hM_1$ -Mutanten untersucht.

##### **4.2.4.1 Einfluss putativ allosterischer Punktmutationen auf das Bindungsverhalten muskarinischer Agonisten am muskarinischen $hM_1$ -Rezeptor**

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei Acetylcholin um den endogenen Neurotransmitter muskarinischer Acetylcholinrezeptoren, der bekannterweise die orthosterische Bindungsstelle des Rezeptorproteins nutzt (Wess 1996). Diese orthosterische Bindungsstelle ist unter den fünf Subtypen stark konserviert und wird im oberen Drittel der transmembranären helikalen Bündel des Rezeptorproteins postuliert (Hulme 1990). Die unter den fünf Subtypen konservierte Aminosäure  $M_1^{400}\text{Trp}$  konnte bereits an  $M_2$  ( $M_2^{422}\text{Trp}$ ) und  $M_5$  ( $M_5^{477}\text{Trp}$ )-Rezeptoren als wichtiges Bindungsepitop

für allosterische Modulatoren identifiziert werden (Prilla et al. 2006). Des Weiteren wurde diese Aminosäure, sowohl am  $M_2$ - als auch am  $M_3$ -Rezeptor als affinitätsgebende Aminosäure für unterschiedliche orthosterische Vollagonisten identifiziert (Jager et al. 2007; Li et al. 2007). Die besondere Lage dieser Aminosäure in einem Übergangsbereich zwischen orthosterischer und allosterischer Bindungsdomäne (Jager et al. 2007; Kruse et al. 2013) hat somit einen großen Einfluss auf die Bindung unterschiedlicher Liganden. Aus diesem Grund sollte nachfolgend zunächst untersucht werden, welchen Einfluss die putativ allosterischen Mutationen auf das Bindungsverhalten von Acetylcholin und Iperoxo in heterologen Konkurrenzexperimenten aufweisen.

Die Substitution der Aminosäuren Tryptophan 400 und Glutaminsäure 401 durch die aliphatische Aminosäure Alanin führte in beiden Fällen zu einer signifikanten Reduktion der Bindungsneigung von Acetylcholin zum entsprechenden Rezeptorprotein (vgl. Abb. 4.52). Die Mutation  $M_1^{400}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$  führte mit einem  $\log K_{\text{Iapp}}$ -Wert von  $-4,53 \pm 0,10$  zu einer 16-fach, die Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$  ( $\log K_{\text{I}}: -4,89 \pm 0,08$ ) zu einer 7-fach reduzierten Bindungsneigung verglichen mit dem Wildtyprezeptor ( $\log K_{\text{Iapp}}: -5,73 \pm 0,17$ ) (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Mutation  $M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$  wies mit einem  $\log K_{\text{I}}$ -Wert von  $-5,33 \pm 0,27$  dagegen keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyprezeptor auf (t-Test,  $p > 0,05$ ). Vergleichbare Änderungen der Bindungsneigung des orthosterischen Agonisten Acetylcholin konnte von Antony und Mitarbeitern (2009) für Mutationen am  $hM_2$ -Rezeptorsubtyp und durch L. Vogel (Vogel, Dissertationsschrift 2015) am  $hM_3$ -Rezeptorsubtyp gezeigt werden.



**Abbildung 4.52: Bedeutung unterschiedlicher Punktmutationen in allosterischen Epitopen des  $hM_1$ -Rezeptors auf die Gleichgewichtsbindung des endogenen Vollagonisten Acetylcholin.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  in Prozent des Wertes in Abwesenheit von Acetylcholin. 0% entspricht der unspezifischen  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Anwesenheit von Atropin  $10 \mu\text{M}$ , 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des eingesetzten Agonisten (ACh). Die Radioligandkonzentration betrug  $0,2 \text{ nM}$ , die Zellzahl  $75.000$  Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES ( $20 \text{ mM}$ ) Puffer (L14),  $\text{pH } 7,4$ ,  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Die Kurvensteilheit ( $n_{\text{H}}$ ) der Inhibitionskurve von ACh war sowohl am Wildtyp als auch in Gegenwart der Mutation  $M_1^{400}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$  signifikant flacher, im Sinne von  $n_{\text{H}} > -1$  (F-Test,  $p < 0,05$ ). Dieses Phänomen konnte auch L. Vogel (2015) in ihrer Dissertationsschrift an ganzen, intakten Zellen sowohl

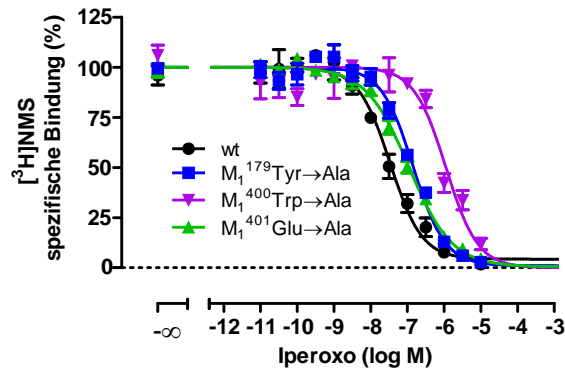
für den muskarinischen  $hM_3$ -Rezeptorwildtyp als auch für  $M_3^{526}\text{Trp Ala}$ , der zu  $M_1^{400}\text{Tyr Ala}$  korrespondierenden Mutation des  $hM_3$ -Rezeptors zeigen. In der Datenanalyse „flacher“ Kurven (mit  $n_H > -1$ ) wurden zum Zwecke der Vergleichbarkeit apparente Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_{I/app}$ - anstelle von  $K_I$ -Werten berechnet (vgl. Tab. 4.48).

Substanz	Rezeptor	$\log K_{I/app}$	$\log K_{I/app}$	$n_H$	n
ACh	$M_1$ -wt	$-5,73 \pm 0,17$	-	$-0,75 \pm 0,07^\#$	3
	$M_1^{179}\text{Tyr Ala}$	$-4,89 \pm 0,08^{**}$	0,84	$=-1,00$	4
	$M_1^{400}\text{Trp Ala}$	$-4,53 \pm 0,10^{**}$	1,20	$-0,75 \pm 0,09^\#$	3
	$M_1^{401}\text{Glu Ala}$	$-5,33 \pm 0,27$	0,40	$=-1,00$	4

**Tabelle 4. 48: Kenngrößen der in Abbildung 4.52 dargestellten Bindungskurven.**  $\log K_{I/app}$ : dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsinhibitionskonstante  $K_I$  ( $K_{I/app}$  bei von  $n_H = -1$  abweichender Kurvensteilheit) der Testsubstanz, (vgl. 3.2.4.1, Gl. 8)  $\log K_I$ : Differenz zwischen dem  $\log K_I$ -Wert von ACh für die jeweilige  $M_1$ -Rezeptormutante und seinem  $\log K_I$ -Wert am  $hM_1$ -Wildtyprezeptor.  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl der durchgeführten Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*: Wert hochsignifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Rezeptors (t-Test,  $**p < 0,01$ ); #: Wert signifikant verschieden von  $n_H = -1$  (F-Test,  $^\#p < 0,05$ ).

#### 4.2.4.2 Einfluss putativ allosterischer Punktmutationen auf die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Agonisten Iperoxo am muskarinischen $hM_1$ -Rezeptor

Neben dem endogenen Neurotransmitter ACh, sollte auch der orthosterische Agonist Iperoxo erstmals hinsichtlich seines Bindungsverhalten an  $hM_1$ -Rezeptoren, die putativ allosterische Punktmutationen aufwiesen, untersucht werden. Da es sich, wie bereits erwähnt, bei Iperoxo um den orthosterischen Baustein der zu untersuchenden Hybride (JK 550, JK 537)(vgl. Abb. 4.1) handelte und Iperoxo damit eine entscheidende Rolle bei der Bindung der Hybride einnimmt, war es in Hinblick auf die Untersuchung der Bindungstopographie unerlässlich, seine Bindungseigenschaften zu untersuchen. In Abbildung 4.53 sind die Kurven für die Inhibition der  $[^3\text{H}]$ NMS Bindung durch Iperoxo, die an den drei  $M_1$ -Mutationen erhoben wurden, derjenigen am Wildtyp gegenübergestellt. Die zu den Kurven gehörenden Kenngrößen sind in Tabelle 4.49 aufgeführt.



**Abbildung 4.53: Bedeutung unterschiedlicher Punktmutationen in allosterischen Epitopen des  $hM_1$ -Rezeptors auf die Gleichgewichtsbindung des Vollagonisten Iperoxo.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden  $[^3H]NMS$  in Prozent des Wertes in Abwesenheit von Acetylcholin. 0% entspricht der unspezifischen  $[^3H]NMS$ -Bindung in Anwesenheit von Atropin 10  $\mu M$ , 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des eingesetzten Agonisten (Iperoxo). Die Radioligandkonzentration betrug 0,2 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28 °C. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Deutlich zu erkennen war die signifikante Abnahme der Bindungsneigung des orthosterischen Agonisten Iperoxo auf Grund von Mutationen im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstelle.  $M_1^{179}Tyr \rightarrow Ala$  ( $\log K_{I/app} = -6,91 \pm 0,02$ ) und  $M_1^{401}Glu \rightarrow Ala$  ( $\log K_{I/app} = -7,21 \pm 0,04$ ) zeigen beim Austausch der jeweiligen Aminosäure gegen die aliphatische Aminosäure Alanin eine signifikante Rechtsverschiebung des Wendepunktes und damit eine signifikante Abnahme der Bindungsneigung im Vergleich zum  $hM_1$ -wt Rezeptor ( $\log K_I = -7,92 \pm 0,07$ ). Die Entfernung des aromatischen Ringsystems und sein Ersatz durch eine Methylgruppe in der Mutation  $M_1^{400}Trp \rightarrow Ala$  ( $\log K_I = -6,11 \pm 0,04$ ) bewirkte sogar einen Affinitätsverlust um den Faktor 65 (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Kurvensteilheit konnte mit Ausnahme von  $M_1^{401}Glu \rightarrow Ala$  ( $n_H = -0,73 \pm 0,03$ ) immer mit  $n_H = -1$  beschrieben werden (F-Test,  $p < 0,05$ ).

Substanz	Rezeptor	$\log K_{I/app}$	$\log K_{I/app}$	$n_H$	n
Iperoxo	$M_1$ -wt	$-7,92 \pm 0,07$	-	$-1,00$	3
	$M_1^{179}Tyr \rightarrow Ala$	$-6,91 \pm 0,02^{***}$	1,01	$-1,00$	4
	$M_1^{400}Trp \rightarrow Ala$	$-6,11 \pm 0,04^{***}$	1,81	$-1,00$	3
	$M_1^{401}Glu \rightarrow Ala$	$-7,21 \pm 0,04^{***}$	0,71	$-0,73 \pm 0,03^{\#}$	4

**Tabelle 4.49: Kenngrößen der in Abbildung 4.53 dargestellten Bindungskurven.**  $\log K_{I/app}$ : dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsinhibitionskonstante  $K_I$  ( $K_{I/app}$  bei von  $n_H = -1$  abweichender Kurvensteilheit) der Testsubstanz, (vgl. 3.2.4.1, Gl. 8)  $\log K_I$ : Differenz zwischen dem  $\log K_I$ -Wert von ACh für die jeweilige  $hM_1$ -Rezeptormutante und seinem  $\log K_I$ -Wert am  $hM_1$ -Wildtyprezeptor.  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl der durchgeführten Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*\*: Wert hochsignifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Rezeptors (t-Test,  $***p < 0,001$ ); #: Wert signifikant verschieden von  $n_H = -1$  (F-test,  $^{\#}p < 0,05$ ).



Schlussfolgernd konnte für den muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptorsubtyp gezeigt werden, dass die Aminosäuren  $M_1^{179}$ Tyrosin,  $M_1^{400}$ Tryptophan und  $M_1^{401}$ Glutaminsäure nicht nur eine Bedeutung für die Bindung allosterischer Modulatoren haben, sondern auch die Bindung orthosterischer Liganden beeinflussen können.

#### ***4.2.4.3 Einfluss putativer allosterischer Punktmutationen auf die Gleichgewichtsbindung der dualsterischen Hybridliganden JK 550 ( $C_4$ ), JK 537 ( $C_6$ ) und ihrer allosterischer Fragmente JK 533 ( $C_4$ ), JK 532 ( $C_6$ )***

Dualsterische Hybridliganden sind dadurch gekennzeichnet, dass sie über zwei verschiedene Pharmakophore verfügen: ein allosterisches und ein orthosterisches Pharmakophor, die über eine unterschiedlich lange Zwischenkette verbunden sind (Disingrini et al. 2006, Steinfeld et al. 2007; Antony et al. 2009; Valant et al. 2012b). Die im Rahmen dieser Substanzserie (vgl. 2.11.5) getesteten dualsterischen Hybridliganden verfügen über ein allosterisches Pharmakophor, welches sich von dem hoch selektiven, positiv allosterischen Modulator BQCA ableitet. In vorangegangenen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Aminosäure  $M_1^{400}$ Trp die einzige Aminosäure in der postulierten BQCA-Bindungsstelle ist, die zu einem völligen Verlust der Fähigkeit von BQCA führt, die Funktion als auch die Ligandbindung an  $M_1$ -Rezeptoren zu modulieren (Ma et al. 2009; Abdul-Ridha et al. 2014b). Leider zeigt BQCA eine sehr geringe Affinität zum freien  $hM_1$ -Rezeptor, aber eine bemerkenswert hohe Kooperativität mit ACh (Ma et al. 2009; Canals et al. 2012; Abdul-Ridha et al. 2013). Auf Grund der schlechten Löslichkeit und der geringen Bindungsneigung, fällt es schwer, eine Reduktion der Affinität an den unterschiedlichen Mutationen zu erfassen (Abdul-Ridha et al. 2014b). Da die beiden allosterischen Fragmente JK 533 ( $C_4$ ) und JK532 ( $C_6$ ) eine höhere Affinität als ihre Muttersubstanz BQCA (Ma et al. 2009) zum freien  $hM_1$ -Rezeptor aufweisen, erschien es durchführbar und interessant, die Auswirkungen der unterschiedlichen Mutationen der allosterischen Bindungsstelle auf ihre [ $^3$ H]NMS-Gleichgewichtsbindung näher zu untersuchen. Für beide allosterischen Fragmente JK 533 ( $C_4$ ) und JK 532 ( $C_6$ ) sowie für die zugehörigen dualsterischen Hybride JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) konnte bereits eine dissoziationsverzögernde Wirkung gezeigt werden (vgl. 4.2.3), die ihre Interaktion mit einer allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptor unterstreicht. Weiterhin konnte im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt werden, dass die beiden Hybridliganden am  $hM_1$ -Rezeptor in der Lage sind, in zwei unterschiedlichen Orientierungen mit dem Rezeptorprotein zu interagieren. Mit Hilfe der CHO- $M_1$ -Mutationen  $M_1^{179}$ Tyr Ala,  $M_1^{400}$ Trp Ala und  $M_1^{401}$ Glu Ala sollte erstmalig untersucht werden, inwieweit diese drei Aminosäuren zur Affinität, bzw. Bindungsneigung der dualsterischen Hybride sowie ihrer allosterischen Fragmente zum orthosterisch unbesetzten  $hM_1$ -Rezeptor beitragen. Neben dem Einfluss auf die Affinität sollte ebenfalls der Einfluss der drei mutierten Aminosäuren auf die Bindungsorientierung und die damit verbundene maximale, fraktionelle Rezeptorbesetzung bestimmt werden. Darüber hinaus sollte geklärt werden, ob Richtung und Ausmaß

der Kooperativität mit [<sup>3</sup>H]NMS sowohl der allosterischen Fragmente, als auch der dualsterischen Hybridliganden von bestimmten Epitopen des Rezeptors abhängig sind.

Für diese Fragestellung wurden wie in den Experimenten zuvor Gleichgewichts-Bindungsexperimente mit [<sup>3</sup>H]NMS mittels ganzer, intakter Zellen durchgeführt. Die Auswertung der Bindungsdaten erfolgte analog den im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit erläuterten Modellen (vgl. 3.2.4.2, 4.1.3).

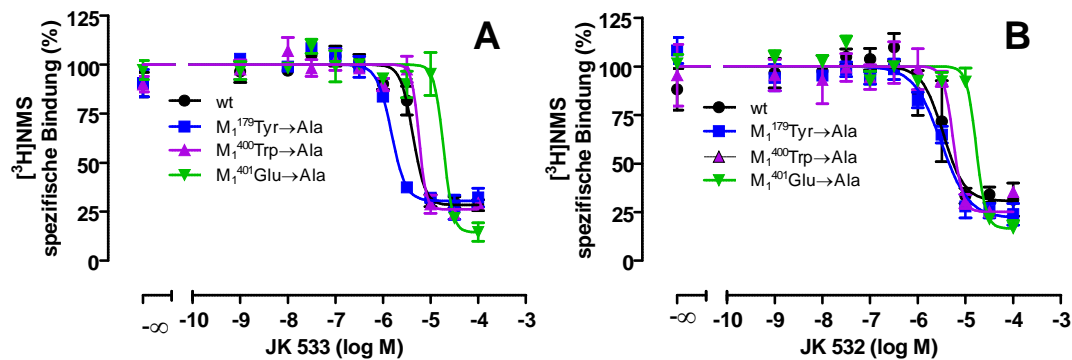
#### **Analyse a) der Einzelkurven für die Hemmung der [<sup>3</sup>H]NMS Bindung durch die Hybride:**

Wie bereits im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben (vgl. Kapitel 3.2.4.2), standen im Rahmen dieser Arbeit drei verschiedene Analysen (a, b, c) zur Ermittlung der Bindungskonstanten der dualsterischen Hybride zur Verfügung, die auch im vorliegenden Kapitel Anwendung fanden und später verglichen werden sollten. Begonnen wurde mit der Verwendung der modifizierten Gleichung nach Antony et al. 2009 (vgl. Kapitel 3.2.4.2, Gleichung 17 mit Gleichung 21). Da die Konzentrations-Bindungs-Kurven beider untersuchten allosterischen Fragmente meistens eine Kurvensteilheit signifikant kleiner als  $n_H = -1$  zeigten, wurde zur Ermittlung der Bindungskonstanten ( $K_B$ ) der allosterischen Fragmente zum freien Rezeptorprotein sowie der Kooperativität ( $\rho$ ) gegenüber dem Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS ein allosterisches, ternäres Komplexmodell nach Ehlert (1988) verwendet, das durch Einführen eines Steigungsmaßes modifiziert worden war (Tränkle et al. 2003) (vgl. Kapitel 3.2.4.2, Gleichung 16).

Die Ergebnisse der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungsexperimente mit den allosterischen Fragmenten sind in Abbildung 4.54 (A) für JK 533 ( $C_4$ ) und in (B) für JK 532 ( $C_6$ ) dargestellt. Das dualsterische Fragment JK 533 ( $C_4$ ) zeigte sowohl am  $hM_1$ -wt-Rezeptor sowie an allen drei Mutationen eine Inhibition der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindung, was sich ebenfalls in negativen Werten für den Kooperativitätsfaktor  $\log \rho$  widerspiegelte. Die negative Kooperativität zwischen dem Fragment JK 533 ( $C_4$ ) und dem Radioliganden unterschied sich weder zwischen den einzelnen Rezeptormutanten, noch von der des  $hM_1$ -Wildtyp-Rezeptor signifikant (Tab. 4.50, t-Test,  $p > 0,05$ ). Ein Einfluss auf die Bindungskonstante des Bausteins JK 533 ( $C_4$ ), konnte nur bei zwei der untersuchten Rezeptormutanten verzeichnet werden (Tab. 4.50). Die Mutation  $M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$  ( $\log K_B = -4,73 \pm 0,08$ ) führte gegenüber dem  $hM_1$ -Wildtyprezeptor zu einer vierfach schwächeren Bindungsneigung von JK 533 ( $C_4$ ) zum Rezeptorprotein, wohingegen die Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$  ( $\log K_B = -5,82 \pm 0,08$ ) interessanterweise zu einer signifikanten Steigerung der Bindungsneigung von JK 533 ( $C_4$ ) führte (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Mutation  $M_1^{400}\text{Tryptophan}$  zu Alanin, die mit dem Verlust des aromatischen Ringsystems einhergeht, zeigte überraschenderweise keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität des allosterischen Fragmentes ( $\log K_B = -5,25 \pm 0,12$ ) (t-Test,  $p > 0,05$ ).

Das allosterische Fragment JK 532 ( $C_6$ ) - mit der um zwei C-Atome längeren Zwischenkette - zeigte ebenfalls an allen untersuchten Mutationen eine stark ausgeprägte negative Kooperativität, die (im Vergleich zum  $hM_1$ -wt-Rezeptor) nur im Falle von  $M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$  signifikant weiter abnahm (Abb.

4.54 (B); Tab. 4.50)(t-Test,  $p < 0,05$ ). Ein Einfluss auf die Bindungskonstante  $K_B$  des allosterischen Fragments konnte ebenfalls bei dem Austausch der Aminosäure  $M_1^{401}$ Glu zu Alanin festgestellt werden. Hier zeigte sich im Vergleich zum  $hM_1$ -wt-Rezeptor, wie bereits für das kürzere allosterische Fragment JK 533 ( $C_4$ ) eine signifikante Abnahme der Affinität um den Faktor vier ( $hM_1$ -wt  $\log K_B = -5,47 \pm 0,10$ ;  $M_1^{401}$ Glu Ala  $K_B = -4,78 \pm 0,07$ )(t-Test,  $p < 0,05$ ). Durch die Entfernung von Hydroxylgruppe und Phenylring in der Mutation  $M_1^{179}$ Tyr Ala, zeigte sich hinsichtlich der Bindungsneigung für JK 532 ( $C_6$ ) im Gegensatz zu JK 533 ( $C_4$ ) kein signifikanter Unterschied zum  $hM_1$ -wt-Rezeptor (t-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4. 54: Bedeutung unterschiedlicher Punktmutationen in allosterischen Epitopen des  $hM_1$ -Rezeptors auf die spezifische Bindung der allosterischen Bausteine JK 533 ( $C_4$ ) und JK 532 ( $C_6$ ).** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden  $[^3H]NMS$  in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen  $[^3H]NMS$ -Bindung in Anwesenheit von Atropin  $10 \mu M$ , 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug  $0,2 \text{ nM}$ , die Zellzahl  $75.000$  Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES ( $20 \text{ mM}$ ) Puffer (L14), pH  $7,4$ ,  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Kurvenanpassung: Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient  $n_H$  in Tabelle 4.50 wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Auf Grund eines Steilheitsmaßes, das signifikant verschieden von  $n_H = -1$  war, erfolgte die weitere Analyse der allosterischen Fragmente mit Hilfe von Gleichung 16. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Bindung der allosterischen Fragmente eine Abhängigkeit von den Aminosäuren  $M_1^{179}$ Tyr Ala und  $M_1^{401}$ Glu Ala zeigt, wohingegen interessanterweise die Aminosäure  $M_1^{400}$ Trp Ala, bzw. das aromatische Indol-Ringsystem des Tryptophans keinen Einfluss auf die Bindung der Bausteine zu besitzen scheinen.

Substanz	Rezeptor	Unteres Plateau (%)	$n_H$	$\log K_B$	$\log K_B$	$\log \rho$	n
<b>JK 533</b> (AF/C <sub>4</sub> )	M <sub>1</sub> -wt	28 ± 4	-3,43 ± 1,48	-5,37 ± 0,04	-	-0,55 ± 0,06	3
	M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	31 ± 3	-2,90 ± 1,18	-5,82 ± 0,08**	-0,45	-0,52 ± 0,04	4
	M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	26 ± 4	-5,81 ± 2,80	-5,25 ± 0,12	0,12	-0,58 ± 0,06	3
	M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	14 ± 5	-3,26 ± 0,93	-4,73 ± 0,08**	0,64	-0,84 ± 0,15	3
<b>JK 532</b> (AF/C <sub>6</sub> )	M <sub>1</sub> -wt	33 ± 4	-5,74 ± 9,67	-5,47 ± 0,10	-	-0,49 ± 0,06	3
	M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	17 ± 4**	-1,50 ± 0,35	-5,51 ± 0,07	-0,04	-0,66 ± 0,08	4
	M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	26 ± 1	-4,36 ± 1,01	-5,26 ± 0,02	0,21	-0,59 ± 0,02	3
	M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	17 ± 7*	-4,65 ± 2,11	-4,78 ± 0,07**	0,69	-0,78 ± 0,13*	3

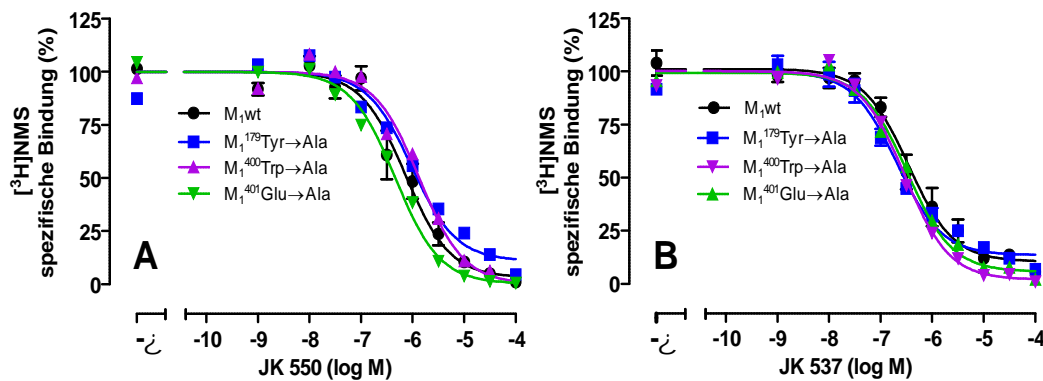
**Tabelle 4. 50: Kenngrößen der in Abbildung 4.54 dargestellten Bindungskurven.**  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit.  $\log K_B$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Bindung des allosterischen Fragmentes.  $\log K_B$ : Differenz zwischen dem  $\log K_B$ -Wert an der jeweiligen M<sub>1</sub>-Rezeptormutante und dem  $\log K_B$ -Wert am hM<sub>1</sub>-Wildtyprezeptor.  $\log \rho$ : Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\rho$ . n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Auf Grund eines Steilheitsmaßes signifikant verschieden von -1, erfolgte die weitere Analyse der Daten der allosterischen Fragmente mit Hilfe von Gleichung 16. AF: allosterisches Fragment. \*, \*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptors (t-Test, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01).

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten der beiden dualsterischen Hybride JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) wurden, wie für die allosterischen Fragmente, Gleichgewichtsbindungs-Experimente mit 0,2 nM [<sup>3</sup>H]NMS durchgeführt. Die Ergebnisse für die beiden Hybride sind in Abbildung 4.55 (A) JK 550 (C<sub>4</sub>), (B) JK 537 (C<sub>6</sub>) und Tabelle 4.51 gegenübergestellt.

Bei der Verwendung dieser Analyse für die einzelnen Inhibitionskurven der Hybride ist es notwendig, den für das korrespondierende allosterische Fragment ermittelten Schätzwert der Bindungskonstante  $K_B$  (vgl. Tab. 4.50) als konstanten Parameter zu behandeln, um eine Überparametrisierung zu verhindern und valide Schätzwerte für die Bindungskonstante  $K_A$  der dualsterischen Hybridbindung erhalten zu können. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden diese Werte nochmals mit in Tabelle 4.51 aufgeführt. Um  $K_A$  abschätzen zu können, war eine Behandlung der für die allosterischen Bausteine ermittelten Kooperativitätswerte ( $\rho$ ) als Konstanten bei dieser Analyse nicht notwendig (vgl. 3.2.4.2).

Die Inhibitionskurven der zwei dualsterischen Hybride konnten, unter Verwendung von Gleichung 12 („Vier-Parameter-logistische-Gleichung“), im Gegensatz zu den allosterischen Fragmenten sowohl am hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor, als auch an den unterschiedlichen Mutationen mit einem Steilheitsmaß von  $n_H = -1$  beschrieben werden (F-Test, p > 0,05). Das kurze dualsterische Hybrid JK 550 (C<sub>4</sub>), führte bei dem Austausch der Aminosäure Tryptophan 400 zu Alanin im Beginn der siebten Transmembran (TM VII), anders als für den allosterischen Baustein gezeigt, zu einer signifikanten Abnahme der Bindungskonstante  $K_A$  des dualsterischen Hybrides JK 550 (C<sub>4</sub>) zum Rezeptorprotein (t-Test, p < 0,05). Ebenfalls anders als es für das zugehörig allosterische Fragment JK 533 (C<sub>4</sub>) beobachtet werden konnte, zeigt JK 550 (C<sub>4</sub>) an der Rezeptormutation M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala keine Affinitätszunahme, sondern eine

signifikante Abnahme der Bindungsneigung ( $\log K_A$  wurde größer) (t-Test,  $p < 0,05$ ). Zudem zeigte die Inhibitionskurve ein mit Hilfe von Gleichung 12 ermitteltes unteres Plateau von  $10 \pm 3\%$ , das sich signifikant von Null unterschied (F-Test,  $p < 0,05$ ). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass das allosterische Fragment JK 533 zu dieser Mutation eine größere Affinität zeigt. Dies wiederum könnte dazu führen, dass das dualsterische Hybrid an dieser Rezeptormutation vermehrt in der allosterischen Bindungspose bindet. Das Resultat wäre dann eine Zunahme der der allosterischen Bindungspose des dualsterischen Hybrides, die in der Folge zu einer unvollständigen Inhibition führt.



**Abbildung 4.55: Bedeutung unterschiedlicher Punktmutationen in allosterischen Epitopen des  $hM_1$ -Rezeptors auf die Bindung der dualsterischen Hybridliganden JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ).** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden  $[^3H]NMS$  in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen  $[^3H]NMS$ -Bindung in Anwesenheit von Atropin  $10 \mu M$ , 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug  $0,2 \text{ nM}$ , die Zellzahl  $75.000$  Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES ( $20 \text{ mM}$ ) Puffer (L14), pH  $7,4$ ,  $28 \text{ }^\circ C$ . Kurvenanpassung: Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient  $n_H$  in Tabelle 4.51 wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen Gleichung (Gleichung 12) analysiert. Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe von Gleichung 17 in der  $R_i$  durch Gleichung 21 ersetzt wurde (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

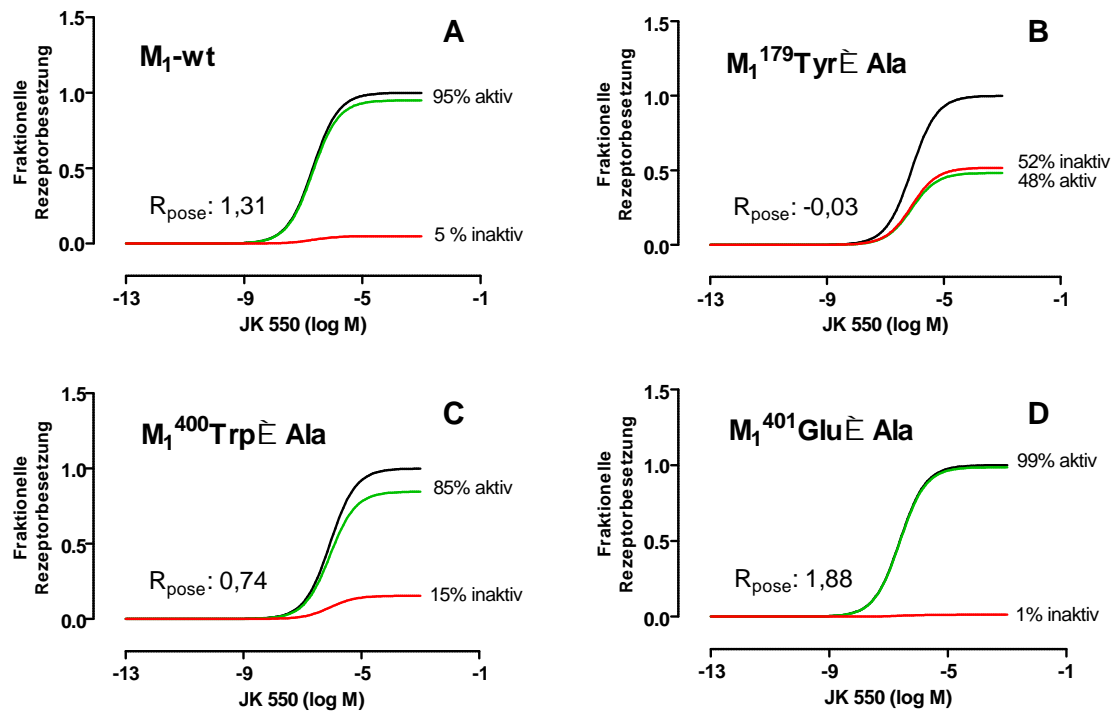
Abbildung 4.55 (B) zeigt die aus der Anwendung des Bindungsmodells für dualsterische Hybridliganden (Gleichung 17 in der  $R_i$  durch Gleichung 21 ersetzt wurde) resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven des dualsterischen Hybrides JK 537 ( $C_6$ ) für  $hM_1$ -wt-Rezeptoren sowie die Rezeptormutanten  $M_1^{179}Tyr \rightarrow Ala$ ,  $M_1^{400}Trp \rightarrow Ala$  und  $M_1^{401}Glu \rightarrow Ala$ . Eine zusammenfassende Darstellung der Parameterschätzwerte ist Tabelle 4.51 zu entnehmen. Die für das Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) ermittelten Bindungskonstanten  $K_A$  unterschieden sich für keinen der untersuchten Rezeptoren (t-Test,  $p > 0,05$ ). Lediglich die Inhibitionskurve der Mutation  $M_1^{179}Tyr \rightarrow Ala$  zeigte mit einem unteren Plateau von  $13 \pm 2\%$  eine nicht vollständige Inhibition (vgl. Tab. 4.51).

Substanz	Rezeptor	Unteres Plateau (%)	$n_H$	$\log K_B$	$\log K_A$	$\log K_A$
<b>JK 550</b> (DH/C <sub>4</sub> )	M <sub>1</sub> -wt	3 ± 4	= -1,00	= -5,37	-6,65 ± 0,08	-
	M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	10 ± 3*	= -1,00	= -5,82	-5,79 ± 0,15**	-0,89
	M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	0 ± 3	= -1,00	= -5,25	-5,99 ± 0,07**	-0,69
	M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	0 ± 3	= -1,00	= -4,73	-6,61 ± 0,06	-0,07
<b>JK 537</b> (DH/C <sub>6</sub> )	M <sub>1</sub> -wt	11 ± 3	= -1,00	= -5,34	-6,97 ± 0,08	-
	M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	13 ± 2**	= -1,00	= -5,51	-6,74 ± 0,06	-0,23
	M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	2 ± 2	= -1,00	= -5,27	-6,82 ± 0,06	-0,15
	M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	6 ± 2	= -1,00	= -4,78	-6,77 ± 0,05	-0,20

**Tabelle 4. 51: Kenngrößen der in Abbildung 4.55 dargestellten Bindungskurven.**  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit.  $\log K_B$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des allosterischen Fragmentes.  $\log K_A$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Bindung des dualsterischen Hybrides in dualsterischer Orientierung.  $\log K_A$ : Differenz zwischen dem  $\log K_A$ -Wert an der jeweiligen M<sub>1</sub>-Rezeptormutante und dem  $\log K_A$ -Wert am *h*M<sub>1</sub>-Wildtyprezeptor. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe von Gleichung 17 in der R<sub>i</sub> durch Gleichung 21 ersetzt wurde (vgl. 3.2.4.2). DH: dualsterisches Hybrid. \*, \*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße für den *h*M<sub>1</sub>-wt-Rezeptors (t- Test, \*p<0,05, \*\*p<0,01).

#### 4.2.4.4 Einfluss putativ allosterischer Punktmutationen auf die fraktionelle Rezeptorbesetzung der dualsterischen Hybridliganden JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>)

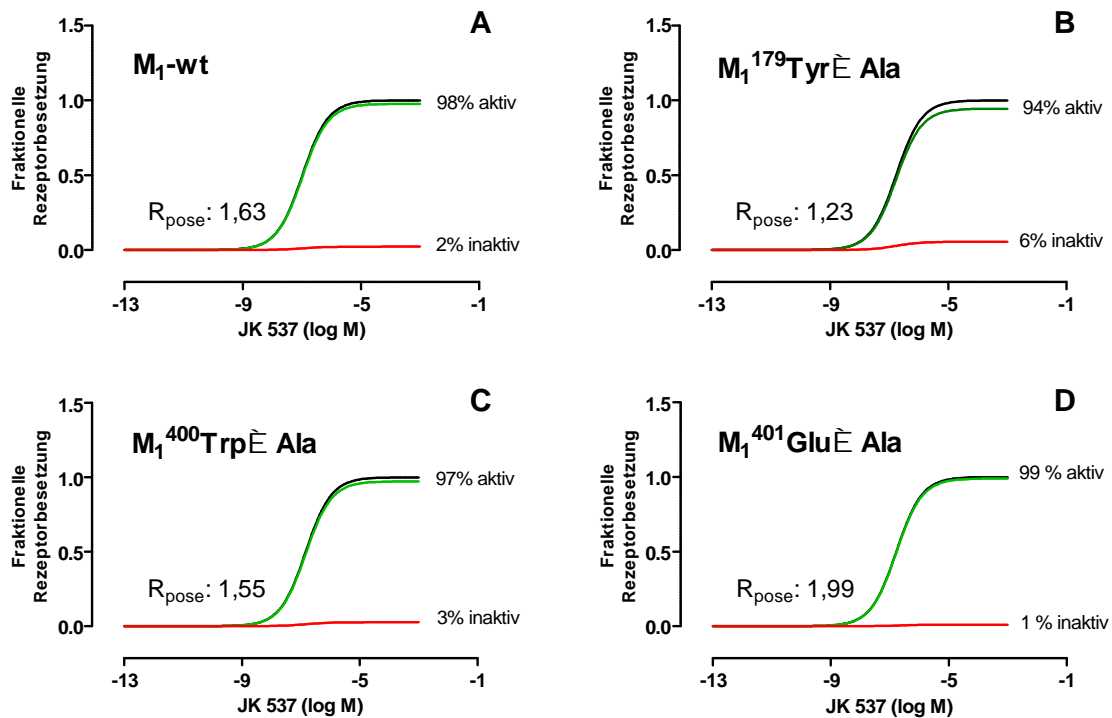
Um die Hypothese einer möglichen Beeinflussung der Bindungspose, ausgelöst durch Punktmutationen im allosterischen Bereich des *h*M<sub>1</sub>-Rezeptors zu bestätigen, wurden mit Hilfe der Gleichungen 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2) die maximalen, fraktionellen Größen der aktiven und inaktiven Rezeptorpopulation der Hybride ermittelt. Verwendet wurden für diese Berechnung die in Tabelle 4.51 aufgeführten Werte für  $K_A$  und  $K_B$ . Darüberhinaus kann das Verhältnis von aktiven und inaktiven Rezeptorenensembles durch das Orientierungs-Verhältnis  $R_{pose}$  quantifiziert werden, also dem Verhältnis der Bindungskonstanten der Hybride in der dualsterischen aktiven oder der der allosterischen inaktiven Pose des Rezeptors. Eine Gegenüberstellung der fraktionellen Rezeptorbesetzungen und der ermittelten  $R_{pose}$ -Werte für das dualsterische Hybrid JK 550 (C<sub>4</sub>) sind in Abbildung 4.56 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass alle drei Mutationen (wenn auch manche nur sehr gering) einen Einfluss auf die Bindungspose haben, mit der das dualsterische Hybrid JK 550 (C<sub>4</sub>) an das Rezeptorprotein bindet.



**Abbildung 4.56: Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des dynamischen Hybridliganden JK 550 ( $C_4$ ) in der aktiven und der inaktiven Bindungspose an Wildtyp und punktmutierten  $hM_1$ -Rezeptoren.** Grün: aktive dualsterische Rezeptorbesetzung; rot: inaktive allosterische Rezeptorbesetzung; schwarz: orientierungsunabhängige Gesamtrezeptorbesetzung.  $R_{\text{pose}}$ : Negativer Logarithmus des Orientierungs-Verhältnis der Bindungskonstanten der Pharmakophore für die aktive ( $K_A$ ) oder die inaktive ( $K_B$ ) Bindungs-Pose. Die Kurven wurden unter Anwendung von Gleichung 26 und 27 in Kenntnis von  $K_A$  und  $K_B$  errechnet (vgl. Kapitel 3.2.4.2).

Wie auf Grund der Zunahme der Bindungsneigung des allosterischen Fragmentes JK 533 ( $C_4$ ) für die Rezeptormutation  $M_1^{179}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$  postuliert, bestätigte sich die Annahme einer Zunahme der inaktiven Rezeptorpopulation von 5% im  $hM_1$ -Wildtyprezeptor auf 52% und in einem Vorzeichenwechsel der  $R_{\text{pose}}$ -Werte (wt:  $R_{\text{pose}} = 1,31$  und  $^{179}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$ :  $R_{\text{pose}} = -0,03$ ). Für die JK 550 Bindung an der Rezeptormutation  $M_1^{400}\text{Tryptophan}$  zu Alanin betrug  $R_{\text{pose}} = 0,74$ . Hinsichtlich der fraktionellen Rezeptorbesetzung konnte eine leichte Abnahme der aktiven und Zunahme der inaktiven Rezeptorpopulation um 10% beobachtet werden. Ein Austausch der Aminosäure  $M_1^{401}\text{Glutaminsäure}$  gegen die kleine Aminosäure Alanin, ergab für JK 550 mit  $R_{\text{pose}} = 1,88$  den höchsten Wert. Dies entsprach einer aktiven Rezeptorfraktion von 99% und damit einer fast vollständigen Bindung des Hybrides in der dualsterischen Bindungsorientierung.

Das durch eine längere Zwischenkette gekennzeichnete dualsterische Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) zeigte bei einer analogen Betrachtung der fraktionellen Rezeptorbesetzung nur sehr geringe Unterschiede. Im Gegensatz dazu, fielen die Unterschiede zwischen den  $R_{\text{pose}}$ -Werten weitaus deutlicher aus (vgl. Abb. 4.57).



**Abbildung 4.57: Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des dynamischen Hybridliganden JK 537 ( $C_6$ ) in der aktiven und der inaktiven Bindungspose an Wildtyp und punktmutierten  $hM_1$ -Rezeptoren.** Grün: aktive dualsterische Rezeptorbesetzung; rot: inaktive allosterische Rezeptorbesetzung; schwarz: orientierungsunabhängige Gesamtrezeptorbesetzung.  $R_{\text{pose}}$ : Negativer Logarithmus des Orientierungs-Verhältnis der Bindungskonstanten der Pharmakophore für die aktive ( $K_A$ ) oder die inaktive ( $K_B$ ) Bindungs-Pose. Die Kurven wurden unter Anwendung von Gleichung 26 und 27 in Kenntnis von  $K_A$  und  $K_B$  errechnet (vgl. Kapitel 3.2.4.2).

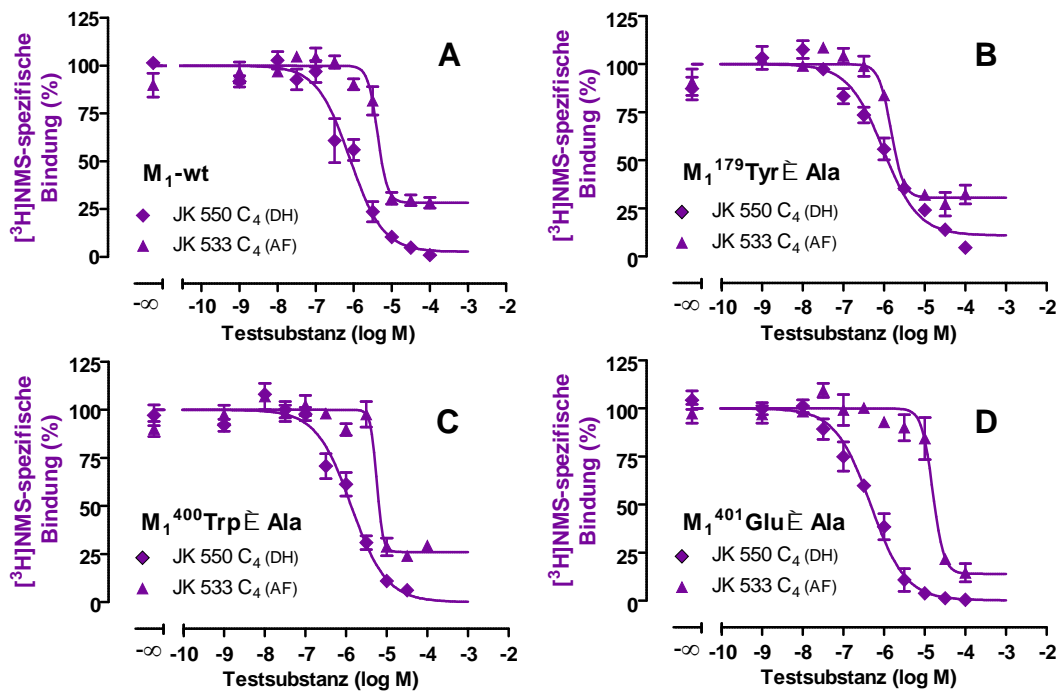
So bewirkt die Mutation von  $M_1^{179}\text{Tyr}$  zu Alanin in der zweiten extrazellulären Schleife (ECL2) eine um vier Prozent niedrigere Bindung des Hybrides in der dualsterischen Pose, die Mutation von  $M_1^{400}\text{Trp}$  zu Alanin eine um ein Prozent kleinere aktive Bindungsorientierung. Die Mutation von  $M_1^{401}\text{Glu}$  zu Alanin führte zu einer 99%igen Induktion der aktiven Rezeptorfraction durch JK 537 ( $C_6$ ). Über eine Signifikanz der Unterschiede zwischen den  $R_{\text{pose}}$ -Werten ließ sich auf Grund der in der Analyse als Konstanten behandelten  $K_B$  Parametern und dem damit verbundenen fehlenden Parameterfehler keine Aussage treffen.

#### **Analyse b) globale Analyse der [ $^3\text{H}$ ]NMS Bindungsdaten des Fragmentes und des Hybrides**

Um numerische Schätzwerte samt eines Standardfehler für die Parameter  $K_A$  als auch  $K_B$  zu erhalten, die für die statistische Bewertung von  $R_{\text{pose}}$  Vergleichen essentiell sind (vgl. oben sowie Kapitel 4.1.3.2), wurde ein neues globales Analyseverfahren eingesetzt. Dies erlaubt es, die [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindungskurven des allosterischen Fragmentes und des dualsterischen Hybrides simultan zu analysieren, sodass beide Datensätze (engl. „*parameter sharing*“) zur Ergebnisfindung für diese Parameter beitragen konnten.



Die Ergebnisse der globalen Datenanalysen für die drei Mutationen  $M_1^{179}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$ ,  $M_1^{400}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$  und  $M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$ , sowie des  $hM_1$ -wt-Rezeptors sind in Abbildung 4.58 gegenübergestellt. Die Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$  führte zu einer achtfach schwächeren Affinität der dualsterischen und einer zweifach stärkeren Bindungsneigung der allosterischen Bindungspose des dualsterischen Hybrides JK 550 ( $C_4$ ). Ein Austausch der Aminosäure Tryptophan 400 gegen Alanin führte ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung der Bindungsneigung von JK 550 ( $C_4$ ) in der dualsterischen Bindungspose, ein Unterschied hinsichtlich der Bindungskonstante der allosterischen Bindungspose konnte bei dieser Mutation nicht detektiert werden (t-Test,  $p > 0,05$ ). Die Mutation  $M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$  zeigte nur einen Affinitätsabfall des Hybrides JK 550 in der allosterischen Bindungspose, die Affinität der dualsterischen Bindungspose blieb unbeeinflusst. Ein Vergleich der Bindungskonstanten für die dualsterische ( $K_A$ ) und allosterische ( $K_B$ ) Bindungspose, mit den bereits unter Analyse a) (vgl. Tab. 4.51) ermittelten Schätzwerten, die mit Hilfe der sequentiellen getrennten Datenanalyse der Bindungskurven für Fragment und Hybrid ermittelt wurden, ergab für keinen der Werte eine signifikante Abweichung (vgl. Tab. 4.51 und 4.52) (t-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4. 58:** Ergebnisse der globalen Analyse der  $[^3\text{H}]$ NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten von Fragment (JK 533) und Hybrid (JK 550) basierend auf dem Bindungsmodell für dualsterische Hybridliganden und dem ternären Modell allosterischer Interaktionen an den gezeigten Rezeptoren in intakten CHO-Flp- $hM_1$ -Zellen. Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus zwei Kurven (dualsterisches Hybrid (DH) und allosterisches Fragment plus Zwischenkette (AF)), vgl. Kapitel 3.2.4.2. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung in Gegenwart von JK 550 und JK 533 in Prozent an intakten CHO-Flp Zellen stabil transfiziert mit dem aufgeführten Rezeptorprotein. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	Rezeptor	log K <sub>A</sub>	log K <sub>B</sub>	R <sub>pose</sub>	dual (%)	allo (%)
	M <sub>1</sub> -wt	-6,64 ± 0,07	-5,50 ± 0,05	1,14 ± 0,09	93%	7%
	M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	-5.76 ± 0.18***	-5.85 ± 0.08***	-0.09 ± 0.23***	45%	55%
<b>JK 550</b>	M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	-5,99 ± 0,08***	-5,27 ± 0,12	0,72 ± 0,16	84%	16%
(DH/C <sub>4</sub> )	M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	-6.66 ± 0.07	-4.88 ± 0.05***	1,78 ± 0,09***	98%	2%

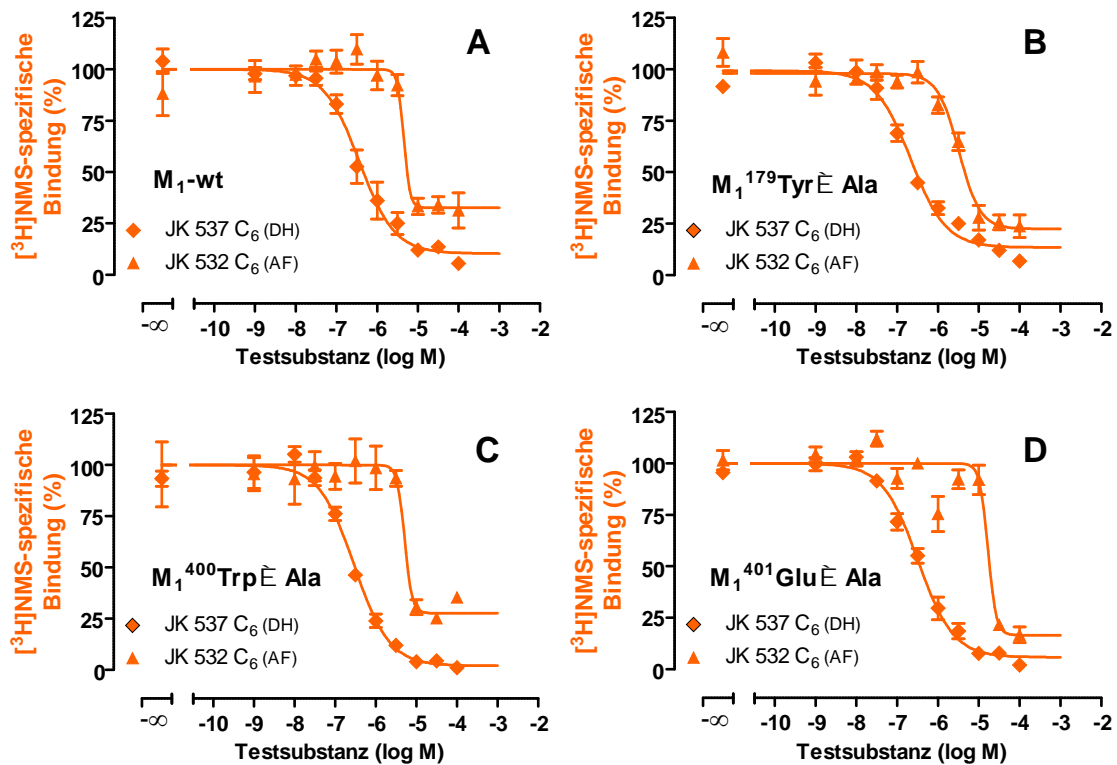
**Tabelle 4. 52: Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.58 dargestellten Bindungskurven der globalen Analyse.** logK<sub>A</sub>: Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des dynamischen Hybridliganden für die dualsterische aktive Bindungspose. logK<sub>B</sub>: Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des allosterischen Molekülbausteins und damit der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des dynamischen Hybridliganden in der allosterischen Bindungspose. R<sub>pose</sub>: Negativer Logarithmus des Orientierungsverhältnisses der Bindungskonstanten der Pharmakophore für die aktive (K<sub>A</sub>) oder die inaktive (K<sub>B</sub>) Bindungspose. dual/ allo: Konzentrationsabhängige maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch das Hybrid in der aktiven (dual) und der inaktiven (allo) Bindungspose. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Kurvenanalyse: globale Analyse des allosterischen Fragmentes Gleichung (16) und des dualsterischen Hybrides Gleichung (17 in Verbindung mit 21)(vgl. Kapitel 3.2.4.2). DH: dualsterisches Hybrid. \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße für den hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor (t-Test, \*\*\*p<0,001).

Auch die R<sub>pose</sub>-Werte aus der globalen Analyse dargestellt in Abbildung 4.58 zeigen Übereinstimmungen mit den bereits mit Analyse a) ermittelten Werten für das dualsterische Hybrid JK 550 (vgl. Tab. 4.51). Kleine Differenzen, z.B. für den hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor sowie die Mutation M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala waren auf geringe, aber nicht signifikante Abweichungen der K<sub>A</sub> und K<sub>B</sub>-Werte zurückzuführen (t-Test, p>0,05). Da die mit Hilfe der globalen Analyse ermittelten R<sub>pose</sub>-Werte Standardfehler besaßen, war es damit erstmalig möglich, signifikante Unterschiede zwischen den R<sub>pose</sub>-Werten für die Hybride an den Mutationen im Vergleich mit dem hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor zu überprüfen. Die Ergebnisse sind zusammen mit den Ergebnissen der maximalen, fraktionellen Rezeptorbesetzung der Hybride in Tabelle 4.52 aufgeführt.

Für die Mutation M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyrosin zu Alanin betrug R<sub>pose</sub> = -0,09 ± 0,23 und unterschied sich signifikant von dem des hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptors (t-Test, p<0,05). Wie bereits mit Hilfe der Analysevariante a) gezeigt werden konnte (vgl. 4.2.4.3), spiegelt ein negativer R<sub>pose</sub>-Wert ein Überwiegen der inaktiven Rezeptorfraktion wider. Ein Austausch der Aminosäure Tryptophan 400 gegen Alanin zeigte gegenüber dem Wildtyp ebenfalls einen signifikant geringeren R<sub>pose</sub>-Wert (0,72 ± 0,16) (t-Test, p<0,05), der verglichen mit M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala jedoch nur zu einer 9%igen Reduktion der aktiven Rezeptorfunktion führte. Die Mutation M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala wies mit R<sub>pose</sub> = 1,78 ± 0,09 den höchsten R<sub>pose</sub>-Wert auf, der sich in einer sehr hohen aktiven Rezeptorfraktion von maximal 98% widerspiegelte. Er bestätigte damit den mit der Analysevariante a) ermittelten Wert von 99% aktiven Rezeptoren und damit die fast vollständige Bindung des Hybrides JK 550 in der dualsterischen Bindungsorientierung.

In gleicher Weise wurde das Hybrid JK 537 (C<sub>6</sub>) sowie sein zugehöriges allosterisches Fragment JK 532 analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.59 und Tabelle 4.53 aufgeführt. Die Mutation M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala führte weder in der dualsterischen noch in der allosterischen Bindungspose des

dualsterischen Hybrides JK 537 zu einer signifikanten Änderung der Bindungskonstante. Ein Austausch der Aminosäure Tryptophan 400 gegen Alanin bewirkte dagegen eine signifikante Abnahme der Affinität in der dualsterischen Bindungspose, ein Affinitätsunterschied hinsichtlich der allosterischen Bindungspose konnte bei dieser Mutation nicht detektiert werden (t-Test,  $p > 0,05$ ). Die Mutation  $M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$  zeigte für das dualsterische Hybrid JK 537, ebenso wie im Fall des JK 550 nur einen Affinitätsabfall in der allosterischen Bindungspose, die Bindungskonstante für die dualsterische Bindungspose blieb unbeeinflusst. Die  $R_{\text{pose}}$ -Werte und die Ergebnisse für die maximale, fraktionelle Rezeptorbesetzung des Hybrides sind in Tabelle 4.53 zusammengefasst.



**Abbildung 4.59:** Ergebnisse der globalen Analyse der  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindungsdaten von Fragment (JK 532) und Hybrid (JK 537) basierend auf dem Bindungsmodell für dualsterische Hybridliganden und dem ternären Modell allosterischer Interaktionen an den gezeigten Rezeptoren in intakten CHO-Flp- $hM_1$ -Zellen. Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus zwei Kurven (dualsterisches Hybrid (DH) und allosterisches Fragment plus Zwischenkette (AF)), vgl. Kapitel 3.2.4.2. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in Gegenwart von JK 537 und JK 532 in Prozent an intakten CHO-Flp Zellen stabil transfiziert mit dem aufgeführten Rezeptorprotein. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Das Orientierungsverhältnis für JK 537 an der Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$  betrug  $R_{\text{pose}} = 1,19 \pm 0,11$  und unterschied sich damit nicht signifikant von dem des  $hM_1$ -wt-Rezeptors (t-Test,  $p > 0,05$ ). Auch der  $R_{\text{pose}}$ -Wert der Mutation  $M_1^{400}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$  war gegenüber dem  $hM_1$ -wt nicht signifikant verschieden (t-Test,  $p > 0,05$ ). Lediglich die Mutation  $M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$  zeigte mit einem Orientierungsverhältnis von  $R_{\text{pose}} = 1,94 \pm 0,08$  eine signifikante Zunahme (t-Test,  $p < 0,05$ ). Dieses Ergebnis spiegelte sich ebenfalls in der maximalen, fraktionellen Rezeptorbesetzung wider. JK 537 induzierte demnach eine 94 %ige aktive

Rezeptorfraction an der Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  und dem gegenüber eine 99 %ige an der Mutation  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$ . Somit bestätigt sich auch für JK 537, wie zuvor für JK 550, eine fast 100%ige Bindung in der dualsterischen Bindungsorientierung. Demnach führt der Verlust der Aminosäure Glutaminsäure gegen Alanin in Position 401 des  $hM_1$ -Rezeptors zu einem fast vollständigen Verschwinden der allosterischen Bindungspose.

Substanz	Rezeptor	$\log K_A$	$\log K_B$	$R_{\text{pose}}$	dual (%)	allo (%)
<b>JK 537</b> (DH/C <sub>6</sub> )	$M_1$ -wt	$-6,93 \pm 0,08$	$-5,42 \pm 0,13$	$1,51 \pm 0,16$	97	3
	$M_1^{179}\text{Tyr Ala}$	$-6,72 \pm 0,08$	$-5,53 \pm 0,06$	$1,19 \pm 0,11$	94	6
	$M_1^{400}\text{Trp Ala}$	$-6,70 \pm 0,08^*$	$-5,32 \pm 0,11$	$1,38 \pm 0,14$	96	4
	$M_1^{401}\text{Glu Ala}$	$-6,78 \pm 0,05$	$-4,84 \pm 0,06^{***}$	$1,94 \pm 0,08^*$	99	1

**Tabelle 4. 53: Kenngrößen der in Abbildung 4.59 dargestellten Bindungskurven der globalen Analysen.**  $\log K_A$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des dynamischen Hybridliganden für die dualsterische aktive Bindungspose.  $\log K_B$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des allosterischen Molekülbausteins und damit der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des dynamischen Hybridliganden in der allosterischen Bindungspose.  $R_{\text{pose}}$ : Negativer Logarithmus des Orientierungsverhältnisses der Bindungskonstanten der Pharmakophore für die aktive ( $K_A$ ) oder die inaktive ( $K_B$ ) Bindungspose. dual/ allo: Konzentrationsabhängige maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch das Hybrid in der aktiven (dual) und der inaktiven (allo) Bindungspose. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Kurvenanalyse: globale Analyse des allosterischen Fragmentes Gleichung (16) und des dualsterischen Hybrides Gleichung (17 in Verbindung mit 21)(vgl. Kapitel 3.2.4.2). DH: dualsterisches Hybrid. \*,\*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße für den  $hM_1$ -wt-Rezeptor (t-Test,  $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die durch die Mutation von  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  in der zweiten extrazellulären Schleife hervorgerufene Abnahme der dualsterischen Bindungsorientierung für JK 550 auf Grund der signifikanten Abnahme der  $R_{\text{pose}}$ -Werte (vergl) als signifikant verzeichnet werden kann (t-Test,  $p < 0,05$ ). Eine signifikante Änderung für das längere Hybrid JK 537 konnte an dieser Mutation nicht nachgewiesen werden (keine signifikante Veränderung der  $R_{\text{pose}}$ -Werte, t-Test,  $p > 0,05$ )(vgl. Tab. 4.53). Die Mutation  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  führte bei keinem der beiden Hybride zu signifikanten Änderungen der Bindungsorientierung (t-Test,  $p > 0,05$ ), wohingegen die Mutation  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$  in beiden Fällen zu einer signifikanten Zunahme der dualsterischen Bindungsorientierung führte (signifikante Zunahme der  $R_{\text{pose}}$ -Werte (t-Test,  $p < 0,05$ )(vgl. Tabelle 4.52 und 4.53).

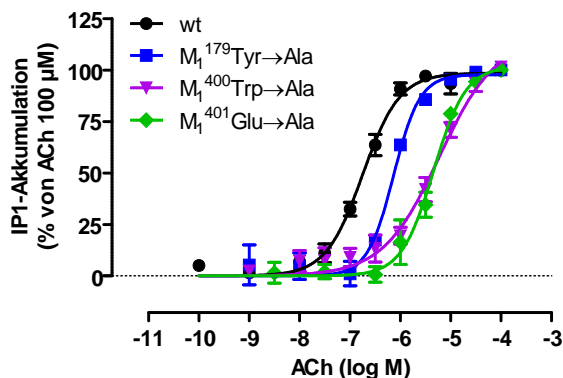
#### 4.2.5 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen des $hM_1$ -Rezeptors auf die Produktion unterschiedlicher sekundärer Botenstoffe

Wie bereits in Kapitel 4.1.4 des Ergebnisteils dieser Arbeit dargestellt, zeigten die untersuchten dualsterischen Hybridliganden einen ausgeprägten Partial-, bzw. sogar Vollagonismus. Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob die ausgewählten Punktmutationen im potentiell allosterischen Bereich des muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptors einen möglichen Einfluss auf die Hybrid-induzierte Signalinduktion besitzen. Des Weiteren diene die Erhebung der funktionellen Daten zur Durchführung einer erweiterten

globalen Analysevariante c), die auf den Bindungs- und Funktionsdaten der Hybride basierte (vgl. 4.2.7). Schließlich wurden die funktionellen Daten auf das Vorhandensein einer potentiellen Signalwegelektivität (engl.: „*biased signaling*“) der dualsterischer Hybridliganden JK 550 und JK 537 (vgl. 4.2.8) geprüft.

#### 4.2.5.1 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im allosterischen Bereich des $hM_1$ -Rezeptors auf die durch Acetylcholin-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- $hM_1$ -Zellen

Abbildung 4.60 zeigt die Acetylcholin induzierte IP1-Akkumulation der im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstelle untersuchten Punktmutationen des  $hM_1$ -Rezeptors im Vergleich zu den ebenfalls mit diesem Expressionssystem erhobenen Wildtypdaten. Wie bereits in vorangegangenen Kapiteln dieser Arbeit erläutert (vgl. 4.1.4), diente auch in diesen Experimenten der endogene Vollagonist Acetylcholin als Referenzagonist. Infolgedessen galt es, im ersten Schritt zu überprüfen, welchen Einfluss die Mutationen auf das agonistische Verhalten von Acetylcholin zeigten. Die Normierung der Datensätze erfolgte auf den durch 100  $\mu$ M Acetylcholin ausgelösten Maximaleffekt, der stets an jedem Versuchstag bestimmt wurde. Obwohl es sich bei allen drei Punktmutationen um Mutationen im potentiell allosterischen Bereich des muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptors handelt und Acetylcholin sich orthosterisch bindet (Hulme et al. 1990; Wess 1993; Eglén 2005), zeigte sich an allen untersuchten Rezeptormutationen eine signifikante Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve gegenüber dem Wildtyp-  $hM_1$ -Rezeptor (t-Test,  $p < 0,05$ ) (Abb. 4.60, Tab. 4.54).



**Abbildung 4. 60: Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptors auf die ACh-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- $M_1$ -Zellen.** Ordinate: IP1-Akkumulation in %: 0% entspricht dem unteren Plateau (basale IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (Acetylcholin 100  $\mu$ M). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration. Die Zellzahl betrug 100.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Die stärkste Rechtsverschiebung gegenüber dem  $hM_1$ -Wildtyprezeptor mit ca. 1,5 Dekaden zeigten die beiden Mutationen  $M_1^{400}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$  ( $\log EC_{50} = -5,26 \pm 0,07$ ) und  $M_1^{401}\text{Glu}\rightarrow\text{Ala}$  ( $\log EC_{50} = -5,27 \pm$

0,07), die sich untereinander nicht signifikant unterschieden (Tab. 4.54, t-Test,  $p > 0,05$ ). Die Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  besaß einen  $\log EC_{50} = -6,13 \pm 0,04$  für Acetylcholin, der eine um den Faktor drei signifikant geringere Wirkstärke gegenüber dem Wildtyprezeptor markierte (t-Test,  $p < 0,05$ ). Im Gegensatz zu den anderen Mutationen, konnte für  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  eine Kurvensteilheit ermittelt werden, die sich signifikant von  $n_H = 1$  unterschied ( $n_H = 1,72 \pm 0,25$ , F-Test,  $p > 0,05$ ). Alle vier Kurven zeigten ein oberes Plateau, das sich nicht signifikant von 100% unterschied (F-Test,  $p < 0,05$ ); dies ist ein Hinweis darauf, dass an jeder der drei untersuchten Mutationen eine vollständige Rezeptoraktivierung möglich war.

Substanz	Rezeptor	$\log EC_{50}$	$\log EC_{50}$	$E_{\max} (\%)$	$n_H$	n
ACh	$M_1$ -wt	$-6,71 \pm 0,04$	-	$98 \pm 2$	$1,32 \pm 0,15$	6
	$M_1^{179}\text{Tyr Ala}$	$-6,13 \pm 0,04^{***}$	0,58	$98 \pm 2$	$1,72 \pm 0,25$	4
	$M_1^{400}\text{Trp Ala}$	$-5,26 \pm 0,07^{***}$	1,45	$108 \pm 4$	$0,98 \pm 0,15$	5
	$M_1^{401}\text{Glu Ala}$	$-5,27 \pm 0,07^{***}$	1,44	$109 \pm 5$	$1,36 \pm 0,22$	3

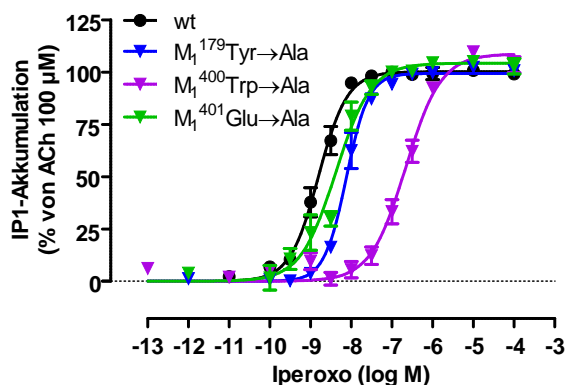
**Tabelle 4. 54: Kenngrößen der in Abbildung 4.60 dargestellten gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven der Acetylcholin-induzierten IP1-Akkumulation.**  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $\log EC_{50}$ : Differenz zwischen dem  $\log EC_{50}$ -Wert an der jeweiligen  $M_1$ -Rezeptormutante und dem  $\log EC_{50}$ -Wert am  $hM_1$ -Wildtyprezeptor.  $E_{\max}$ : Maximale IP1-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve) in Prozent des Acetylcholineffektes (100  $\mu\text{M}$ ).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit bei variabler Kurvensteilheit, sofern verschieden von  $n_H = 1$  (F-Test,  $p < 0,05$ ). n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*\*: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden  $hM_1$ -wt-Kenngröße (t-Test, \*\*\* $p < 0,001$ ).

Somit zeigte sich, dass die Fähigkeit der  $G_q$  Protein vermittelten IP1-Akkumulation durch den endogenen Vollagonisten Acetylcholin bei allen untersuchten Rezeptormutationen des  $hM_1$ -Rezeptors möglich ist. Die maximale intrinsische Wirksamkeit des Acetylcholins blieb durch alle Punktmutationen unbeeinflusst, wohingegen signifikante Verluste der Wirkstärke gegenüber dem Wildtyprezeptor zu verzeichnen waren.

#### 4.2.5.2 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im allosterischen Bereich des $hM_1$ -Rezeptors auf die durch Iperoxo-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- $M_1$ -Zellen

Es ist bekannt, dass manche der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Mutationen an  $hM_1$ -Rezeptoren am  $M_2$ -Rezeptor einen deutlichen Einfluss auf die Wirksamkeit und die Wirkstärke von Vollagonisten aufweisen (z.B. Jager et al. 2007). Aus diesem Grund sollte erstmalig auch der Vollagonist Iperoxo hinsichtlich der drei im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstelle des muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptors mutierten Epitope untersucht werden. Da es sich bei Iperoxo um den orthosterischen Baustein der zu untersuchenden dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537 handelte, erschien seine Untersuchung zudem als eine sehr interessante Ergänzung. Die Normierung der Datensätze erfolgte auf den durch 100  $\mu\text{M}$  Acetylcholin ausgelösten Maximizeffekt, der stets an jedem Versuchstag ermittelt wurde.

In Abbildung 4.61 sind die Ergebnisse des durch den Vollagonisten induzierten Effektes auf die IP1-Akkumulation an den zuvor beschriebenen Mutationen sowie dem  $hM_1$ -Wildtyprezeptor dargestellt. Deutlich zu erkennen ist eine durch die Punktmutationen hervorgerufene Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurven verglichen mit dem  $hM_1$ -Wildtyp-Rezeptor (vgl. Abb. 4.61).



**Abbildung 4. 61: Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptors auf die Iperoxo-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- $M_1$ -Zellen.** Ordinate: IP1-Akkumulation in %: 0% entspricht dem unteren Plateau (basale IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (Acetylcholin 100  $\mu$ M). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration. Die Zellzahl betrug 100.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier bis sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Die gezielte Mutation der Aminosäure Tyrosin 179 in der zweiten extrazellulären Schleife sowie Glutaminsäure 401 im Beginn der siebten Transmembran führte zu einer signifikanten Abnahme der Wirkstärke im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor (t-Test,  $p < 0,05$ , Tab. 4.55). Der Austausch von Tryptophan 400 gegen Alanin führte neben einem 138-fachen Verlust der Wirkstärke zusätzlich zu einem signifikant höheren, oberen Plateau von  $109 \pm 2\%$ , was einer höheren intrinsischen Aktivität des Vollagonisten Iperoxo im Vergleich zu Acetylcholin (100  $\mu$ M) entsprach (t-Test,  $p < 0,05$ , Abb. 4.61).

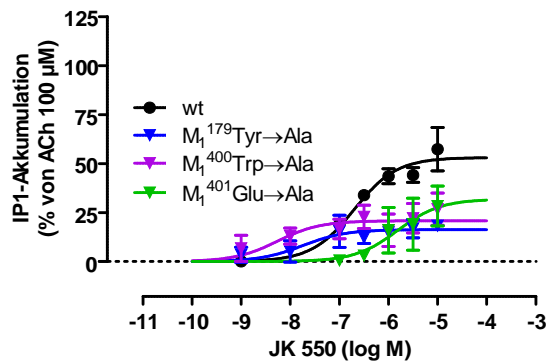
Substanz	Rezeptor	$\log EC_{50}$	$\log EC_{50}$	$E_{max} (\%)$	$n_H$	n
Iperoxo	$M_1$ -wt	$-8,80 \pm 0,03$	-	= 100	$1,24 \pm 0,10$	5
	$M_1^{179}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$	$-8,11 \pm 0,03^{***}$	0,69	= 100	$1,57 \pm 0,15$	5
	$M_1^{400}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$	$-6,66 \pm 0,05^{***}$	2,14	$109 \pm 2^{**}$	= 1,00	6
	$M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$	$-8,43 \pm 0,06^{***}$	0,37	= 100	= 1,00	4

**Tabelle 4. 55: Kenngrößen der in Abbildung 4.61 dargestellten gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven der Iperoxo-induzierten IP1-Akkumulation.**  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $\log EC_{50}$ : Differenz zwischen dem  $\log EC_{50}$ -Wert an der jeweiligen  $M_1$ -Rezeptormutante und dem  $\log EC_{50}$ -Wert am  $hM_1$ -Wildtyprezeptor.  $E_{max}$ : Maximale IP1-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve) in Prozent des Acetylcholineffektes (100  $\mu$ M).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit bei variabler Kurvensteilheit, sofern verschieden von  $n_H = 1$  (F-Test,  $p < 0,05$ ). n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*,\*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden  $hM_1$ -wt-Kenngröße (t-Test,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ).

So wie für den endogenen Agonisten Acetylcholin, zeigte sich ebenfalls für Iperoxo die Fähigkeit der  $G_q$  Protein-vermittelten IP1-Aktivierung bei allen drei untersuchten Mutationen des  $hM_1$ -Rezeptors. Anders als im Falle von Acetylcholin, zeigte sich für Iperoxo eine signifikante Zunahme der intrinsischen Wirksamkeit ( $E_{max}$ ) an der Mutation  $M_1^{400}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ , wohingegen sie bei den zwei anderen Mutationen unbeeinflusst blieb.

#### 4.2.5.3 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen auf die durch die Hybridliganden JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- $hM_1$ -Zellen

Mit den bereits bekannten Hybridliganden JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) sollten erstmals dualsterische Hybridliganden an  $hM_1$ -Rezeptoren mit den ausgewählten Mutationen hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht werden,  $G_q$  Proteine zu aktivieren. Der Einfluss der Mutationen im allosterischen Epitop des  $hM_1$ -Rezeptors auf die Hybrid-induzierte IP1-Akkumulation ist in Abbildung 4.62 dargestellt.



**Abbildung 4. 62: Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptors auf die JK 550-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- $M_1$ -Zellen.** Ordinate: IP1-Akkumulation in %: 0% entspricht dem unteren Plateau (basale IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (Acetylcholin 100  $\mu\text{M}$ ). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Hybrid-Konzentration. Die Zellzahl betrug 100.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Da sowohl die dualsterischen Hybridliganden, als auch die allosterischen Fragmente, wie ihre Muttersubstanz BQCA eine sehr geringe Wasserlöslichkeit aufwiesen, wurde DMSO als Lösungsmittel eingesetzt. Dadurch konnten allerdings keine Substanzen in höheren Konzentrationen als 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt werden, da es sonst zu signifikanten Veränderungen des Messsignales gekommen wäre. Um die intrinsische Aktivität der beiden Substanzen gegenüber dem endogenen Vollagonisten Acetylcholin zu verdeutlichen, wurden an jedem einzelnen Versuchstag die Konzentrations-Effekt-Kurven der Hybridliganden auf das obere Plateau des Effektes von Acetylcholin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  prozentualisiert. Wie bereits im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit an CHO- $hM_1$ -wt-Zellen gezeigt (vgl. 4.1.4.1.2), konnte das Hybrid JK 550 auch an den CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Zellen dieses zweiten Ergebnisteiles einen konzentrationsabhängigen Effekt erzielen. Allerdings zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Lage des oberen Plateaus ( $E_{max} = \text{CHO-}hM_1\text{-wt} = 85 \pm 4\%$  / CHO-Flp-



$hM_1$ -wt =  $53 \pm 4\%$ ; t-Test,  $p < 0,05$ ) der Konzentrations-Wirkungskurve zu den im ersten Ergebnisteil verwendeten CHO- $M_1$ -wt Zellen. Dieser Unterschied ließe sich durch die ausgeprägte Verschiedenheit in der Rezeptorexpression der beiden Systeme (vgl. 4.2.1.1) erklären. Zudem könnte auch eine verminderte G Protein Expression einen Einfluss auf diese Ergebnisunterschiede besitzen (Yang und Lanier 1999; Kinzer-Ursem und Linderman 2007).

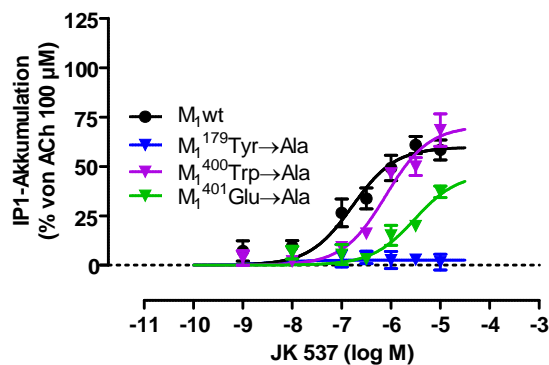
An der Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  zeigte JK 550 eine 11-fach stärkere Wirkstärke  $\log EC_{50} = -7,75 \pm 0,45$  als am  $hM_1$ -wt-Rezeptor, zudem verringerte sich das obere Plateau auf  $E_{\max} = 16 \pm 2\%$  im Sinne einer signifikanten Abnahme der intrinsischen Wirksamkeit (t-Test,  $p < 0,05$ ). Der Austausch von  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  führte gegenüber dem  $hM_1$ -Wildtyp ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der Wirkstärke (t-Test,  $p < 0,05$ ). Damit wies das Hybrid JK 550 eine 36-fach höhere Wirkpotenz im Vergleich zum Wildtyprezeptor auf. Sein orthosterischer Baustein Iperoxo dagegen zeigte eine 138-fach schwächere Wirkstärke bei dieser Mutation, vergleichen mit dem  $hM_1$ -wt-Rezeptor (vgl. Tab. 4.55). Interessanterweise zeigte das Hybrid JK 550 (vgl. Tab. 4.56) eine 39-fach höhere Wirkstärke an dieser Mutation als Iperoxo (vgl. Tab. 4.55). Die intrinsische Aktivität war gegenüber dem Wildtyp auf  $21 \pm 3\%$  reduziert, wohingegen sein orthosterischer Baustein Iperoxo an dieser Mutation eine signifikante Zunahme der intrinsischen Wirksamkeit auf über 100% zeigte (vgl. Tab. 4.55; t-Test  $< 0,05$ ). Die Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve für JK 550 durch die Mutation  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$  und der damit einhergehende Verlust der Wirkstärke gegenüber dem  $hM_1$ -Wildtyp waren nicht signifikant. Ähnlich erwies sich die Abnahme des oberen Plateaus ( $E_{\max} = 32 \pm 11\%$ ) auf Grund des großen Standardfehlers ebenfalls als nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ). Alle vier Konzentrations-Effekt-Kurven konnten signifikant besser mit einer Kurvensteilheit von  $n_H = 1$  beschrieben werden (F-Test,  $p < 0,05$ ).

Substanz	Rezeptor	$\log EC_{50}$	$\log EC_{50}$	$E_{\max} (\%)$	$n_H$	n
	$M_1$ -wt	$-6,70 \pm 0,17$		$53 \pm 4$	= 1,00	5
JK 550	$M_1^{179}\text{Tyr Ala}$	$-7,75 \pm 0,45^*$	1,05	$16 \pm 2^{***}$	= 1,00	3
	$M_1^{400}\text{Trp Ala}$	$-8,26 \pm 0,54^*$	1,56	$21 \pm 3^{***}$	= 1,00	6
	$M_1^{401}\text{Glu Ala}$	$-5,81 \pm 0,48$	-0,89	$32 \pm 11$	= 1,00	3

**Tabelle 4.56: Kenngrößen der in Abbildung 4.62 dargestellten gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 550 induzierten IP1-Akkumulation.**  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der JK 550-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $\log EC_{50}$ : Differenz zwischen dem  $\log EC_{50}$ -Wert an der jeweiligen  $M_1$ -Rezeptormutante und dem  $\log EC_{50}$ -Wert am  $hM_1$ -Wildtyprezeptor.  $E_{\max}$ : Maximale IP1-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve) in Prozent des Acetylcholineffektes (100  $\mu\text{M}$ ).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit bei variabler Kurvensteilheit, sofern verschieden von  $n_H = 1$  (F-Test,  $p < 0,05$ ). n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12).  $^{***}$ : Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße für den  $hM_1$ -wt (t-Test,  $^* p < 0,05$ ,  $^{***} p < 0,001$ ).

Das Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) zeigte gegenüber dem kürzeren Hybrid JK 550 ( $C_4$ ) (vgl. Abb. 4.62 bzw. Abb. 4.63) ein vollkommen anderes Bild hinsichtlich der  $G_q$ -vermittelten Rezeptoraktivierung an den  $hM_1$ -Rezeptormutanten. Der Austausch der Aminosäure Tyrosin 179 zu Alanin führt hier interessanterweise zu einem vollständigen Verlust des Hybrid-induzierten Signals, sodass eine Ermittlung der Parameter

$E_{\max}$  und  $\log EC_{50}$  in diesem Fall nicht möglich war. An den beiden Mutationen  $M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$  und  $M_1^{400}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$  zeigte JK 537 ( $C_6$ ) einen signifikanten Verlust der Wirkstärke (t-Test,  $p < 0,05$ ). Anders als bei Iperoxo, dem orthosterischen Baustein dieses Hybrides, führte der Austausch der konservierten Aminosäure Tryptophan 400 bei JK 537 zu einem Verlust der Wirkstärke um den Faktor 5, die fehlende negativ geladene Aminosäure Glutaminsäure sogar um den Faktor 18 (t-Test,  $p < 0,05$ ). Interessanterweise führte die Mutation  $M_1^{400}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ , wie bei seinem orthosterischen Baustein zu einer nicht signifikanten Zunahme der intrinsischen Wirksamkeit von  $E_{\max}$ :  $hM_1\text{-wt} = 60 \pm 4\%$  zu  $E_{\max}$ .  $M_1^{400}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala} = 70 \pm 5\%$  (t-Test,  $p > 0,05$ ). Der Austausch von Glutaminsäure 401 im Übergang zwischen der dritten extrazellulären Schleife und Transmembran VII zur aliphatischen Aminosäure Alanin führt zu einer Absenkung des oberen Plateaus, welche sich aber auf Grund des hohen Standardfehlers ebenfalls als nicht signifikant verschieden vom  $hM_1$ -Wildtyp erwies (t-Test,  $p > 0,05$ ). Auch hier konnten alle Konzentrations-Effekt-Kurven (mit Ausnahme von  $M_1^{179}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$ ) mit einer Kurvensteilheit von  $n_H = 1$  beschrieben werden (F-Test,  $p > 0,05$ , Tab. 4.57).



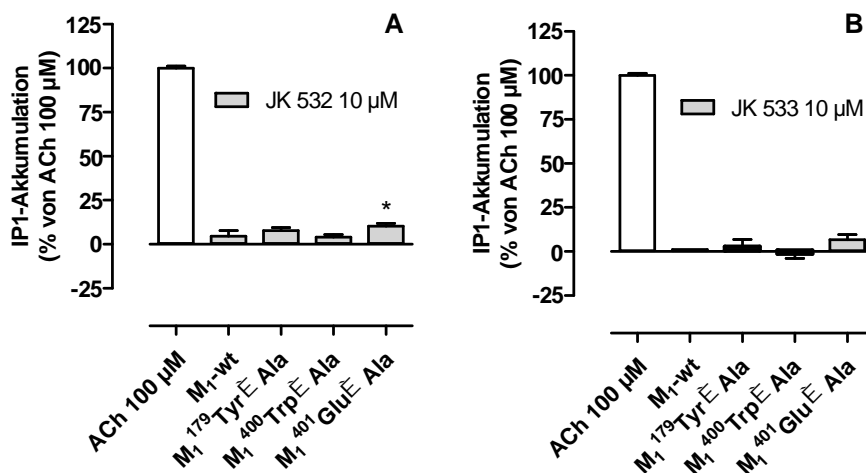
**Abbildung 4.63: Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptors auf die JK 537-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- $M_1$ -Zellen.** Ordinate: IP1-Akkumulation in %: 0% entspricht dem unteren Plateau (basale IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (Acetylcholin 100  $\mu\text{M}$ ). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Hybrid-Konzentration. Die Zellzahl betrug 100.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis sieben unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	Rezeptor	$\log EC_{50}$	$\log EC_{50}$	$E_{\max}$ (%)	$n_H$	n
JK 537	$M_1\text{-wt}$	$-6,78 \pm 0,14$	-	$60 \pm 4$	$= 1,00$	7
	$M_1^{179}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$	-	-	-	-	4
	$M_1^{400}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$	$-6,11 \pm 0,12^{**}$	-0,67	$70 \pm 5$	$= 1,00$	5
	$M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$	$-5,52 \pm 0,27^{**}$	-1,26	$47 \pm 11$	$= 1,00$	3

**Tabelle 4.57: Kenngrößen der in Abbildung 4.63 dargestellten gemittelten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 537 induzierten IP1-Akkumulation.**  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der JK 537-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $\log EC_{50}$ : Differenz zwischen dem  $\log EC_{50}$ -Wert an der jeweiligen  $M_1$ -Rezeptormutante und dem  $\log EC_{50}$ -Wert am  $hM_1$ -Wildtyprezeptor.  $E_{\max}$ : Maximale IP1-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve) in Prozent des Acetylcholineffektes (100  $\mu\text{M}$ ).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit bei variabler Kurvensteilheit, sofern verschieden von  $n_H = 1$  (F-Test,  $p < 0,05$ ). n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des  $hM_1\text{-wt}$  Rezeptors (t-Test,  $**p < 0,01$ ).

#### 4.2.5.4 Charakterisierung der allosterischen Bausteine hinsichtlich eines möglichen agonistischen Effektes durch Punktmutationen im allosterischen Haftareals des muskarinischen $hM_1$ -Rezeptors.

In vorangegangenen Experimenten (Holze, Masterarbeit 2013), sowie im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit an  $hM_1$ -wt-Rezeptoren, konnte mit Hilfe von DMR- und IP1- Experimenten gezeigt werden, dass die allosterischen Bausteine der dualsterischen Hybridliganden keinen agonistischen Effekt besitzen (vgl. 4.1.7), wohingegen der orthosterische Baustein Iperoxo ein vollagonistisches Verhalten unabhängig vom untersuchten Signalweg zeigt. Um nun zu prüfen, ob der Austausch bestimmter Aminosäuren im allosterischen Bereich des  $hM_1$ -Rezeptors einen Einfluss auf den agonistischen Effekt der Bausteine hat, wurden die allosterischen Fragmente JK 533 ( $C_4$ ) und JK 532 ( $C_6$ ) hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, den  $G_q$ -Signalweg zu aktivieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.64 und Tabelle 4.58 dargestellt. Keines der allosterischen Fragmente zeigte am CHO-Flp- $hM_1$ -wt Rezeptor oder an den Mutationen  $M_1^{179}$ Tyr Ala und  $M_1^{400}$ Trp Ala einen von Null verschiedenen Effekt (t-Test,  $p > 0,05$ ). Lediglich über die Rezeptormutation  $M_1^{401}$ Glu Ala, konnte das allosterische Fragment JK 532 ( $10 \pm 2\%$ ) ein von Null signifikant unterschiedliches agonistisches Signal hervorrufen (t-Test,  $p < 0,05$ ). Das Fragment JK 533 verursachte an keinem der untersuchten Rezeptoren ein signifikantes, vom  $G_q$  Protein vermitteltes Signal (t-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4. 64:** Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen des potentiellen allosterischen Bindungsareals des  $hM_1$ -Rezeptors auf die Fragment-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- $M_1$ -Zellen. Die Zellzahl betrug 100.000 Zellen pro Vertiefung. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. \*: signifikant unterschiedlich von Null (Einstichproben t-Test,  $*p < 0,05$ ).

Rezeptor	JK 533 (C <sub>4</sub> )		JK 532 (C <sub>6</sub> )	
	E <sub>max</sub> (%)	n	E <sub>max</sub> (%)	n
M <sub>1</sub> -wt	4 ± 3 <sup>n.s.</sup>	3	1 ± 6 <sup>n.s.</sup>	3
M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	8 ± 2 <sup>n.s.</sup>	3	3 ± 4 <sup>n.s.</sup>	3
M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	4 ± 1 <sup>n.s.</sup>	3	-1 ± 3 <sup>n.s.</sup>	3
M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	7 ± 3 <sup>n.s.</sup>	3	10 ± 2 <sup>*</sup>	3

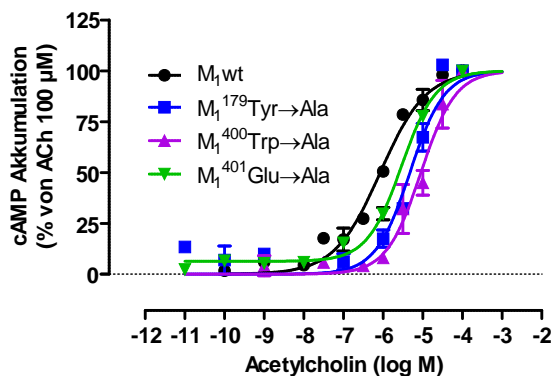
**Tabelle 4. 58: Kenngrößen der in Abbildung 4.64 dargestellten Fragment-induzierten IP1-Akkumulation.** E<sub>max</sub>: Maximale IP1-Akkumulation in Prozent des durch Acetylcholin 100 µM ausgelösten Effektes. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. \*: signifikant unterschiedlich von Null (Einstichproben t-Test, \*p<0,05); n.s.: nicht signifikant unterschiedlich von Null (Einstichproben t-Test, p>0,05).

#### 4.2.5.5 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im allosterischen Bereich des hM<sub>1</sub>-Rezeptors auf die durch Acetylcholin induzierte cAMP-Akkumulation in CHO-Flp-M<sub>1</sub>-Zellen

Neben den Experimenten zur Überprüfung des Einflusses der drei allosterischen Rezeptorpunktmutationen auf die G<sub>q</sub> Protein-Aktivierung, wurde in einem weiteren Schritt ihr Einfluss auf die G<sub>s</sub> Protein-Aktivierung überprüft. Hierzu wurde wie bereits unter 4.1.4.2 dieser Arbeit am hM<sub>1</sub>-Wildtyp-Rezeptor gezeigt, die Produktion des sekundären Botenstoffs cAMP mit Hilfe eines kompetitiven Immunoassays gemessen, dessen Messprinzip auf dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) basiert (vgl. 3.3.3). Wie zuvor in den Messungen der IP1-Akkumulation wurde mit der Charakterisierung der beiden Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo begonnen. Die Normierung der Datensätze erfolgte stets auf die an jedem Versuchstag mitgeführte Konzentration von 100 µM Acetylcholin.

Der Effekt von Acetylcholin auf die cAMP-Akkumulation in Abhängigkeit verschiedener Rezeptorpunktmutationen ist in Abbildung 4.65 dargestellt. Der endogene Vollagonist Acetylcholin führte sowohl am CHO-Flp-hM<sub>1</sub>-wt Rezeptor, als auch an allen drei unterschiedlichen Mutationen zu einer konzentrationsabhängigen cAMP-Akkumulation. Die drei Punktmutationen zeigten keinen Einfluss auf die Fähigkeit der Rezeptoraktivierung durch Acetylcholin; keines ihrer oberen Kurvenplateaus war signifikant verschieden von dem maximalen Effekt der Kontrolle (F-Test, p>0,05). Anders als der Effekt auf die intrinsische Aktivität, zeigten die Rezeptormutationen einen deutlichen Einfluss auf die Wirkstärke von Acetylcholin. Die Wendepunkte der Konzentrations-Wirkungs-Kurven für alle drei M<sub>1</sub>-Rezeptormutanten unterschieden sich signifikant vom dem des hM<sub>1</sub>-Wildtyp-Rezeptors (t-Test, p<0,05), wobei die Mutation M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala (logEC<sub>50</sub> = -5,05 ± 0,06) mit fast einer ganzen Dekade den höchsten Verlust der Wirkstärke zeigte (vgl. Tab. 4.59). Der Austausch der Aminosäure Tyrosin 179 zu Alanin (logEC<sub>50</sub> = -5,32 ± 0,08) zeigte eine 4-fach schwächere Wirkstärke für Acetylcholin gegenüber dem Wildtyprezeptor, der Austausch von Glutaminsäure 401 zu Alanin

( $\log EC_{50} = -5,53 \pm 0,05$ ) eine 3-fach schwächere. Alle vier-Konzentrations-Effekt-Kurven konnten mit einem Hill-Koeffizienten von  $n_H = 1$  angepasst werden (F-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4. 65: Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptors auf die ACh-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- $M_1$ -Zellen.** Ordinate: cAMP-Akkumulation in %: 0% entspricht dem unteren Plateau (basale cAMP-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (Acetylcholin 100  $\mu$ M). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration. Die Zellzahl betrug 50.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	Rezeptor	$\log EC_{50}$	$\log EC_{50}$	Basalwert (%)	$E_{max}$ (%)	$n_H$	n
ACh	$M_1$ -wt	$-5,96 \pm 0,06$	-	$6 \pm 2$	= 100	= 1,00	3
	$M_1^{179}$ Tyr Ala	$-5,32 \pm 0,08^{**}$	0,64	= 0	= 100	= 1,00	3
	$M_1^{400}$ Trp Ala	$-5,05 \pm 0,06^{***}$	0,91	= 0	= 100	= 1,00	3
	$M_1^{401}$ Glu Ala	$-5,53 \pm 0,05^{**}$	0,43	$6 \pm 1^{\#}$	= 100	= 1,00	3

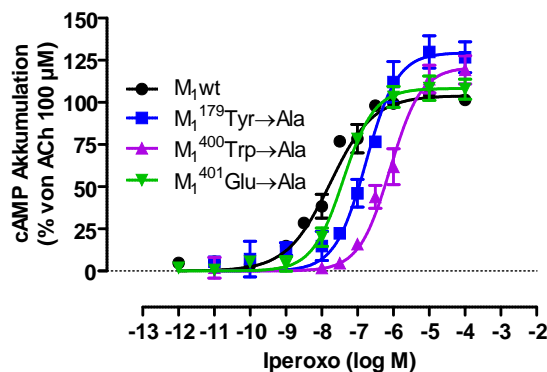
**Tabelle 4. 59: Kenngrößen der in Abbildung 4.65 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch ACh induzierten cAMP-Akkumulation.**  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der ACh-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $\log EC_{50}$ : Differenz zwischen dem  $\log EC_{50}$ -Wert an der jeweiligen  $M_1$ -Rezeptormutante und dem  $\log EC_{50}$ -Wert am  $hM_1$ -Wildtyprezeptor.  $E_{max}$ : Maximale cAMP-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve) in Prozent des Acetylcholinergebnisses (100  $\mu$ M).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit bei variabler Kurvensteilheit, sofern verschieden von  $n_H = 1$  (F-Test,  $p < 0,05$ ). n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*, \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des  $hM_1$ -wt-Rezeptors (t-Test,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ). # signifikant verschieden von 0 (F-Test,  $\#p < 0,05$ ).

#### 4.2.5.6 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im allosterischen Bereich des $hM_1$ -Rezeptors auf die durch Iperoxo-induzierte cAMP Akkumulation in CHO-Flp- $M_1$ -Zellen

Nachfolgend wurde erstmals Iperoxo an den mutierten  $hM_1$ -Rezeptoren hinsichtlich seiner Fähigkeit überprüft, den  $G_s$  Protein-vermittelten Signalweg zu aktivieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.66

dargestellt, die zugehörigen Kenngrößen in Tabelle 4.60 zusammengefasst. Die Mutation Tryptophan 400 zu Alanin ( $\log EC_{50} = -6,09 \pm 0,09$ ) zeigte wie zuvor Acetylcholin auch im Falle des Vollagonisten Iperoxo - bezogen auf den Wildtyp-Rezeptor ( $\log EC_{50} = -7,83 \pm 0,06$ ) - den stärksten Verlust der Wirkstärke von 1,74 log Einheiten, die einem Faktor von 55 entsprechen. Der Austausch der Aminosäuren  $M_1^{179}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$  ( $\log EC_{50} = -6,76 \pm 0,11$ ) und  $M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$  ( $\log EC_{50} = -7,42 \pm 0,07$ ) zu Alanin, führte gleichfalls zu signifikanten Verlusten der Wirkstärke (t-Test,  $p < 0,05$ ). Auch der Austausch der Aminosäure Glutaminsäure 401 zu Alanin führte, ebenfalls in Analogie zu Acetylcholin, zur geringsten Abnahme bezogen auf die Wirksamkeit des  $hM_1$ -Wildtyprezeptors. Interessanterweise zeigten die untersuchten  $hM_1$ -Punktmutationen hinsichtlich der Wirkstärke der  $G_s$ -Aktivierung für Acetylcholin und Iperoxo dasselbe Profil, wohingegen sich ihre Profile auf dem  $G_q$ -Signalweg unterschieden (vgl. Tab. 4.54, 4.55 und 4.59, 4.60).

Bemerkenswert war zudem die Zunahme der intrinsischen Aktivität von Iperoxo, die sich in einer signifikanten Erhöhung des oberen Kurvenplateaus in Gegenwart der Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$  (lokalisiert in der zweiten extrazellulären Schleife) als auch von  $M_1^{400}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$  (lokalisiert im oberen Bereich der siebten Transmembran) zeigte (t-Test,  $p < 0,05$ ). Ein geringerer Anstieg konnte wie in Kapitel 4.2.5.2 auch schon bei der Iperoxo-induzierten IP1-Akkumulation an  $M_1^{400}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$  festgestellt werden. Für Acetylcholin konnten im Gegensatz dazu sowohl hinsichtlich der  $G_q$  als auch der  $G_s$  Protein vermittelten Aktivierung keinerlei Veränderungen des oberen Kurvenplateaus festgestellt werden (vgl. Tabelle 4.60).



**Abbildung 4. 66: Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptors auf die Iperoxo-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- $M_1$ -Zellen.** Ordinate: cAMP-Akkumulation in %: 0% entspricht dem unteren Plateau (basale cAMP-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (Acetylcholin 100  $\mu\text{M}$ ). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration. Die Zellzahl betrug 50.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

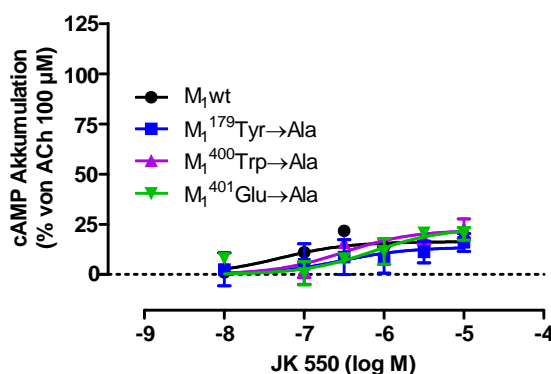
Substanz	Rezeptor	log EC <sub>50</sub>	log EC <sub>50</sub>	Basalwert (%)	E <sub>max</sub> (%)	n <sub>H</sub>	n
Iperoxo	M <sub>1</sub> -wt	-7,83 ± 0,06		= 0	= 100	= 1,00	4
	M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	-6,76 ± 0,11 <sup>***</sup>	1,07	= 0	130 ± 6 <sup>#</sup>	= 1,00	4
	M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	-6,09 ± 0,09 <sup>***</sup>	1,74	= 0	121 ± 5 <sup>#</sup>	= 1,00	4
	M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	-7,42 ± 0,07 <sup>**</sup>	0,41	= 0	107 ± 2	= 1,00	3

**Tabelle 4. 60: Kenngrößen der in Abbildung 4.66 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch Iperoxo induzierten cAMP-Akkumulation.** logEC<sub>50</sub>: Dekadischer Logarithmus der Iperoxo-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. logEC<sub>50</sub>: Differenz zwischen dem logEC<sub>50</sub>-Wert an der jeweiligen M<sub>1</sub>-Rezeptormutante und dem logEC<sub>50</sub>-Wert am hM<sub>1</sub>-Wildtyprezeptor. E<sub>max</sub>: Maximale cAMP-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve) in Prozent des Acetylcholineffektes (100 µM). n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit bei variabler Kurvensteilheit, sofern verschieden von n<sub>H</sub> = 1 (F-Test, p<0,05). n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*,\*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptors (t-Test, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001). # signifikant verschieden von 0 (F-Test, #p<0,05).

#### 4.2.5.7 Einfluss unterschiedlicher Rezeptorpunktmutationen auf die durch JK 550 und JK 537 induzierte cAMP Akkumulation in CHO-Flp-M<sub>1</sub>-Zellen

Im nächsten Schritt wurden die dualsterischen Hybride JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) hinsichtlich der G<sub>s</sub> Protein-vermittelten Signalwegaktivierung untersucht.

Die Ergebnisse für JK 550 (C<sub>4</sub>) sind in Abbildung 4.67 aufgeführt. JK 550 war unabhängig vom untersuchten hM<sub>1</sub>-Rezeptor ausgeprägt partialagonistisch wirksam, mit einer maximalen Wirksamkeit kleiner als 25% (von ACh 100 µM).



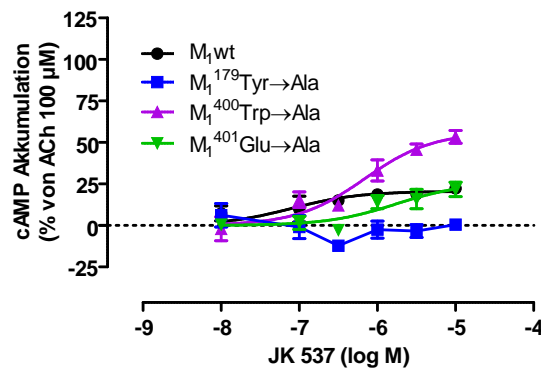
**Abbildung 4. 67: Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des hM<sub>1</sub>-Rezeptors auf die JK 550-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp-M<sub>1</sub>-Zellen.** Ordinate: cAMP-Akkumulation in %: 0% entspricht dem unteren Plateau (basale cAMP-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (Acetylcholin 100 µM). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Hybrid-Konzentration. Die Zellzahl betrug 50.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Auf Grund des allgemein geringeren, maximalen Effektes, zeigten die mittels der nichtlinearen Datenanalyse ermittelten  $\log EC_{50}$ -Werte aller Konzentrations-Effekt-Kurven größere Standardfehler (Tab. 4.61) als in Fällen eines vollagonistischen Effektes (vgl. Tab. 4.60). Somit konnte lediglich bei der Mutation  $M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$  eine signifikante Abnahme der Wirkstärke verzeichnet werden. Der Austausch der Aminosäuren Tyrosin 179 und Tryptophan 400 zeigte zwar ebenfalls Verluste hinsichtlich der Wirkstärke, jedoch waren diese nicht statistisch signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ). Wie bereits im  $G_q$ -Signalweg, zeigte JK 550 ( $C_4$ ) auch im  $G_s$ -Signalweg bei keiner der drei untersuchten Mutanten eine Zunahme des oberen Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurve, bzw. der intrinsischen Wirksamkeit.

Rezeptor	$\log EC_{50}$	$\log EC_{50}$	Basalwert (%)	$E_{\max}$ (%)	$n_H$	n
$M_1$ -wt	$-7,30 \pm 0,22$	-	= 0	$16 \pm 1$	= 1,00	3
$M_1^{179}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$	$-6,53 \pm 0,81$	-0,77	= 0	$14 \pm 5$	= 1,00	4
$M_1^{400}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$	$-6,50 \pm 0,31$	-0,80	= 0	$22 \pm 3$	= 1,00	3
$M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$	$-6,14 \pm 0,29^*$	-1,16	= 0	$23 \pm 4$	= 1,00	3

**Tabelle 4. 61: Kenngrößen der in Abbildung 4.67 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 550 induzierten cAMP-Akkumulation.**  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der JK 550-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $\log EC_{50}$ : Differenz zwischen dem  $\log EC_{50}$ -Wert an der jeweiligen  $M_1$ -Rezeptormutante und dem  $\log EC_{50}$ -Wert am  $hM_1$ -Wildtyprezeptor.  $E_{\max}$ : Maximale cAMP-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve) in Prozent des Acetylcholineffektes (100  $\mu\text{M}$ ).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit bei variabler Kurvensteilheit, sofern verschieden von  $n_H = 1$  (F-Test,  $p < 0,05$ ). n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des  $hM_1$ -wt-Rezeptors (t-Test,  $*p < 0,05$ ).

Die korrespondierenden Daten für das Hybrid JK 537 sind in Abbildung 4.68 dargestellt.



**Abbildung 4. 68: Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptors auf die JK 537-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- $M_1$ -Zellen.** Ordinate: cAMP-Akkumulation in %: 0% entspricht dem unteren Plateau (basale cAMP-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (Acetylcholin 100  $\mu\text{M}$ ). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Hybrid-Konzentration. Die Zellzahl betrug 50.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12) oder Punkt-zu-Punkt-Verbindungen. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.



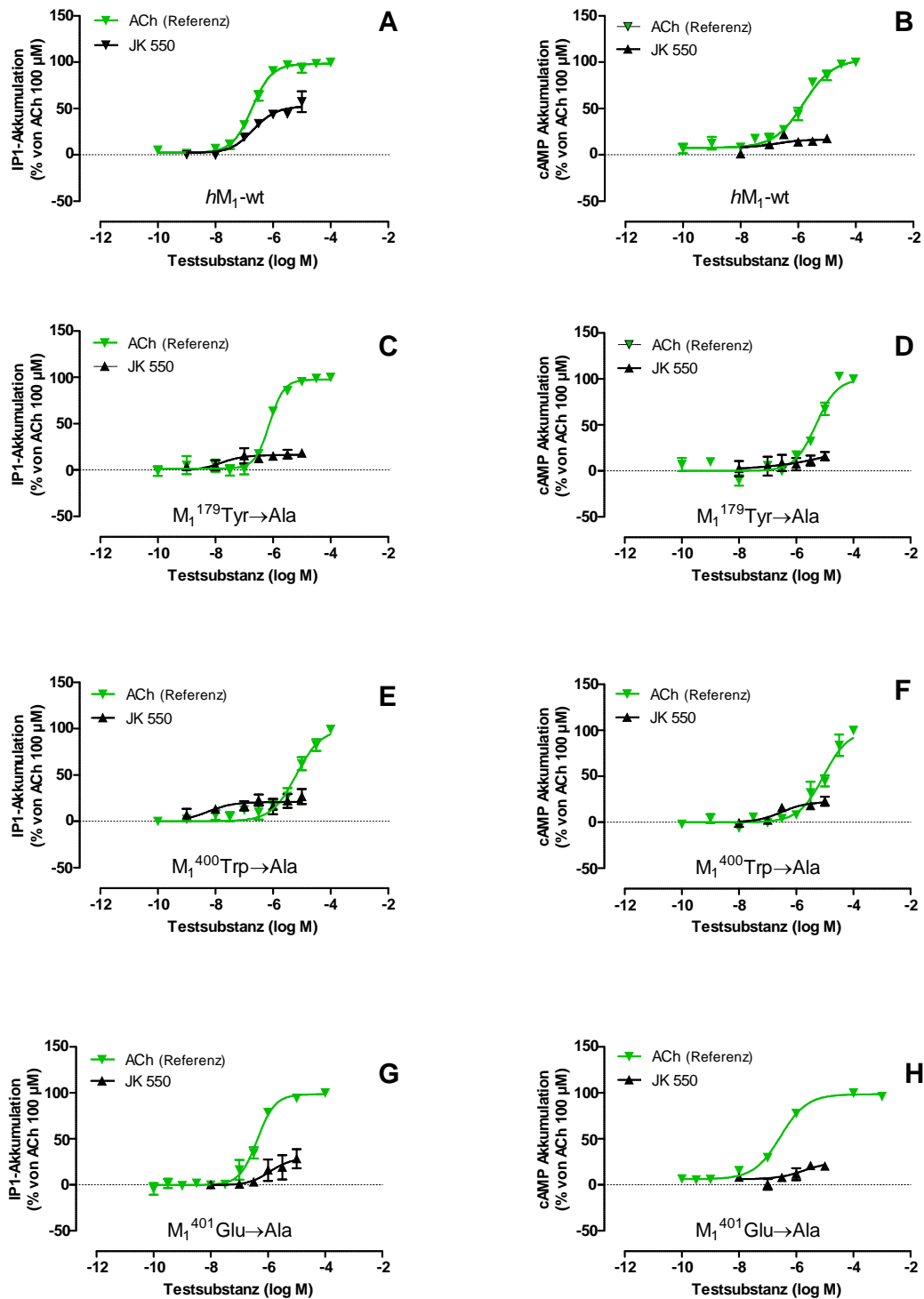
Wie zuvor in Abbildung 4.63 für die IP1-Akkumulation gezeigt (vgl. Kapitel 4.2.5.3), verlor das dualsterische Hybrid JK 537 nach dem Austausch der Aminosäure  $M_1^{179}\text{Tyr}$  Ala in der zweiten extrazellulären Schleife des  $M_1$ -Rezeptors seine Fähigkeit zur  $G_q$  Protein-Aktivierung. Da es sich bei dem  $G_q$ -Signalweg um den Hauptsignalweg des  $hM_1$ -Rezeptors handelt, vermuteten wir, dass das Hybrid ebenfalls nicht in der Lage sein würde, den  $G_s$ -Signalweg zu aktivieren. Andererseits zeigte der orthosterische Baustein Iperoxo des Hybrides JK 537 genau an dieser Rezeptormutation eine signifikante Zunahme seiner intrinsischen Aktivität bezüglich des  $G_s$  Signalweges im Vergleich zum  $hM_1$ -wt-Rezeptor (vgl. Abb. 4.68), die auf das dualsterische Hybrid übertragbar sein könnte. Wie in Abbildung 4.68 deutlich wird, war das Hybrid JK 537 jedoch nicht in der Lage über die  $M_1^{179}\text{Tyr}$  Ala Rezeptormutante einen messbaren Effekt zu erzielen, was dafür spricht, dass das JK 537 an diesem Rezeptorprotein nicht in der Lage ist, die Interaktion mit stimulatorischen  $G_s$ -Proteinen zu induzieren. An der Mutation  $M_1^{400}\text{Trp}$  Ala konnte JK 537 interessanterweise (vgl. Abb. 4.68, Tabelle 4.62) ebenso wie sein orthosterischer Baustein Iperoxo (vgl. Abb. 4.66, Tabelle 4.60) einen signifikanten Anstieg der intrinsischen Aktivität ( $E_{\max,JK537} = 56 \pm 5\%$ ,  $E_{\max,Iperoxo} = 121 \pm 5\%$ ) gegenüber dem  $hM_1$ -Wildtyp ( $E_{\max,JK537} = 21 \pm 3\%$ ,  $E_{\max,Iperoxo} = 100\%$ ) vermitteln. Die Entfernung der negativen Ladung im Bereich der siebten Transmembrandomäne in der Rezeptormutation  $M_1^{401}\text{Glu}$  Ala führte zu keinem signifikanten Unterschied im oberen Kurvenplateau.  $M_1^{400}\text{Trp}$  Ala zeigte gegen über dem Wildtyp Rezeptor eine 9-fach schwächere, die Mutation  $M_1^{401}\text{Glu}$  Ala sogar eine 21-fach schwächere Wirkstärke (vgl. Tabelle 4.62). Auf Grund des geringen maximalen Effekts zeigten auch hier die nichtlinear ermittelten  $\log EC_{50}$ -Werte aller Konzentrations-Effekt-Kurven hohe Standardfehler, wodurch das Auffinden statistischer Unterschiede zwischen den detektierten Verlusten der Wirkstärke behindert wurde (t-Test,  $p > 0,05$ ). Alle Kurven konnten mit einem Steilheitsmaß, das nicht signifikant verschieden von  $n_H = 1$  war, beschrieben werden (F-test,  $p > 0,05$ ; Tabelle 4.62).

Rezeptor	$\log EC_{50}$	$\log EC_{50}$	Basalwert (%)	$E_{\max}$ (%)	$n_H$	n
$M_1$ -wt	$-7,10 \pm 0,35$	-	= 0	$21 \pm 3$	= 1,00	3
$M_1^{179}\text{Tyr}$ Ala	-	-	-	-	-	3
$M_1^{400}\text{Trp}$ Ala	$-6,16 \pm 0,17$	-0,94	= 0	$56 \pm 5^{**}$	= 1,00	3
$M_1^{401}\text{Glu}$ Ala	$-5,77 \pm 0,33$	-1,33	= 0	$26 \pm 6$	= 1,00	3

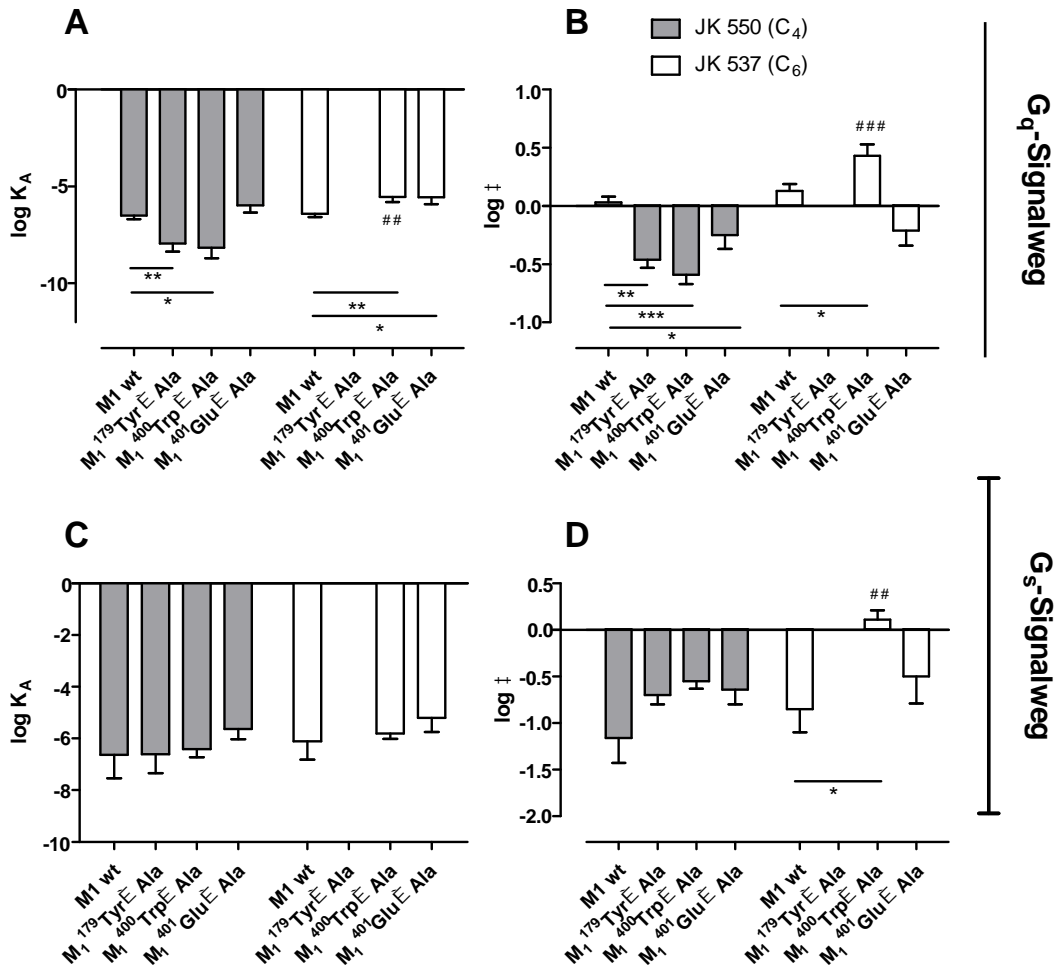
**Tabelle 4. 62: Kenngrößen der in Abbildung 4.68 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch JK 537 induzierten cAMP-Akkumulation.**  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der JK 537-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $\log EC_{50}$ : Differenz zwischen dem  $\log EC_{50}$ -Wert an der jeweiligen  $M_1$ -Rezeptormutante und dem  $\log EC_{50}$ -Wert am  $hM_1$ -Wildtyprezeptor.  $E_{\max}$ : Maximale cAMP-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve) in Prozent des Acetylcholineffektes (100  $\mu\text{M}$ ).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit bei variabler Kurvensteilheit, sofern verschieden von  $n_H = 1$  (F-Test,  $p < 0,05$ ). n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des  $hM_1$ -wt-Rezeptors (t-Test,  $**p < 0,01$ ).

#### 4.2.6 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im putativ allosterischen Bindungsareal des $hM_1$ -Rezeptors auf die Hybrid induzierte funktionelle Affinität sowie seine Kopplungseffizienz

Mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983, vgl. 3.4) wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal untersucht, welchen Einfluss die Mutationen im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstelle des muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptors auf die funktionelle Affinität ( $K_A$ ) sowie die Kopplungseffizienz ( $\tau$ ) der dualsterischen Hybridliganden JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) besitzen. Analysiert wurden die zuvor gezeigten funktionellen Daten des  $G_q$ -Signalweges (vgl. 4.2.5.3) zur Hybrid induzierten IP1-Akkumulation sowie des  $G_s$ -Signalweges (vgl. 4.2.5.7) zur cAMP-Akkumulation. Als Referenzagonist diente der endogene Agonist Acetylcholin. Die Ergebnisse sind, repräsentativ für das dualsterische Hybrid JK 550 ( $C_4$ ) am Flp- $hM_1$ -wt-Rezeptor sowie an den drei Mutationen ( $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$ ,  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  und  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$ ) in Abbildung 4.69 für die zwei untersuchten Signalwege dargestellt. Die Auswertung des Hybrides JK 537 ( $C_6$ ) erfolgte analog zu dieser Vorgehensweise. Die mit Hilfe dieses Modells ermittelten Parameter  $K_A$  und  $\tau$  sind für beide Hybride in Abbildung 4.70 und Tabelle 4.63 zusammengefasst.



**Abbildung 4.69:** Ergebnisse der Anwendung des „Operational Model of Agonism“ auf die Fähigkeit des dualsterischen Hybrides JK 550 zur IP1- und cAMP-Akkumulation  $hM_1$ -wt-Rezeptor vermittelt  $hM_1$ -wt-Rezeptor bzw.  $hM_1$ -Rezeptoren mit unterschiedlichen Punktmutationen im allosterischen Bindungsareal. Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus zwei Kurven (dualsterisches Hybrid und Referenzagonist), vgl. Kapitel 3.2.4.2. Ordinate: (A,C,D,E) IP1-Akkumulation in %. 0% entspricht der basalen IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz und 100% dem oberen Plateau in Gegenwart von 100  $\mu$ M Acetylcholin. (B,D;F,H) cAMP-Akkumulation in %. 0% entspricht der basalen cAMP-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz und 100% dem Effekt von 100  $\mu$ M Acetylcholin. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des Hybrid- oder Referenzagonisten. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (Gleichung 36) nach Black und Leff, 1983. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.



**Abbildung 4.70: Einfluss unterschiedlicher Rezeptorpunktmutationen des potentiellen allosterischen Bindungsareales des *hM<sub>1</sub>*-Rezeptors auf die durch JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) induzierte funktionelle Affinität  $K_A$  und Kopplungseffizienz  $\dagger$  im  $G_q$ - und  $G_s$ -Signalweg in CHO-Flp- $M_1$ -Zellen.** Die Werte für  $\log K_A$  (funktionelle Affinität) und  $\log \dagger$  (Kopplungseffizienz) wurden mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff, 1983, vgl. 3.4 (Gleichung 36)) ermittelt. Der endogene Vollagonist ACh diente als Referenzagonist. Dargestellt sind die in Tabelle 4.63 dargestellten Mittelwerte. \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des *hM<sub>1</sub>*-wt-Rezeptors (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). ##, ###: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße induziert durch das kürzere Hybrid JK 550 (t-Test, ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ ).

<b>G<sub>q</sub>-Signalwegaktivierung</b>						
<b>JK 550 (C<sub>4</sub>)</b>	<b>log K<sub>A</sub></b>	<b>log K<sub>A</sub></b>	<b>log</b>	<b>log</b>		<b>n</b>
<b>M<sub>1</sub>-wt</b>	-6,51 ± 0,17	0,03	0,03 ± 0,05	-	1,07	5
<b>M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala</b>	-7,94 ± 0,42**	1,43	-0,46 ± 0,07**	-0,49	0,35	3
<b>M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala</b>	-8,16 ± 0,55*	1,65	-0,59 ± 0,08***	-0,62	0,26	6
<b>M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala</b>	-5,97 ± 0,38	-0,54	-0,25 ± 0,12*	-0,28	0,56	3
<b>JK 537 (C<sub>6</sub>)</b>	<b>log K<sub>A</sub></b>	<b>log K<sub>A</sub></b>	<b>log</b>	<b>log</b>		<b>n</b>
<b>M<sub>1</sub>-wt</b>	-6,40 ± 0,17	-	0,13 ± 0,06	-	1,35	7
<b>M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4
<b>M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala</b>	-5,54 ± 0,16***#	-0,86	0,43 ± 0,10****	0,30	2,69	5
<b>M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala</b>	-5,56 ± 0,35*	-0,84	-0,08 ± 0,13	-0,21	0,83	3

<b>G<sub>s</sub>-Signalwegaktivierung</b>						
<b>JK 550 (C<sub>4</sub>)</b>	<b>log K<sub>A</sub></b>	<b>log K<sub>A</sub></b>	<b>log</b>	<b>log</b>		<b>n</b>
<b>M<sub>1</sub>-wt</b>	-6,63 ± 0,91		-1,16 ± 0,27	-	0,07	3
<b>M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala</b>	-6,61 ± 0,73	-0,02	-0,70 ± 0,10	0,46	0,20	4
<b>M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala</b>	-6,40 ± 0,32	-0,23	-0,55 ± 0,08	0,61	0,28	3
<b>M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala</b>	-5,63 ± 0,40	-1,00	-0,64 ± 0,16	0,52	0,23	3
<b>JK 537 (C<sub>6</sub>)</b>	<b>log K<sub>A</sub></b>	<b>log K<sub>A</sub></b>	<b>log</b>	<b>log</b>		<b>n</b>
<b>M<sub>1</sub>-wt</b>	-6,11 ± 0,71	-	-0,85 ± 0,25	-	0,14	3
<b>M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3
<b>M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala</b>	-5,80 ± 0,21	-0,31	0,11 ± 0,10*##	0,96	1,29	3
<b>M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala</b>	-5,20 ± 0,55	-0,91	-0,50 ± 0,29	0,35	0,32	3

**Tabelle 4. 63: Zusammenfassung der in Abbildung 4.70 dargestellten numerischen Parameter.** logK<sub>A</sub>: Dekadischer Logarithmus der funktionellen Affinität. logK<sub>A</sub>: Differenz zwischen dem logK<sub>A</sub>-Wert an der jeweiligen M<sub>1</sub>-Rezeptormutante und dem logK<sub>A</sub>-Wert am hM<sub>1</sub>-Wildtyprezeptor. Log : Dekadischer Logarithmus der Kopplungseffizienz. log : Differenz zwischen dem log -Wert an der jeweiligen M<sub>1</sub>-Rezeptormutante und dem log -Wert am hM<sub>1</sub>-Wildtyprezeptor. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff, 1983; vgl. (Gleichung 36)) \*,\*\*,\*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptors (t-Test, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).##,###: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße induziert durch das kürzere Hybrid JK 550 (t-Test, ##p<0,01, ###p<0,001).

#### hM<sub>1</sub>-wt

Das dualsterische Hybrid JK 550 (C<sub>4</sub>) zeigte am hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptor sowohl auf dem G<sub>q</sub>- als auch auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg eine kleinere Kopplungseffizienz (logτ) als das längere Hybrid JK 537 (C<sub>6</sub>), wobei beide Hybride die Kopplungseffizienz eines schwachen Partialagonisten (Black und Leff 1983) aufwiesen (vgl. Tab. 4.63). Im Falle von JK 550 (C<sub>4</sub>) war die Kopplungseffizienz für den G<sub>s</sub>-Signalweg 15-fach geringer als für den G<sub>q</sub>-Signalweg. Das Hybrid JK 537 zeigte eine 10-fach geringere

Kopplungseffizienz für den  $G_s$ -Signalweg. Die negativen  $\log$ -Werte, die für den  $G_s$  Protein-vermittelten Signalweg ermittelt wurden, deuten darauf hin, dass mehr als 100% der Rezeptoren besetzt sein mussten, damit ein halbmaximaler Effekt erzielt werden konnte. Der Vergleich mit den auf diesem Signalweg ermittelten  $E_{\max}$ -Werten (JK 550 = 16%; JK 537 = 21%) (vgl. 4.2.5.7) bestätigte diesen Befund (Black und Leff, 1983). Auf dem  $G_q$ -Signalweg benötigte JK 550 ( $C_4$ ) die Besetzung von 93% um einen halbmaximalen Effekt auszulösen, JK 537 mit 74%, etwa zwanzig Prozent weniger. Die funktionelle Affinität der beiden dualsterischen Hybride unterschieden sich weder untereinander, noch in Bezug auf die beiden untersuchten Signalwege signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ).

#### $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$

Die Mutation Tyrosin 179 zu Alanin zeigte für das kürzere der beiden untersuchten Hybride JK 550 ( $C_4$ ) im Gegensatz zum Wildtyp-Rezeptor eine auf dem  $G_q$ -Signalweg eine 3-fach schwächere Kopplungseffizienz (t-Test,  $p < 0,05$ ). Auf dem  $G_s$ -Signalweg konnte kein signifikanter Unterschied gegenüber dem  $hM_1$ -wt-Rezeptor in der Kopplungseffizienz festgestellt werden (t-Test,  $p > 0,05$ ). Interessant ist, dass JK 550 ( $C_4$ ) sowohl auf dem  $G_q$ - als auch auf dem  $G_s$ -Signalweg zu einer negativen Kopplungseffizienz ( $\tau$ ) ( $\log\tau_{G_q} = -0,46 \pm 0,07$ ;  $\log\tau_{G_s} = -0,70 \pm 0,10$ ) führte, was in beiden Fällen zeigt, dass bei dieser Mutation zur Aktivierung beider Signalwege theoretisch sogar mehr als 100% der Rezeptoren von JK 550 ( $C_4$ ) besetzt sein müssten, damit ein halbmaximaler Effekt erzielt werden konnte. Im Falle des dualsterischen Hybrides JK 537 ( $C_6$ ) konnten keine Kopplungseffizienz und keine funktionelle Affinität ermittelt werden, da diese Mutation zu einem völligen Funktionsverlust des  $hM_1$ -Rezeptors führte.

#### $M_1^{400}\text{Trp Ala}$

Der Austausch der Aminosäure Tryptophan 400, lokalisiert in der siebten Transmembrandomäne, zu Alanin, führte im Falle von JK 550 ( $C_4$ ) auf dem  $G_q$ -Signalweg zu einer 4-fachen Abnahme der Kopplungseffizienz  $\tau$  gegenüber dem  $hM_1$ -wt-Rezeptor (t-Test,  $p < 0,05$ ). Auf dem  $G_s$ -Signalweg konnte eine Zunahme um denselben Faktor detektiert werden, die jedoch auf Grund des hohen Standardfehlers nicht signifikant war (t-Test,  $p > 0,05$ ). Das dualsterische Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) führte interessanterweise sowohl auf dem  $G_q$ -Signalweg als auch auf dem  $G_s$ -Signalweg zu einer signifikanten Zunahme der Kopplungseffizienz  $\tau$  im Vergleich zum  $hM_1$ -wt-Rezeptor (t-Test,  $p < 0,05$ ). Auf dem  $G_q$ -Signalweg musste JK 537 damit theoretisch mehr als 100%, auf dem  $G_s$ -Signalweg 77% der Rezeptoren aktivieren, um einen halbmaximalen Effekt zu indizieren.

Obgleich die Mutation  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  für den Effekt des Hybrides JK 550 ( $C_4$ ) über den  $G_q$ -Signalweg eine signifikante Abnahme der Kopplungseffizienz  $\tau$  bewirkte, zeigte es eine 45-fach höhere funktionelle Affinität gegenüber dem  $hM_1$ -wt-Rezeptor. Im Gegensatz dazu konnte bei dem längeren Hybrid JK 537 ( $C_6$ ), für welches eine Zunahme der Kopplungseffizienz bei dieser Mutation ermittelt werden konnte, eine 7-fach schwächere Affinität gefunden werden. Somit besitzt das Hybrid JK 550 auf

dem  $G_q$ -Signalweg eine 8-fach schwächere Kopplungseffizienz als JK 537, dafür aber eine 417-fach höhere funktionelle Affinität. Auf dem  $G_s$ -Signalweg konnten trotz einer 9-fachen Zunahme von  $\tau$  jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der funktionellen Affinität ( $K_A$ ) zwischen beiden Hybriden festgestellt werden.

#### $M_1^{401}\text{Glu Ala}$

Das dualsterische Hybrid JK 550 ( $C_4$ ) zeigte an der Mutation  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$  auf dem  $G_q$ -Signalweg eine signifikante (von  $\tau = 1,07$  ( $hM_1$ -wt) zu  $\tau = 0,56$  ( $M_1^{401}\text{Glu Ala}$ )) Halbierung der Kopplungseffizienz  $\tau$  gegenüber dem  $hM_1$ -wt-Rezeptor. Dennoch lagen die  $\log$ -Werte im negativen Bereich (vgl. Tab. 4.63), was sich mit den in diesem Signalweg ermittelten Maximalwerten. ( $E_{\max, G_q} = 32 \pm 11\%$ ) deckte. Auf dem  $G_s$ -Signalweg konnten keine signifikanten Änderungen in der Kopplungseffizienz gefunden werden (t-Test,  $p > 0,05$ ), auch nicht für JK 537 ( $C_6$ ), weder auf dem  $G_q$ - noch auf dem  $G_s$ -Signalweg. Die funktionellen Affinitäten unterschieden sich weder zwischen den beiden Signalwegen, noch zwischen den beiden Hybridliganden (t-Test,  $p > 0,05$ ).

Das dualsterische Hybrid JK 550 zeigte am  $hM_1$ -Wildtyprezeptor auf dem  $G_q$ -Signalweg eine Kopplungseffizienz ( $\tau$ ) von 1,07 ( $\log \tau : 0,03 \pm 0,05$ ). Die funktionelle Affinität betrug  $\log K_A = -6,51 \pm 0,17$ . Der Austausch der Aminosäure Tryptophan 179 zu Alanin führte auf diesem Signalweg zu einer signifikanten Abnahme der Kopplungseffizienz ( $\tau = 0,35$ ), dafür aber zu einer 22-fach höheren funktionellen Affinität von JK 550 zum Rezeptorprotein. Die Mutation  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  zeigte mit einem  $\tau$ -Wert von 0,26 die höchste Abnahme der Kopplungseffizienz. Interessanterweise wies diese Mutation aber die höchste funktionelle Affinität auf. Der Austausch der negativ geladenen Aminosäure  $M_1^{401}\text{Glu}$  zu Alanin führte gegenüber dem  $hM_1$ -Wildtyp ebenfalls zu einer Senkung der Kopplungseffizienz, jedoch zeigte diese  $M_1$ -Mutante verglichen mit den anderen  $M_1$ -Mutanten den geringsten Verlust an Kopplungseffizienz. Die funktionelle Affinität entsprach mit  $-5,97 \pm 0,38$  dem  $EC_{50}$ -Wert.

Das dualsterische Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) zeigte auf dem  $G_s$ -Signalweg mit einem  $\tau$ -Wert von 0,14 am Wildtyp-Rezeptor eine sehr schwache Kopplungseffizienz, die für einen schwachen Partialagonismus spricht. Verglichen mit dem Wildtyprezeptor zeigte JK 537 an der Mutation  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  interessanterweise eine 9-fach höhere Kopplungseffizienz. Der Austausch der Aminosäure 401 zu Alanin führte demgegenüber zu einer Kopplungseffizienz, die nicht signifikant verschieden von der des  $hM_1$ -Wildtyprezeptors war. Die schwache Kopplungseffizienz sowohl des Wildtyprezeptors, als auch der Mutation  $M_{401}\text{Glu Ala}$  deuteten darauf hin, dass zur Aktivierung des  $G_s$ -Signalweges mehr als 100% der Rezeptoren mit JK537 besetzt sein müssen, damit ein halbmaximaler Effekt erzielt werden kann. Ein statistischer Vergleich der funktionellen Affinitätswerte beider Hybride war nicht möglich, da die geringen Maximalwerte der Konzentrations-Effekt-Kurven für den  $G_s$ -Signalweg eine große Ergebnisunsicherheit von  $\log K_A$  während der nichtlinearen Regressionsanalyse nach sich zogen (vgl.

Tab. 4.63). Im Falle von JK 537 konnten für die Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$  keine Werte ermittelt werden, da diese auf beiden Signalwegen zu einem völligen Funktionsverlust führten (vgl. Tab. 4.63).

#### **4.2.7 Identifizierung des Bindungsverhältnisses, des dynamischen Transduktionskoeffizienten sowie der systemabhängigen maximalen Wirksamkeit der dualsterischen Hybridliganden an $hM_1$ -Rezeptoren mit Punktmutationen allosterischer Epitope**

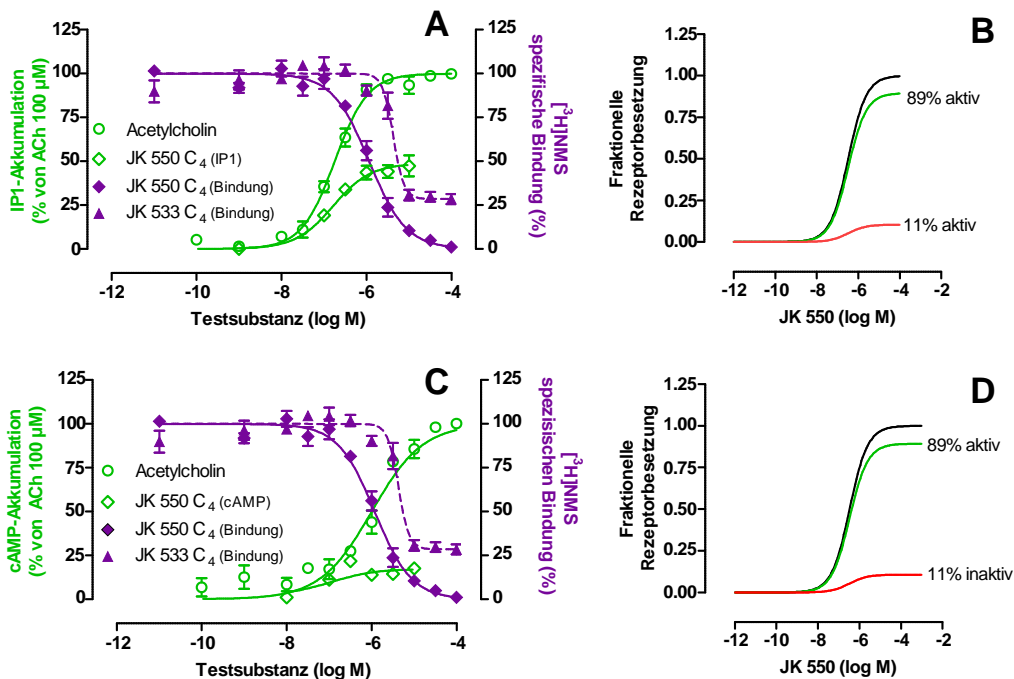
Nachfolgend sollte erstmalig die Auswirkung der drei ausgewählten Punktmutationen des  $hM_1$ -Rezeptors in ECL2 und TM VII auf den dynamischen Transduktionskoeffizienten sowie die systemunabhängige, maximale intrinsische Wirksamkeit ( $\epsilon_{\text{max}}$ ) der dualsterischen Liganden untersucht werden. Hierzu diente die im ersten Kapitel dieser Arbeit vorgestellte globale Analyse, die neben Daten aus Gleichgewichtsbindungsexperimenten auch Daten aus funktionellen Experimenten mit in die Analyse einbezieht (vgl. 3.2.4.2). Als funktionelle Daten dienten in dieser Analyse die Daten der IP1-Akkumulation (vgl. 4.2.5.3) zur Ermittlung der  $G_q$ -Signalwegsaktivierung und die Daten der cAMP-Akkumulation (vgl. 4.2.5.7) für die  $G_s$ -Signalwegsaktivierung. Zusätzlich sollten die mit Hilfe der neuen Analyse erhaltenen Kenngrößen für die Affinität des dualsterischen Liganden  $K_A$  in der dualsterischen und  $K_B$  in der allosterischen Bindungspose sowie von  $R_{\text{pose}}$  mit den Werten aus den vorangegangenen Analysen (vgl. 4.2.4) verglichen werden, um eine Vorstellung über den Einfluss der funktionellen Daten auf die Berechnung von  $K_A$ ,  $K_B$  und  $R_{\text{pose}}$  zu erhalten. Damit diese Ergebnisse mit denen des  $hM_1$ -Wildtypes verglichen werden konnten, wurden die Daten der Hybride und allosterischen Bausteine auch an CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Zellen mit Hilfe des neuen globalen Ansatzes analysiert. In den nachfolgenden Abbildungen sind jeweils die Ergebnisse nach den dualsterischen Hybriden JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) nacheinander getrennt sowohl für den  $G_q$ -Signalweg (A,B) als auch für den  $G_s$ -Signalweg (C,D) dargestellt. Wie bereits erläutert, stellen auch in diesen Sets aus vier Kurven die grünen Konzentrations-Effekt-Kurven die Daten der funktionellen Experimente dar, wohingegen die violetten Kurven die  $[^3\text{H}]\text{NMS}$  Bindungsdaten widerspiegeln (A,C). Ebenfalls sind in den einzelnen Abbildungen die aus den Bindungskonstanten  $K_A$  und  $K_B$  ermittelten Hybrid-Kurven der maximalen, fraktionellen Rezeptorbesetzung in der allosterischen und dualsterischen Pose (B,D) dargestellt. Die ermittelten numerischen Schätzwerte der Parameter beider Hybride werden in den sich anschließenden Tabellen aufgeführt. Zum graphischen Vergleich der Parameter  $\epsilon_{\text{dyn}}$  und  $\epsilon_{\text{max}}^*$  mit den  $R_{\text{pose}}$ -Werten dient jeweils ein zusätzliches Balkendiagramm.

##### **4.2.7.1 $hM_1$ -wt-Rezeptor zeigt nur geringen Einfluss auf die Bindungsorientierung der dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537**

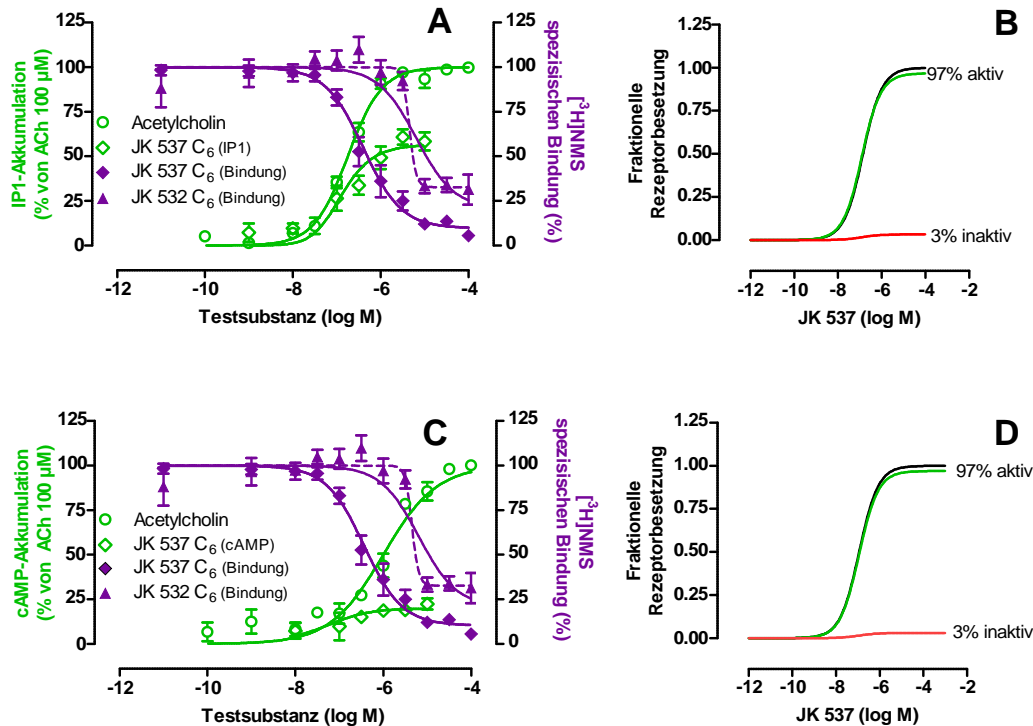
In Abbildung 4.71 sind die Ergebnisse der globalen Analyse für das dualsterische Hybrid JK 550 ( $C_4$ ) am  $hM_1$ -wt-Rezeptor dargestellt. Abbildung 4.72 zeigt das korrespondierende Ergebnis für das Hybrid JK 537 ( $C_6$ ). Die Bindungskonstanten  $K_A$  und  $K_B$  zeigten für keines der Hybride Signalweg-abhängige Unterschiede, die  $R_{\text{pose}}$ -Werte verhielten sich analog (Tab. 4.64)(t-Test,  $p > 0,05$ ). Ein Vergleich der



Bindungskonstanten zwischen den dualsterischen Hybriden zeigte, dass JK 537 ( $C_6$ ) unabhängig vom Signalweg eine dreifach höhere Affinität in der dualsterischen Bindungspose aufwies als JK 550 ( $C_4$ ). Es bestand kein Unterschied zwischen JK 550 und JK 537 bezüglich ihrer Bindungsneigung in der allosterischen Bindungspose (repräsentiert durch  $K_B$ ) (t-Test,  $p > 0,05$ ) (vgl. Tab. 4.64). Wurden die  $R_{\text{pose}}$ -Werte zwischen den Hybriden verglichen, so zeigte das längere Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) auf dem  $G_q$ -Signalweg einen um den Faktor drei und auf dem  $G_s$ -Signalweg einen um den Faktor vier höheren Wert, der sich auch in einem höheren Wert für die maximale aktive Rezeptorfraction widerspiegelte. Hier konnte für das Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) eine maximale aktive Rezeptorfraction von 97% ermittelt werden, wohingegen JK 550 ( $C_4$ ) eine um fast 10% niedrigere maximale Fraction aktiver Rezeptoren (89%) induzierte. Ein „Flip-Flop“ zwischen den beiden Hybriden, wie sie in den CHO- $hM_1$ -wt-Zellen beobachtet werden konnte (vgl. Kapitel 4.1), zeigte sich auch bei dieser Methode der Auswertung in den CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Zellen nicht (vgl. auch mit Kapitel 4.2.4).

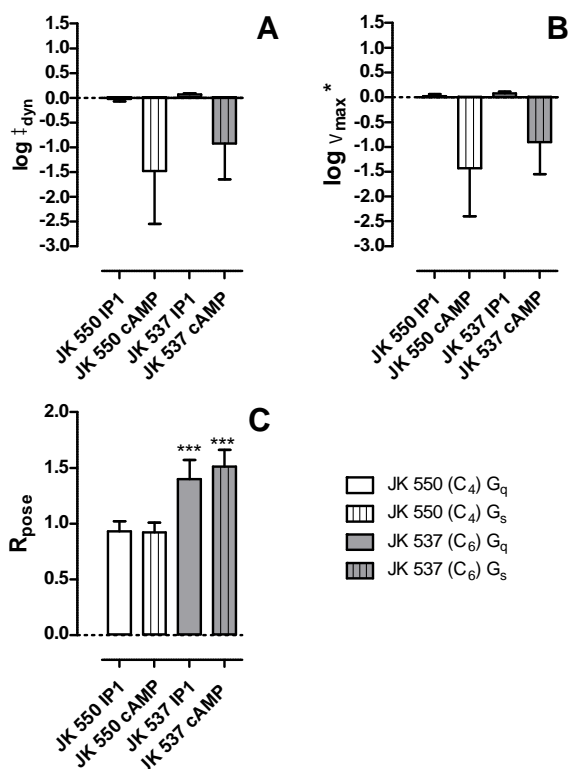


**Abbildung 4. 71.** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IPI- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrid JK 550 sowie seines allosterischen Fragments JK 533 an intakten CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Zellen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven: Grüne Kurven zeigen den Effekt ansteigender Konzentrationen von ACh (Kontrolle) und des dualsterischen Hybridliganden JK 550 auf die (A) IP1-Akkumulation oder (B) cAMP-Akkumulation in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung von JK 550 und JK 533 in Prozent an intakten CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung von Gleichung 20, 17 (mit 21) und 22; für Details vgl. 3.2.4.2. (B,D) Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch JK 550 in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichung 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.



**Abbildung 4.72:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrides JK 537 sowie seines allosterischen Fragmentes JK 532 an intakten CHO-Flp-hM<sub>1</sub>-wt-Zellen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven: Grüne Kurven zeigen den Effekt ansteigender Konzentrationen von ACh (Kontrolle) und des dualsterischen Hybridliganden JK 537 auf die (A) IP1-Akkumulation oder (B) cAMP-Akkumulation in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung von JK 537 und JK 532 in Prozent an intakten CHO-Flp-hM<sub>1</sub>-wt Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung von Gleichung 20, 17 (mit 21) und 22; für Details vgl. 3.2.4.2. (B,D) Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch JK 537 in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichung 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Der dynamische Transduktionskoeffizient ( $\tau_{\text{dyn}}$ ) zeigte bei dem Hybrid JK 550 (C<sub>4</sub>) auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg einen 29-fach schwächeren Wert als auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg ( $\log \tau_{\text{dyn,Gq}} = -0,02 \pm 0,05 / \log \tau_{\text{dyn,Gs}} = -1,48 \pm 1,07$ ), was wie zu erwarten für eine höhere Kopplungseffizienz gegenüber dem G<sub>q</sub>-Signalweg sprach. Ein fast identisches Ergebnis wurde für die system-unabhängige, maximale intrinsische Wirksamkeit der Hybride gefunden ( $\log \text{max}^*_{\text{Gq}} = 0,02 \pm 0,04 / \log \text{max}^*_{\text{Gs}} = -1,43 \pm 0,97$ ). Leider waren auf Grund der sehr geringen Hybrid-induzierten G<sub>s</sub>-Signalwegsaktivierung, die E<sub>max</sub>-Werte von 21% nicht überstiegen, die Standardfehler der mit Hilfe der globalen Analyse für den G<sub>s</sub>-Signalweg bestimmten Parameter  $\log \tau_{\text{dyn}}$  und  $\log \text{max}^*$  sehr hoch. Deshalb konnte trotz des deutlichen numerischen Unterschiedes keine Signifikanz zwischen den Parametern für beide Signalwege festgestellt werden. Der dynamische Transduktionskoeffizient ( $\tau_{\text{dyn}}$ ) des Hybrides JK 537 (C<sub>6</sub>) zeigte einen um den Faktor 10 höheren Wert auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg als auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg ( $\tau_{\text{dyn,Gq}} = 1,17; \tau_{\text{dyn,Gs}} = 0,12$ ). Eine fast identische Differenz zeigte sich für den Parameter  $\text{max}^*$  ( $\epsilon_{\text{dyn,Gq}} = 1,20; \epsilon_{\text{dyn,Gs}} = 0,13$ ) (vgl. Abb. 4.73 und Tab. 4.64).



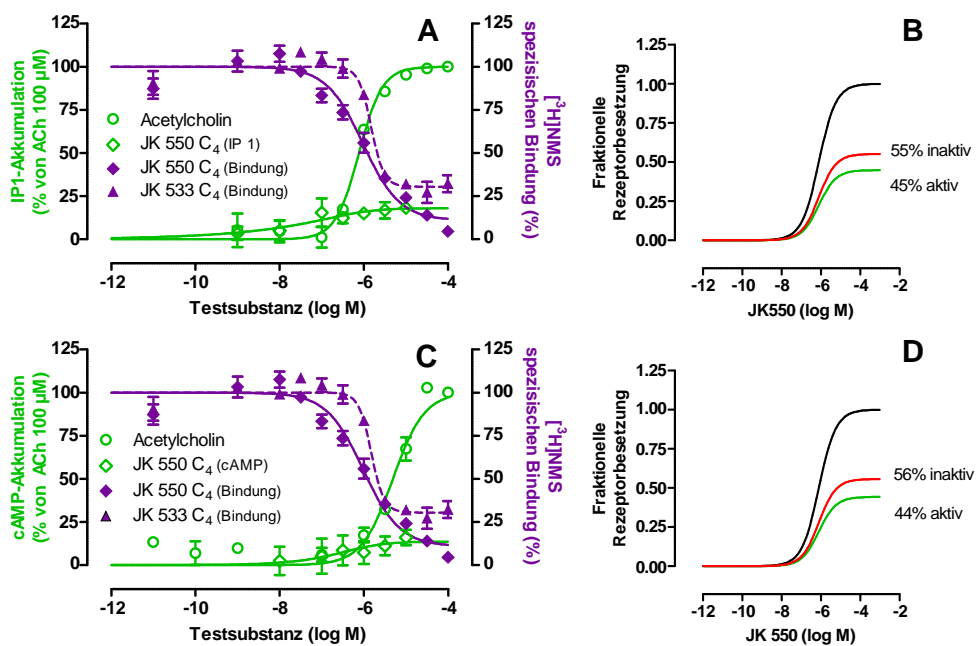
**Abbildung 4.73:** Graphische Darstellung der mit Hilfe globaler Analyse von Bindung und Funktion ermittelten Parameter  $\tau_{\text{dyn}}$ ,  $\log v_{\text{max}^*}$  und  $R_{\text{pose}}$  unter Verwendung der Daten aus IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten des Hybridpaares JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) an *hM*<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren in intakten CHO-Flp-Zellen. (A-C) Gegenüberstellung der Parameter (A)  $\log \tau_{\text{dyn}}$ : dynamischer Transduktionskoeffizient. (B)  $\log v_{\text{max}^*}$ : system-unabhängige maximale intrinsische Wirksamkeit, in Abwesenheit einer Rezeptorreserve. (C)  $R_{\text{pose}}$ : Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Rezeptorbindungsorientierung,  $R_{\text{pose}} = -\log(K_A/K_B)$  der beiden Hybride JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) für die G<sub>q</sub>- und G<sub>s</sub>-Signalwegaktivierung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis sieben unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 550 (t-Test, \*\*\* $p < 0,001$ ).

CHO-Flp- <i>hM</i> <sub>1</sub> -wt					
		JK 550 C <sub>4</sub>		JK 537 C <sub>6</sub>	
		G <sub>q</sub> - Signalweg	G <sub>s</sub> - Signalweg	G <sub>q</sub> - Signalweg	G <sub>s</sub> - Signalweg
<b>log K<sub>A</sub></b>		-6,43 $\pm$ 0,07	-6,42 $\pm$ 0,08	-6,83 $\pm$ 0,08***	-6,93 $\pm$ 0,08***
<b>log K<sub>B</sub></b>		-5,50 $\pm$ 0,04###	-5,50 $\pm$ 0,04###	-5,42 $\pm$ 0,15###	-5,42 $\pm$ 0,13###
<b>R<sub>pose</sub></b>		0,93 $\pm$ 0,09	0,92 $\pm$ 0,09	1,40 $\pm$ 0,17***	1,51 $\pm$ 0,15***
<b>dual</b>		89%	89%	97%	97%
<b>allo</b>		11%	11%	3%	3%
<b>log <math>\tau_{\text{dyn}}</math></b>		-0,02 $\pm$ 0,05	-1,48 $\pm$ 1,07	0,07 $\pm$ 0,02	-0,92 $\pm$ 0,73
<b>log <math>v_{\text{max}^*}</math></b>		0,02 $\pm$ 0,04	-1,43 $\pm$ 0,97	0,08 $\pm$ 0,03	-0,90 $\pm$ 0,65

**Tabelle 4.64:** Kenngrößen der in Abbildung 4.71 und 4.72 dargestellten Ergebnisse, die mit Hilfe einer globalen simultanen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“ an intakten CHO-Flp-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen für die dualsterischen Liganden JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) ermittelt wurden.  $\log K_A$ ,  $\log K_B$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des dynamischen Hybridliganden für die aktive, bzw. die inaktive Bindungspose.  $R_{\text{pose}}$ : Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Rezeptorbindungsorientierung,  $R_{\text{pose}} = -\log(K_A/K_B)$ . dual/ allo: Konzentrationsabhängige maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors in der aktiven (dual) und inaktiven (allo) Bindungspose  $\log \tau_{\text{dyn}}$ : dynamischer Transduktionskoeffizient.  $\log v_{\text{max}^*}$ : systemunabhängige maximale intrinsische Wirksamkeit des dualsterischen Liganden in 100% aktiver Bindungspose. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 550 (t-Test, \*\*\* $p < 0,001$ ). ###: Wert signifikant verschieden von der Kenngröße  $\log K_A$  desselben Hybrides (t-Test, ### $p < 0,001$ ).

#### 4.2.7.2 Mutation $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$ führt zu einem Wechsel in der Bindungsorientierung des dualsterischen Hybrides JK 550 ( $C_4$ )

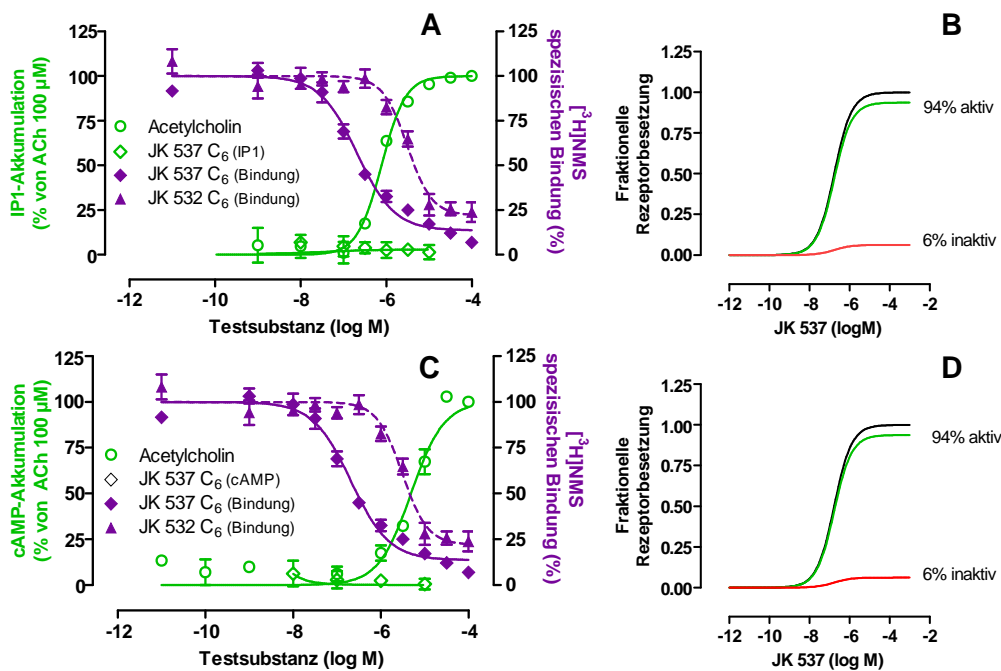
In den Abbildungen 4.74 und 4.75 sind die an der Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  erhobenen Ergebnisse der globalen Analyse der Funktions- und Bindungsdaten für JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) dargestellt. Der Austausch der Aminosäure Tyrosin zu Alanin in der zweiten extrazellulären Schleife des  $M_1$ -Rezeptors führte für keinen der dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537 zu einem signifikanten Unterschied der Affinitätswerte bezüglich der zwei untersuchten Signalwege (vgl. Tab. 4.65; t-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4. 74:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrides JK 550 sowie seines allosterischen Fragmentes JK 533 an intakten CHO-Flp- $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$ -Zellen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven: Grüne Kurven zeigen den Effekt ansteigender Konzentrationen von ACh (Kontrolle) und des dualsterischen Hybridliganden JK 550 auf die (A) IP1-Akkumulation oder (B) cAMP-Akkumulation in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung von JK 550 und JK 533 in Prozent an intakten CHO-Flp- $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$ -Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung von Gleichung 20, 17 (mit 21) und 22; für Details vgl. 3.2.4.2. (B,D) Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch JK 550 in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichung 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Die globale Analyse bestätigte für das dualsterische Hybrid JK 550, wie schon zuvor beschrieben (vgl. 4.2.4), eine höhere Affinität der allosterischen Bindungspose im Vergleich zu seiner dualsterischen Bindungspose. Dieses Ergebnis spiegelt sich ebenfalls in den für dieses Hybrid ermittelten  $R_{\text{pose}}$ -Werten wider, da in vorangegangenen Arbeiten bereits gezeigt werden konnte, dass negative Werte dieses Parameters ein Indiz für ein Überwiegen der inaktiven Rezeptororientierung gegenüber der aktiven sind (Bock et al. 2013; Chen, Klöckner und Holze et al. 2015). Die  $R_{\text{pose}}$ -Werte von JK 550 bestätigten diese

Befunde mit Werten von  $R_{\text{pose}} = -0,09 \pm 0,22$  für den  $G_q$ -Signalweg und  $R_{\text{pose}} = -0,10 \pm 0,26$  für den  $G_s$ -Signalweg. Darüberhinaus zeigte JK 550 eine 10-fach schwächere Affinität in der aktiven Bindungspose ( $K_A$ ) als das um zwei C-Atome längere Hybrid JK 537. Im Gegensatz dazu zeigte das kürzere Hybrid JK 550 eine zweifach höhere Affinität in der allosterischen Bindungspose ( $K_B$ )(vgl. Tab. 4.65)(t-Test,  $p < 0,05$ ). Die  $R_{\text{pose}}$ -Werte von JK 537 waren gegenüber JK 550 sowohl auf dem  $G_q$ -Signalweg als auch auf dem  $G_s$ -Signalweg mit  $1,18 \pm 0,10$  signifikant höher (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung der durch JK 537 induzierten aktiven Bindungspose betrug 94%, die der inaktiven Pose 6%.

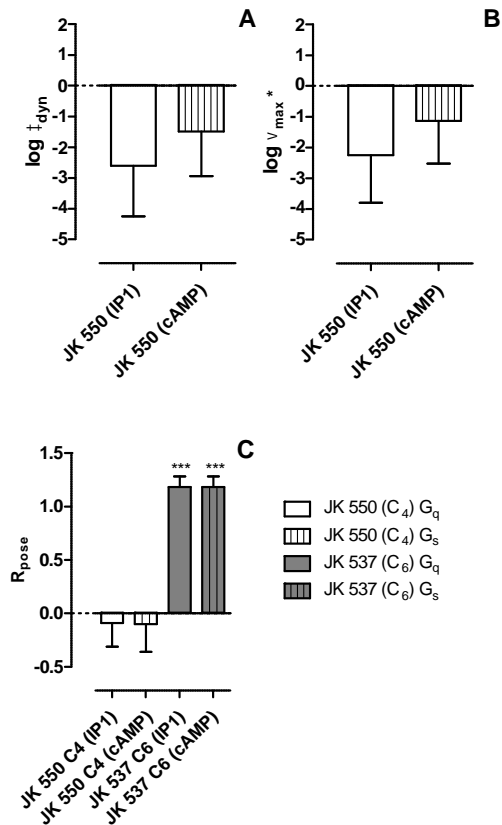


**Abbildung 4.75:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrides JK 537 sowie seines allosterischen Fragmentes JK 532 an intakten CHO-Flp- $M_1^{179}\text{Tyr}$  Ala-Zellen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven: Grüne Kurven zeigen den Effekt ansteigender Konzentrationen von ACh (Kontrolle) und des dualsterischen Hybridliganden JK 537 auf die (A) IP1-Akkumulation oder (B) cAMP-Akkumulation in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung von JK 537 und JK 532 in Prozent an intakten CHO-Flp- $M_1^{179}\text{Tyr}$  Ala-Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung von Gleichung 20, 17 (mit 21) und 22; für Details vgl. 3.2.4.2. (B,D) Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch JK 550 in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichung 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala				
	JK 550 C <sub>4</sub>		JK 537 C <sub>6</sub>	
	G <sub>q</sub> - Signalweg	G <sub>s</sub> - Signalweg	G <sub>q</sub> - Signalweg	G <sub>s</sub> - Signalweg
log K <sub>A</sub>	-5,76 ± 0,17	-5,75 ± 0,20	-6,74 ± 0,07 <sup>***</sup>	-6,74 ± 0,07 <sup>***</sup>
log K <sub>B</sub>	-5,85 ± 0,07	-5,85 ± 0,09	-5,56 ± 0,06 <sup>**###</sup>	-5,56 ± 0,06 <sup>**###</sup>
R <sub>pose</sub>	-0,09 ± 0,22	-0,10 ± 0,26	1,18 ± 0,10 <sup>***</sup>	1,18 ± 0,10 <sup>***</sup>
dual	45%	44%	94%	96%
allo	55%	56%	6%	4%
log <sub>dyn</sub>	-2,60 ± 1,65	-1,49 ± 1,45	n.d.	n.d.
log <sub>max</sub> *	-2,25 ± 1,55	-1,14 ± 1,38	n.d.	n.d.

**Tabelle 4. 65:** Kenngrößen der in Abbildung 4.74 und 4.75 dargestellten Ergebnisse, die mit Hilfe einer globalen simultanen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“ an intakten CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala-Zellen für die dualsterischen Liganden JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) ermittelt wurden. logK<sub>A</sub>, logK<sub>B</sub>: Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des dynamischen Hybridliganden für die aktive, bzw. die inaktive Bindungspose. R<sub>pose</sub>: Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Receptorbindungsorientierung, R<sub>pose</sub> = -log(K<sub>A</sub>/K<sub>B</sub>). dual/ allo: Konzentrationsabhängige maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors in der aktiven (dual) und inaktiven (allo) Bindungspose log<sub>dyn</sub>: dynamischer Transduktionskoeffizient. log<sub>max</sub>\*: systemunabhängige maximale intrinsische Wirksamkeit des dualsterischen Liganden in 100% aktiver Bindungspose. Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. \*\*,\*\*\*: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 550 (t-Test, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001). ###: Wert signifikant verschieden von der Kenngröße logK<sub>A</sub> desselben Hybrides (t-Test, ###p<0,001).

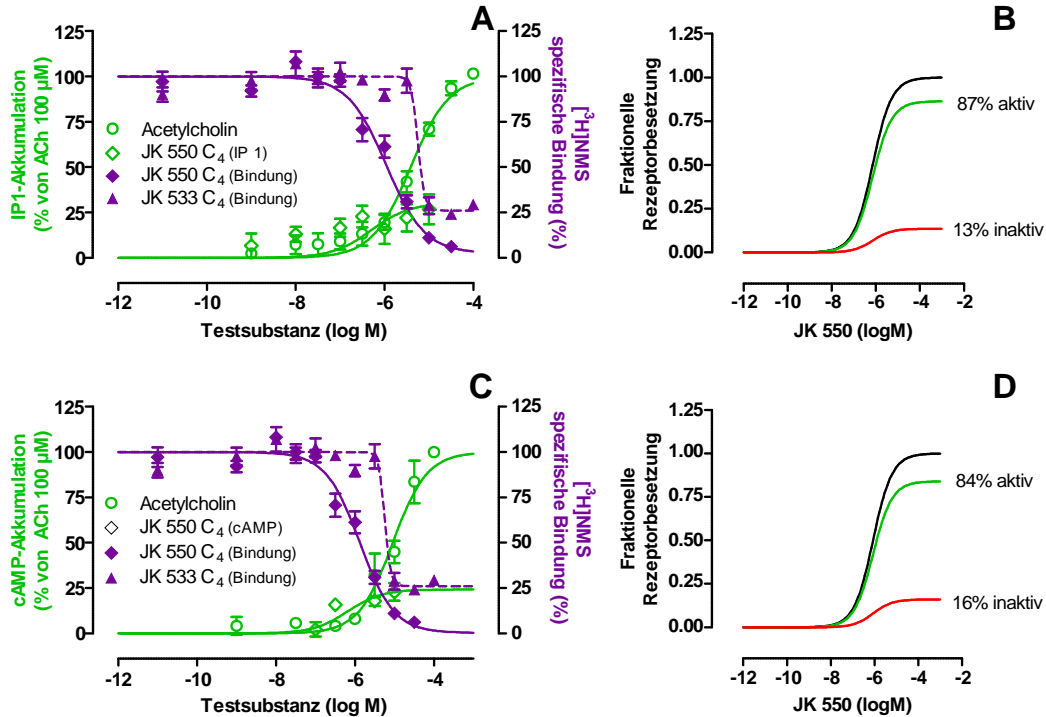
Das kürzere der beiden dualsterischen Hybride JK 550 (C<sub>4</sub>) zeigte interessanterweise eine 13-fach schwächere dynamische Kopplungseffizienz für den G<sub>q</sub>-Signalweg als für den G<sub>s</sub>-Signalweg. Ebenfalls war die system-unabhängige intrinsische Aktivität auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg 14-fach schwächer als auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg. In beiden Fällen war der Unterschied auf Grund der deutlichen Standardfehler der nichtlinear ermittelten Werte, insbesondere für den G<sub>s</sub>-Signalweg, nicht signifikant (t-Test, p>0,05). Für das längere der beiden Hybride konnten auf Grund des völligen Funktionsverlustes auf beiden Signalwegen weder eine intrinsische Aktivität noch ein dynamischer Transduktionskoeffizient ermittelt werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass das längere Hybrid JK 537 trotz der höheren dualsterischen Bindung und der nachgewiesenen höheren R<sub>pose</sub>-Werte (vgl. Abb. 4.76 und Tab. 4.65; t-Test, p<0,05) nicht in der Lage war, den Rezeptor mit der Mutation M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala zu aktivieren.



**Abbildung 4.76:** Graphische Darstellung der mit Hilfe globaler Analyse von Bindung und Funktion ermittelten Parameter  $\tau_{\text{dyn}}$ ,  $\epsilon_{\text{max}}^*$  und  $R_{\text{pose}}$  unter Verwendung der Daten aus IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten des Hybridpaares JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) an  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$ -Rezeptoren in intakten CHO-Flp-Zellen. (A-C) Gegenüberstellung der Parameter (A)  $\log \tau_{\text{dyn}}$ : dynamischer Transduktionskoeffizient. (B)  $\log \epsilon_{\text{max}}^*$ : system-unabhängige maximale intrinsische Wirksamkeit, in Abwesenheit einer Rezeptorreserve. (C)  $R_{\text{pose}}$ : Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Rezeptorbindungsorientierung,  $R_{\text{pose}} = -\log(K_A/K_B)$  der beiden Hybride JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) für die  $G_q$ - und  $G_s$ -Signalwegaktivierung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis sieben unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 550 (t-Test, \*\*\* $p < 0,001$ ).

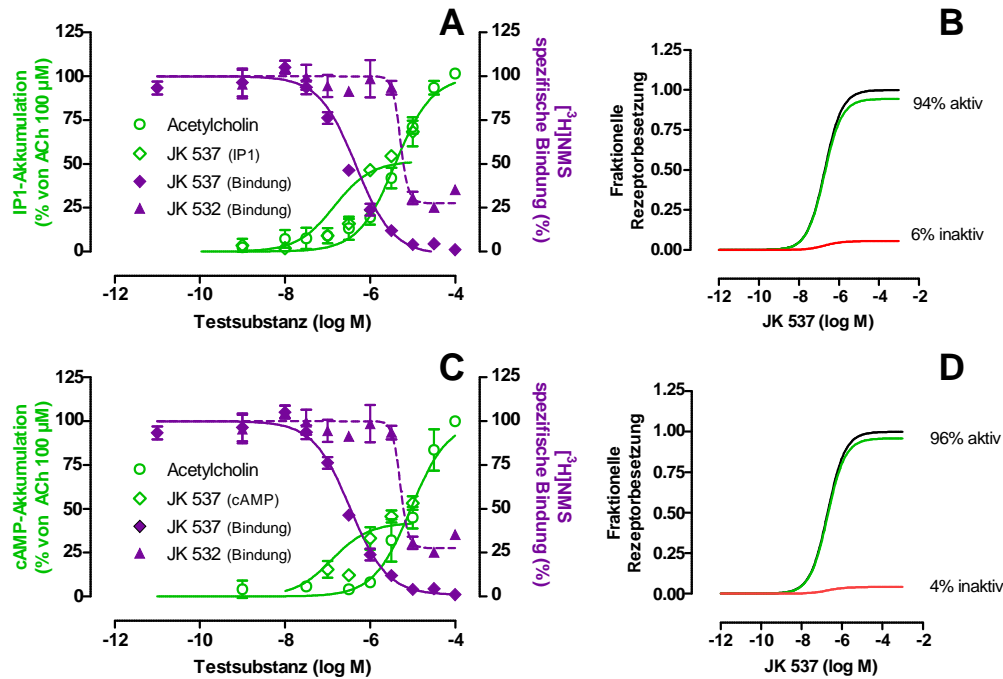
#### 4.2.7.3 Mutation $M_1^{400}\text{Trp Ala}$ zeigt keinen Einfluss auf die Bindungsorientierung der dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537

Die Kurvensets der globalen Datenanalyse, sowie die simulierten Kurven der fraktionellen Rezeptorbesetzungen von JK 550 und JK 537 an der Mutation  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  sind in Abbildung 4.77 und 4.78 dargestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.66 zusammengefasst. Die Affinitätsparameter  $\log K_A$  und  $\log K_B$  des dualsterischen Hybrides JK 550 unterschieden sich zwischen den Signalwegen ( $G_q$  und  $G_s$ ) (JK 550, IP1/cAMP:  $\log K_A = -5,99 \pm 0,10 / -5,99 \pm 0,08$ ;  $\log K_B = -5,27 \pm 0,15 / -5,27 \pm 0,11$ ) nicht signifikant (t-Test,  $p > 0,05$ ). JK 537 wies auf dem  $G_s$ -Signalweg eine leichte, aber nicht signifikante Zunahme der Affinität in der dualsterischen Bindungspose auf (JK 537, IP1/cAMP,  $\log K_A = -6,50 \pm 0,08 / -6,69 \pm 0,07$ ;  $\log K_B = -5,32 \pm 0,10 / -5,32 \pm 0,09$ , t-Test,  $p > 0,05$ ). Die  $R_{\text{pose}}$ -Werte zeigten im direkten Vergleich zwischen den Hybridsstoffen keinen signifikanten Unterschied ( $R_{\text{pose (IP1)}}$ : JK 550 =  $1,87 \pm 0,11$ ; JK 537 =  $1,89 \pm 0,07$ ) (t-Test,  $p > 0,05$ ). Die Maximalwerte für die fraktionelle Rezeptorbesetzung wiesen im Falle des kurzen dualsterischen Hybrides JK 550 auf beiden Signalwegen ( $G_q/G_s$ ) eine aktive Rezeptorpopulation von (87/84 %) auf (vgl. Abb. 4.77 B und D), wohingegen das längere Hybrid JK 537 eine deutlich höhere Fraktion (94/96 %) (vgl. Abb. 4.78 B und D) aktiver Rezeptorbindungsorientierungen zeigte.



**Abbildung 4. 77:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrides JK 550 sowie seines allosterischen Fragmentes JK 533 an intakten CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala-Zellen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven: Grüne Kurven zeigen den Effekt ansteigender Konzentrationen von ACh (Kontrolle) und des dualsterischen Hybridliganden JK 550 auf die (A) IP1-Akkumulation oder (B) cAMP-Akkumulation in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung von JK 550 und JK 533 in Prozent an intakten CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala-Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung von Gleichung 20, 17 (mit 21) und 22; für Details vgl. 3.2.4.2. (B,D) Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch JK 550 in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichung 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.



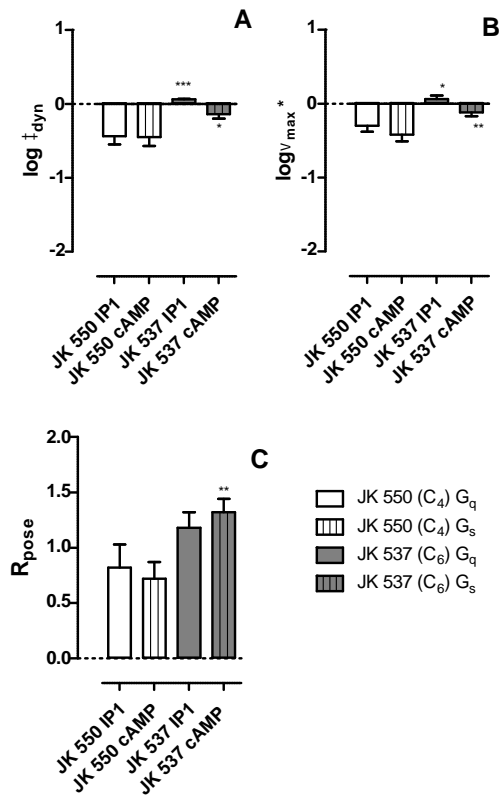


**Abbildung 4.78:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrides JK 537 sowie seines allosterischen Fragmentes JK 532 an intakten CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>400</sup> Trp Ala-Zellen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven: Grüne Kurven zeigen den Effekt ansteigender Konzentrationen von ACh (Kontrolle) und des dualsterischen Hybridliganden JK 537 auf die (A) IP1-Akkumulation oder (B) cAMP-Akkumulation in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung von JK 537 und JK 532 in Prozent an intakten CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>400</sup> Trp Ala-Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung von Gleichung 20, 17 (mit 21) und 22; für Details vgl. 3.2.4.2. (B,D) Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch JK 537 in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichung 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Der dynamische Transduktionskoeffizient für das Hybrid JK 550 (C<sub>6</sub>) besaß auf beiden Signalwegen einen negativen Wert, was auf einen schwachen Partialagonismus mit einem Maximaleffekt von  $E_{\max} < 50\%$  deutete (Black und Leff 1983)(vgl. Abb.4.77 und Tab. 4.66). Die Werte der beiden Signalwege unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $\text{dynG}_q = -0,44 \pm 0,11$  /  $\text{dynG}_s = -0,45 \pm 0,12$ , t-Test,  $p > 0,05$ ). Die maximale intrinsische Aktivität  $\log_{\max}^*$  war für JK 550 auf dem G<sub>q</sub>-Signalweges gegenüber dem G<sub>s</sub>-Signalweg nicht signifikant erhöht ( $\log_{\max}^* \text{G}_q = -0,30 \pm 0,08$  /  $\log_{\max}^* \text{G}_s = -0,42 \pm 0,09$ , t-Test,  $p > 0,05$ ). Das Hybrid JK 537 zeigte sowohl hinsichtlich der dynamischen Kopplungseffizienz  $\log_{\text{dyn}}$  als auch bezüglich der maximalen intrinsischen Aktivität  $\log_{\max}^*$  keine Unterschiede zwischen den Signalwegen G<sub>q</sub> und G<sub>s</sub>. Ein Vergleich zwischen den Hybriden ergab, dass JK 537 auf dem G<sub>q</sub> Protein vermittelten Signalweg eine dreifach höhere und auf dem G<sub>s</sub> Protein vermittelten Signalweg eine zweifach höhere dynamische Kopplungseffizienz zeigte als das dualsterische Hybrid JK 550 (C<sub>4</sub>)(t-Test,  $p < 0,05$ ). Die maximale intrinsische Aktivität  $\log_{\max}^*$  war für JK 537 sowohl auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg als auch auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg zweimal höher im Vergleich zum kürzeren Hybrid JK 550 (vgl. Abb. 4.79 und Tab. 4.66)(t-Test,  $p < 0,05$ ).

CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala				
	JK 550 C <sub>4</sub>		JK 537 C <sub>6</sub>	
	G <sub>q</sub> - Signalweg	G <sub>s</sub> - Signalweg	G <sub>q</sub> - Signalweg	G <sub>s</sub> - Signalweg
log K <sub>A</sub>	-6,09 ± 0,10 <sup>**</sup>	-6,00 ± 0,08 <sup>***</sup>	-6,50 ± 0,08	-6,64 ± 0,07
log K <sub>B</sub>	-5,27 ± 0,16 <sup>###</sup>	-5,27 ± 0,11 <sup>###</sup>	-5,32 ± 0,11 <sup>###</sup>	-5,32 ± 0,09 <sup>###</sup>
R <sub>pose</sub>	0,82 ± 0,21	0,72 ± 0,15 <sup>**</sup>	1,18 ± 0,14	1,32 ± 0,12
dual	83%	84%	94%	96%
allo	16%	16%	6%	4%
log τ <sub>dyn</sub>	-0,44 ± 0,11 <sup>***</sup>	-0,45 ± 0,12 <sup>*</sup>	0,06 ± 0,01	-0,14 ± 0,06
log ε <sub>max</sub> <sup>*</sup>	-0,30 ± 0,08 <sup>*</sup>	-0,42 ± 0,09 <sup>**</sup>	0,06 ± 0,05	-0,12 ± 0,05

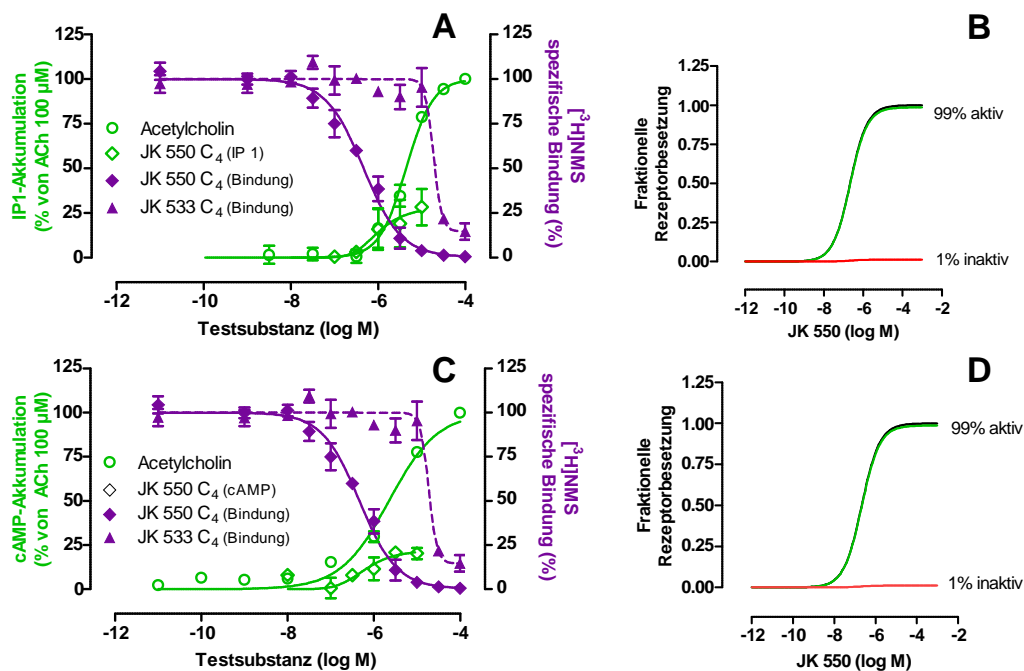
**Tabelle 4. 66:** Kenngrößen der in Abbildung 4.77 und 4.78 dargestellten Ergebnisse, die mit Hilfe einer globalen simultanen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“ an intakten CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala-Zellen für die dualsterischen Liganden JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) ermittelt wurden. logK<sub>A</sub>, logK<sub>B</sub>: Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des dynamischen Hybridliganden für die aktive, bzw. die inaktive Bindungspose. R<sub>pose</sub>: Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Rezeptorbindungsorientierung, R<sub>pose</sub> = -log(K<sub>A</sub>/K<sub>B</sub>). dual/ allo: Konzentrationsabhängige maximale fraktionale Rezeptorbesetzung des Rezeptors in der aktiven (dual) und inaktiven (allo) Bindungspose logτ<sub>dyn</sub>: dynamischer Transduktionskoeffizient. log ε<sub>max</sub><sup>\*</sup>: systemunabhängige maximale intrinsische Wirksamkeit des dualsterischen Liganden in 100% aktiver Bindungspose. Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. \*,\*\*,\*\*\*: Wert signifikant verschieden von der korrespondierenden Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 550 (t-Test, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001). ###: Wert signifikant verschieden von der Kenngröße logK<sub>A</sub> desselben Hybrides (t-Test, ###p<0,001).



**Abbildung 4. 79:** Graphische Darstellung der mit Hilfe globaler Analyse ermittelten Parameter τ<sub>dyn</sub>, ε<sub>max</sub><sup>\*</sup> und R<sub>pose</sub> unter Verwendung der Daten aus IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten des Hybridpaares JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) an M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala-Rezeptoren in intakten CHO-Flp-Zellen. (A-C) Gegenüberstellung der Parameter (A) logτ<sub>dyn</sub>: dynamischer Transduktions-koeffizient. (B) logε<sub>max</sub><sup>\*</sup>: system-unabhängige maximale intrinsische Wirksamkeit, in Abwesenheit einer Rezeptorreserve. (C) R<sub>pose</sub>: Orientierungs-verhältnis von aktiver versus inaktiver Rezeptorbindungsorientierung, R<sub>pose</sub> = -log(K<sub>A</sub>/K<sub>B</sub>) der beiden Hybride JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) für die G<sub>q</sub>- und G<sub>s</sub>-Signalwegaktivierung. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis sieben unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. \*,\*\*,\*\*\*: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 550 (t-Test, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).

#### 4.2.7.4 Mutation $M_1^{401}Glu \text{ Ala}$ führt zu einer fast 99-prozentigen Bindung beider dualsterischen Hybrids-substanzen in der dualsterischen Pose

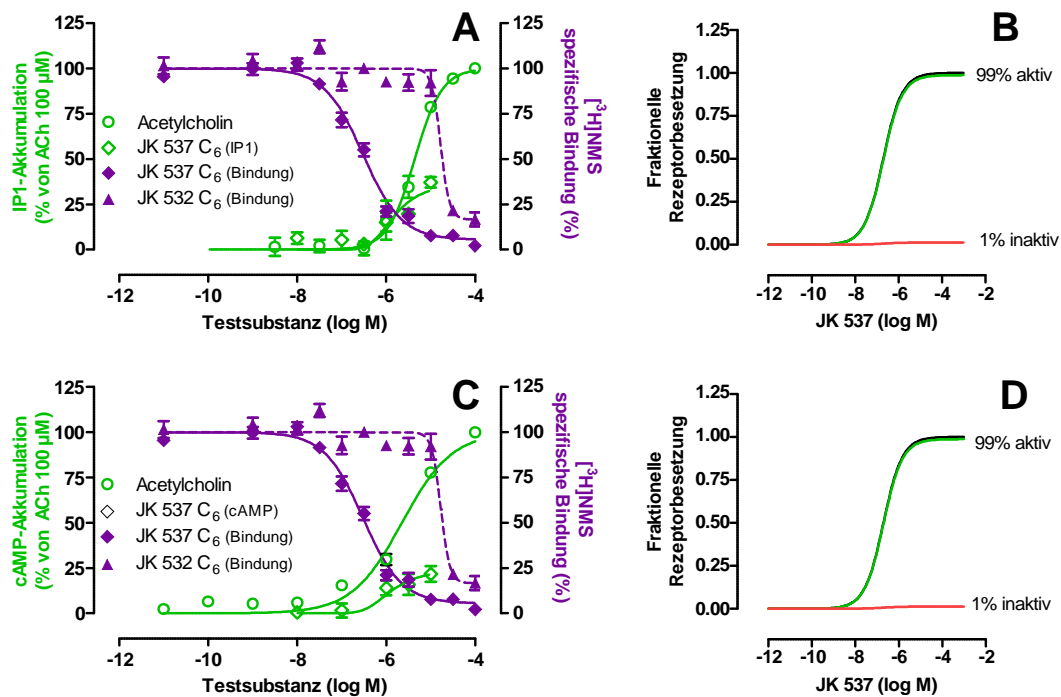
Bei der letzten untersuchten Rezeptormutation handelte es sich um einen Austausch der negativ geladenen Aminosäure Glutaminsäure gegen Alanin an Position 401 des  $hM_1$ -Rezeptors, die am Beginn der siebten Transmembrandomäne lokalisiert ist (vgl. Abb. 5.20). Wie bereits erwähnt, ist Glutaminsäure 401 eine Aminosäure, die unter den fünf Muskarinrezeptorsubtypen nicht konserviert ist. Vielmehr ist sie im  $M_1$ -Rezeptorsubtyp ein Alleinstellungsmerkmal und trägt an dieser Position als Besonderheit eine negative Ladung in das Rezeptorprotein ein, welche die anderen vier Subtypen nicht besitzen. In den Abbildungen 4.80 und 4.81 sind die Konzentrations-Effekt-Kurven der für die globale Analyse verwendeten Daten von JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) sowie die daraus berechneten Kurven ihrer maximalen, fraktionellen Rezeptorbesetzungen zu sehen. Die Ergebnisse der Analysen wurden in Tabelle 4.67 zusammengefasst und zusätzlich in Abbildung 4.82 dargestellt.



**Abbildung 4. 80:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie  $[^3H]NMS$ -Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrides JK 550 sowie seines allosterischen Fragmentes JK 533 an intakten CHO-Flp- $M_1^{401}Glu \text{ Ala}$ -Zellen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven: Grüne Kurven zeigen den Effekt ansteigender Konzentrationen von ACh (Kontrolle) und des dualsterischen Hybridliganden JK 550 auf die (A) IP1-Akkumulation oder (B) cAMP-Akkumulation in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3H]NMS$ -Bindung von JK 550 und JK 533 in Prozent an intakten CHO-Flp- $M_1^{401}Glu \text{ Ala}$ -Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung von Gleichung 20, 17 (mit 21) und 22; für Details vgl. 3.2.4.2. (B,D) Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch JK 550 in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichung 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

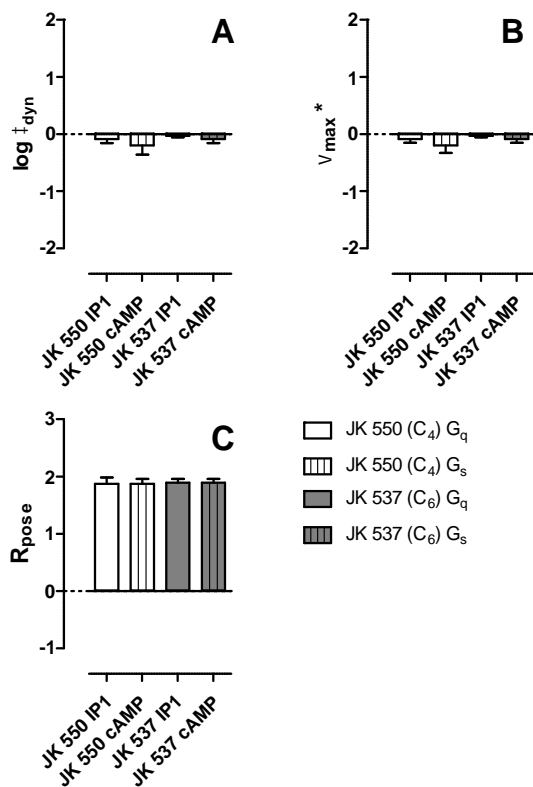
Die für die Hybride ermittelten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $\log K_A$  und  $\log K_B$  unterschieden sich zwischen den zwei Signalwege  $G_q$  und  $G_s$  nicht (JK 550, IP1/cAMP,  $\log K_A = -6,66 \pm 0,07 / -6,66 \pm 0,06$ ;  $\log K_B = -4,78 \pm 0,09 / -4,78 \pm 0,07$ ; JK 537, IP1/cAMP,  $\log K_A = -6,70 \pm 0,05 / -6,70 \pm 0,04$ ;  $\log K_B = -4,81 \pm 0,06 / -4,81 \pm 0,06$ ; t-Test,  $p > 0,05$ ). Auch zwischen den Hybriden untereinander konnte für beide Signalwege kein signifikanter Unterschied zwischen den Affinitätsparametern ausgemacht werden (vgl. Tab. 4.67; t-Test,  $p > 0,05$ ). Die  $R_{\text{pose}}$ -Werte zeigten im direkten Vergleich zwischen den Hybridsubstanzen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ( $R_{\text{pose (IP1)}}$ : JK 550 =  $1,87 \pm 0,11$ ; JK 537 =  $1,89 \pm 0,07$ ; t-Test,  $p > 0,05$ ). Die Werte der maximalen, fraktionellen Rezeptorbesetzung wiesen in allen Fällen eine aktive Rezeptorpopulation von 99% auf, was für eine fast vollständige Bindung beider dualsterischen Hybride in der dualsterischen Bindungsorientierung sowie einer daraus resultierenden Verhinderung des allosterischen Bindungsmodus sprach.

Auf Basis dieser Daten erscheint es naheliegend, dass das Entfernen der negativen Ladung an der Position 401 im Beginn der siebten Transmembran die dualsterische Orientierung der dualsterischen Hybride im Vergleich zum  $hM_1$ -Wildtyp (vgl. Tab. 4.67) fördert.



**Abbildung 4. 81:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten sowie  $[^3\text{H}]$ NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten des dualsterischen Hybrides JK 537 sowie seines allosterischen Fragmentes JK 532 an intakten CHO-Flp- $M_1^{401}$ Glu Ala-Zellen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven: Grüne Kurven zeigen den Effekt ansteigender Konzentrationen von ACh (Kontrolle) und des dualsterischen Hybridliganden JK 537 auf die (A) IP1-Akkumulation oder (B) cAMP-Akkumulation in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung von JK 537 und JK 532 in Prozent an intakten CHO-Flp- $M_1^{401}$ Glu Ala-Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung von Gleichung 20, 17 (mit 21) und 22; für Details vgl. 3.2.4.2. (B,D) Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch JK 550 in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichung 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Auf Grund der Tatsache, dass beide dualsterischen Hybride an dieser Rezeptormutation ein gleiches Orientierungsverhältnis besitzen, stellte sich die Frage, ob sich Unterschiede in der dynamischen Kopplungseffizienz  $\tau_{\text{dyn}}$  oder der system-unabhängigen maximalen intrinsischen Aktivität bei vollständiger Besetzung aller Rezeptoren in der aktiven Bindungspose  $\epsilon_{\text{max}}^*$  widerspiegeln würden. Die Ergebnisse sind sowohl in Tabelle 4.67 als auch in Abbildung 4.82 dargestellt. Weder für JK 550 noch für JK 537 unterschieden sich beide Parameter signifikant zwischen den Signalwegen  $G_s$  und  $G_q$  (t-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4. 82: Graphische Darstellung der mit Hilfe globaler Analyse von Bindung und Funktion ermittelten Parameter  $\tau_{\text{dyn}}$ ,  $\epsilon_{\text{max}}^*$  und  $R_{\text{pose}}$  unter Verwendung der Daten aus IP1- und cAMP-Akkumulationsdaten des Hybridpaares JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) an  $M_1^{401}$ Glu Ala-Rezeptoren in intakten CHO-Flp-Zellen. (A-C)**

Gegenüberstellung der Parameter (A)  $\log \tau_{\text{dyn}}$ : dynamischer Transduktions-koeffizient. (B)  $\log \epsilon_{\text{max}}^*$ : system-unabhängige maximale intrinsische Wirksamkeit, in Abwesenheit einer Rezeptorreserve. (C)  $R_{\text{pose}}$ : Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Receptorbindungsorientierung,  $R_{\text{pose}} = -\log(K_A/K_B)$  der beiden Hybride JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) für die G<sub>q</sub>- und G<sub>s</sub>-Signalwegaktivierung. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis sieben unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

CHO-Flp-M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala				
	JK 550 C <sub>4</sub>		JK 537 C <sub>6</sub>	
	G <sub>q</sub> - Signalweg	G <sub>s</sub> - Signalweg	G <sub>q</sub> - Signalweg	G <sub>s</sub> - Signalweg
log K <sub>A</sub>	-6,66 ± 0,07	-6,66 ± 0,06	-6,70 ± 0,05	-6,70 ± 0,04
log K <sub>B</sub>	-4,78 ± 0,09 <sup>###</sup>	-4,78 ± 0,07 <sup>###</sup>	-4,81 ± 0,06 <sup>###</sup>	-4,81 ± 0,06 <sup>###</sup>
R <sub>pose</sub>	1,87 ± 0,11	1,87 ± 0,09	1,89 ± 0,07	1,89 ± 0,07
dual	99%	99%	99%	99%
allo	1%	1%	1%	1%
log τ <sub>dyn</sub>	-0,09 ± 0,07	-0,20 ± 0,16	-0,03 ± 0,03	-0,09 ± 0,07
log max <sup>*</sup>	-0,09 ± 0,06	-0,20 ± 0,13	-0,03 ± 0,03	-0,09 ± 0,06

**Tabelle 4. 67:** Kenngrößen der in Abbildung 4.80 und 4.81 dargestellten Ergebnisse, die mit Hilfe einer globalen simultanen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“ an intakten CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala-Zellen für die dualsterischen Liganden JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) ermittelt wurden. logK<sub>A</sub>, logK<sub>B</sub>: Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des dynamischen Hybridliganden für die aktive, bzw. die inaktive Bindungspose. R<sub>pose</sub>: Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Receptorbindungsorientierung, R<sub>pose</sub> = -log(K<sub>A</sub>/K<sub>B</sub>). dual/ allo: Konzentrationsabhängige maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors in der aktiven (dual) und inaktiven (allo) Bindungspose logτ<sub>dyn</sub>: dynamischer Transduktionskoeffizient. log max<sup>\*</sup>: systemunabhängige maximale intrinsische Wirksamkeit des dualsterischen Liganden in 100% aktiver Bindungspose. Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. ###: Wert signifikant verschieden von der Kenngröße logK<sub>A</sub> desselben Hybrides (t-Test, ###p<0,001).

Somit führt der Austausch der Aminosäure <sup>401</sup>Glu zu Alanin am muskarinischen M<sub>1</sub>-Rezeptor für beide untersuchten dualsterischen Hybridliganden zu identischen Werten der dynamischen Transduktionskoeffizienten sowie der maximalen rezeptorvermittelten intrinsischen Aktivität, und zwar sowohl bezüglich des G<sub>q</sub>- als auch des G<sub>s</sub>-Signalweges (vgl. Tab. 4.67; (t-Test, p>0,05). Dieses Ergebnis verifiziert die Hypothese, dass eine negative Ladung an Position 401 notwendig ist, dass beide Hybride in unterschiedlicher, differenzierter Weise mit dem hM<sub>1</sub>-Rezeptorprotein interagieren können.

#### 4.2.8 Einfluss von Rezeptormutationen innerhalb des putativ allosterischen Bindungsareales auf die Signalwegelektivität dualsterischer Hybridliganden

Im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die dualsterischen Hybridliganden JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) an hM<sub>1</sub>-Wildtyp-Rezeptoren keinen der untersuchten Signalwege gegenüber dem anderen bevorzugt zu aktivieren vermochten. In diesem Kapitel soll nun überprüft werden, ob die Mutationen im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstelle des hM<sub>1</sub>-Rezeptors in der Lage sind, eine Ligand-spezifische Bevorzugung eines speziellen Signalweges zu induzieren. Auf diese Weise könnten Einblicke darüber gewonnen werden, welche Aminosäuren möglicherweise an der Bindung unterschiedlicher G Proteine sowie der Beeinflussung unterschiedlicher Rezeptorkonformationen beteiligt sind.

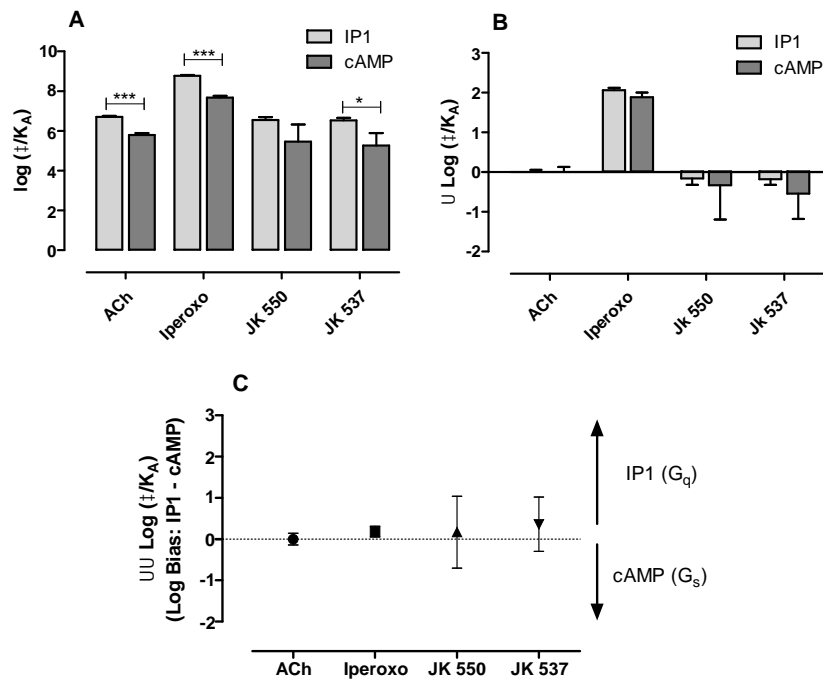
Der erste Schritt, auch bei der Analyse hinsichtlich einer potentiellen Signalwegelektivität in Gegenwart der in putativ allosterischen Epitopen mutatierten  $hM_1$ -Rezeptoren, war die Auswahl des richtigen Referenzagonisten. Wie zuvor für die  $hM_1$ -Wildtyp-Rezeptoren beschrieben (vgl. 4.1.6), wurden auch bei der „Bias“-Berechnung an mutierten  $hM_1$  Rezeptoren mit den dualsterischen Hybriden JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) sowohl Acetylcholin als auch Iperoxo verwendet. Dieses Vorgehen sollte es ermöglichen, am Ende Rückschlüsse hinsichtlich der Empfehlung für die Auswahl des geeigneten Referenzagonisten geben zu können. Nachfolgend werden demnach sowohl die „Bias“ Berechnungen mit dem endogenen Agonisten Acetylcholin, als auch mit dem Vollagonisten Iperoxo, als Referenzagonist dargestellt.

Wie bereits im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit unter 4.1.6 beschrieben, erfolgte die Ermittlung der „Transduktionskoeffizienten“ ( $\log(1/K_A)$ ) mit Hilfe einer nach Shonberg et al. 2014 modifizierten Gleichung des „Operational Model of agonism“ (Black und Leff, 1983)(vgl. 3.5). Die Berechnung des „Ligand-Bias“ erfolgte wie bereits unter 4.1.6 erläutert. Nachfolgend werden die Ergebnisse für die beiden dualsterischen Hybride JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) hinsichtlich ihrer Fähigkeit dargestellt, eine Signalwegelektivität ( $G_q$  oder  $G_s$ ) an den drei putativ allosterischen Rezeptormutanten  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$ ,  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  und  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$  zu induzieren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Ergebnisse in Abhängigkeit des verwendeten Expressionssystems der untersuchten Rezeptoren deutlich unterscheiden können (vgl. Kapitel 4.2.1.1). Da Kenakin und Kollegen jedoch experimentell zeigen konnten, dass die ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten Transduktionskoeffizienten ( $\log(1/K_A)$ ) zu Berechnung eines „Ligand-Bias“ über eine große Spanne von Veränderungen hinsichtlich der Rezeptorexpression konstant bleiben (Kenakin et al. 2012), blieb zu prüfen, ob sich dies hinsichtlich der zwei verwendeten Vektorsystemen (CHO- $hM_1$ -wt und CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Rezeptor) bestätigen würde. Aus diesem Grund wurde ebenfalls der CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Rezeptor mit in die „Bias“ Berechnung aufgenommen.

### **CHO-Flp- $hM_1$ -wt**

Die nach Shonberg und Kollegen (2014) ermittelten Transduktionskoeffizienten sind in Abbildung 4.83 (A) für den Referenzagonisten ACh, sowohl für den  $G_q$ - als auch für den  $G_s$ -Signalweg in einem Balkendiagramm dargestellt und zusätzlich in Tabelle 4.68 zusammengefasst. Der Transduktionskoeffizient des Referenzagonisten Acetylcholin  $\log(1/K_A)_{\text{ACh,Ref:ACh}} = 6,71 \pm 0,04$  für den  $G_q$ -Signalweg war signifikant größer als  $\log(1/K_A)_{\text{ACh,Ref:ACh}} = 5,80 \pm 0,09$  für die Aktivierung des  $G_s$ -Signalweges (t-Test,  $p < 0,05$ ). Ein ähnliches Ergebnis zeigte der Vollagonist Iperoxo, auch hier konnte für den  $G_q$ -Signalweg mit  $\log(1/K_A)_{\text{Iperoxo,Ref:ACh}} = 8,77 \pm 0,04$  ein signifikant höherer Transduktionskoeffizient als auf dem  $G_s$ -Signalweg  $\log(1/K_A)_{\text{Iperoxo,Ref:ACh}} = 7,68 \pm 0,08$  ermittelt werden. (t-Test,  $p < 0,05$ ). Das kürzere der beiden untersuchten Hybride JK 550 ( $C_4$ ) zeigte keinen signifikanten Unterschied seiner Transduktionskoeffizienten, wohingegen das längere Hybrid JK 537

(C<sub>6</sub>) ebenfalls einen signifikant höheren  $\log ( /K_A)$ -Wert für den G<sub>q</sub>-Signalweg im Vergleich zum G<sub>s</sub>-Signalweg aufwies (t-Test,  $p < 0,05$ ) (vgl. Abb. 4.83 (A), Tab. 4.68).



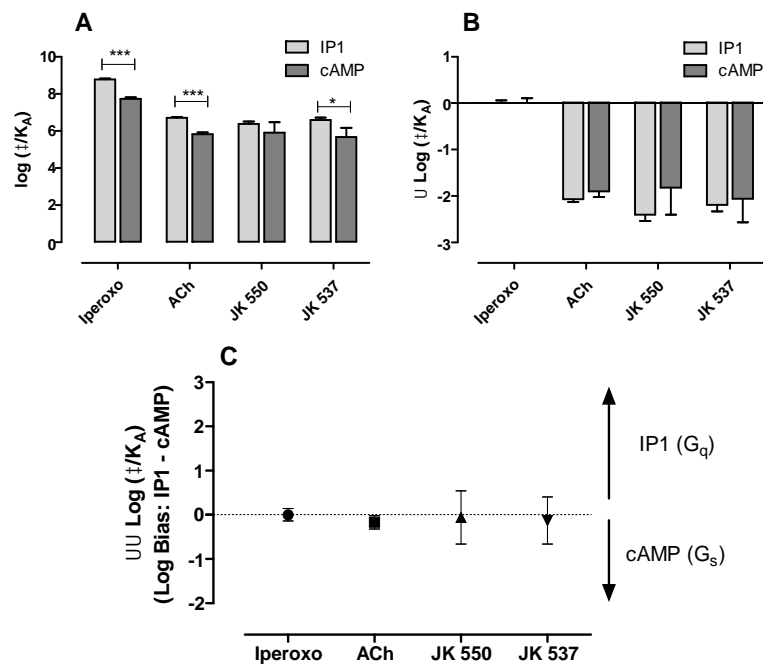
**Abbildung 4.83: Keine der untersuchten Substanzen zeigte, bezogen auf den Referenzagonisten Acetylcholin, an CHO-Flp-*hM*<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren eine ligandspezifische Bevorzugung eines Signalweges.** (A) Transduktionskoeffizienten  $\log ( /K_A)$  des orthosterischen Agonisten Iperoxo sowie der dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537. Die  $\log ( /K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 37 durch nichtlineare Regressionsanalyse ermittelt (vgl. 3.5). (B) Normalisierte Transduktionskoeffizienten  $\log ( /K_A)$ . Die  $\log ( /K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 38 ermittelt. (C) Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die G<sub>q</sub>- und G<sub>s</sub>-Signalwegaktivierung, dargestellt für ACh, Iperoxo sowie JK 550 und JK 537. Die  $\log ( /K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung (39) ermittelt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 und 41 errechnet. Weder Iperoxo noch die Hybride zeigten eine ligandspezifische Bevorzugung eines der untersuchten Signalwege. \*, \*\*\*: Wert signifikant verschieden von dem Wert für die G<sub>q</sub>-Aktivierung (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

In Abbildung 4.84 (A) wurden die Transduktionskoeffizienten des G<sub>q</sub>- und G<sub>s</sub>-Signalweges für den Referenzagonisten Iperoxo gegenübergestellt. Iperoxo und ACh besaßen für den G<sub>q</sub>-Signalweg, wie schon im Falle der Verwendung des Referenzagonisten Acetylcholin beschrieben, einen signifikant höheren Transduktionskoeffizienten als für den G<sub>s</sub>-Signalweg (t-Test,  $p < 0,05$ ). Das kürzere der beiden untersuchten Hybride JK 550 (C<sub>4</sub>) zeigte - wie bereits im Falle von ACh als Referenzagonisten (vgl. Abb. 4.83 und Tab. 4.68) - keinen signifikanten Unterschied seiner Transduktionskoeffizienten, wohingegen das längere Hybrid JK 537 (C<sub>6</sub>) ebenfalls einen signifikant höheren  $\log ( /K_A)$  Wert für den G<sub>q</sub>-Signalweg im Vergleich mit dem G<sub>s</sub>-Signalweg aufwies (G<sub>q</sub>:  $\log ( /K_A)_{JK537,Ref:Iper} = 6,59 \pm 0,13$ ; G<sub>s</sub>:  $\log ( /K_A)_{JK537,Ref:Iper} = 5,67 \pm 0,50$ ; t-Test,  $p < 0,05$ ) (vgl. Abb. 4.84 (A), Tab. 4.68). Die höheren Transduktionskoeffizienten für den G<sub>q</sub>-Signalweg zeigten für die Vollagonisten ACh und Iperoxo sowie für JK 537 (C<sub>6</sub>) einen „System-Bias“ (Kenakin und Christopoulos 2013b), mit welchem der *hM*<sub>1</sub>-Rezeptor den G<sub>q</sub>-Signalweg vom Liganden unabhängig bevorzugt aktiviert. Um den Einfluss des Systems und den damit verbundenen „Observations-Bias“ (Kenakin und Christopoulos 2013b)



auszuschließen, erfolgte im nächsten Schritt, wie auch unter 3.5 sowie 4.1.6 beschreiben, die Normalisierung der  $\log(1/K_A)$ -Werte (Kenakin und Christopoulos 2013). Dazu wurden sowohl für den  $G_q$ -Signalweg, als auch für den  $G_s$ -Signalweg der logarithmierte Transduktionskoeffizient ( $\log(1/K_A)$ ) des jeweiligen Referenzagonisten von dem logarithmierten Transduktionskoeffizienten der Testsubstanz subtrahiert. Diese Differenz lieferte dann den normalisierten Transduktionskoeffizienten  $\log(1/K_A)$ . Die den Referenzagonisten entsprechend zugeordneten  $\log(1/K_A)$ -Werte, sind in Abbildung 4.83 (B) für den Referenzagonisten ACh und Abbildung 4.84 (B) für den Referenzagonist Iperoxo dargestellt.

Die Verwendung des Referenzagonisten Acetylcholin zeigte, dass der Vollagonist Iperoxo den  $G_q$ -Signalweg 115-fach, und den  $G_s$ -Signalweg 76-fach stärker aktiviert, als der Referenzagonist Acetylcholin (vgl. Abb. 4.83 (A), Tab. 4.68). Demgegenüber aktiviert der endogene Agonist Acetylcholin den  $G_q$ -Signalweg 117-fach und den  $G_s$ -Signalweg 79-fach schwächer als der Referenzagonist Iperoxo ( $G_q$ :  $\log(1/K_A)_{ACh,Ref:Iper} = -2,07 \pm 0,06$ ,  $G_s$ :  $\log(1/K_A)_{ACh,Ref:Iper} = -1,90 \pm 0,12$ ) (vgl. Abb.4.84 (A), Tab. 4.68). Das kurze Hybrid JK 550 ( $C_4$ ) aktivierte den  $G_q$ -Signalweg 1,45-fach schwächer als Acetylcholin, aber 251-fach schwächer als sein orthosterischer Baustein Iperoxo ( $G_q$ :  $\log(1/K_A)_{JK550,Ref:ACh} = -0,16 \pm 0,16$ ,  $G_q$ :  $\log(1/K_A)_{JK550,Ref:Iper} = -2,40 \pm 0,14$ ). Den  $G_s$ -Signalweg aktivierte es zweifach schwächer als Acetylcholin bzw. 66-fach schwächer als Iperoxo ( $G_s$ :  $\log(1/K_A)_{JK550,Ref:ACh} = -0,33 \pm 0,86$ ;  $G_s$ :  $\log(1/K_A)_{JK550,Ref:Iper} = -1,82 \pm 0,58$ ). Das längere Hybrid JK 537 zeigte eine zweifach schwächere  $G_q$ -Signalwegsaktivierung als der endogene Agonist Acetylcholin aber eine 155-fach schwächere gegenüber dem Vollagonisten Iperoxo ( $G_q$ :  $\log(1/K_A)_{JK537,Ref:ACh} = -0,18 \pm 0,14$ ;  $G_q$ :  $\log(1/K_A)_{JK537,Ref:Iper} = -2,19 \pm 0,14$ ). Den  $G_s$ -Signalweg aktivierte es dreifach schwächer als Acetylcholin und 115-fach schwächer als Iperoxo ( $G_s$ :  $\log(1/K_A)_{JK537,Ref:ACh} = -0,54 \pm 0,64$ ;  $G_s$ :  $\log(1/K_A)_{JK537,Ref:Iper} = -2,06 \pm 0,51$ ; vgl. Abb.4.83 (B) und 4.84 (B), Tab. 4.68).



**Abbildung 4. 84: Keine der untersuchten Substanzen zeigte, bezogen auf den Referenzagonisten Iperoxo, an CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Rezeptoren eine ligandspezifische Bevorzugung eines Signalweges** (A) Transduktionskoeffizienten  $\log(+/K_A)$  des orthosterischen Agonisten Iperoxo sowie der dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537. Die  $\log(+/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 37 durch nichtlineare Regressionsanalyse ermittelt (vgl. 3.5). (B) Normalisierte Transduktionskoeffizienten  $U \text{ Log}(+/K_A)$ . Die  $\log(+/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 38 ermittelt. (C) Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$ - und  $G_s$ -Signalwegaktivierung, dargestellt für ACh, Iperoxo sowie JK 550 und JK 537. Die  $\log(+/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung (39) ermittelt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 und 41 errechnet. Weder Iperoxo noch die Hybride zeigten eine ligandspezifische Bevorzugung eines der untersuchten Signalwege. \*, \*\*\*: Wert signifikant verschieden von dem Wert für die  $G_q$ -Aktivierung (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

Um die Ligand-spezifische Bevorzugung eines Signalweges zu quantifizieren, erfolgte eine Subtraktion der für die jeweiligen Signalwege normalisierten Transduktionskoeffizienten  $\log(+/K_A)$  des betrachteten Liganden. Der Vergleich der auf diese Weise erhaltenen  $\log(+/K_A)$ -Werte des Vollagonisten Iperoxo sowie der dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537 zeigte, dass - weder relativ zum Referenzagonisten Acetylcholin (Abb. 4.83 (C)) noch zum Referenzagonisten Iperoxo (Abb. 4.84 (C)) - für keinen der Liganden eine Abweichung von der Nulllinie auftrat. Somit zeigte (hinsichtlich der Referenzagonisten ACh und Iperoxo) keiner der beiden dualsterischen Hybridliganden eine Bevorzugung eines der untersuchten zwei Signalwege. Ebenso konnte aus diesen Ergebnissen abgeleitet werden, dass keiner der Vollagonisten gegenüber dem jeweils anderen einen „Ligand-Bias“ aufwies (vgl. Abb.4.83 (C)) und 4.84 (C), Tab. 4.68).

<b>CHO-Flp-M<sub>1</sub>-wt</b> <b>Referenzagonist Acetylcholin</b>										
<b>Substanz</b>	<b>G<sub>q</sub>-</b>		<b>G<sub>s</sub>-</b>		<b>G<sub>q</sub>-</b>		<b>G<sub>s</sub>-</b>		<b>G<sub>q</sub>-G<sub>s</sub>-</b>	
	<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>	
	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>
<b>ACh</b>	6,71 ± 0,04	6	5,80 ± 0,09 <sup>***</sup>	3	0,00 ± 0,06	6	0,00 ± 0,13	3	0,00 ± 0,14	9
<b>Iperoxo</b>	8,77 ± 0,04	5	7,68 ± 0,08 <sup>***</sup>	4	2,06 ± 0,06	5	1,88 ± 0,12	4	0,18 ± 0,13	9
<b>JK 550</b>	6,55 ± 0,15	5	5,47 ± 0,86	3	-0,16 ± 0,16	5	-0,33 ± 0,86	3	0,17 ± 0,87	8
<b>JK 537</b>	6,53 ± 0,13	7	5,26 ± 0,63 <sup>*</sup>	3	-0,18 ± 0,14	7	-0,54 ± 0,64	3	0,36 ± 0,66	10

<b>CHO-Flp-M<sub>1</sub>-wt</b> <b>Referenzagonist Iperoxo</b>										
<b>Substanz</b>	<b>G<sub>q</sub>-</b>		<b>G<sub>s</sub>-</b>		<b>G<sub>q</sub>-</b>		<b>G<sub>s</sub>-</b>		<b>G<sub>q</sub>-G<sub>s</sub>-</b>	
	<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>	
	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>
<b>Iperoxo</b>	8,78 ± 0,04	5	7,73 ± 0,08 <sup>***</sup>	4	0,00 ± 0,06	5	0,00 ± 0,11	4	0,00 ± 0,14	9
<b>ACh</b>	6,71 ± 0,04	6	5,83 ± 0,09 <sup>***</sup>	3	-2,07 ± 0,06	6	-1,90 ± 0,12	3	-0,17 ± 0,15	9
<b>JK 550</b>	6,38 ± 0,13	5	5,91 ± 0,57	3	-2,40 ± 0,14	5	-1,82 ± 0,58	3	-0,58 ± 0,60	8
<b>JK 537</b>	6,59 ± 0,13	7	5,67 ± 0,50 <sup>*</sup>	3	-2,19 ± 0,14	7	-2,06 ± 0,51	3	-0,13 ± 0,53	10

**Tabelle 4. 68:** Numerische Schätzwerte der in Abbildung 4.83 und 4.84 dargestellten Parameter  $\log(\tau/K_A)$ ,  $\log(\tau/K_A)$ , und  $\log(\tau/K_A)$  zur Berechnung einer ligandspezifisch bevorzugten Signalwegaktivierung an CHO-Flp-hM<sub>1</sub>-wt-Zellen.  $\log(\tau/K_A)$ : Transduktionskoeffizient nach Kenakin et al. 2012; Die  $\log( /K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 37 durch nichtlineare Regressionsanalyse ermittelt (vgl. 3.5).  $\log(\tau/K_A)$ : normalisierter Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  der zu untersuchenden Substanzen nach Kenakin et al. 2012; Die  $\log( /K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 38 ermittelt.  $\log(\tau/K_A)$ : Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die G<sub>q</sub> und G<sub>s</sub>-Signalwegsaktivierung (Kenakin et al. 2012); Die  $\log( /K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung (39) ermittelt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 und 41 errechnet, \*,\*\*\*: signifikant verschieden von dem Wert für die G<sub>q</sub>-Aktivierung (t-Test, \*p<0,05; \*\*\*p<0,001).

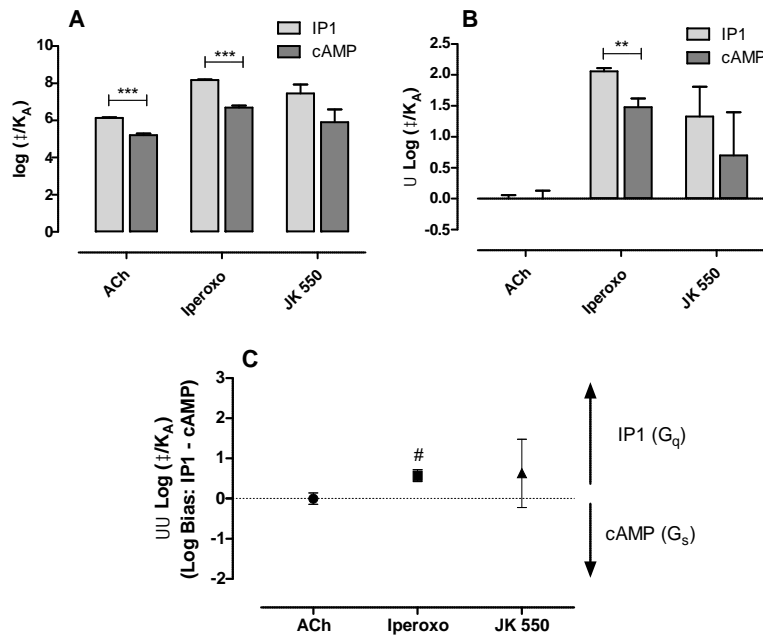
**CHO-M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala**

Als erste *hM<sub>1</sub>*-Rezeptormutation wurde der Austausch der Aminosäure Tyrosin 179 zu Alanin bezüglich einer eventuellen Herbeiführung einer bevorzugten Signalwegaktivierung untersucht. Die Ergebnisse für den Referenzagonisten Acetylcholin sind in Abbildung 4.85, die für den Referenzagonisten Iperoxo in Abbildung 4.86 dargestellt. Alle ermittelten Parameter für eine „Bias“-Berechnung wurden in Tabelle 4.69 zusammengefasst. Auf Grund des bereits unter 4.2.5 dargestellten Funktionsverlusts der Substanz JK 537, der sich sowohl auf dem G<sub>q</sub>- als auch auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg zeigte, konnte mit diesem Hybrid keine Quantifizierung eines eventuellen „Ligand-Bias“ durchgeführt werden.

Die Fähigkeit des dualsterischen Hybrides JK 550 (C<sub>4</sub>) am M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala-Rezeptor G<sub>q</sub> oder G<sub>s</sub> Proteine in unterschiedlichem Ausmaß aktivieren zu können, wurde wiederum mit Hilfe der Transduktionskoeffizienten bestimmt (Abb. 4.85 (A), 4.86 (A); Tab. 4.69). Der Transduktionskoeffizient des Referenzagonisten Acetylcholin (G<sub>q</sub>:  $\log(1/K_A)_{\text{ACh,Ref:ACh}} = 6,13 \pm 0,04$ ) war für den G<sub>q</sub>-Signalweg signifikant größer als für den G<sub>s</sub>-Signalweg (G<sub>s</sub>:  $\log(1/K_A)_{\text{ACh,Ref:ACh}} = 5,21 \pm 0,09$ ; t-Test,  $p < 0,05$ ). Ein qualitativ gleichartiges Ergebnis zeigte auch Iperoxo, welches für den G<sub>q</sub>-Signalweg einen signifikant höheren Transduktionskoeffizient besaß (t-Test,  $p < 0,05$ ). Das Hybrid JK 550 wies, wie bereits am *hM<sub>1</sub>*-Wildtyp, keinen signifikanten Unterschied der Transduktionskoeffizienten für die Signalwege G<sub>q</sub> und G<sub>s</sub> auf (vgl. Abb. 4.85 (A), Tab. 4.69).

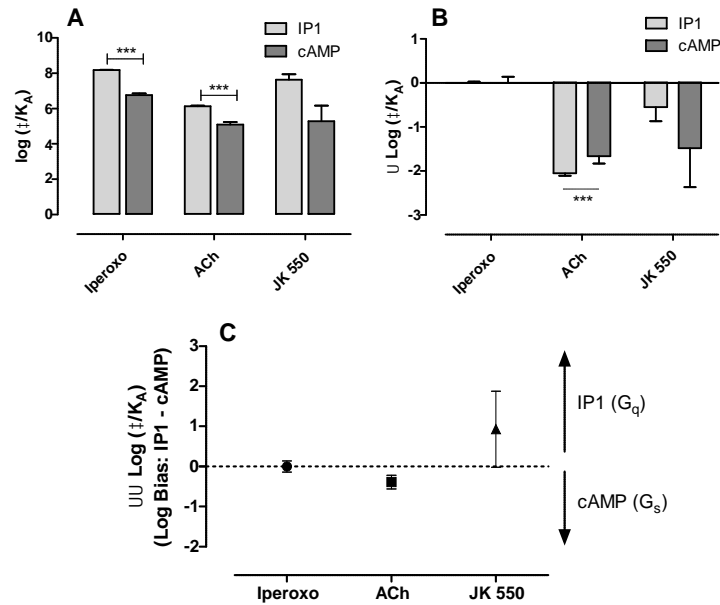
Die mit Hilfe des Referenzagonisten Iperoxo ermittelten Transduktionskoeffizienten von Iperoxo und Acetylcholin waren - wie im Fall des Referenzagonisten Acetylcholin - für den G<sub>q</sub>-Signalweg signifikant höher als für den G<sub>s</sub>-Signalweg (G<sub>q</sub>:  $\log(1/K_A)_{\text{Iper,Ref:Iper}} = 8,18 \pm 0,02$ / G<sub>s</sub>:  $\log(1/K_A)_{\text{Iper,Ref:Iper}} = 6,76 \pm 0,10$  G<sub>q</sub>:  $\log(1/K_A)_{\text{ACh,Ref:Iper}} = 6,13 \pm 0,03$ / G<sub>s</sub>:  $\log(1/K_A)_{\text{ACh,Ref:Iper}} = 5,10 \pm 0,14$ ) (vgl. Abb. 4.86 (A), Tab. 4.69, t-Test,  $p < 0,05$ ). Wie zuvor für den *hM<sub>1</sub>*-Wildtyp-Rezeptor gefunden, zeigt auch der Austausch der Aminosäure Tyrosin 179 zu Alanin, dass die beiden Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo den G<sub>q</sub>-Signalweg bevorzugt zu aktivieren scheinen. Um jedoch einen „System-Bias“ auszuschließen, erfolgte im nächsten Schritt die Normalisierung der  $\log(1/K_A)$ -Werte. Die Verwendung des Referenzagonisten Acetylcholin zeigte, dass der orthosterische Baustein der dualsterischen Hybride Iperoxo den G<sub>q</sub>-Signalweg 112-fach und den G<sub>s</sub>-Signalweg 30-fach stärker aktiviert als der Referenzagonist Acetylcholin (G<sub>q</sub>:  $\log(1/K_A)_{\text{Iper,Ref:ACh}} = 2,05 \pm 0,05$ / G<sub>s</sub>:  $\log(1/K_A)_{\text{Iper,Ref:ACh}} = 1,48 \pm 0,14$ ) (t-Test,  $p < 0,05$ ). Demgegenüber aktiviert Acetylcholin den G<sub>q</sub>-Signalweg 112-fach und den G<sub>s</sub>-Signalweg 46-fach schwächer als der Referenzagonist Iperoxo (G<sub>q</sub>:  $\log(1/K_A)_{\text{ACh,Ref:Iper}} = -2,05 \pm 0,04$ / G<sub>s</sub>:  $\log(1/K_A)_{\text{ACh,Ref:Iper}} = -1,66 \pm 0,17$ ) (t-Test,  $p < 0,05$ ). Das Hybrid JK 550 (mit der C<sub>4</sub>-Zwischenkette) aktivierte den G<sub>q</sub>-Signalweg 21-fach stärker als der endogene Agonist Acetylcholin, aber 4-fach schwächer als sein orthosterischer Baustein Iperoxo (G<sub>q</sub>:  $\log(1/K_A)_{\text{JK550,Ref:ACh}} = 1,33 \pm 0,48$ / G<sub>q</sub>:  $\log(1/K_A)_{\text{JK550,Ref:Iper}} = -0,55 \pm 0,32$ ). Den G<sub>s</sub>-Signalweg aktivierte es nur fünffach stärker als

Acetylcholin aber 30-fach schwächer als Iperoxo ( $G_s$ :  $\log(1/K_A)_{JK550,Ref:ACh} = 0,70 \pm 0,70/$   
 $G_s$ :  $\log(1/K_A)_{JK550,Ref:Iper} = -1,48 \pm 0,89$ ) (vgl. Abb. 4.85 (B), Abb. 4.86 (B), Tab. 4.69).



**Abbildung 4. 85: Nur Iperoxo zeigt, bezogen auf den Referenzagonisten Acetylcholin, am CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala-Rezeptor eine ligandspezifische Bevorzugung eines Signalweges.** (A) Transduktionskoeffizienten  $\log(1/K_A)$  des orthosterischen Agonisten Iperoxo sowie der dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537. Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 37 durch nichtlineare Regressionsanalyse ermittelt (vgl. 3.5). (B) Normalisierte Transduktionskoeffizienten  $\log(1/K_A)$ . Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 38 ermittelt. (C) Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$ - und  $G_s$ -Signalwegaktivierung, dargestellt für ACh, Iperoxo sowie JK 550 und JK 537. Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung (39) ermittelt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 und 41 errechnet. Weder Iperoxo noch die Hybride zeigten eine ligandspezifische Bevorzugung eines der untersuchten Signalwege. \*, \*\*\*: Wert signifikant verschieden von dem Wert für die  $G_q$ -Aktivierung (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). #:  $\log(1/K_A)$ -Wert signifikant unterschiedlich vom  $\log(1/K_A)$ -Wert des Referenzagonisten (ACh) (t-Test, # $p < 0,05$ ).

Die Subtraktion der  $\log(1/K_A)$ -Werte von JK 550 beider zu untersuchenden Signalwege ergab unabhängig vom Referenzagonisten, dass bei Austausch der Aminosäure Tyrosin in der zweiten extrazellulären Schleife des  $hM_1$ -Rezeptors ein  $\log(1/K_A)$ -Wert resultierte, der nicht signifikant unterschiedlich von der Nulllinie (definiert durch den Referenzagonisten) war (Abb. 4.85 (C), 4.86 (C); Tab. 4.69)(t-Test,  $p > 0,05$ ). Folglich war keine JK 550-spezifisch bevorzugte Signalwegaktivierung an dieser Rezeptormutante feststellbar. Es soll jedoch erwähnt werden, dass im Falle von Iperoxo eine bevorzugte Signalwegaktivierung gegenüber dem endogenen Liganden Acetylcholin detektiert werden konnte (vgl. Abb. 4.85 (C); Tab.4.69; t-Test,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 4. 86: Keine der untersuchten Substanzen zeigt, bezogen auf den Referenzagonisten Iperoxo, an CHO-Flp- $M_1^{179}$ Tyr Ala-Zellen eine ligandspezifische Bevorzugung eines Signalweges.** (A) Transduktionskoeffizienten  $\log(1/K_A)$  des orthosterischen Agonisten Iperoxo sowie der dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537. Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 37 durch nichtlineare Regressionsanalyse ermittelt (vgl. 3.5). (B) Normalisierte Transduktionskoeffizienten  $U \log(1/K_A)$ . Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 38 ermittelt. (C) Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$ - und  $G_s$ -Signalwegaktivierung, dargestellt für ACh, Iperoxo sowie JK 550 und JK 537. Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung (39) ermittelt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 und 41 errechnet. Weder Iperoxo noch die Hybride zeigten eine ligandspezifische Bevorzugung eines der untersuchten Signalwege. \*\*\*: Wert signifikant verschieden von dem Wert für die  $G_q$ -Aktivierung (t-Test, \*\*\* $p < 0,001$ ).

<b>CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala</b> <b>Referenzagonist Acetylcholin</b>										
	<b>G<sub>q</sub>-</b>		<b>G<sub>s</sub>-</b>		<b>G<sub>q</sub>-</b>		<b>G<sub>s</sub>-</b>		<b>G<sub>q</sub>-G<sub>s</sub>-</b>	
	<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>	
<b>Substanz</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>
<b>ACh</b>	6,13 ± 0,04	4	5,21 ± 0,09 <sup>***</sup>	3	0,00 ± 0,06	4	0,00 ± 0,13	3	0,00 ± 0,14	7
<b>Iperoxo</b>	8,18 ± 0,03	4	6,69 ± 0,11 <sup>***</sup>	4	2,05 ± 0,05	4	1,48 ± 0,14 <sup>**</sup>	4	0,57 ± 0,15 <sup>#</sup>	8
<b>JK 550</b>	7,46 ± 0,48	3	5,91 ± 0,69	4	1,33 ± 0,48	3	0,70 ± 0,70	4	0,63 ± 0,85	7
<b>JK 537</b>	n.d.	4	n.d.	3	n.d.	4	n.d.	3	n.d.	7

<b>CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala</b> <b>Referenzagonist Iperoxo</b>										
	<b>G<sub>q</sub>-</b>		<b>G<sub>s</sub>-</b>		<b>G<sub>q</sub>-</b>		<b>G<sub>s</sub>-</b>		<b>G<sub>q</sub>-G<sub>s</sub>-</b>	
	<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>	
<b>Substanz</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>
<b>Iperoxo</b>	8,18 ± 0,02	4	6,76 ± 0,10 <sup>***</sup>	4	0,00 ± 0,03	4	0,00 ± 0,14	4	0,00 ± 0,14	8
<b>ACh</b>	6,13 ± 0,03	4	5,10 ± 0,14 <sup>***</sup>	3	-2,05 ± 0,04	4	-1,66 ± 0,17 <sup>***</sup>	3	-0,39 ± 0,17	7
<b>JK 550</b>	7,63 ± 0,32	3	5,28 ± 0,88	4	-0,55 ± 0,32	3	-1,48 ± 0,89	4	0,93 ± 0,95	7
<b>JK 537</b>	n.d.	4	n.d.	3	n.d.	4	n.d.	3	n.d.	7

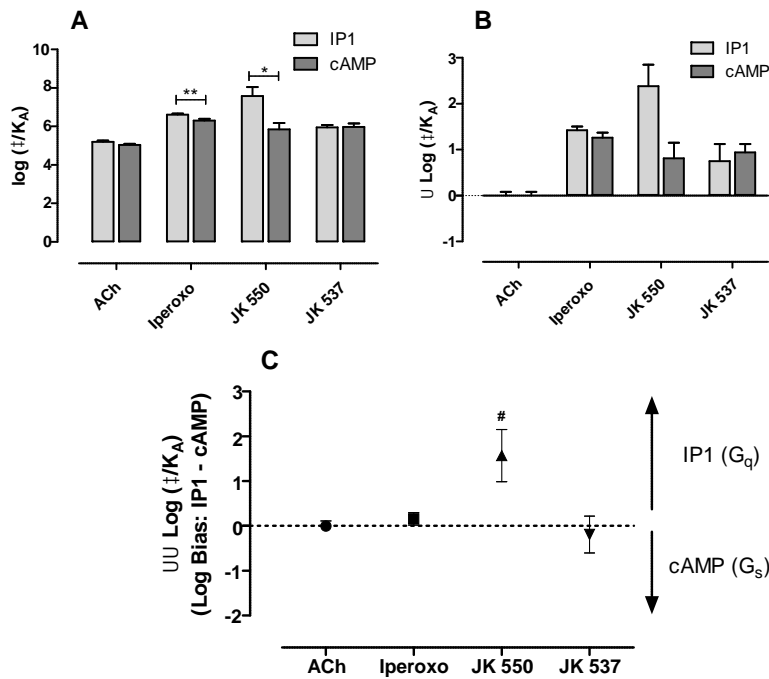
**Tabelle 4. 69:** Numerische Schätzwerte der in Abbildung 4.85 und 4.86 dargestellten Parameter  $\log(\tau/K_A)$ ,  $\log(\tau/K_A)$ , und  $\log(\tau/K_A)$  zur Berechnung einer ligandspezifisch bevorzugten Signalwegaktivierung an CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala-Zellen.  $\log(\tau/K_A)$ : Transduktionskoeffizient nach Kenakin et al. 2012; Die  $\log( /K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 37 durch nichtlineare Regressionsanalyse ermittelt (vgl. 3.5).  $\log(\tau/K_A)$ : normalisierter Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  der zu untersuchenden Substanzen nach Kenakin et al. 2012; Die  $\log( /K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 38 ermittelt.  $\log(\tau/K_A)$ : Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die G<sub>q</sub> und G<sub>s</sub>-Signalwegsaktivierung (Kenakin et al. 2012); Die  $\log( /K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung (39) ermittelt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 und 41 errechnet. \*, \*\*, \*\*\* signifikant verschieden von dem Wert für die G<sub>q</sub>-Aktivierung (t-Test, p<0,05). ). #:  $\log( /K_A)$ -Wert signifikant unterschiedlich vom  $\log( /K_A)$ -Wert des jeweiligen Referenzagonisten (ACh/Iperoxo) (t-Test, #p<0,05).

#### CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala

Als zweite Rezeptormutation wurde der Austausch der unter den fünf Muskarin-Rezeptorsubtypen konservierten Aminosäure Tryptophan 400 zu Alanin, hinsichtlich des möglichen Herbeiführens einer bevorzugten Signalwegaktivierung untersucht. Die Ergebnisse sowohl für den Referenzagonisten Acetylcholin, als auch für den Referenzagonisten Iperoxo sind in den Abbildungen 4.87 und 4.88, sowie in Tabelle 4.70 zusammengefasst.

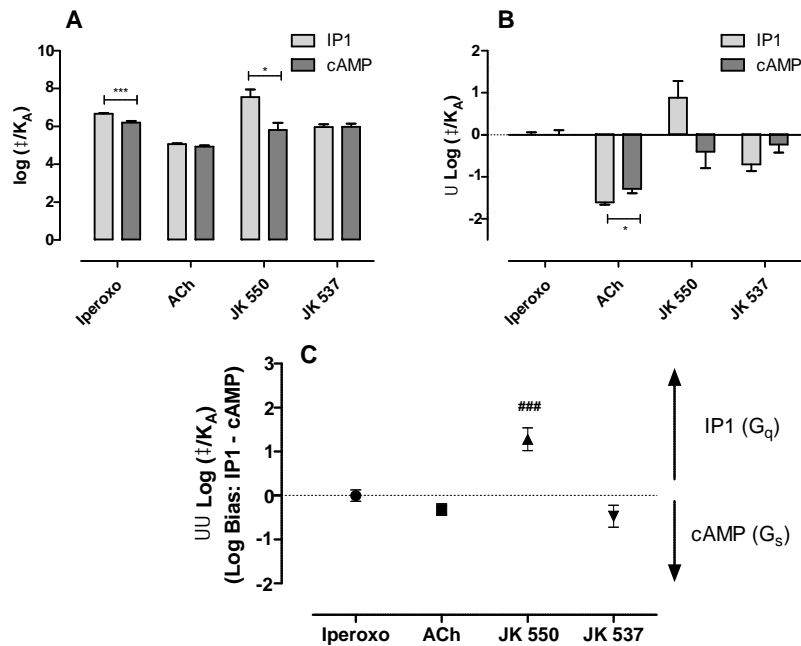
Die mit Hilfe des Referenzagonisten Acetylcholin ermittelten  $\log(\tau/K_A)$ -Werte zeigten interessanterweise für den endogenen Agonisten Acetylcholin keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Signalwegen (vgl. Abb. 4.87 (A) und Tab. 4.70; t-Test, p>0,05). Der

Vollagonist Iperoxo dagegen zeigte bezüglich des  $G_q$ -Signalweges einen signifikant höheren Wert als für den  $G_s$ -Signalweg ( $G_q$ :  $\log(1/K_A)_{\text{Iper,Ref:ACh}} = 6,62 \pm 0,05$ ;  $G_s$ :  $\log(1/K_A)_{\text{Iper,Ref:ACh}} = 6,30 \pm 0,09$ )(t-Test,  $p < 0,05$ ). Bei Betrachtung der Transduktionskoeffizienten, die mit Hilfe des Referenzagonisten Iperoxo ermittelt wurden, ergab sich für den endogenen Agonisten Acetylcholin kein signifikanter Unterschied zwischen den Signalwegen. Der Vollagonist Iperoxo wies hingegen bezüglich des  $G_q$ -Signalweges einen signifikant höheren Wert als zum  $G_s$ -Signalweges auf ( $G_q$ :  $\log(1/K_A)_{\text{Iper,Ref:Iperoxo}} = 6,67 \pm 0,04$ ;  $G_s$ :  $\log(1/K_A)_{\text{Iper,Ref:Iperoxo}} = 6,21 \pm 0,08$ , vgl. Abb. 4.88 (A) und Tab. 4.70; t-Test,  $p < 0,05$ ). Somit besitzt die CHO-Flp- $M_1^{400}$ Trp Ala Rezeptormutation keinen von Acetylcholin abhängigen „System Bias“, wohingegen letzterer in Gegenwart von Iperoxo den  $G_q$ -Signalweg weiterhin messbar ist (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Ergebnisse der anschließenden Normalisierung der  $\log(1/K_A)$ -Werte sind in den Abbildungen 4.87 (B), 4.88 (B) sowie Tabelle 4.70 zusammengefasst.



**Abbildung 4. 87: Ligandspezifische Bevorzugung des IP1-Signalweges durch JK 550 an CHO-Flp- $M_1^{400}$ Trp Ala-Zellen bezogen auf den Referenzagonisten ACh.** (A) Transduktionskoeffizienten  $\log(1/K_A)$  des orthosterischen Agonisten Iperoxo sowie der dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537. Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 37 durch nichtlineare Regressionsanalyse ermittelt (vgl. 3.5). (B) Normalisierte Transduktionskoeffizienten  $U \log(1/K_A)$ . Die  $U \log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 38 ermittelt. (C) Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$ - und  $G_s$ -Signalwegaktivierung, dargestellt für ACh, Iperoxo sowie JK 550 und JK 537. Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung (39) ermittelt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 und 41 errechnet. Weder Iperoxo noch die Hybride zeigten eine ligandspezifische Bevorzugung eines der untersuchten Signalwege. \*, \*\*: Wert signifikant verschieden von dem Wert für die  $G_q$ -Aktivierung (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ). #:  $\log(1/K_A)$ -Wert signifikant unterschiedlich vom  $\log(1/K_A)$ -Wert des Referenzagonisten (ACh) (t-Test, # $p < 0,05$ ).





**Abbildung 4.88: Ligandspezifische Bevorzugung des IP1-Signalweges durch JK 550 an CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>400r</sup> Trp Ala Zellen bezogen auf den Referenzagonisten Iperoxo.** (A) Transduktionskoeffizienten  $\log(1/K_A)$  des orthosterischen Agonisten Iperoxo sowie der dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537. Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 37 durch nichtlineare Regressionsanalyse ermittelt (vgl. 3.5). (B) Normalisierte Transduktionskoeffizienten  $\log(1/K_A)$ . Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 38 ermittelt. (C) Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die G<sub>q</sub>- und G<sub>s</sub>-Signalwegaktivierung, dargestellt für ACh, Iperoxo sowie JK 550 und JK 537. Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung (39) ermittelt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 und 41 errechnet. Weder Iperoxo noch die Hybride zeigten eine ligandspezifische Bevorzugung eines der untersuchten Signalwege. \*, \*\*\*: Wert signifikant verschieden von dem Wert für die G<sub>q</sub>-Aktivierung (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). ###:  $\log(1/K_A)$ -Wert signifikant unterschiedlich vom  $\log(1/K_A)$ -Wert des Referenzagonisten (Iperoxo) (t-Test, ### $p < 0,001$ ).

Mit Iperoxo als Referenzagonisten aktivierte ACh den G<sub>q</sub>-Signalweg im Gegensatz zum Wildtyp-Rezeptor 40-fach und den G<sub>s</sub>-Signalweg nur noch 19-fach schwächer als der Referenzagonist (G<sub>q</sub>:  $\log(1/K_A)_{ACh,Ref:Iper} = -1,60 \pm 0,06$ / G<sub>s</sub>:  $\log(1/K_A)_{ACh,Ref:Iper} = -1,28 \pm 0,11$ )(t-Test,  $p < 0,05$ ). Interessanterweise aktiviert das kurze Hybrid JK 550 (C<sub>4</sub>), den G<sub>q</sub>-Signalweg 240-fach stärker als der endogene Agonist Acetylcholin und sogar 8-fach stärker als sein orthosterischer Baustein Iperoxo G<sub>q</sub>: ( $\log(1/K_A)_{JK550,Ref:ACh} = 2,38 \pm 0,47$ / G<sub>q</sub>:  $\log(1/K_A)_{JK550,Ref:Iper} = -0,88 \pm 0,40$ )(t-Test,  $p < 0,05$ ). Hinsichtlich des G<sub>s</sub>-Signalweges zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (t-Test,  $p > 0,05$ ). Das Hybrid JK 537 offenbarte eine gegenüber dem Referenzagonisten Acetylcholin 6-fach stärkere Aktivierung des G<sub>q</sub>-Weges, jedoch ist dieses Ausmaß deutlich kleiner als es bei JK 550 ermittelt werden konnte (G<sub>q</sub>:  $\log(1/K_A)_{JK537,Ref:ACh} = 0,75 \pm 0,37$ ). Gegenüber Iperoxo besaß das Hybrid JK 537 eine 5-fach schwächere Fähigkeit den G<sub>q</sub>-Weg zu aktivieren (G<sub>q</sub>:  $\log(1/K_A)_{JK537,Ref:Iper} = -0,70 \pm 0,16$ ). Ebenso zeigt sich bei JK 537 eine 9-fach stärkere Aktivierung des G<sub>s</sub>-Signalweges gegenüber Acetylcholin und eine nur 2-fach geringere Aktivierung gegenüber dem Referenzagonisten Iperoxo (G<sub>s</sub>:  $\log(1/K_A)_{JK537,Ref:ACh} = 0,94 \pm 0,18$ / G<sub>s</sub>:  $\log(1/K_A)_{JK537,Ref:Iper} = -0,23 \pm 0,19$ , vgl. Abb. 4.87 (B), Abb. 4.88 (B), Tab. 4.70, t-Test,  $p < 0,05$ ).

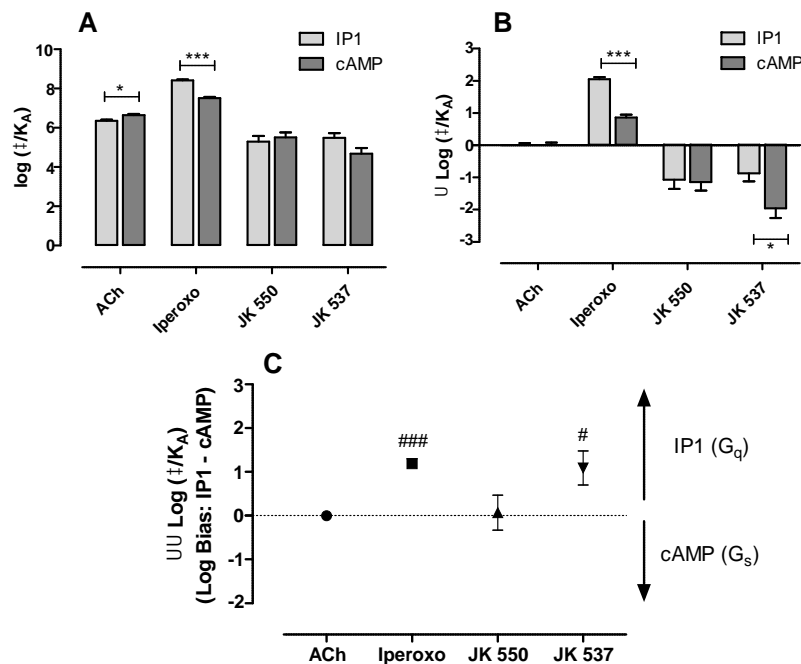
Die Berechnung der  $\log(\tau/K_A)$ -Werte zeigte, dass der Austausch der Aminosäure Tryptophan 400 in der siebten Transmembran gegen die Aminosäure Alanin beim kürzeren Hybrid JK 550 eine signifikante Bevorzugung des  $G_q$ -Signalweges gegenüber dem Referenzagonisten ACh zur Folge hat (vgl. Abb. 4.87 (C), Tab. 4.70, t-Test,  $p < 0,05$ ) Demnach führt der Wegfall der lipophilen und aromatischen Seitenkette des Tryptophans an dieser Position des  $M_1$ -Rezeptors, für JK 550 zu einer  $37_{(\text{Ref:ACh})}$ - bzw.  $19_{(\text{Ref:Iper})}$ -fachen Bevorzugung des  $G_q$ -Signalweges im Vergleich zum  $G_s$  Protein vermittelten Signalweg. Dieser „Ligand-Bias“ konnte sowohl bei Verwendung des Referenzagonisten Acetylcholin, als auch mit Verwendung von Iperoxo ermittelt werden (vgl. Abb. 4.87 (C), Abb. 4.88 (C), Tab. 4.70). Interessanterweise zeigt das längere Hybrid JK 537 gegenüber beiden Referenzagonisten keinen „Ligand-Bias“ (vgl. Abb. 4.87 (C), Abb. 4.88 (C), Tab. 4.70; t-Test,  $p > 0,05$ ).

<b>CHO-Flp-<math>M_1^{400}</math>Trp Ala</b> <b>Referenzagonist Acetylcholin</b>										
	<b><math>G_q</math>- Signalweg</b>		<b><math>G_s</math>- Signalweg</b>		<b><math>G_q</math>- Signalweg</b>		<b><math>G_s</math>- Signalweg</b>		<b><math>G_q</math>-<math>G_s</math>- Signalweg</b>	
<b>Substanz</b>	<b><math>\log(\tau/K_A)</math></b>	<b>n</b>	<b><math>\log(\tau/K_A)</math></b>	<b>n</b>	<b><math>\log(\tau/K_A)</math></b>	<b>n</b>	<b><math>\log(\tau/K_A)</math></b>	<b>n</b>	<b><math>\log(\tau/K_A)</math></b>	<b>n</b>
<b>ACh</b>	5,20 ± 0,06	5	5,04 ± 0,06	3	0,00 ± 0,08	5	0,00 ± 0,08	3	0,00 ± 0,11	8
<b>Iperoxo</b>	6,62 ± 0,05	6	6,30 ± 0,09**	4	1,42 ± 0,08	6	1,26 ± 0,11	4	0,16 ± 0,14	10
<b>JK 550</b>	7,58 ± 0,47	6	5,85 ± 0,33*	3	2,38 ± 0,47	6	0,81 ± 0,34	3	1,57 ± 0,58#	9
<b>JK 537</b>	5,95 ± 0,13	5	5,98 ± 0,17	3	0,75 ± 0,37	5	0,94 ± 0,18	3	-0,19 ± 0,41	8
<b>CHO-Flp-<math>M_1^{400}</math>Trp Ala</b> <b>Referenzagonist. Iperoxo</b>										
	<b><math>G_q</math>- Signalweg</b>		<b><math>G_s</math>- Signalweg</b>		<b><math>G_q</math>- Signalweg</b>		<b><math>G_s</math>- Signalweg</b>		<b><math>G_q</math>-<math>G_s</math>- Signalweg</b>	
<b>Substanz</b>	<b><math>\log(\tau/K_A)</math></b>	<b>n</b>	<b><math>\log(\tau/K_A)</math></b>	<b>n</b>	<b><math>\log(\tau/K_A)</math></b>	<b>n</b>	<b><math>\log(\tau/K_A)</math></b>	<b>n</b>	<b><math>\log(\tau/K_A)</math></b>	<b>n</b>
<b>Iperoxo</b>	6,67 ± 0,04	6	6,21 ± 0,08***	4	0,00 ± 0,06	6	0,00 ± 0,11	4	0,00 ± 0,13	10
<b>ACh</b>	5,07 ± 0,05	5	4,93 ± 0,07	3	-1,60 ± 0,06	5	-1,28 ± 0,11*	3	-0,32 ± 0,13	8
<b>JK 550</b>	7,55 ± 0,40	6	5,81 ± 0,38*	3	0,88 ± 0,40	6	-0,40 ± 0,39	3	1,28 ± 0,26###	9
<b>JK 537</b>	5,97 ± 0,15	5	5,98 ± 0,17	3	-0,70 ± 0,16	5	-0,23 ± 0,19	3	-0,47 ± 0,25	8

**Tabelle 4. 70:** Numerische Schätzwerte der in Abbildung 4.87 und 4.88 dargestellten Parameter  $\log(\tau/K_A)$ ,  $\log(\tau/K_A)$ , und  $\log(\tau/K_A)$  zur Berechnung einer ligandspezifisch bevorzugten Signalwegaktivierung an CHO-Flp- $M_1^{400}$ Trp Ala-Zellen.  $\log(\tau/K_A)$ : Transduktionskoeffizient nach Kenakin et al. 2012; Die  $\log(\tau/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 37 durch nichtlineare Regressionsanalyse ermittelt (vgl. 3.5).  $\log(\tau/K_A)$ : normalisierter Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  der zu untersuchenden Substanzen nach Kenakin et al. 2012; Die  $\log(\tau/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 38 ermittelt.  $\log(\tau/K_A)$ : Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$  und  $G_s$ -Signalwegsaktivierung (Kenakin et al. 2012); Die  $\log(\tau/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung (39) ermittelt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 und 41 errechnet, \*,\*\*\*: signifikant verschieden von dem Wert für die  $G_q$ -Aktivierung (t-Test, \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). #,###:  $\log(\tau/K_A)$ -Wert signifikant unterschiedlich vom  $\log(\tau/K_A)$ -Wert des jeweiligen Referenzagonisten (ACh/Iperoxo) (t-Test, # $p < 0,05$ ; ### $p < 0,001$ ).

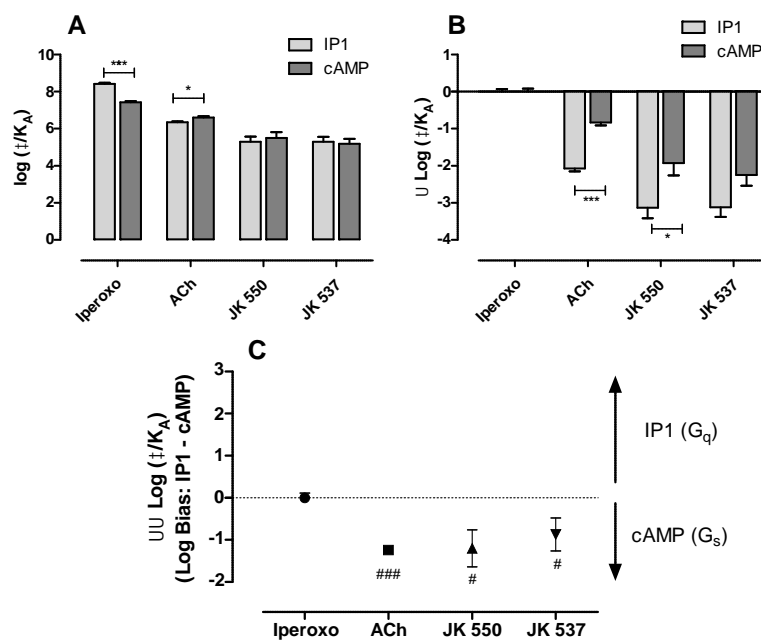
CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala

Als letzte hM<sub>1</sub>-Rezeptormutation wurde der Austausch der negativ geladenen Glutaminsäure gegen Alanin innerhalb des transmembranalen Abschnittes VII des Rezeptorproteins zur Aufspürung einer möglichen Ligand-spezifischen Bevorzugung des G<sub>q</sub>- oder G<sub>s</sub>-Signalweges untersucht. Die Ergebnisse zu den Fähigkeiten der beiden dualsterischen Hybridliganden am M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala-Rezeptor, G<sub>q</sub> oder G<sub>s</sub> Proteine in unterschiedlichem Ausmaß aktivieren zu können, sind in Abbildung 4.89 (Referenzagonist Acetylcholin) und Abbildung 4.90 (Referenzagonist Iperoxo) dargestellt; die numerischen Schätzwerte sind tabellarisch in Tabelle 4.71 zusammengefasst. Der Transduktionskoeffizient des Referenzagonisten Acetylcholin G<sub>q</sub>:  $\log(1/K_A)_{\text{ACh,Ref:ACh}} = 6,36 \pm 0,05$  zeigte für den G<sub>q</sub>-Signalweg einen zweifach höheren Wert als für den G<sub>s</sub>-Signalweg G<sub>s</sub>: ( $\log(1/K_A)_{\text{ACh,Ref:ACh}} = 6,64 \pm 0,06$ , t-Test,  $p < 0,05$ ), wohingegen Iperoxo gegenüber dem G<sub>q</sub>-Signalweg einen um den Faktor 8 höheren Transduktionskoeffizienten zeigte (G<sub>q</sub>:  $\log(1/K_A)_{\text{Iper,Ref:ACh}} = 8,41 \pm 0,05$ / G<sub>s</sub>:  $\log(1/K_A)_{\text{Iper,Ref:ACh}} = 7,50 \pm 0,07$ ; t-Test,  $p < 0,05$ ). Die dualsterischen Hybride JK 550 und JK 537 zeigten im Vergleich zu ACh unabhängig vom betrachteten Signalweg keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich ihrer Transduktionskoeffizienten (vgl. Abb. 4.89 (A), Tab. 4.71).



**Abbildung 4.89: Ligandspezifische Bevorzugung des IP1-Signalweges von Iperoxo JK 537 an CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala-Zellen bezogen auf den Referenzagonisten Acetylcholin.** (A) Transduktionskoeffizienten  $\log(1/K_A)$  des orthosterischen Agonisten Iperoxo sowie der dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537. Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 37 durch nichtlineare Regressionsanalyse ermittelt (vgl. 3.5). (B) Normalisierte Transduktionskoeffizienten  $\log(1/K_A)$ . Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 38 ermittelt. (C) Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die G<sub>q</sub>- und G<sub>s</sub>-Signalwegaktivierung, dargestellt für ACh, Iperoxo sowie JK 550 und JK 537. Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung (39) ermittelt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 und 41 errechnet. Weder Iperoxo noch die Hybride zeigten eine ligandspezifische Bevorzugung eines der untersuchten Signalwege. \*, \*\*\*, Wert signifikant verschieden von dem Wert für die G<sub>q</sub>-Aktivierung (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). #, ###:  $\log(1/K_A)$ -Wert signifikant unterschiedlich vom  $\log(1/K_A)$ -Wert des Referenzagonisten (ACh) (t-Test, # $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$ ).

Die mit Hilfe des Referenzagonisten Iperoxo ermittelten Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  für Iperoxo sind für den  $G_q$ -Signalweg im Vergleich zum  $G_s$ -Signalweg um den Faktor 10 höher ( $G_q$ :  $\log(\tau/K_A)_{\text{Iper,Ref:Iper}} = 8,42 \pm 0,06$ ,  $G_s$ :  $\log(\tau/K_A)_{\text{Iper,Ref:Iper}} = 7,43 \pm 0,06$ , t-Test,  $p < 0,05$ ). Der endogene Ligand Acetylcholin zeigte nur einen um den Faktor zwei höheren Transduktionskoeffizienten im  $G_q$ -Signalweg ( $G_q$ :  $\log(\tau/K_A)_{\text{ACh,Ref:Iper}} = 6,35 \pm 0,05$ ) gegenüber dem  $G_s$ -Signalweg ( $G_s$ :  $\log(\tau/K_A)_{\text{ACh,Ref:Iper}} = 6,60 \pm 0,07$ ). Beide Hybride zeigten, wie bereits für den Referenzagonisten Acetylcholin ermittelt, keinen signifikanten Unterschied bezüglich ihrer Transduktionskoeffizienten für beide Signalwege (vgl. Abb. 4.89 (A), Tab. 4.71; t-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4.90: Ligandspezifische Bevorzugung des cAMP-Signalweges von JK 550, JK 537 und ACh an CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala-Zellen bezogen auf den Referenzagonisten Iperoxo** (A) Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  des orthosterischen Agonisten Iperoxo sowie der dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537. Die  $\log(\tau/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 37 durch nichtlineare Regressionsanalyse ermittelt (vgl. 3.5). (B) Normalisierte Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$ . Die  $\log(\tau/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 38 ermittelt. (C) Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$ - und  $G_s$ -Signalwegaktivierung, dargestellt für ACh, Iperoxo sowie JK 550 und JK 537. Die  $\log(\tau/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung (39) ermittelt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 und 41 errechnet. Weder Iperoxo noch die Hybride zeigten eine ligandspezifische Bevorzugung eines der untersuchten Signalwege. \*, \*\*\*: Wert signifikant verschieden von dem Wert für die  $G_q$ -Aktivierung (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). #, ###:  $\log(\tau/K_A)$ -Wert signifikant unterschiedlich vom  $\log(\tau/K_A)$ -Wert des Referenzagonisten (ACh) (t-Test, # $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$ ).

Bei dem Vergleich mit dem Referenzagonisten Acetylcholin zeigte sich, dass der Vollagonist Iperoxo an der Mutation M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala den  $G_q$ -Signalweg 112-fach stärker, den  $G_s$ -Signalweg allerdings nur noch 7-fach stärker aktivierte als Acetylcholin ( $G_q$ :  $\log(\tau/K_A)_{\text{Iper,Ref:ACh}} = 2,05 \pm 0,07$ ,  $G_s$ :  $\log(\tau/K_A)_{\text{Iper,Ref:ACh}} = 0,86 \pm 0,09$ ; t-Test,  $p < 0,05$ ). Dagegen aktiviert der endogene Agonist Acetylcholin den  $G_q$ -Signalweg 117-fach und den  $G_s$ -Signalweg 7-fach schwächer als der Referenzagonist Iperoxo ( $G_q$ :  $\log(\tau/K_A)_{\text{ACh,Ref:Iper}} = -2,07 \pm 0,08$ ,  $G_s$ :  $\log(\tau/K_A)_{\text{ACh,Ref:Iper}} = -0,83 \pm$

0,08; t-Test,  $p < 0,05$ ). Das dualsterische Hybrid JK 550 aktivierte den  $G_q$ -Signalweg 12-fach schwächer als der endogene Agonist Acetylcholin und erstaunlicherweise 1349-fach schwächer als sein orthosterischer Baustein Iperoxo ( $G_q$ :  $\log(1/K_A)_{JK550,Ref:ACH} = -1,07 \pm 0,29$ ,  $G_q$ :  $\log(1/K_A)_{JK550,Ref:Iper} = -3,13 \pm 0,29$ ; t-Test,  $p < 0,05$ ). Hinsichtlich des  $G_s$ -Signalweges zeigte JK 550 gegenüber Acetylcholin und Iperoxo keine signifikanten Unterschiede (t-Test,  $p > 0,05$ ). Die  $\log(1/K_A)$  Werte für Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) waren nicht verschieden von denjenigen für JK 550 ( $C_4$ ) (t-Test,  $p > 0,05$ ). Gegenüber dem Referenzagonisten Acetylcholin war die Aktivierung des  $G_q$ -Weges 7-fach schwächer, gegenüber seinem orthosterischen Baustein Iperoxo jedoch 1318-fach schwächer ( $G_q$ :  $\log(1/K_A)_{JK537,Ref:ACH} = -0,87 \pm 0,25$ ,  $G_q$ :  $\log(1/K_A)_{JK537,Ref:Iper} = -3,12 \pm 0,26$ ; t-Test,  $p < 0,05$ ). Bezüglich des  $G_s$ -Signalweges zeigte sich, wie schon bei JK 550 verzeichnet, gegenüber Acetylcholin und Iperoxo kein signifikanter Unterschied (t-Test,  $p > 0,05$ ) (vgl. Abb. 4.89 (B), Abb. 4.90 (B), Tab. 4.71).

Anders als im Fall der Mutation  $M_1^{400}Trp \rightarrow Ala$  zeigte das Hybrid JK 550 kein „Bias“ gegenüber dem  $G_q$ -Signalweg (vgl. Abb. 4.89 (C), wohingegen das Hybrid mit der längeren Zwischenkette eine signifikante Bevorzugung des  $G_q$ -Signalweges aufwies. Interessanterweise verursachte Iperoxo gegenüber dem endogenen Vollagonisten Acetylcholin ebenfalls eine 15-fach stärkere Bevorzugung des  $G_q$ -Signalweges. Somit war die Mutation  $M_1^{401}Glu \rightarrow Ala$  die einzige der untersuchten  $M_1$ -Rezeptormutationen, über die ein Vollagonist eine ligandabhängige bevorzugte Signalwegaktivierung verursachte (vgl. Abb. 4.89 (C), Tab. 4.71).

Abbildung 4.90 (C) zeigt die  $\log(1/K_A)$ -Werte bezogen auf den Referenzagonisten Iperoxo. Unter Verwendung dieses Referenzagonisten zeigte Acetylcholin eine 17-fach höhere Neigung den  $G_s$ -Signalweg zu aktivieren. Auch die beiden dualsterischen Hybride zeigten ein ähnliches Bild. Das kurze Hybrid JK 550 besaß eine 16-fach stärkere Neigung zum  $G_s$ - als zum  $G_q$ -Signalweg, das längere Hybrid JK 537 eine 7-fach stärkere (vgl. Abb. 4.90 (C), Tab. 4.71; t-Test,  $p < 0,05$ ).

<b>CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala</b> <b>Referenzagonist Acetylcholin</b>										
	<b>G<sub>q</sub>-</b>		<b>G<sub>s</sub>-</b>		<b>G<sub>q</sub>-</b>		<b>G<sub>s</sub>-</b>		<b>G<sub>q</sub>-G<sub>s</sub>-</b>	
	<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>	
<b>Substanz</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>
<b>ACh</b>	6,36 ± 0,05	3	6,64 ± 0,06*	3	0,00 ± 0,07	3	0,00 ± 0,08	3	0,00 ± 0,08	6
<b>Iperoxo</b>	8,41 ± 0,05***	4	7,50 ± 0,07***	3	2,05 ± 0,07	4	0,86 ± 0,09	3	1,19 ± 0,11###	7
<b>JK 550</b>	5,29 ± 0,29*	3	5,50 ± 0,26	3	-1,07 ± 0,29	3	-1,14 ± 0,27	3	0,07 ± 0,40	6
<b>JK 537</b>	5,49 ± 0,24*	3	4,68 ± 0,29	3	-0,87 ± 0,25	3	-1,96 ± 0,30	3	1,09 ± 0,39#	6
<b>CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala</b> <b>Referenzagonist Iperoxo</b>										
	<b>G<sub>q</sub>-</b>		<b>G<sub>s</sub>-</b>		<b>G<sub>q</sub>-</b>		<b>G<sub>s</sub>-</b>		<b>G<sub>q</sub>-G<sub>s</sub>-</b>	
	<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>		<b>Signalweg</b>	
<b>Substanz</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>
<b>Iperoxo</b>	8,42 ± 0,06	4	7,43 ± 0,06***	3	0,00 ± 0,07	4	0,00 ± 0,08	3	0,00 ± 0,11	7
<b>ACh</b>	6,35 ± 0,05***	3	6,60 ± 0,07*	3	-2,07 ± 0,08	3	-0,83 ± 0,08	3	-1,24 ± 0,11###	6
<b>JK 550</b>	5,29 ± 0,29***	3	5,50 ± 0,32	3	-3,13 ± 0,29	3	-1,93 ± 0,33	3	-1,20 ± 0,44#	6
<b>JK 537</b>	5,30 ± 0,26***	3	5,18 ± 0,28	3	-3,12 ± 0,26	3	-2,25 ± 0,29	3	-0,87 ± 0,39#	6

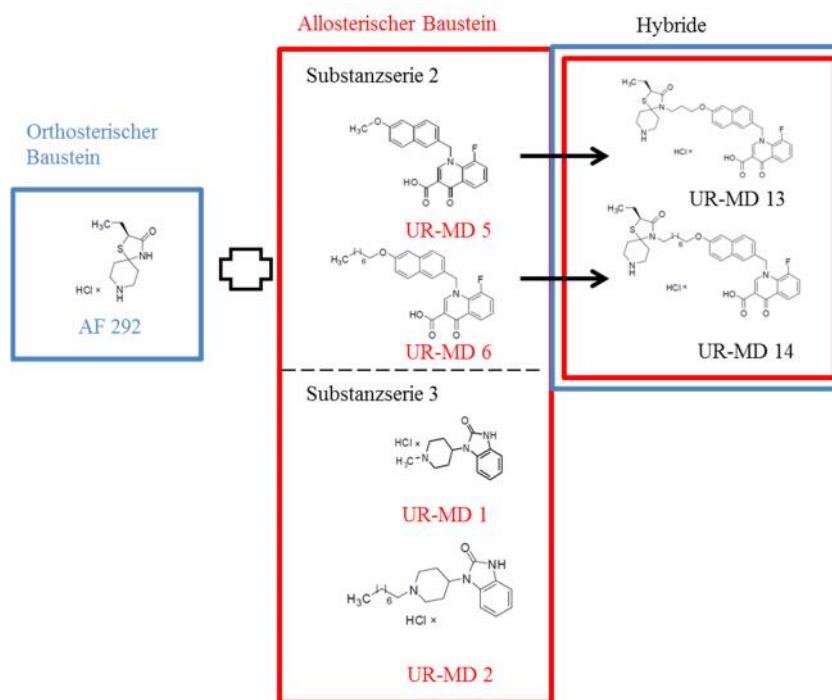
**Tabelle 4. 71:** Numerische Schätzwerte der in Abbildung 4.89 und 4.90 dargestellten Parameter  $\log(\tau/K_A)$ ,  $\log(\tau/K_A)$ , und  $\log(\tau/K_A)$  zur Berechnung einer ligandspezifisch bevorzugten Signalwegaktivierung an CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala-Zellen.  $\log(\tau/K_A)$ : Transduktionskoeffizient nach Kenakin et al. 2012; Die  $\log(\tau/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 37 durch nichtlineare Regressionsanalyse ermittelt (vgl. 3.5).  $\log(\tau/K_A)$ : normalisierter Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  der zu untersuchenden Substanzen nach Kenakin et al. 2012; Die  $\log(\tau/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 38 ermittelt.  $\log(\tau/K_A)$ : Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die G<sub>q</sub> und G<sub>s</sub>-Signalwegsaktivierung (Kenakin et al. 2012); Die  $\log(\tau/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung (39) ermittelt. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 und 41 errechnet. \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Referenzagonist-Kenngröße (t-Test, p<0,05), #, ###:  $\log(\tau/K_A)$ -Wert signifikant unterschiedlich vom  $\log(\tau/K_A)$ -Wert des jeweiligen Referenzagonisten (ACh/Iperoxo) (t-Test, #p<0,05, ###p<0,001).

### **4.3 Charakterisierung von dualsterischen AF292/BQCAD-Hybridliganden sowie allosterischen Fragmenten vom Typ BQCAD und TBPBd an muskarinischen $hM_1$ -Rezeptoren**

#### **4.3.1 Charakterisierung der Bindung und Signalwegaktivierung dualsterischer AF292/BQCAD-Hybridliganden an muskarinischen $hM_1$ -Rezeptoren**

Die Entwicklung subtypselektiver Liganden stellt auf Grund der hohen Sequenzhomologie im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle bis heute eine große Herausforderung dar (Eglen 2006). Ein bereits in dieser Arbeit vorgestellter Lösungsansatz ist die Entwicklung dualsterischer Hybridliganden, die durch eine simultane Besetzung der orthosterischen und allosterischen Bindungsstelle gekennzeichnet sind. Kombinationen verschiedenster orthosterischer und allosterischer Bausteine sowie die Verwendung unterschiedlicher Zwischenkettenlängen, sollten weitere Erkenntnisse über den Mechanismus der Generierung subtypselektiver Liganden bringen. Neben den bereits in den ersten beiden Ergebnisteilen charakterisierten dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybriden (Substanzserie 1, vgl. 2.11.5 und Abb. 4.1), werden in diesem Kapitel die dualsterischen Hybridliganden UR-MD-13 und UR-MD-14 (vgl. Abb. 4.91) vorgestellt und hinsichtlich ihres jeweiligen Bindungsmodus und ihrer Signalwegaktivierung näher untersucht. Der strukturelle Aufbau der Verbindungen ist in Abbildung 4.91 schematisch dargestellt.

Anders als die bereits in Kapitel 4.1 und 4.2 beschriebenen Hybride, besitzen UR-MD-13 und UR-MD-14 nicht den Vollagonisten Iperoxo als orthosterischen Baustein, sondern verfügen als orthosterisches Fragment über den putativ orthosterischen Agonisten AF292 (US-Patent: US7049321, vgl. Abbildung 4.91). Die korrespondierenden allosterischen Bausteine UR-MD-5 und UR-MD-6 (vgl. Abbildung 4.91) leiten sich ebenfalls von dem  $M_1$ -Rezeptor selektiven, positiv allosterischen Modulator BQCA (Shirey et al. 2009; Ma et al. 2009; Mistry et al. 2013; Yeatman et al. 2014) ab, unterscheiden sich aber dennoch von den bereits vorgestellten allosterischen Bausteinen aus Substanzserie 1 (vgl. 2.11.5 und Abb. 4.1). Die Verknüpfung der beiden Bausteine erfolgte entweder über eine  $C_3$  oder  $C_8$  Zwischenkette.



**Abbildung 4. 91:** Schematische Übersicht des strukturellen Aufbaus der in diesem Ergebnisteil untersuchten potenziell dualsterischen Hybridliganden der Substanzserie 2 sowie der allosterischen Fragmente der Substanzserien 2 und 3. Die beiden dualsterischen Hybride UR-MD-13 und -14 bestehen aus dem orthosterischen Baustein AF292 (blau) und den allosterischen Bausteinen UR-MD-5 und -6 der Substanzserie 2 (rot), die sich durch die Länge ihrer Zwischenkette unterscheiden. Bei UR-MD-1 und -2 handelt es sich um allosterische Fragmente der Substanzserie 3 (vgl. Kapitel 2.11.5).

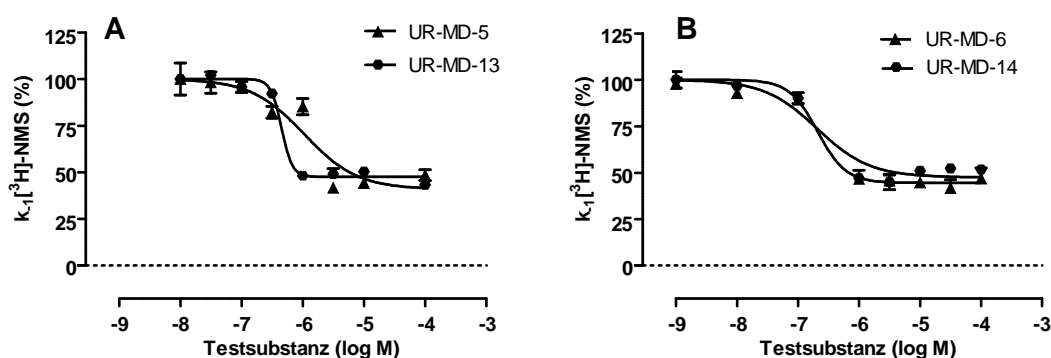
#### 4.3.1.1 Charakterisierung möglicher allosterischer Effekte dualsterischer AF292/BQCAD-Hybridliganden sowie ihrer Einzelkomponenten auf die [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation von hM<sub>1</sub>-Rezeptoren intakter CHO-Zellen

Zu Beginn der Charakterisierung einer zweiten Substanzserie dualsterischer Hybridliganden, wurden zur Überprüfung auf eine potenziell allosterische Ligand-Interaktion mit dem orthosterisch besetzten Rezeptorprotein „Drei-Punkt“-kinetische-Experimente durchgeführt (vgl. Kapitel 3.2.5.2). Die spezifische Radioligandbindung zu den beiden Zeitpunkten  $t_{\text{off1}}$  (14min) und  $t_{\text{off2}}$  (17 min) (vgl. Tab. 3.6; Kapitel 3.2.5.2) wurde sowohl in Anwesenheit einer allosterischen Testsubstanz, als auch unter Kontrollbedingungen ermittelt. Zur Verhinderung der Reassoziaton des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS mit dem vorliegenden Rezeptorprotein wurde, wie bereits zuvor beschrieben, Atropin im Überschuss (10  $\mu$ M) zugesetzt, das als strukturverschiedener, nicht radioaktiv markierter, kompetitiver Antagonist, an der NMS Bindungsstelle fungierte. Die ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten  $k_{-1}$  der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation wurden in Prozent der Geschwindigkeitskonstante der Kontrollkurve in Abwesenheit eines allosterischen Liganden gegen die Konzentration des dualsterischen Liganden, oder des jeweiligen allosterischen Fragmentes aufgetragen. Durch die Verwendung einer „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12), wurde der  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$  als Maßzahl der Affinität der Testsubstanzen zum [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptor bestimmt. In allen nachfolgend dargestellten Experimenten wurden lebende, intakte Zellen in einer Zellzahl von 75.000 Zellen in HBSS-Puffer + 20mM Hepes (L14) pro Plattenvertiefung verwendet. Die Temperatur betrug stets 28°C.



#### 4.3.1.1.1 Einfluss dualsterischer AF292/BQCA-Hybridliganden sowie ihrer allosterischen Fragmente auf die [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation von hM<sub>1</sub>-Rezeptoren intakter CHO-Zellen

Die durch UR-MD-13 und UR-MD-14 sowie ihren allosterischen Fragmente UR-MD-5 und UR-MD-6 induzierte konzentrationsabhängige Dissoziationsverzögerung sind in Abbildung 4.92 (A) und (B) dargestellt, die zugehörigen Kenndaten sind Tabelle 4.72 zu entnehmen. Das obere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurven konnte auf 100% festgelegt werden, da es sich bei keiner der vier Kurven signifikant von diesem Wert unterschied (F-Test,  $p > 0,05$ ). Das untere Plateau unterschied sich dagegen signifikant von Null Prozent, weshalb dieses während der computergestützten Regressionsanalyse (Gleichung 12) als Variable behandelt wurde (F-Test,  $p < 0,05$ ). Das Ergebnis zeigte, dass sich weder die unteren Plateaus der dualsterischen Hybride untereinander, noch diejenigen ihrer allosterischen Fragmente davon signifikant unterschieden, *one-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test*  $p > 0,05$ , vgl. Tabelle 4.72). Auch die Maßzahl für die mutmaßliche Bindungsneigung der dualsterischen Liganden  $\log EC_{0,5, \text{Diss UR-MD13}} = -6,35 \pm 0,12$  und  $\log EC_{0,5, \text{Diss UR-MD-14}} = -6,69 \pm 0,13$  zum [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptor unterschieden sich nicht signifikant voneinander (t-Test,  $p > 0,05$ ). Im Unterschied hierzu, zeigten die allosterischen Fragmente jedoch, im Vergleich ihrer Bindungsneigung zum [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptor, einen signifikanten Unterschied. Das längere der beiden Fragmente UR-MD-6 wies mit  $\log EC_{0,5, \text{Diss}} = -6,62 \pm 0,13$  eine vierfach höhere Bindungsneigung zum Orthoster-hM<sub>1</sub>-Rezeptor-Komplex auf, als UR-MD-5 mit  $\log EC_{0,5, \text{Diss}} = -5,98 \pm 0,15$  (vgl. Tab. 4.72)(t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Steilheit der Kurven konnte, mit Ausnahme des dualsterischen Liganden UR-MD-13, mit  $n_H = -1$  beschrieben werden (F-Test,  $p > 0,05$ ). Für UR-MD-13 betrug die Kurvensteilheit  $n_H = -4,91 \pm 3,61$  und deutete auf ein komplexeres Bindungsgeschehen dieser Substanz hin.



**Abbildung 4.92: Interaktion von UR-MD-13 und UR-MD-14 (dualsterische Hybridliganden) und UR-MD-5 und UR-MD-6 (allosterische Fragmente) an [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten hM<sub>1</sub>-wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.** Ordinate: Geschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  der [<sup>3</sup>H]NMS Dissoziation in % des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug 2,0 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28°C. Kurvenanpassung: Die nichtlineare Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimente, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz		C-Kette	Unteres Plateau (%)	log EC <sub>0,5, Diss</sub>	k <sub>-1</sub> (min <sup>-1</sup> )	n <sub>H</sub>	n
UR-MD-5	AF	1	41 ± 5	-5,98 ± 0,15	0,08 ± 0,01	= -1,00	3
UR-MD-13	DH	1	48 ± 1	-6,35 ± 0,12	0,08 ± 0,00	-4,91 ± 3,61 <sup>§</sup>	3
UR-MD-6	AF	8	46 ± 2	-6,62 ± 0,13*	0,08 ± 0,00	= -1,00	3
UR-MD-14	DH	8	48 ± 2	-6,69 ± 0,13	0,07 ± 0,00	= -1,00	3

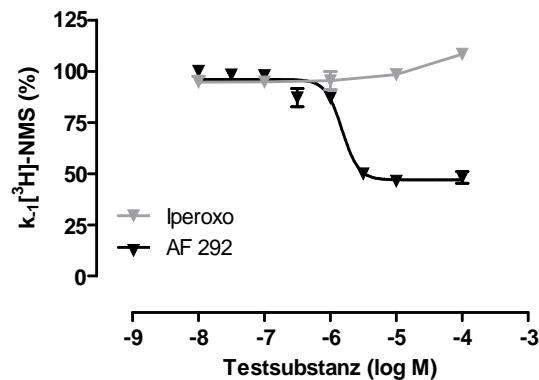
**Tabelle 4. 72: Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.92 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven.** AF: allosterisches Fragment plus Zwischenkette (C<sub>1</sub> oder C<sub>8</sub>). DH: Dualsterisches Hybrid. logEC<sub>0,5, Diss</sub>: Dekadischer Logarithmus derjenigen Konzentration der Testsubstanz, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation führt. k<sub>-1</sub>: Geschwindigkeitskonstante der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation in min<sup>-1</sup>. n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl durchgeführter Versuche. Kurvenanpassung: Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kürzeren allosterischen Fragmentes UR-MD-5 (t-Test, \*p<0,05). §: Kurvensteilheit signifikant verschieden von n<sub>H</sub> = -1 (F-Test, p< 0,05).

Zusammenfassend zeigten sowohl die Hybride, als auch die allosterischen Fragmente eine Dissoziationshemmung, die auf eine allosterische Interaktion schließen ließ. Weder die allosterischen Fragmente UR-MD-5 und UR-MD-6, noch die korrespondierenden dualsterischen Hybride UR-MD-13 und UR-MD-14 waren jedoch in der Lage die [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation komplett zu inhibieren. Ein Vergleich der maximalen Dissoziationshemmungen (untere Plateaus) und der allosterischen Affinität (logEC<sub>0,5, Diss</sub>) der dualsterischen Hybriden mit ihren korrespondierenden allosterischen Fragmenten, zeigte keinen signifikanten Unterschied auf. Dies deutet auf einen gleichen (allosterischen) Bindungsmodus von Hybriden und Fragmenten.

#### 4.3.1.1.2 Einfluss des orthosterischen Bausteins AF 292 auf die [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation

Um sicherzustellen das es sich bei dem orthosterischen Baustein AF292 um eine Substanz handelt, die mit der orthosterischen Bindungsstelle des hM<sub>1</sub>-Rezeptors interagiert, wurde auch die Fähigkeit dieser Substanz untersucht, die Dissoziation des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS zu verzögern. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.93 dargestellt. Die ermittelte Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante unter Kontrollbedingungen betrug k<sub>-1</sub> = 0,09 ± 0,001, und wurde auf 100% konstant gesetzt. Um einen Vergleich mit dem orthosterischen Baustein der im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit untersuchten dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden ziehen zu können, wurden die bereits unter 4.1.2.2 (vgl. Abb. 4.7) gezeigten Daten des bekannten orthosterischen Agonisten Iperoxo mit in die Abbildung 4.93 aufgenommen (grau). Es wird deutlich, dass die als orthosterischer Baustein postulierte Substanz AF292 im Gegensatz zu Iperoxo sehr wohl in der Lage war, die [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation deutlich zu verzögern. Zwar kam es lediglich zu einer unvollständigen Inhibition der Dissoziation von [<sup>3</sup>H]NMS die durch ein unteres Kurvenplateau von 47 ± 2% gekennzeichnet war (vgl. Abb. 4.93 und Tab. 4.73), dennoch spricht dieser Befund dafür, dass es sich bei AF292 um eine Substanz handelt, die nicht nur mit der orthosterischen sondern auch mit Epitopen eines allosterischen Haftareals von hM<sub>1</sub>-Rezeptoren interagiert. Eine sichere Aussage über die Bindungstopographie von AF292 konnte jedoch auf Grund dieser Befunde nicht getroffen werden, da bekannt ist, dass andere orthosterische

Liganden, wie der inverse Agonist Atropin (Trankle et al. 1996) sowie der inverse Agonist NMS und der Vollagonist Oxotremorin M (Redka et al. 2008) in sehr hohen Konzentrationen ebenfalls einen verzögernden Effekt auf die Dissoziation des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS aufweisen können. Durch den dissoziationsverzögernden Effekt von AF292 war es im Gegensatz zu Iperoxo möglich, einen Wert für dessen Bindungsneigung zum [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptor zu ermitteln. Mit  $\log EC_{0,5, \text{Diss}} = -5,82 \pm 0,07$  wies AF292, verglichen mit UR-MD-13, eine dreifach niedrigere und mit UR-MD-14 eine 7-fach niedrigere Bindungsneigung zum Rezeptor-Orthoster-Komplex auf (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Kurve von AF292 für die Inhibition von  $k_{-1}$  besaß, wie diejenige für UR-MD-13, eine sehr steile Kurvensteilheit, die mit einem „Hillslope“ von  $n_H = -3,47 \pm 1,07$  signifikant unterschiedlich von  $n_H = -1$  war (F-Test,  $p < 0,05$ ). Dieses komplexe Bindungsverhalten von AF292 an NMS-besetzten  $hM_1$ -Rezeptoren lässt die Frage aufwerfen, ob die steilen Kurven einen weiteren Hinweis auf ein komplexeres Bindungsverhalten von AF292 unterstreichen.



**Abbildung 4.93: Einfluss der beiden orthosterischen Bausteine AF292 (Substanzserie 2) und Iperoxo (Substanzserie 1) auf die [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation von  $hM_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.** Ordinate: Geschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation in % des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der orthosterischen Bausteine AF 292 und Iperoxo. Die in der Abbildung dargestellten Daten von Iperoxo stammen aus Abbildung 4.7 in Kapitel 4.1.2.1 und werden hier zu Vergleichszwecken in grauer Farbe mitgeführt. Die Radioligandkonzentration betrug 2,0 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28°C. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

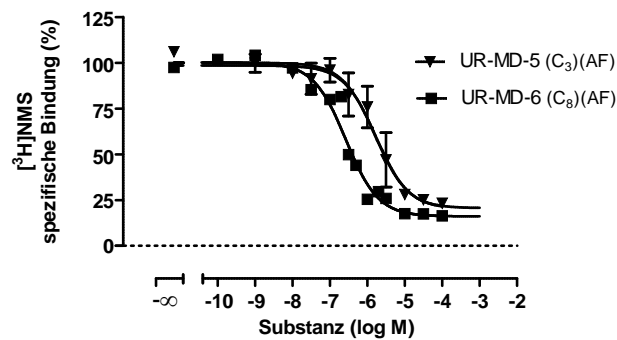
Substanz	Unteres Plateau (%)	$\log EC_{0,5, \text{Diss}}$	$k_{-1} (\text{min}^{-1})$	$n_H$	n
Iperoxo	OF -	-	-	-	3
AF292	OF 47 $\pm$ 2	-5,82 $\pm$ 0,07 <sup>***</sup>	0,09 $\pm$ 0,001	-3,47 $\pm$ 1,07	3

**Tabelle 4.73: Parameterschätzwerte des in Abbildung 4.93 dargestellten Effektes der orthosterischen Bausteine AF 292 (Substanzserie 2) und Iperoxo (Substanzserie 1) auf die Geschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  der [<sup>3</sup>H]NMS Dissoziation von  $hM_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.** OF: Orthosterisches Fragment.  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ : Dekadischer Logarithmus der Konzentration, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation durch die der Testsubstanz führt.  $k_{-1}$ : Geschwindigkeitskonstante der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation in  $\text{min}^{-1}$ .  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl durchgeführter Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*: Wert signifikant verschieden von der korrespondierenden Kenngröße des dualsterischen Hybrides UR-MD-13 (vgl. Tab. 4.73) (t-Test, \* $p < 0,05$ ). \*\*: Wert signifikant verschieden von der korrespondierenden Kenngröße des dualsterischen Hybrides UR-MD-14 (vgl. Tab. 4.73) (t-Test, \*\* $p < 0,01$ ).

#### 4.3.1.2 Bindungseigenschaften der dualsterischen AF292/TBPBd-Hybridliganden (Substanzserie 2) an orthosterisch unbesetzten CHO- $hM_1$ -wt-Rezeptoren

Nachfolgend wurden die allosterischen Fragmente UR-MD-5 und UR-MD-6, als auch die dualsterischen Hybridliganden UR-MD-13 und UR-MD-14 in [ $^3$ H]NMS-Bindungsexperimenten an CHO- $hM_1$ -wt-Zellen untersucht. Wie in den bereits beschriebenen kinetischen Experimenten, wurden auch in allen nachfolgenden heterologen Konkurrenzexperimenten lebende, intakte Zellen verwendet.

Abbildung 4.94 zeigt die [ $^3$ H]NMS-Gleichgewichtsbindungskurven für die allosterischen Fragmente UR-MD-5 und UR-MD-6. Ihre Kurvensteilheit war nicht signifikant von  $n_H = -1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ), weshalb zur Ermittlung ihrer Bindungskonstante zum freien Rezeptorprotein  $K_B$  sowie ihrer Kooperativität gegenüber dem Radioliganden [ $^3$ H]NMS, das ternäre Modell allosterischer Interaktionen Anwendung fand (vgl. 3.2.4.2, Gleichung 15). Die aus den Kurven abgeleiteten Parameterwerte können Tabelle 4.74 entnommen werden.



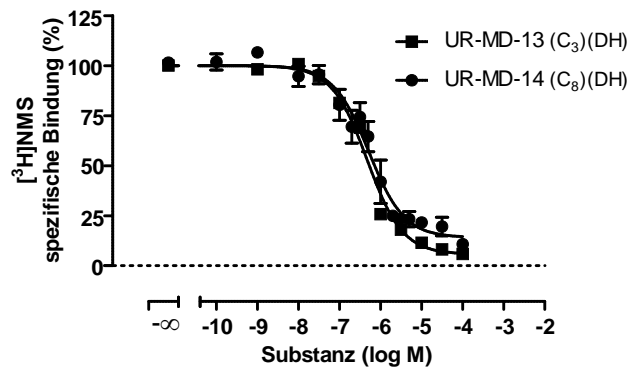
**Abbildung 4. 94: Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der allosterischen Fragmente UR-MD-5 und UR-MD-6 mit dem orthosterischen Radioantagonisten [ $^3$ H]NMS an  $hM_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.** AF: allosterisches Fragment plus Zwischenkette. Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [ $^3$ H]NMS in Prozent des Wertes in Abwesenheit von Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen [ $^3$ H]NMS Bindung in Anwesenheit von Atropin 10  $\mu$ M, 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug 0,2 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28  $^{\circ}$ C. Kurvenanpassung: Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient  $n_H$  in Tabelle 4.74 wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert; auf Grund eines nicht von  $n_H = -1$  verschiedenen Steilheitsmaßes, erfolgte die weitere Analyse der allosterischen Fragmente mit Hilfe von Gleichung 15. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis acht unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Beide Fragmente verhielten sich gegenüber [ $^3$ H]NMS am  $hM_1$ -wt-Rezeptor negativ kooperativ und unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $\log \hat{\nu}_{UR-MD-5} = -0,86 \pm 0,14 / \log \hat{\nu}_{UR-MD-6} = -1,00 \pm 0,08$ ) (t-Test,  $p > 0,05$ ). Die Bindungskonstanten der Fragmente zum freien Rezeptor unterschieden sich dagegen signifikant voneinander. Das längere Fragment UR-MD-6 zeigte mit einem  $\log K_B$  von  $-6,78 \pm 0,08$  eine 10-fach höhere Bindungsneigung zum freien Rezeptorprotein als sein Partner UR-MD-5, für das  $\log K_B = -5,76 \pm 0,17$  ermittelt wurde (t-Test,  $p < 0,05$ ).

Substanz	Logistische Gleichung (Gl.12)		Ehler Modell (Gl.15)		
	Unteres Plateau (%)	$n_H$	$\log K_B$	$\log \alpha$	n
UR-MD-5 (AF)	17 ± 5	= -1,00	-5,76 ± 0,17	-0,86 ± 0,14	3
UR-MD-6 (AF)	16 ± 3	= -1,00	-6,78 ± 0,08	-1,00 ± 0,08	8

**Tabelle 4. 74: Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.94 dargestellten Bindungskurven.**  $n_H$ : Maßzahl für die Kurvensteilheit.  $\log K_B$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Bindung des allosterischen Fragmentes.  $\log \alpha$ : Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\alpha$ . n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten die in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Kurvenanpassung: Das untere Plateau sowie die Kurvensteilheit wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Auf Grund eines nicht signifikant von -1 verschiedenen Steilheitsmaßes (F-Test,  $p > 0,05$ ), erfolgte die weitere Analyse der allosterischen Fragmente mit Hilfe von Gleichung (15). AF: allosterisches Fragment plus Zwischenkette.

Abbildung 4.95 zeigt die Ergebnisse der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungsexperimente der Hybride UR-MD-13 und UR-MD-14. Die Analyse der Bindungsdaten erfolgte zur Ermittlung der Kurvensteilheit und des unteren Plateaus mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12), die Bindungskonstante  $K_A$  für die Bindungsneigung des dualsterischen Hybrides in der dualsterischen Bindungspose sowie der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  erfolgte mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten modifizierten Gleichung nach Antony (Gleichung 17, in der  $R_i$  durch Gleichung 21 ersetzt wurde, vgl. Kapitel 3.2.4.2). Interessanterweise ergab nur die Analyse des kürzeren dualsterischen Hybrides UR-MD-13 ein Ergebnis, das eine weitere Interpretation erlaubte. Die Nichtlineare Kurvenanalyse für das dualsterische Hybrid UR-MD-14 konvergierte dagegen nicht, sodass kein Regressionsergebnis erhalten werden konnte (vgl. Tabelle 4.75).

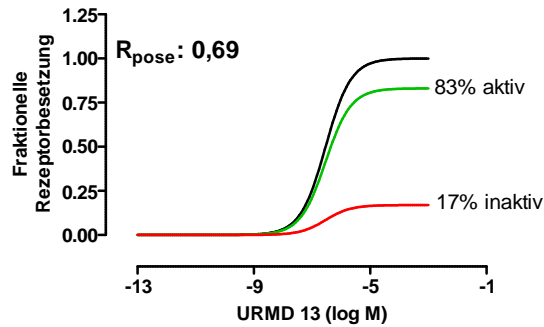


**Abbildung 4. 95: Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der dualsterischen Hybride UR-MD-13 und UR-MD-14 mit dem orthosterischen Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS an  $hM_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.** DH: Dualsterisches Hybrid. Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS in Prozent des Wertes in Abwesenheit von Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Anwesenheit von 10  $\mu$ M Atropin, 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug 0,2 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28 °C. Kurvenanpassung: Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient  $n_H$  in Tabelle 4.75 wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Die weitere Analyse erfolgte mit Hilfe von Gleichung 17 in der  $R_i$  durch Gleichung 21 ersetzt wurde, vgl. Kapitel 3.2.4.2. Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis sieben unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	Modifizierte Gleichung nach Antony (Gl. 16)				Ehlerl Modell (Gl.15)		
	Unteres Plateau (%)	$n_H$	$\log K_A$	$\log K_B$	$\log \hat{\nu}$	$R_{\text{pose}}$	n
UR-MD-13 (DH/C <sub>4</sub> )	= 0	= -1,00	-6,45 ± 0,08	= -5,76	-0,68 ± 0,12	0,69	3
UR-MD-14 (DH/C <sub>6</sub> )	14 ± 4	= -1,00	-	= -6,78	-	-	7

**Tabelle 4. 75: Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.95 dargestellten Bindungskurven.** DH: Dualsterisches Hybrid.  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit.  $\log K_A$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des dualsterischen Hybrides in dualsterischer Orientierung.  $\log K_B$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des allosterischen Fragmentes.  $\log \hat{\nu}$ : Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\hat{\nu}$ .  $R_{\text{pose}}$ : Negativer Logarithmus des Orientierungsverhältnisses der Bindungskonstanten der Pharmakophore für die aktive  $K_A$  und die inaktive  $K_B$  Bindungs-Pose. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Kurvenanpassung: Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Die weitere Analyse der erfolgte mit Hilfe von Gleichung 17 in der  $R_i$  durch Gleichung 21 ersetzt wurde, vgl. Kapitel 3.2.4.2. Grau hinterlegt sind in der Analyse der Hybriddaten als Konstanten behandelte  $K_B$ -Werte der allosterischen Fragmente aus separaten Gleichgewichtsbindungsexperimenten (vgl. Tab. 4.74).

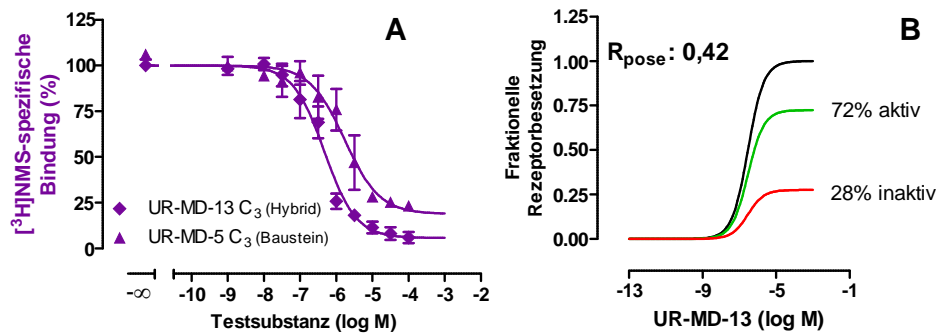
UR-MD-13 besaß mit  $\log \hat{\nu} = -0,68 \pm 0,12$  eine deutliche negative Kooperativität mit [<sup>3</sup>H]NMS, die sich in einer abwärts gerichteten Inhibitionskurve widerspiegelte. Im Vergleich zu seinem allosterischen Fragment UR-MD-5, zeigte sich hinsichtlich der Kooperativität kein signifikanter Unterschied (t-Test,  $p > 0,05$ , vgl. Tab. 4.75). Der  $R_{\text{pose}}$ -Wert von 0,69 bringt zum Ausdruck, dass die Bindungsneigung von UR-MD-13 in der dualsterischen Bindungspose fünffach höher ist, als die Bindungsneigung in der rein allosterischen Rezeptorbindungspose. Der positive  $R_{\text{pose}}$ -Wert lieferte ergänzend dazu Hinweise darauf, dass UR-MD-13 vorwiegend in der dualsterischen Bindungspose mit dem Rezeptorprotein interagiert und die Fraktion der Ligandmoleküle in der aktive Rezeptorpopulation vermutlich über einem Wert von 50% liegen muss (vgl. 4.1.3.2). Für eine genauere Aussage wurde die fraktionelle Rezeptorbesetzung, durch beide Posen mit Hilfe der Bindungskonstanten  $K_A$  für die dualsterische und  $K_B$  für die allosterische Bindungspose, ermittelt (vgl. 3.2.4.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.96 dargestellt. Die Hypothese einer hohen maximalen, fraktionellen Rezeptorbesetzung durch UR-MD-13 in der aktiven Pose, wurde durch eine Fraktion aktiver Rezeptoren von 83% bestätigt.



**Abbildung 4.96: Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des dynamischen Hybridliganden UR-MD-13 in der aktiven und der inaktiven Bindungspose am muskarinischen  $hM_1$ -wt-Rezeptor.** Grün: aktive dualsterische Rezeptorbesetzung; rot: inaktive allosterische Rezeptorbesetzung; Schwarz: orientierungsunabhängige Gesamtrezeptorbesetzung.  $R_{\text{pose}}$ : Negativer Logarithmus des Orientierungsverhältnisses der Bindungskonstanten des Hybrides für die aktive ( $K_A$ ) oder die inaktive ( $K_B$ ) Bindungspose. Die Kurven wurden unter Anwendung von Gleichung 26 und 27 in Kenntnis von  $K_A$  und  $K_B$  errechnet (vgl. Kapitel 3.2.4.2).

Da es im Sinne einer Einzelkurvenanalyse nicht möglich war, mit Hilfe des Fünf-Zustandsmodells (Gleichung nach Antony et al. 2009, in der Gleichung 17 durch Gleichung 21 ersetzt wurde) die [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindungsdaten des längeren dualsterischen Hybrides UR-MD-14 konvergent zu analysieren, wurde für beide Hybride auch die Vorgehensweise der globalen Analyse der Bindungsdaten für Hybrid und Baustein angewendet (vgl. 3.2.4.2).

Wie bereits zuvor für das Hybrid beobachtet, war es auch mit Hilfe der globalen Analyse nicht möglich, die Bindungsdaten des allosterischen Fragmentes UR-MD-6 und des dualsterischen Hybrides UR-MD-14 modellkonvergent zu analysieren. Die Kurven, der im Gegensatz dazu erfolgreichen globalen Analyse für das Fragment UR-MD-5 und das Hybrid UR-MD-13, sind in Abbildung 4.97 (A) dargestellt. Die dazu gehörenden Parameterwerte finden sich in Tabelle 4.76. Diese Analyse erlaubte es, alle für die allosterische  $hM_1$ -Rezeptorinteraktion der Bindung von UR-MD-13 relevanten Parameter des Modells, ohne separate Bestimmung und Konstant setzen einzelner Parameter, zu ermitteln. UR-MD-13 und UR-MD-5 zeigten in der allosterischen Bindungspose eine negative Kooperativität mit dem Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]NMS, die sich nicht signifikant voneinander unterschied (t-Test,  $p > 0,05$ ). Die Bindungsneigung von UR-MD-13 in der dualsterischen Bindungspose war mit einem Wert  $\log K_A = -6,39 \pm 0,12$  dreifach höher, als die Bindungsneigung in der rein allosterischen Bindungspose. Der  $R_{\text{pose}}$ -Wert von 0.42 war kleiner als bei den Einzelkurven-Analysen. Für einen quantitativen Vergleich der aktiven und der inaktiven Rezeptorfractionen, wurden anhand der ermittelten Bindungskonstanten  $K_A$  und  $K_B$ , die mit Hilfe von Gleichung 26 und 27 die jeweilige fraktionelle Rezeptorbesetzung, errechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.97 (B) dargestellt. Im Gegensatz zu der zuvor verwendeten Einzelkurvenanalyse, ergab die globale Analyse basierend auf den Bindungsdaten des allosterischen Fragmentes und des Hybrides, eine um 11% geringere Fraktion dualsterisch (mutmaßlich aktiven) gebundenen Hybrides UR-MD-13 von 72%.



**Abbildung 4.97: Ergebnisse der globalen Analyse der  $[^3\text{H}]$ NMS Gleichgewichtsbindungsdaten des Hybrides UR-MD-13 und des Fragmentes UR-MD-5 basierend auf dem Bindungsmodell für dualsterische Hybridliganden und dem ternären Modell allosterischer Interaktionen an  $h\text{M}_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen.** (A): Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus den Kurven für das dualsterische Hybrid und das allosterische Fragment, vgl. auch Kapitel 3.2.4.2. Ordinate: spezifische  $[^3\text{H}]$ NMS-Bindung in Gegenwart von UR-MD-13 und UR-MD-5 in Prozent des Kontrollwertes in Abwesenheit von Tests substanz an intakten CHO- $h\text{M}_1$ -wt-Zellen. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. (B): Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des dynamischen Hybridliganden UR-MD-13 in der aktiven und der inaktiven Bindungspose an  $h\text{M}_1$ -Rezeptoren. Grün: dualsterische rezeptoraktivierende Besetzung. Rot: allosterische rezeptorinaktive Besetzung. Schwarz: orientierungsunabhängige Gesamtbesetzung. Die Kurven wurden unter Anwendung von Gleichung 26 und 27 in Kenntnis von  $K_A$  und  $K_B$  errechnet (vgl. Kapitel 3.2.4.2).  $R_{\text{pose}}$ : Negativer Logarithmus des Orientierungsverhältnisses der Bindungskonstanten des Hybrides für die aktive ( $K_A$ ) oder die inaktive ( $K_B$ ) Bindungspose (vgl. Kapitel 3.2.4.2).

Substanz	$\log K_A$	$\log K_B$	$\log \rho$ (Hybrid)	$\log \rho$ (Fragment)	$R_{\text{pose}}$
UR-MD-13 (DH/C <sub>4</sub> )	$-6,39 \pm 0,12^*$	$-5,97 \pm 0,13$	$-0,89 \pm 0,32$	$-0,91 \pm 0,17$	$0,42 \pm 0,21$
UR-MD-14 (DH/C <sub>6</sub> )	-	-	-	-	-

**Tabelle 4.76: Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.97 dargestellten Bindungskurven der globalen Analyse.** DH: Dualsterisches Hybrid.  $\log K_A$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstanten der Bindung des dualsterischen Hybrides in dualsterischer Orientierung.  $\log K_B$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des allosterischen Fragmentes und damit der Gleichgewichtsbindungskonstante der dualsterischen Hybride in ihrer allosterischen Bindungspose.  $\log \rho$  (Hybrid): Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\rho$  des dualsterischen Hybrides in der allosterischen Bindungspose.  $\log \rho$  (Fragment): Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\rho$  des allosterischen Fragmentes allosterischen Bindungspose.  $R_{\text{pose}}$ : Negativer Logarithmus des Orientierungsverhältnisses der Bindungskonstanten des Hybrides für die aktive ( $K_A$ ) oder die inaktive ( $K_B$ ) Bindungspose. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus drei bis acht unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Kurvenanalyse: globale Analyse des allosterischen Fragmentes (Gleichung 16) und des dualsterischen Hybrides (Gleichung 17 in der Rt durch Gleichung 21 ersetzt wurde, vgl. 3.2.4.2). \*: Wert signifikant verschieden von der Kenngröße  $\log K_B$  des dualsterischen Hybrides UR-MD-13 (t-Test,  $*p < 0,05$ ).

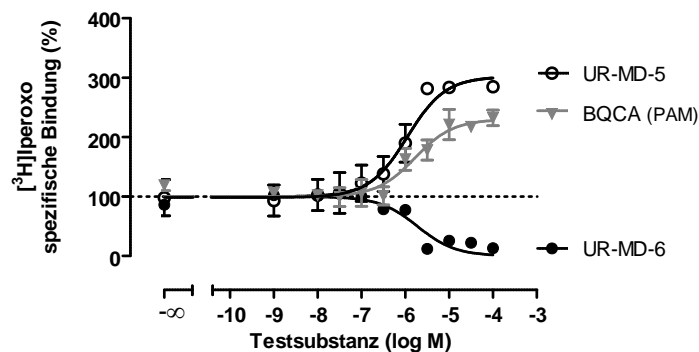
#### 4.3.1.3 Charakterisierung der allosterischen Fragmente UR-MD-5 und UR-MD-6 mit Hilfe des Radioagonisten $[^3\text{H}]$ Iperoxo an $h\text{M}_1$ -wt-Rezeptoren in Membransuspensionen aus CHO-Zellen

Wie bereits erläutert, stellen die beiden allosterischen Fragmente UR-MD-5 und UR-MD-6 Derivate des hoch  $\text{M}_1$ -selektiven, positiv allosterischen Modulator BQCA dar (Shirey et al. 2009; Ma et al. 2009; Mistry et al. 2013; Yeatman et al. 2014). Im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass BQCA sich in Bindungsexperimenten positiv kooperativ gegenüber dem Radioliganden



[<sup>3</sup>H]Iperoxo verhielt. Die allosterischen Fragmente der Substanzserie 1, die ebenfalls Derivate des positiv allosterischen Modulators BQCA sind, zeigten im Gegensatz dazu negative Kooperativität mit dem Radioagonisten (vgl. 4.1.8.2.3). Nun sollte geprüft werden, wie sich die beiden allosterischen Fragmente UR-MD-5 und UR-MD-6 hinsichtlich ihrer Kooperativität mit [<sup>3</sup>H]Iperoxo verhalten. Dazu wurden heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente durchgeführt (Durchführung vgl. 3.2.4.2). In Anbetracht einer potenziellen Rezeptorinternalisierung die eintreten kann, wenn eine Dauerinkubation mit einem Agonisten (in diesem Falle des Radioagonisten [<sup>3</sup>H]Iperoxo) vorliegt (Maloteaux und Hermans 1994), wurden Membranhomogenate und keine lebenden Zellen verwendet.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.98 dargestellt. Für einen besseren Vergleich mit der Muttersubstanz BQCA, wurde die bereits in Kapitel 4.1.8.2.1 gezeigte Bindungskurve von BQCA ebenfalls mit in die Abbildung aufgenommen (vgl. Abb. 4.98, graue Kurve).



**Abbildung 4. 98: Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der allosterischen Fragmente UR-MD-5 und UR-MD-6 mit dem orthosterischen Radioagonisten [<sup>3</sup>H]Iperoxo an Membranhomogenaten aus CHO-*hM<sub>1</sub>*-wt-Zellen.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]Iperoxo in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen [<sup>3</sup>H]Iperoxo Bindung in Anwesenheit von 10  $\mu$ M Carbachol, 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die in der Abbildung dargestellten Daten für BQCA stammen aus Abbildung 4.36. in Kapitel 4.1.8.2.2 und werden hier zu Vergleichszwecken in grauer Farbe mitgeführt. Die Radioligandkonzentration betrug 0,2 nM, die Proteinmenge 40  $\mu$ g pro Vertiefung in HEPES (12,5 nM)-Puffer (L12), pH 7,4, 30 °C. Kurvenanpassung: Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient  $n_H$  in Tabelle 4.77 wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Auf Grund eines Steilheitsmaßes von  $n_H = -1$ , erfolgte die weitere Analyse der allosterischen Fragmente mit Hilfe von Gleichung (15). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis sechs unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Wie BQCA, zeigte das kurze Fragment UR-MD-5 im Vergleich zu seinem längeren Pendant UR-MD-6 mit dem Radioagonisten [<sup>3</sup>H]Iperoxo eine stark positive Kooperativität ( $\log_{UR-MD-5} = 0,64 \pm 0,13$ ), was sich in einer deutlichen Bindungsförderung des Radioagonisten widerspiegelte (vgl. Abb. 4.98). UR-MD-6 zeigte interessanterweise anhand eines  $\log = -0,97 \pm 0,18$  negative Kooperativität gegenüber [<sup>3</sup>H]Iperoxo. Eindrucksvoll ist der Wechsel von positiver Kooperativität, im Fall von UR-MD-5 ( $C_1$  Zwischenkette) zu negativer, im Fall von UR-MD-6 ( $C_8$  Zwischenkette) durch die Verlängerung der Kohlenstoffkette um fünf C-Atome (vgl. Abb. 4.98); ihre Bindungsneigung zum Rezeptorprotein unterschied sich nicht signifikant voneinander (t-Test,  $p > 0,05$ ). Auf Grund der positiven Kooperativität lag das obere Plateau der Bindungskurve von UR-MD-5 bei  $302 \pm 45\%$ , wohingegen das untere Plateau der Inhibitionskurve, das durch UR-MD-6 auf Grund der negativen Kooperativität induziert wurde,

nicht verschieden von 0% war (F-Test,  $p > 0,05$ ). Alle drei Bindungskurven konnten mit einer Steilheit von  $n_H = -1$  beschrieben werden (F-Test,  $p > 0,05$ ). Ein Vergleich mit BQCA ergab für UR-MD-5 keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Bindungsneigung und der Kooperativität mit [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo (t-Test,  $p > 0,05$ ). Somit konnte UR-MD-5 im Rahmen dieser Arbeit als einzige Substanz identifiziert werden, die neben BQCA eine positive Kooperativität und eine damit verbundene Bindungsförderung des orthosterischen Agonisten Iperoxo zeigte.

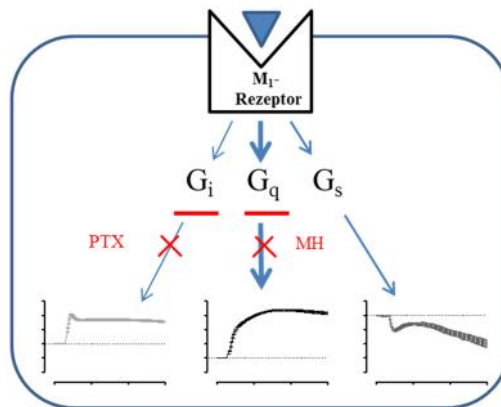
Substanz	Logistische Gleichung (Gl.12)			Ehler Modell (Gl.15)		
	Unteres Plateau (%)	Oberes Plateau (%)	$n_H$	$\log K_B$	$\log \tau$	n
BQCA	= 100	$230 \pm 12^{***}$	= -1,00	$-5,68 \pm 0,17$	$0,46 \pm 0,03$	3
UR-MD-5	= 100	$302 \pm 45^{***}$	= -1,00	$-5,81 \pm 0,32$	$0,64 \pm 0,13$	6
UR-MD-6	= 0	= 100	= -1,00	$-5,93 \pm 0,12$	$-0,97 \pm 0,18$	4

**Tabelle 4. 77: Kenngrößen der in Abbildung 4.98 dargestellten Bindungskurven.**  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit.  $\log K_B$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des allosterischen Fragmentes/Modulators.  $\log \tau$ : Dekadischer Logarithmus der Kooperativitätsfaktors  $\tau$  innerhalb ternärer Komplexe aus [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo/Modulator/ $M_1$ -Rezeptor. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Die in der Abbildung dargestellten Daten für BQCA stammen aus Tabelle 4.34 in Kapitel 4.1.8.2.2, die korrespondierenden Parameterwerte werden hier zu Vergleichszwecken in grauer Farbe mit aufgelistet. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Auf Grund eines Steilheitsmaßes von  $n_H = -1$ , erfolgte die weitere Analyse der allosterischen Fragmente mit Hilfe von Gleichung (15). \*: Wert signifikant verschieden von 100% (t-Test, \*\*\*  $p < 0,001$ ).

#### 4.3.1.4 Charakterisierung der dualsterischen AF292/TBPBd-Hybridliganden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Signalwegaktivierung

Um einen ersten Eindruck darüber zu gewinnen, wie sich die beiden dualsterischen Hybride UR-MD-13 und UR-MD-14 hinsichtlich der durch sie induzierten Signalwegaktivierung verhalten, wurde die Methode der Messung der dynamischen Massenumverteilung gewählt. Diese Technologie erlaubt es, ein durch die Testsubstanzen induziertes Signal, ohne Verwendung von Sonden (d.h. „label-free“), in Echtzeit und an lebenden Zellen zu detektieren. Das Prinzip der Messung sowie das genaue experimentelle Vorgehen, ist im Methoden Teil dieser Arbeit beschrieben (vgl. Kapitel 3.3.4). Wie in bisher allen funktionellen Experimenten der vorliegenden Arbeit, diente auch in diesen DMR-Experimenten der endogene Neurotransmitter ACh als Referenzagonist.

Durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Toxine konnten im Rahmen dieser Experimente die UR-MD-13 und UR-MD-14 induzierten G Protein-vermittelten Signaltransduktionswege ( $G_i$  sowie  $G_q$ ) des  $hM_1$ -Rezeptors näher untersucht werden. Während Pertussistoxin (PTX (T1)) in der Lage ist, durch eine irreversible ADP-Ribosylierung der  $\beta$ -Untereinheit inhibitorischer G Proteine den  $G_i$ -Signalweg zu inhibieren (Bokoch und Gilman 1984; Moss et al. 1985; Mangmool und Kurose 2011) zeichnet sich das Toxin MH-362-63-08 (FR900359)(T2) durch die Inhibition des  $G_q$ -Signalweges aus (Nesterov et al. 2010; Schrage et al. 2015) (vgl. Abbildung 4.99).

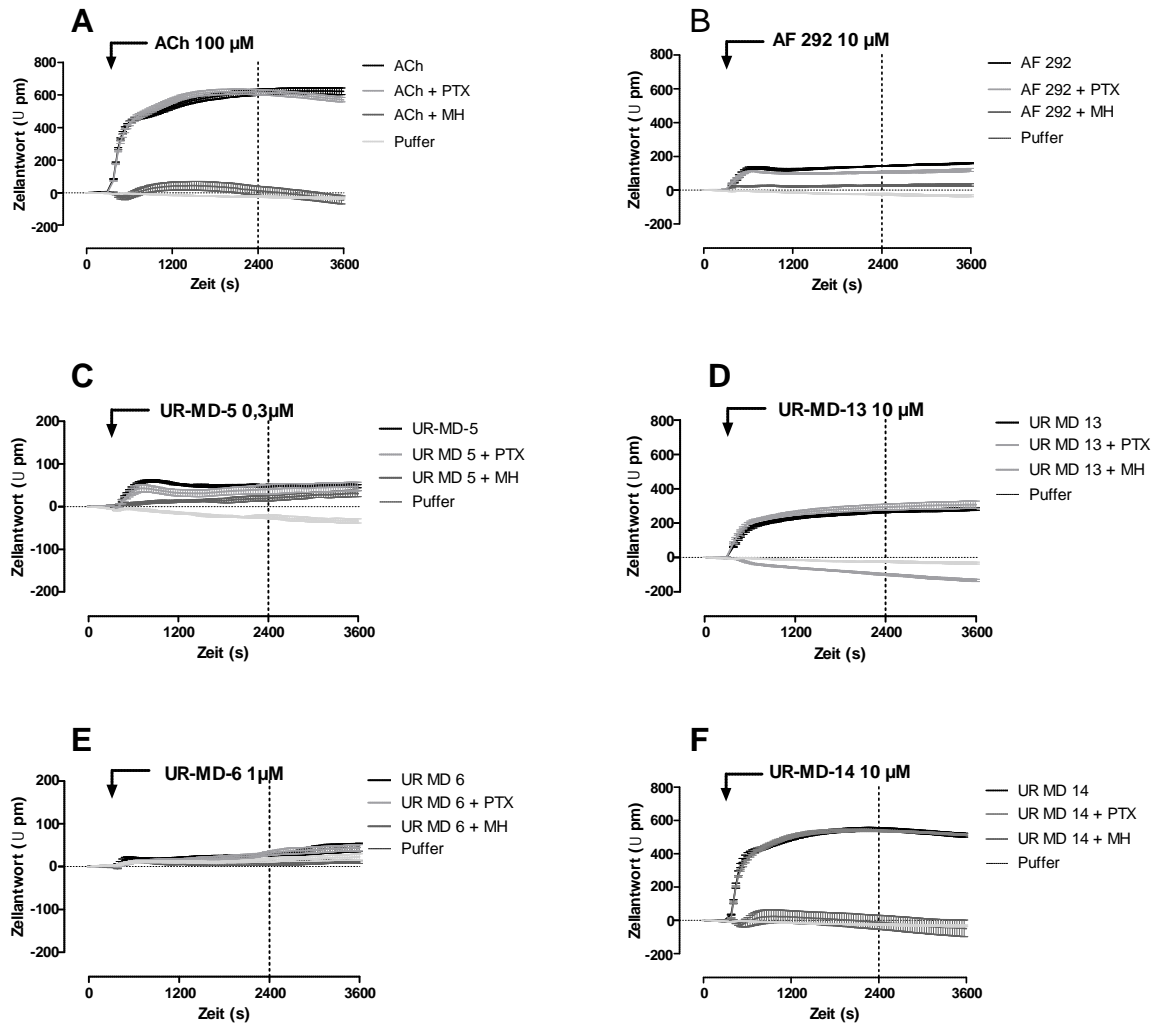


**Abbildung 4. 99: Schematische Darstellung der Rezeptor/G Protein-Kopplung und der daraus resultierenden DMR-Signale sowie der verwendeten Signalweghemmstoffe im Epic<sup>®</sup>-Biosensor System.** Der Einsatz unterschiedlicher Hemmstoffe der drei G Protein-Kopplungswege erlaubte die Ausschaltung einzelner Signalwege. Zur Hemmung des G<sub>i</sub>-Signalweges diente eine Vorbehandlung mit Pertussis Toxin (PTX)(T1)(100 nG/ml, 12h Vorinkubation, vgl. Kap. 3.3.4.2), die zu einer irreversiblen ADP-Ribosylierung der  $\beta$ -Untereinheit inhibitorischer G Proteine und damit zu deren Funktionsverlust führt (Bokoch und Gilman 1984; Mass et al. 1985; Mangmool und Kurose 2011). Zur Überprüfung der Frage, ob die in DMR-Experimenten untersuchten Substanzen in der Lage sind, den G<sub>q</sub>-Signalweg anzustoßen wurden die Zellen mit dem G<sub>q</sub>-Inhibitor MH-362-63-08 (FR900359) (T2) (Nesterov et al. 2010; Schrage et al. 2015) vorbehandelt, 1  $\mu$ M pro Reaktionsansatz, vgl. Kapitel 3.3.4.2).

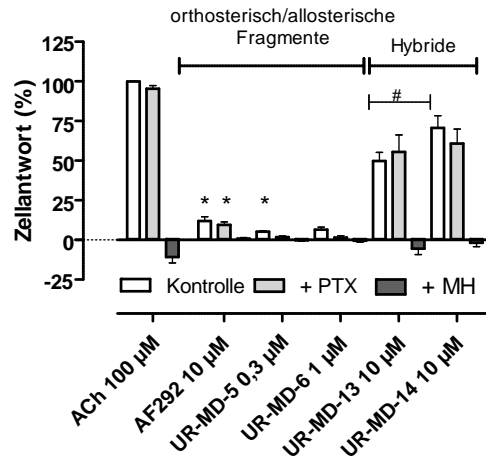
#### 4.3.1.4.1 Charakterisierung der dualsterischen Hybridliganden sowie ihrer Einzelkomponenten an CHO-hM<sub>1</sub>-wt Zellen in DMR Experimenten nach G<sub>q</sub>- und G<sub>i</sub>-Inhibition

Da der endogene Neurotransmitter ACh im Rahmen dieser Experimente der dynamischen Massenumverteilung als Referenzagonist verwendet wurde, sind in Abbildung 4.100 (A) die Ergebnisse der durch ACh (100  $\mu$ M) induzierten Massenumverteilung unter Kontrollbedingungen sowie unter Verwendung des G<sub>i</sub>-Inhibitors PTX (T1) und unter Verwendung des G<sub>q</sub> Protein Inhibitor MH (T2), dargestellt. In gleicher Weise sind in Abbildung 4.100 der orthosterische Baustein AF292 (B), die allosterischen Fragmente UR-MD-5 (C) und UR-MD-6 (D) sowie die beiden dualsterischen Hybride UR-MD-13 (E) und UR-MD-14 (F), veranschaulicht. Die Vorbehandlung von PTX (T1) führte bei keiner der untersuchten Substanzen zu einer Veränderung des Verlaufes der Signalspur. Die Ligand-induzierte Massenumverteilung nach vorheriger Inkubation mit dem G<sub>q</sub> Protein Inhibitor MH (T2) führte bei AF292, sowie den allosterischen Fragmenten UR-MD-5 und -6 zu einer Signatur, die sich nicht von der Nulllinie unterschied. Im Falle von ACh und den dualsterischen Hybriden UR-MD-13 und UR-MD-14 kam es sogar zu einer Verschiebung der Signalspur in den negativen Bereich, die Ausdruck einer Verringerung der optischen Dichte im Messbereich ist.

Zur quantitativen Auswertung mehrerer, unabhängig voneinander durchgeführten Einzelerperimente wurden die nach 2400 Sekunden (s) erhaltenen Daten in Abbildung 4.101 mittels eines Balkendiagramms vergleichend gegenübergestellt. Die dazu gehörenden Kenngrößen sind in der nachfolgenden Tabelle gegenübergestellt (vgl. Tab. 4.78).



**Abbildung 4. 100: Messung der Ligand-induzierten dynamischen Massenumverteilung an  $hM_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen, vor und nach  $G_q$ - oder  $G_i$ -Signalweginhibition.** Dargestellt sind Originalsignaturen jeweils eines repräsentativen Einzelexperimentes, das als Vierfachbestimmung (dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM) durchgeführt wurde. (A): Durch ACh induzierte dynamische Massenumverteilung unter Kontrollbedingungen sowie unter Vorbehandlung mit PTX (T1) ( $G_i$ -Signalweginhibition) und MH (T2) ( $G_q$ -Signalweginhibition). (B): Durch AF292 (orthosterischer Baustein) induzierte dynamische Massenumverteilung unter Kontrollbedingungen sowie unter Vorbehandlung mit PTX (T1) und MH (T2). (C,D): Durch UR-MD-5 und -6 (allosterische Bausteine) induzierte dynamische Massenumverteilung unter Kontrollbedingungen sowie unter Vorbehandlung mit PTX (T1) und MH (T2). (E,F): Durch UR-MD-13 und -14 (dualsterische Hybride) induzierte dynamische Massenumverteilung unter Kontrollbedingungen sowie unter Vorbehandlung mit PTX (T1) und MH (T2). Ordinate: Zellantwort, Wellenlängenverschiebung gegenüber der Ausgangswellenlänge in Picometern [ pm]. Abszisse: Messdauer in Sekunden (s). Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Substanzzugabe. Alle Messpunkte einer Konzentration sind durch eine Linie miteinander verbunden und nicht Basislinien-korrigiert.



**Abbildung 4. 101: Graphische Darstellung der Ligand-induzierten dynamischen Massenumverteilung an  $hM_1$ -wt-Rezeptoren in intakten CHO-Zellen, vor und nach  $G_q$ - oder  $G_i$ -Signalweginhibition.** Ordinate: Um den jeweiligen Puffereffekt korrigierte Zellantwort in %. 0% = Puffereffekt, 100% Effekt in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  Acetylcholin unter Kontrollbedingungen. Abszisse: Testsubstanzen: ACh 100 $\mu\text{M}$ , AF 292 10  $\mu\text{M}$  (orthosterischer Baustein der dualsterischen Hybride), UR-MD-5 0,3  $\mu\text{M}$  und UR-MD-6 1  $\mu\text{M}$  (allosterische Fragmente plus Zwischenkette), UR-MD-13 10  $\mu\text{M}$  und UR-MD-14 10  $\mu\text{M}$  (dualsterische Hybride), jeweils unter Kontrollbedingungen, nach PTX (T1)-Vorbehandlung ( $G_i$ -Signalweginhibition) und nach MH (T2)-Vorbehandlung ( $G_q$ -Signalweginhibition). Balken: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus zwei bis acht voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. \*: Wert signifikant verschieden von 0% (Einstichproben t-Test, \* $p < 0,05$ ). #: Wert signifikant verschieden von UR-MD-13 (t-Test, # $p < 0,05$ ).

	ACh 100 $\mu\text{M}$	n	AF292 10 $\mu\text{M}$	n	UR-MD-5 0,3 $\mu\text{M}$	n	UR-MD-6 1 $\mu\text{M}$	n	UR-MD-13 10 $\mu\text{M}$	n	UR-MD-14 10 $\mu\text{M}$	n
<b>Kontrolle</b>	100 $\pm$ 0	5	12 $\pm$ 3*	5	5 $\pm$ 1*	3	7 $\pm$ 2	3	50 $\pm$ 5	8	71 $\pm$ 8#	6
<b>+ PTX</b>	95 $\pm$ 4	5	10 $\pm$ 2*	4	2 $\pm$ 1	3	2 $\pm$ 1	2	55 $\pm$ 11	6	61 $\pm$ 9	4
<b>+ MH</b>	-11 $\pm$ 4	4	1 $\pm$ 1	3	0 $\pm$ 0	3	0 $\pm$ 1	3	-6 $\pm$ 4	6	-2 $\pm$ 2	3

**Tabelle 4. 78: Messdaten der in Abbildung 4.101 dargestellten Ligand-induzierten dynamischen Massenumverteilung an CHO- $M_1$ -wt-Zellen, vor und nach  $G_q$ - oder  $G_i$ -Signalweginhibition.** Aufgeführt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Effekte des in Abbildung 4.101 gezeigten Balkendiagrammes. \*: Wert signifikant verschieden von 0% (Einstichproben t-Test, \* $p < 0,05$ ). #: Wert signifikant verschieden von UR-MD-13 (t-Test, # $p < 0,05$ ).

Aus den in Tabelle 4.78 zusammengefassten Maximaleffekten geht hervor, dass das DMR-Signal in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  ACh unter PTX (T1)-Vorbehandlung sich nicht signifikant verändert, wohingegen die Verwendung des Inhibitors MH (T2) in der Lage war, das ACh-vermittelte DMR-Signal komplett aufzuheben. Der orthosterische Baustein AF292 (10  $\mu\text{M}$ ) wies unter Kontrollbedingungen an seiner Löslichkeitsgrenze einen Maximaleffekt von  $12 \pm 3\%$  auf. Dies ist vereinbar mit einem sehr schwach partialagonistischen Verhalten. Unter der Verwendung von PTX (T1) gab es keine signifikante Veränderung, wohingegen es nach Inkubation mit MH (T2) zu keiner von der Nulllinie signifikant verschiedenen Zellantwort kam (Einstichproben t-Test,  $p > 0,05$ ). Die allosterischen Fragmente UR-MD-5 und UR-MD-6 zeigten einen in der höchst einsetzbaren Konzentration induzierten Maximaleffekt von  $E_{\text{max, UR-MD-5}} = 5 \pm 1\%$  und  $E_{\text{max, UR-MD-6}} = 7 \pm 2\%$ . Im Fall von UR-MD-5 unterschied sich dieser Wert signifikant von 0% (Einstichproben t-Test,  $p < 0,05$ ). Nach der Inkubation mit PTX (T1)

oder MH (T2) konnte für beide Fragmente keine signifikant von der Nulllinie verschiedene Zellantwort detektiert werden (Einstichproben t-Test,  $p > 0,05$ ). UR-MD-13, das kürzere dualsterische Hybrid erzeugte in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ , nahe seiner Löslichkeitsgrenze, einen Maximaleffekt von  $50 \pm 5\%$  und deutete damit ein partialagonistisches Verhalten an. Der  $E_{\text{max}}$ -Wert von  $55 \pm 11\%$ , gemessen nach der Vorinkubation mit PTX (T1), zeigte keine signifikante Änderung, wohingegen die Verwendung des  $G_q$ -Protein Inhibitors MH (T2) zu einer vollständigen Aufhebung des DMR-Signals führte. Das gleiche Bild zeigte sich für das längere dualsterische Hybrid UR-MD-14. Unter Kontrollbedingungen wies UR-MD-14 (10 $\mu\text{M}$ ) einen Effekt von  $71 \pm 8\%$  auf und, zeigte damit einen 21% höheren Effekt als das kürzere Hybrid UR-MD-13 (t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Vorbehandlung mit PTX (T1) führte zu keiner signifikanten Veränderung des beobachteten Effektes, wohingegen, wie im Fall aller anderen zuvor beschriebenen Substanzen der  $G_q$ -Signalwegsinhibitor MH (T2) in der Lage war, das UR-MD-14-induzierte Signal vollständig aufzuheben.

Somit kann für die dualsterischen Hybridliganden UR-MD-13 und 14 die Schlussfolgerung gezogen werden, dass sie auf Grund der nicht vorhandenen Empfindlichkeit ihres DMR-Signals gegenüber PTX (T1) und ihrer sehr ausgeprägten Empfindlichkeit gegenüber MH (T2) eine intrazelluläre Signalwegaktivierung zeigen, die überwiegend  $G_q$ -vermittelt ist. Gleiches gilt für ihren orthosterischen Baustein AF292. Ob es sich bei dem für das allosterische Fragment UR-MD-5 detektierte Signal tatsächlich um einen durch das Fragment induzierten Effekt handelt, sollte in weiteren Versuchen genauer untersucht werden (vgl. 4.3.1.6).

#### ***4.3.1.5 Einfluss von Rezeptormutationen im putativen allosterischen Bindungsareal auf die Bindungseigenschaften und die Signalwegaktivierung des allosterischen Bausteins UR-MD-5***

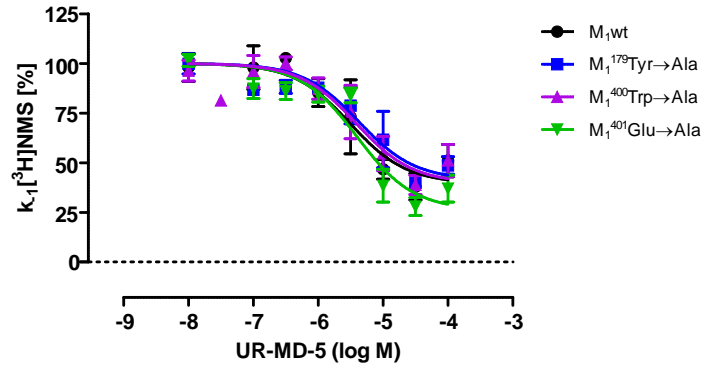
Auf Grund der deutlich positiven Kooperativität zwischen dem allosterischen Fragment UR-MD-5 und dem Radioagonisten [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo (vgl. 4.3.1.3), erschien es interessant, mehr über die Bindungstopographie dieser Substanz zu erfahren. Dazu wurde der Einfluss unterschiedlicher Mutationen, im Bereich des putativ allosterischen Bindungsareals des humanen  $hM_1$ -Rezeptors (vgl. Abb. 5.20; Kapitel 5.4) in Bezug auf die Bindung dieses Modulators untersucht. Bei den Mutationen handelte es sich um die bereits im zweiten Ergebnisteil dieser Arbeit vorgestellten Mutationen des  $hM_1$ -Rezeptors (CHO-Flp- $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$ , CHO-Flp- $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  und CHO-Flp- $M_1^{401}\text{Glu Ala}$ ). Am muskarinischen  $M_1$ -Rezeptor zeigten diese jeweils zu Alanin mutierten Aminosäuren, einen nachweislichen Beitrag zur Bindung und Vermittlung von Kooperativität des  $M_1$ -hochselektiven, positiv-allosterischen Modulators BQCA der Agonist-Bindung (Ma et al. 2009; Abdul-Ridha et al. 2014a; Abdul-Ridha et al. 2014b) welches - entfernt - als Muttersubstanz des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten allosterischen Fragmentes UR-MD-5 aufgefasst werden kann (vgl. 2.4.11). Die mit unterschiedlichen Punktmutationen im putativen allosterischen Bereich versehenen  $hM_1$ -Rezeptoren, lagen wie bereits beschrieben (vgl. 2.6.2), in einem anderen Expressionsvektor vor, als die bereits in diesem Kapitel verwendeten CHO- $hM_1$ -wt-Rezeptoren. Um die Effekte der unterschiedlichen

Mutationen besser vergleichen zu können, wurde deshalb – als weitere Kontrolle – der  $hM_1$ -wt-Rezeptor in diesem Expressionssystem (Flp-In-System) untersucht. Dieser  $M_1$ -wt-Rezeptor wird im Folgenden als CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Rezeptor bezeichnet werden. Vor diesem Hintergrund erschien es interessant zu untersuchen, ob sich Übereinstimmungen hinsichtlich der Bindungs epitope von UR-MD-5 und später UR-MD-2 (vgl. 4.3.2 und folgende Kapitel) finden ließen.

#### *4.3.1.5.1 Einfluss von Rezeptormutationen im putativ allosterischen Bindungsareal auf die dissoziationsverzögernden Eigenschaften des allosterischen Fragmentes UR-MD-5*

Das allosterische Fragment UR-MD-5 zeigte in „Drei-Punkt“-kinetischen Experimenten bereits eine dissoziationsverzögernde Wirkung (vgl. Abb. 4.92 Kapitel 4.3.1.1.1). Eine vollständige Inhibition der [ $^3$ H]NMS-Dissoziation konnte allerdings nicht verzeichnet werden. Diese Ergebnisse lassen erste Vermutungen zu, dass dieses allosterische Fragment mit Bereichen des allosterischen Haftareals interagiert. Mit Hilfe der drei  $M_1$ -Rezeptoren mit Punktmutationen im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstelle, sollte diese Hypothese bestätigt und geklärt werden, ob Aminosäuren in diesem Bereich des  $M_1$ -Rezeptorsubtyp an der Bindung des allosterischen Fragmentes beteiligt sind.

Die Konzentrations-Effekt-Kurven des allosterischen Fragmentes UR-MD-5 sind in Abbildung 4.102 dargestellt. Die pharmakologischen Kenngrößen sind in Tabelle 4.79 aufgeführt. Das obere Plateau der vier Kurven konnte auf 100% festgelegt werden, da es jeweils nicht signifikant verschieden von diesem Wert war (F-Test,  $p > 0,05$ ). UR-MD-5 zeigte interessanterweise im Vergleich zum Wildtyp-Rezeptor bei keiner der untersuchten Mutationen einen Verlust der Bindungsneigung zu [ $^3$ H]NMS-besetzten Rezeptoren, ausgedrückt als  $EC_{0,5, \text{Diss}}$  (t-Test,  $p > 0,05$ , vgl. Tab. 4.79). Das untere Plateau, und damit die Fähigkeit von UR-MD-5 die Dissoziation des Radioantagonisten zu verzögern, zeigte ebenfalls bei keiner der untersuchten Mutationen einen signifikanten Unterschied zum  $hM_1$ -wt-Rezeptor (vgl. Tab. 4.79, t-Test,  $p > 0,05$ ). Die Steilheit konnte für alle vier Kurven mit  $n_H = -1$  beschrieben werden (F-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4. 102: Interaktion von UR-MD-5 (allosterisches Fragment) mit den aufgeführten orthosterisch durch  $[^3\text{H}]$ NMS-besetzten  $h\text{M}_1$ -wt-Rezeptoren mit Punktmutationen im Bereich des putativ allosterischen Bindungsareals.** Ordinate: Geschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  der  $[^3\text{H}]$ NMS Dissoziation in % des Werte in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug 2,0 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28 °C. Kurvenanpassung: Die nichtlineare Datenanalyse erfolgt mit Hilfe einer „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmungen durchgeführt wurden.

Substanz	Rezeptor	Unteres Plateau (%)	$n_H$	$\log EC_{0,5, \text{Diss}}$	$\log EC_{0,5, \text{Diss}}$	$k_{-1} (\text{min}^{-1})$	n
UR-MD-5	$\text{M}_1$ .wt	$40 \pm 7$	$= -1,00$	$-5,51 \pm 0,23$	-	$0,08 \pm 0,01$	3
	$\text{M}_1^{179}\text{Tyr}$ Ala	$41 \pm 6$	$= -1,00$	$-5,37 \pm 0,19$	-0,14	$0,09 \pm 0,01$	4
	$\text{M}_1^{400}\text{Trp}$ Ala	$40 \pm 7$	$= -1,00$	$-5,42 \pm 0,20$	-0,09	$0,05 \pm 0,00$	4
	$\text{M}_1^{401}\text{Glu}$ Ala	$26 \pm 6$	$= -1,00$	$-5,40 \pm 0,15$	-0,11	$0,04 \pm 0,00$	4

**Tabelle 4. 79: Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.102 dargestellten Bindungskurven.**  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit.  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ : Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der  $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation führt.  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ : Differenz zwischen dem  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ -Wert für die jeweilige  $\text{M}_1$ -Rezeptormutante und dem  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ -Wert des  $h\text{M}_1$ -Wildtyprezeptors.  $k_{-1}$ : Geschwindigkeitskonstante der  $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation in  $\text{min}^{-1}$ . Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten die in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12).

#### 4.3.1.5.2 Einfluss von Rezeptormutationen im putativ allosterischen Bindungsareal auf die Bindung von UR-MD-5 an orthosterisch unbesetzten muskarinischen $h\text{M}_1$ -Rezeptoren

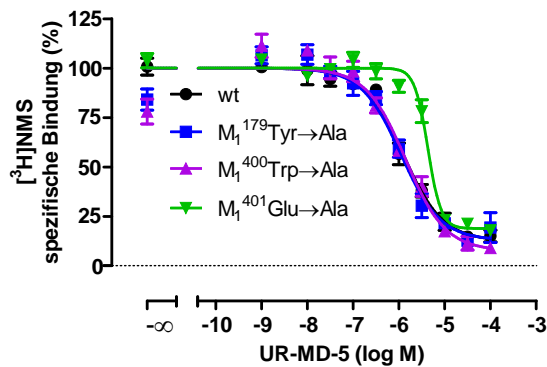
Nachdem das allosterische Fragment UR-MD-5 bei keiner der untersuchten Mutationen eine Veränderung seiner Bindungsneigung zum  $[^3\text{H}]$ NMS-besetzten Rezeptor und dem Ausmaß seiner maximal induzierten Dissoziationsverzögerung zeigte, sollte nachfolgend untersucht werden, ob der Austausch der drei Aminosäuren  $\text{M}_1^{179}\text{Tyr}$ ,  $\text{M}_1^{400}\text{Trp}$  und  $\text{M}_1^{401}\text{Glu}$  zu Alanin, hinsichtlich der Affinität von UR-MD-5 zum freien Rezeptorprotein, einen Effekt aufweisen würde. Es sollte erstmalig untersucht werden, ob der allosterische Baustein UR-MD-5, so wie es bereits für BQCA (Abdul-Ridha et al. 2014b) gezeigt werden konnte, mit den Aminosäuren der „common“-allosterischen Bindungsstelle Muskarinrezeptoren (Ellis 1991, Ellis und Seidenberg 1992) interagiert. Da im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, das UR-MD-5 gegenüber  $[^3\text{H}]$ NMS eine negative Kooperativität



aufweist (vgl. 4.3.1.2), stellte sich zudem die Frage, ob sich Richtung und/oder das Ausmaß der Kooperativität  $\rho$  durch Mutation der drei untersuchten Epitopen beeinflussen lassen. Zu diesem Zweck wurden heterologe Konkurrenzexperimente (vgl. 3.2.4.2) mit [ $^3\text{H}$ ]NMS an den drei punktmutierten  $M_1$ -Rezeptoren sowie am  $hM_1$ -wt-Rezeptor durchgeführt (Abbildung 4.103).

Die dargestellten Inhibitionskurven, wurden zur Ermittlung des unteren Plateaus sowie der Kurvensteilheit mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Die Konzentrations-Effekt-Kurven für den  $hM_1$ -wt und die  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  und  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  Rezeptormutanten zeigten eine Kurvensteilheit nicht signifikant unterschiedlich von  $n_H = -1$  (F-Test,  $p > 0,05$ ). Zur Ermittlung der Bindungskonstanten von UR-MD-5 und seiner Kooperativitätsfaktoren  $\rho$  mit NMS wurde das Model nach Ehlert (1988) verwendet. Die Inhibitionskurve für die Rezeptormutation  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$  zeigte eine signifikant von  $n_H = -1$  ( $n_H = -3,02 \pm 0,64$ ) verschiedene Kurvensteilheit (F-Test,  $p < 0,05$ ). Deshalb wurde die Bindungskonstante von UR-MD-5 zum freien Rezeptorprotein sowie der Kooperativitätsfaktors  $\rho$  mit dem Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]NMS eine modifizierte Gleichung nach Tränkle et al. (2003) eingesetzt, die ein variables Steilheitsmaß enthielt (vgl. 3.2.4.2, Gleichung 16).

Die zu Abbildung 4.103 gehörenden Kenndaten sind in Tabelle 4.80 aufgeführt.



**Abbildung 4. 103: Bedeutung unterschiedlicher Rezeptorpunktmutationen in allosterischen Epitopen des  $hM_1$ -Rezeptors auf die Bindung des allosterischen Fragments UR-MD-5.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]NMS in Prozent des Wertes in Abwesenheit von Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung in Anwesenheit von Atropin  $10 \mu\text{M}$ . 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug  $0,2 \text{ nM}$ , die Zellzahl  $75.000$  Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES ( $20 \text{ mM}$ ) Puffer (L14), pH  $7,4$ ,  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Kurvenanpassung: Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient  $n_H$  in Tabelle 4.80 wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. War das Steilheitsmaß nicht signifikant verschieden von  $n_H = -1$  wurde zur weiteren Analyse Gleichung 15 verwendet, wies das Kurvensteilheit ein von  $n_H = -1$  signifikant verschiedenes Steilheitsmaß auf wurde Gleichung 16 eingesetzt (vgl. Kapitel 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Wie schon für den CHO- $hM_1$ -wt-Rezeptor gezeigt (vgl. 4.3.1.2), konnte auch am CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Rezeptor eine negative Kooperativität zwischen dem Fragment UR-MD-5 und dem Radioliganden

[<sup>3</sup>H]NMS detektiert werden. Allerdings war die negative Kooperativität zwischen UR-MD-5 und [<sup>3</sup>H]NMS am CHO-Flp-*hM*<sub>1</sub>-wt-Rezeptor vierfach größer als am CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Rezeptor. Die Bindungsneigung von UR-MD-5 zum CHO-Flp-*hM*<sub>1</sub>-wt-Rezeptor war fünffach stärker als sie am CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Rezeptor detektiert werden konnte (vgl. Tab. 4.80, und 4.74; t-Test,  $p < 0,05$ ).

Die Rezeptormutationen *M*<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala mit einem  $\log K_B = -6,50 \pm 0,13$  und *M*<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala mit einem  $\log K_B = -6,45 \pm 0,10$  zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Bindungsneigung, verglichen mit dem Flp-*hM*<sub>1</sub>-wt-Rezeptor, wohingegen die Mutation der Aminosäure <sup>401</sup>Glu Ala zu einer Abnahme der Bindungsneigung von etwa einer Dekade führte (vgl. Tab. 4.80, t-Test,  $p < 0,05$ ). Die Entfernung der negativen Ladung in Position 401 des *M*<sub>1</sub>-Rezeptors, zeigte eine fünffache Zunahme der Kooperativität mit NMS im Vergleich zum *hM*<sub>1</sub>-Wildtyprezeptor. Die Mutationen *M*<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala und *M*<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala zeigten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Kooperativität mit [<sup>3</sup>H]NMS (t-Test,  $p > 0,05$ ).

Rezeptor	Unteres Plateau (%)	$n_H$	$\log K_B$	$\log \rho$	n
<i>M</i> <sub>1</sub> -wt	13 ± 2	= -1,00	-6,43 ± 0,06	-1,42 ± 0,09	3
<i>M</i> <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	13 ± 4	= -1,00	-6,50 ± 0,13	-1,42 ± 0,13	4
<i>M</i> <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	=0	= -1,00	-6,45 ± 0,10	-1,70 ± 0,26	3
<i>M</i> <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	8 ± 4	-3,02 ± 0,64	-5,37 ± 0,04***	-0,73 ± 0,05*	4

**Tabelle 4. 80: Kenngrößen der in Abbildung 4.103 dargestellten Bindungskurven.**  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit.  $\log K_B$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des allosterischen Fragmentes.  $\log \rho$ : Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\rho$ . n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. War das Steilheitsmaß nicht signifikant verschieden von  $n_H = -1$  wurde zur weiteren Analyse Gleichung 15 verwendet, wies das Kurvensteilheit ein von  $n_H = -1$  signifikant verschiedenes Steilheitsmaß auf wurde Gleichung 16 verwendet. \*,\*\*\*: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße des *hM*<sub>1</sub>-wt-Rezeptors (t-Test, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

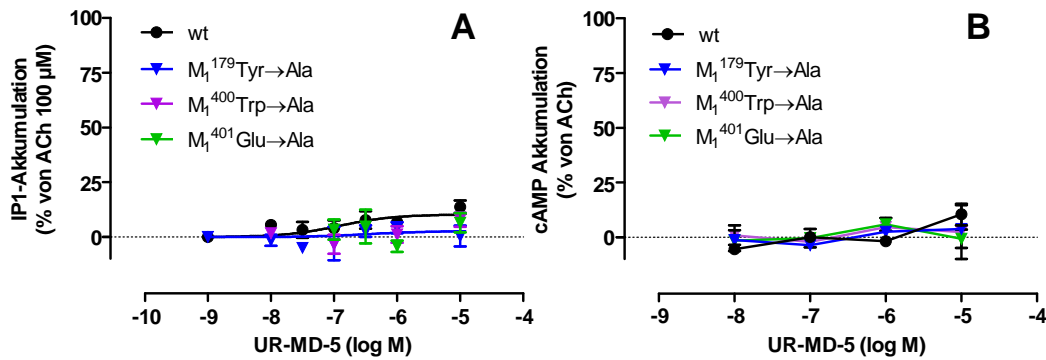
Zusammenfassend stützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass die Aminosäuren *M*<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyrosin und *M*<sub>1</sub><sup>400</sup>Tryptophan nicht an der Bindung von UR-MD-5 beteiligt zu sein scheinen. Die im oberen Bereich der siebten Transmembran (TM7) lokalisierte Aminosäure Glutaminsäure scheint im Gegensatz dazu mit ihrer negativen Ladung an dieser Position von gewichtiger Bedeutung zu sein.

#### 4.3.1.6 Einfluss unterschiedlicher Rezeptorpunktmutationen auf die durch UR-MD-5-induzierte IP1- und cAMP-Akkumulation in CHO-Flp-*M*<sub>1</sub>-Zellen

In den bereits gezeigten DMR-Experimenten (vgl. 4.3.1.4.1), zeigte das allosterische Fragment UR-MD-5 in einer Konzentration von 0,3  $\mu$ M mit einem  $E_{max}$  von  $5 \pm 1\%$  einen von 0% signifikant unterschiedlichen Effekt (Einstichproben t-Test,  $p < 0,05$ ). Um diese Befunde eingehender zu prüfen, wurden weitere funktionelle Experimente durchgeführt, die es erlaubten, höhere Konzentrationen der

Testsubstanz zu untersuchen. UR-MD-5 besitzt, wie seine Muttersubstanz BQCA eine sehr geringe Wasserlöslichkeit, weshalb es die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel erforderte. Diese Eigenschaft verhinderte in DMR-Experimenten den Einsatz der Testsubstanzen in einer Konzentration höher als 0,3  $\mu\text{M}$ , da es sonst zu Verfälschungen des Signales aufgrund eines DMSO Eigeneffektes im DMR-Experiment kam. Mit Hilfe der Messung der IP1-Akkumulation, welche das Lösungsmittel DMSO in einer höheren Konzentration ohne Eigeneffekt toleriert, konnte das allosterische Fragment in einer Konzentration bis zu 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt werden.

Um neben einem potentiellen allosterisch-agonistischen Effekt ebenfalls zu prüfen, ob Punktmutationen in allosterischen Epitopen des muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptors einen möglichen Einfluss auf die qualitative Signalwegaktivierung bzw. das quantitative Ausmaß dieser Aktivierung haben, wurden IP1- und cAMP-Akkumulation Experimente sowohl an CHO- $hM_1$ -wt Zellen, als auch an Zellen mit den bekannten Mutationen  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$ ,  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  und  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$  durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.104 dargestellt. Am CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Rezeptor konnte für das allosterische Fragment UR-MD-5 eine konzentrationsabhängige IP1-Akkumulation detektiert werden (Abbildung 4.104 (A)). Die Konzentrations-Effekt-Kurve konnte signifikant besser mit einem Hill-Koeffizienten von  $n_H = 1$  beschreiben werden (F-test,  $p > 0,05$ ) und wies ein oberes Plateau von  $14 \pm 3\%$  auf. Der  $\log EC_{50}$  betrug  $-6,91 \pm 0,46$ . Die Konzentrations-Effekt-Kurven von UR-MD-5 an den  $M_1$ -Rezeptoren mit Punktmutationen im putativ allosterischen Bereich, zeigten keinen von der Basislinie signifikant unterschiedlichen Effekt (vgl. Abbildung 4.104 (A) und Tabelle 4.81). Eine durch das Fragment UR-MD-5 induzierte konzentrationsabhängige cAMP-Akkumulation konnte weder am CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Rezeptor, noch an den Rezeptoren mit unterschiedlichen Punktmutationen detektiert werden. In allen Fällen war UR-MD-5 auch in der höchst eingesetzten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  nicht in der Lage, ein von 0% unterschiedliches Signal zu induzieren (Einstichproben t-Test,  $p > 0,05$ , vgl. Abbildung 4.104 (B) und Tabelle 4.81).



**Abbildung 4.104: Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im Bereich der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des *hM<sub>1</sub>*-Rezeptors auf die UR-MD-5 induzierte IP1- und cAMP-Akkumulation in CHO-Flp-M<sub>1</sub>-Zellen.** (A) Ordinate: IP1-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (in Gegenwart von Acetylcholin 100 µM). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der UR-MD-5-Konzentration. Die Zellzahl betrug 100.000 Zellen pro Vertiefung. (B): Ordinate: cAMP-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale cAMP-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (in Gegenwart von Acetylcholin 100 µM). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der UR-MD-5-Konzentration. Die Zellzahl betrug 50.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Rezeptor	IP1-Akkumulation				cAMP-Akkumulation	
	E <sub>max</sub> (%)	log EC <sub>50</sub>	n <sub>H</sub>	n	E <sub>max</sub> (%)	n
M <sub>1</sub> -wt	14 ± 3*	-6,91 ± 0,46	= -1,00	4	4 ± 3	3
M <sub>1</sub> <sup>179</sup> Tyr Ala	1 ± 5	-	-	4	10 ± 5	3
M <sub>1</sub> <sup>400</sup> Trp Ala	8 ± 3	-	-	3	2 ± 12	3
M <sub>1</sub> <sup>401</sup> Glu Ala	7 ± 4	-	-	3	-1 ± 4	3

**Tabelle 4. 81: Parameterschätzwerte der in Abbildung 4.104 dargestellten Effekte der UR-MD-5-induzierten IP1- und cAMP-Akkumulation.** E<sub>max</sub>: Maximale IP1- bzw. cAMP-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungskurve). logEC<sub>50</sub>: Dekadischer Logarithmus der Konzentration von UR-MD-5, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Die Kenngrößen basieren auf den in Abb. 4.104 (A) gezeigten Mittelwertskurven oder (B) den Mittelwerten der Messwerte in Gegenwart der höchsten eingesetzten Konzentration der Testsubstanz. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten die in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*: Wert signifikant unterschiedlich von 0% (Einstichproben t-Test, \*p<0,05).

### 4.3.2 Charakterisierung der Bindung und Signalwegaktivierung des allosterischen Fragmentes UR-MD-2 (TBPBd) an muskarinischen *hM<sub>1</sub>*-wt-Rezeptoren

Die allosterische Modulation von GPCR erlaubt es prinzipiell, sowohl die Bindungsaffinität, als auch die intrinsische Aktivität eines orthosterischen Liganden positiv oder negativ zu beeinflussen (z.B. (Zahn et al. 2002; Valant et al. 2012a). Des Weiteren kann die Bindung eines Liganden an eine allosterische Bindungsstelle den Rezeptor aber auch aktivieren, ohne dass die orthosterische Bindungsstelle durch den endogenen Neurotransmitter besetzt ist (Christopoulos 2002; Waelbroeck

2003; Conn et al. 2009). Liganden mit solchen Eigenschaften werden als allosterische Agonisten bezeichnet (Schwartz und Holst 2006; Kenakin 2007). In einer vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass UR-MD-2, welches als allosterisches Fragment in einer weiteren im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vorgestellten Hybridserie eingesetzt wurde, in funktionellen Experimenten (DMR-Messungen) einen Maximaleffekt  $E_{\max} = 62 \pm 2\%$  induzierte (Zimmermann, Masterarbeit 2012). Zur Verifizierung dieses Effektes, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit UR-MD-2 eingehender untersucht werden. Neben weiteren funktionellen Experimenten galt es auch, die Bindung des putativ allosterischen Fragmentes näher zu untersuchen. Wie bereits erwähnt (vgl. Abb. 4.91), handelt es sich bei UR-MD-2 nicht um ein BQCA-, sondern um ein TBPB-Derivat (TBPBd). Basierend auf dem ternären Model allosterischer Interaktionen, wurde TBPB als allosterischer Agonist beschrieben (Christopoulos und Mitchelson 1997; Jacobson et al. 2010). Weitere Studien konnten dagegen nicht ausschließen, dass TBPB als „bitopischer“ Agonist agiert (Avlani et al. 2010; Keov et al. 2013; Keov et al. 2014).

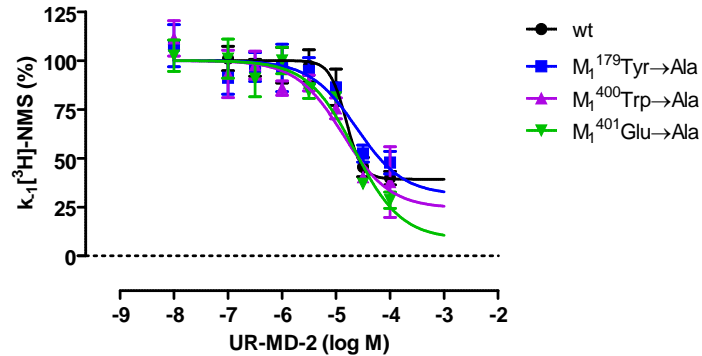
#### **4.3.2.1 Charakterisierung der Bindungseigenschaften von UR-MD-2 an muskarinischen $hM_1$ -wt-Rezeptoren**

##### *4.3.2.1.1 Beeinflussung der [ $^3H$ ]NMS-Dissoziation durch Mutation unterschiedlicher Epitope im putativ allosterischen Bereich des $hM_1$ -wt-Rezeptors*

Wie schon zur Charakterisierung des allosterischen Fragmentes UR-MD-5, wurden für UR-MD-2 ebenfalls „Drei-Punkt“-kinetische Experimente (vgl. 3.2.5.2) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Experimente konnte überprüft werden, ob UR-MD-2 an putativ allosterische Bereiche des  $hM_1$ -wt-Rezeptors bindet, weil hierbei die orthosterische Bindungsstelle mit dem Radioantagonisten [ $^3H$ ]NMS besetzt und nicht für die Testsubstanz zugänglich ist. Tritt ein dissoziationsverzögernder Effekt ein, ist dies ein Hinweis auf eine allosterische, d.h. nicht orthosterischen Interaktion mit dem Rezeptorprotein. Außerdem wurde der mögliche dissoziationsverzögernde Effekt von UR-MD-2 an drei punktmultierten  $hM_1$ -Rezeptoren untersucht, in denen Aminosäuren der putativ allosterischen Bindungsstelle gegen Alanin ausgetauscht wurden, i.e.  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$ ,  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  und  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$ .

Abbildung 4.105 zeigt die dissoziationsverzögernde Wirksamkeit von UR-MD-2 sowohl am  $hM_1$ -Flp-wt, als auch an den untersuchten Rezeptormutationen. Die pharmakologischen Kenngrößen sind in Tabelle 4.82 aufgeführt. Wie aus Abbildung 4.105 deutlich wird, war das allosterische Fragment UR-MD-2 am  $M_1$ -Flp-wt-Rezeptor in der Lage, die Dissoziation des Radioantagonisten [ $^3H$ ]NMS, ausgedrückt als Verminderung der apparenten Geschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$ , auf ein unteres Plateau von  $39 \pm 8\%$  zu verringern; dies entspricht einer Verzögerung der Dissoziationshalbwertszeit unter Kontrollbedingungen um den Faktor  $100/39 = 2,5$ . Das untere Plateau zeigte bei keiner der untersuchten Mutationen einen signifikanten Unterschied zum  $hM_1$ -Wildtyprezeptor (vgl. Tab. 4.82, t-Test,  $p > 0,05$ ). Interessanterweise zeigte ein Vergleich der Bindungsneigung, dass keine der untersuchten Mutationen des  $hM_1$ -Rezeptors die Bindungsneigung von UR-MD-2 im Vergleich zum  $hM_1$ -Flp-wt-Rezeptor

änderte (vgl. Tab. 4.82, t-Test,  $p > 0,05$ ). Die Steilheit der Kurven konnte, mit Ausnahme derjenigen des  $hM_1$ -Flp-wt-Rezeptors ( $n_H = -2,89 \pm 1,40$ ), mit einer Kurvensteilheit von  $n_H = -1$  beschrieben werden (F-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4.105: Interaktion von UR-MD-2 (TBPBd) mit den aufgeführten orthosterisch durch  $[^3\text{H}]$ NMS-besetzten  $M_1$ -Rezeptoren in CHO-Flp-Zellen.** Ordinate: Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  der  $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation in % des Werte in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug 2,0 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28°C. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus der drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	Rezeptor	Unteres Plateau (%)	$\log EC_{0,5, \text{Diss}}$	$\log EC_{0,5, \text{Diss}}$	$k_1$	$n_H$	n
UR-MD-2 (AF)	$M_1$ -wt	$39 \pm 8$	$-4,82 \pm 0,12$	-	$0,07 \pm 0,01$	$-2,89 \pm 1,40^{\S}$	3
	$M_1^{179}\text{Tyr Ala}$	$31 \pm 15$	$-4,62 \pm 0,27$	-0,20	$0,09 \pm 0,01$	$=-1,00$	4
	$M_1^{400}\text{Trp Ala}$	$24 \pm 13$	$-4,87 \pm 0,24$	0,05	$0,05 \pm 0,00$	$=-1,00$	3
	$M_1^{401}\text{Glu Ala}$	$9 \pm 13$	$-4,66 \pm 0,17$	-0,16	$0,04 \pm 0,00$	$=-1,00$	3

**Tabelle 4.82: Kenngrößen der in Abbildung 4.105 dargestellten Kurven für die Verzögerung der Dissoziation von  $[^3\text{H}]$ NMS durch UR-MD-2.**  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ : Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der  $[^3\text{H}]$ NMS-Dissoziation führt.  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ : Differenz zwischen dem  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ -Wert an der jeweiligen  $M_1$ -Rezeptormutante und dem  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ -Wert am  $M_1$ -Wildtyprezeptor.  $k_1$ : Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante von  $[^3\text{H}]$ NMS ( $\text{min}^{-1}$ ).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). AF: allosterisches Fragment.  $\S$ : Kurvensteilheit signifikant verschieden von  $n_H = -1$  (F-Test,  $\S p < 0,05$ )

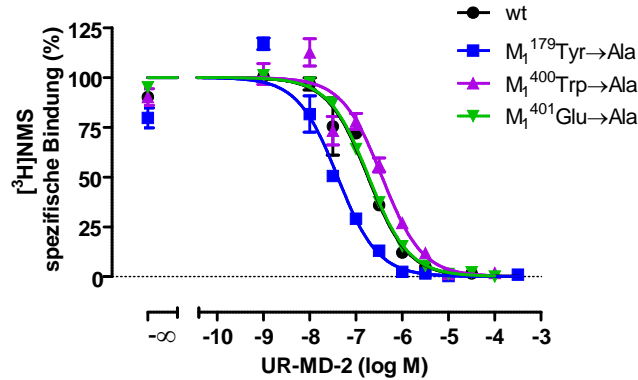
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die drei in der zweiten transmembranären Schleife und am Beginn der siebten Transmembrandomäne (TM7) des  $M_1$  Rezeptorproteines lokalisierten Aminosäuren, interessanterweise keinen signifikanten Beitrag zur Bindungsneigung von UR-MD-2 zum  $[^3\text{H}]$ NMS-besetzten Rezeptor leisten (vgl. Tab. 4.82)

#### 4.3.2.1.2 Einfluss putativer allosterischer Punktmutationen auf die Bindung von UR-MD-2 an orthosterisch unbesetzten muskarinischen $hM_1$ -Rezeptoren

Nachdem keines der untersuchten Rezeptorepitope an der Bindung von UR-MD-2 am [ $^3$ H]NMS-besetzten Rezeptor beteiligt zu sein schien, sollte in einem nächsten Schritt mit Hilfe von Gleichgewichts-Bindungsexperimenten geprüft werden, ob dieselben Epitope  $M_1^{179}$ Tyr,  $M_1^{400}$ Trp und  $M_1^{401}$ Glu der putativ allosterischen Bindungsstelle einen Einfluss auf die Bindungsneigung von UR-MD-2 zum orthosterisch unbesetzten  $hM_1$ -Rezeptorprotein zeigen würden.

In Abbildung 4.106 sind die Bindungskurven für die Interaktion von UR-MD-2 mit [ $^3$ H]NMS sowohl am  $hM_1$ -Flp-wt als auch an den drei Rezeptormutanten dargestellt. Die zugehörigen Parameterwerte sind in Tabelle 4.83 zusammengefasst. Die gezeigten Daten wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Zusätzlich wurden die Daten mit Hilfe des ternären Modells allosterischer Interaktionen nach Ehlert (1988, vgl. 3.2.4.2, Gleichung 15) analysiert, um einen Schätzwert für die Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_B$  sowie den Kooperativitätsfaktor  $\rho$  zu ermitteln (vgl. Kapitel 9.4.1). Wie aus Abbildung 4.106 hervorgeht, induzierte die Mutation  $M_1^{179}$ Tyr Ala eine signifikante Links-Verschiebung der [ $^3$ H]NMS Inhibitionskurve im Sinne einer fünffachen Zunahme der Bindungsneigung von UR-MD-2 ( $\log EC_{50}$ -Wert =  $-7,40 \pm 0,07$ ) im Vergleich zum  $hM_1$ -Flp-wt-Rezeptor ( $\log EC_{50}$  =  $-6,74 \pm 0,06$ ). Ein vergleichbarer Effekt konnte an dieser Mutation von Keov et al. 2014 für das strukturell ähnliche TBPB mit dem Radioliganden [ $^3$ H]QNB in Inhibitionsversuchen beobachtet werden ( $\log K_i$ :  $M_1$ -wt:  $-7,06 \pm 0,12$ ;  $\log K_i$ :  $M_1^{179}$ Tyr Ala:  $-7,97 \pm 0,10$ ) (Keov et al. 2014). Der Austausch der Aminosäure Tryptophan 400 gegen die räumlich kleinere Aminosäure Alanin, führte zu einer schwachen aber signifikanten Rechtsverschiebung ( $\log EC_{50}$  =  $-6,44 \pm 0,06$ ) der Inhibitionskurve im Sinne einer Verringerung der Bindungsneigung von UR-MD-2. Die Inhibition von [ $^3$ H]NMS durch UR-MD-2 an der Rezeptormutante  $M_1^{401}$ Glu Ala zeigte dagegen keinen vom  $M_1$ -wt-Rezeptor signifikanten Unterschied. Sowohl die Zunahme der Bindungsneigung durch den Austausch der Aminosäure Tyrosin 179, als auch der Verlust der Bindungsneigung durch den Austausch der Aminosäure  $M_1^{400}$ Trp zu Alanin gaben Hinweise auf eine mögliche Interaktion von UR-MD-2 mit dem allosterischen Haftareal der  $M_1$ -Rezeptors. Die Aminosäure  $M_1^{401}$ Glu dagegen scheint nicht an der Bindung des allosterischen Fragmentes UR-MD-2 beteiligt zu sein.

Anders als das allosterische Fragment UR-MD-5 war UR-MD-2 sowohl am  $hM_1$ -wt, als auch in Gegenwart der drei  $M_1$ -Rezeptormutationen, in der Lage die [ $^3$ H]NMS-Bindung vollständig zu inhibieren.



**Abbildung 4.106: Bedeutung unterschiedlicher Rezeptorpunktmutationen des  $hM_1$ -Rezeptors auf die Bindung des allosterischen Fragments UR-MD-5.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden  $[^3H]NMS$  in Prozent des Wertes in Abwesenheit von Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen  $[^3H]NMS$  Bindung (in Anwesenheit von  $10 \mu M$  Atropin), 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug  $0,2 \text{ nM}$ , die Zellzahl  $75.000$  Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES ( $20 \text{ mM}$ ) Puffer (L16),  $pH 7,4$ ,  $28^\circ C$ . Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	Rezeptor	Unteres Plateau(%)	$\log EC_{50}$	$\log EC_{50}$	$n_H$	n
UR-MD-2 (AF)	$M_1$ -wt	= 0	$-6,74 \pm 0,06$	-	=1,00	3
	$M_1^{179Tyr}$ Ala	= 0	$-7,40 \pm 0,07^{***}$	0,66	=1,00	3
	$M_1^{400Trp}$ Ala	= 0	$-6,44 \pm 0,06^*$	-0,30	=1,00	4
	$M_1^{401Glu}$ Ala	= 0	$-6,73 \pm 0,02$	-0,01	=1,00	4

**Tabelle 4.83: Kenngrößen der in Abbildung 4.106 dargestellten Bindungskurven.**  $\log EC_{50}$ : Negativer dekadischer Logarithmus der Ligandkonzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $\log EC_{50}$ : Differenz zwischen dem  $\log EC_{50}$ -Wert für die jeweiligen  $M_1$ -Rezeptormutante und dem  $\log EC_{50}$ -Wert des  $M_1$ -Wildtyprezeptors.  $n_H$ : Hill-Koeffizient bei variabler Kurvensteilheit n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten in Vierfachbestimmung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung (Gleichung 12). AF: allosterisches Fragment. \*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des  $M_1$ -wt-Rezeptors (t-Test, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

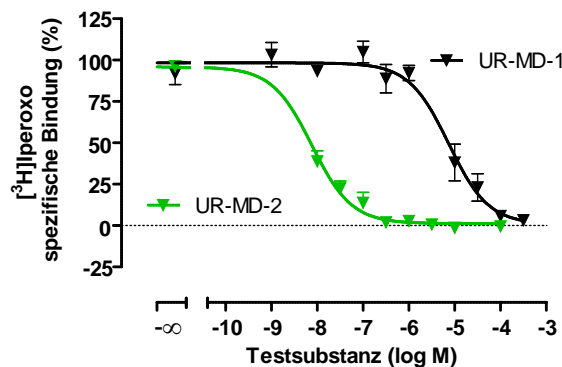
#### 4.3.2.1.3 Effekt der allosterischen Fragmente UR-MD-1 und UR-MD-2 auf die Gleichgewichtsbindung des Radioagonisten $[^3H]Iperoxo$ an $hM_1$ -wt Rezeptoren

Auf Grund der Entdeckung, dass das allosterische Fragment UR-MD-5 (BQCA) gegenüber dem Radioagonisten  $[^3H]Iperoxo$  eine positive Kooperativität aufwies (vgl. 4.3.1.3), sollte geprüft werden, ob UR-MD-2 auch über diese Eigenschaft verfügt. Da interessanterweise nur das kurze  $C_1$ -Fragment UR-MD-5, und nicht das längere  $C_8$ -Fragment UR-MD-6 über die Fähigkeit der Förderung der Bindungsneigung von Iperoxo verfügte, sollte neben UR-MD-2 auch das kürzere Fragment UR-MD-1 (vgl. Abb. 4.91) in heterologen Konkurrenzexperimenten untersucht werden. Wie bereits unter 4.1.8.2 erläutert, wurden zur Vermeidung von Rezeptorinternalisierungs-Effekten durch Agonisten, keine ganzen, lebenden Zellen verwendet, sondern Membranhomogenate (vgl. 3.1.5) aus CHO- $hM_1$ -wt-Zellen. Die Inkubationszeit betrug 3-5h bei  $30^\circ C$ .



Durch die Verwendung einer nichtlinearen Regressionsanalyse konnte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) ein sigmoidaler Kurvenverlauf, mit einer Kurvensteilheit nicht signifikant verschieden von  $n_H = -1$ , und einem unteren Plateau nicht verschieden von 0% ermittelt werden (F-Test,  $p > 0,05$ ). Die Analyse der Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_B$  sowie der Kooperativität  $\rho$  zwischen dem allosterischen Fragment und [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo, erfolgte mit Hilfe von Gleichung 15. Die Parameterwerte der Inhibitionskurven sind in Tabelle 4.84 zusammenfassend gegenübergestellt.

Wie in Abbildung 4.107 zu erkennen ist, zeigten beide Fragmente eine stark negative Kooperativität mit [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo, die sich auf Grund des sehr hohen Standardfehlers für  $\rho$  nicht signifikant voneinander unterschied (t-Test,  $p > 0,05$ ). Interessanterweise zeigte sich, anders als bei den beiden Fragmenten UR-MD-5 und UR-MD-6, ein Affinitätsunterschied von 3 Dekaden, der einer 1000-fach höheren Bindungsneigung von UR-MD-2 ( $\log K_B = -8,18 \pm 0,07$ ) gegenüber seinem kürzeren Verwandten UR-MD-1 ( $\log K_B = -5,18 \pm 0,14$ ) entsprach (t-Test,  $p < 0,05$ ).



**Abbildung 4. 107: Heterologe Gleichgewichtsbindungsexperimente zur Charakterisierung der Interaktion der allosterischen Fragmente UR-MD-1 und UR-MD-2 mit dem orthosterischen Radioagonisten [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo in Prozent des Wertes in Abwesenheit von Tests substanz. 0% entspricht der unspezifischen [ $^3\text{H}$ ]Iperoxo Bindung in Anwesenheit von  $10 \mu\text{M}$  Carbachol, 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Tests substanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Tests substanz. Die Radioligandkonzentration betrug  $0,2 \text{ nM}$ , die Proteinmenge  $40 \mu\text{g}$  pro Vertiefung in HEPES ( $12,5 \text{ nM}$ )-Puffer (L9), pH 7,4,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Kurvenanpassung: Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient  $n_H$  in Tabelle 4.84 wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Auf Grund eines Steilheitsmaßes, das nicht verschieden war von  $n_H = -1$ , erfolgte die weitere Analyse mit Hilfe von Gleichung 15. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	Unteres Plateau (%)	$n_H$	$\log K_B$	$\log \tau$	n
UR-MD-1	= 0	= -1,00	$-5,18 \pm 0,14$	$-2,14 \pm 3,48$	4
UR-MD-2	= 0	= -1,00	$-8,18 \pm 0,07^{***}$	$-1,94 \pm 0,58$	3

**Tabelle 4. 84: Kenngrößen der in Abbildung 4.107 dargestellten Bindungskurven.**  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit.  $\log K_B$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des allosterischen Fragmentes/Modulators.  $\log \tau$ : Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\tau$ . n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten in Dreifachbestimmung. Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Die weitere Analyse der allosterischen Fragmente erfolgte mit Hilfe von Gleichung (15). \*\*\*: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden UR-MD-1 Kenngröße (t- Test,\*\*\* p<0,001)

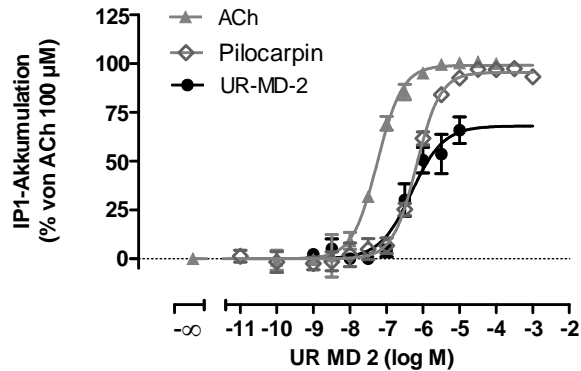
#### 4.3.2.2 Charakterisierung des allosterischen Fragmentes UR-MD-2 hinsichtlich seiner Fähigkeit zur $G_q$ - und $G_s$ -Signalwegaktivierung

Wie bereits zu Beginn dieses Kapitels beschrieben, konnte für das allosterische Fragment UR-MD-2 in DMR-Experimenten bereits früher ein partialagonistisches Verhalten aufgedeckt werden (Zimmermann, Masterarbeit 2012). Mit Hilfe des  $G_i$ -Signalweg-Inhibitors PTX (T1) und des  $G_q$ -Inhibitors MH (T2) (vgl. Abb. 4.99) konnte gezeigt werden, dass der Großteil des UR-MD-2 vermittelten Effektes der  $G_q$  Protein-Kopplung zugeordnet werden konnte. Ebenfalls zeigten sich aber auch Hinweise auf eine  $G_s$ - und eine  $G_i$ -Signalwegaktivierung (Zimmermann, Masterarbeit 2012). Zur Verifizierung dieser Ergebnisse sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit IP1- und cAMP-Akkumulationsexperimente durchgeführt werden, um genauere Einblicke in die Fähigkeit von UR-MD-2 zu erhalten, den  $G_q$ -, bzw.  $G_s$ -Signalweg zu aktivieren.

##### 4.3.2.2.1 UR-MD-2 besitzt auf dem $G_q$ -Signalweg ein partialagonistisches Verhalten mit gleicher Wirksamkeit wie Pilocarpin

Abbildung 4.108 zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurven von UR-MD-2, im Vergleich zu den Konzentrations-Effekt-Kurven des endogenen Agonisten ACh sowie von Pilocarpin. Bei den Konzentrations-Effekt-Kurven von ACh und Pilocarpin (grau dargestellt) handelt es sich um bereits im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellten Daten (vgl. 4.1.4.1.1), die zum Vergleich mit den durch UR-MD-2 induzierten Ergebnissen mit in die Abbildung aufgenommen wurden. Die Kenngrößen der Konzentrations-Effekt-Kurven sind Tabelle 4.85 zu entnehmen. UR-MD-2 zeigte einen  $\log EC_{50}$ -Wert von  $-6,12 \pm 0,18$ , der sich nicht signifikant von dem des für Pilocarpin ermittelten Wertes unterschied (t-Test,  $p > 0,05$ ). Gegenüber dem Vollagonisten ACh zeigte UR-MD-2 eine neunfach schwächere Wirkstärke (t-Test,  $p < 0,05$ ). Das obere Plateau der Konzentrations-Effekt-Kurve von UR-MD-2 betrug  $68 \pm 5\%$  und deckte damit dessen partialagonistisches Verhalten auf. Dennoch war es signifikant niedriger, als das durch den Partialagonisten Pilocarpin induzierte obere Plateau (t-Test,  $p < 0,05$ ). Verglichen mit den Daten aus DMR-Experimenten (Zimmermann, Masterarbeit 2012), zeigte sich weder hinsichtlich der Wirkstärke  $\log EC_{50} = -6,27 \pm 0,04$  noch der maximalen Wirksamkeit  $E_{max} = 62 \pm$

2% ein signifikanter Unterschied für UR-MD-2 (t-Test,  $p > 0,05$ ). Dieser Befund bestätigte die Hypothese, dass die UR-MD-2 vermittelten Effekte früherer DMR-Experimente hauptsächlich  $G_q$  Protein-vermittelt waren.



**Abbildung 4.108: Durch UR-MD-2 induzierte IP1-Akkumulation in CHO-hM<sub>1</sub>-wt-Zellen.** Ordinate: IP1-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (in Gegenwart von 100 µM Acetylcholin). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration von UR-MD-2. Die in der Abbildung dargestellten Daten für ACh und Pilocarpin stammen aus Abbildung 4.17 in Kapitel 4.1.4.1.1 und werden hier zu Vergleichszwecken, in grau dargestellt, mitgeführt. Die Zellzahl betrug 100.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	log EC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)	n <sub>H</sub>	n
ACh	-7,25 $\pm$ 0,03	99 $\pm$ 2	= 1,00	3
Pilocarpin	-6,18 $\pm$ 0,04	96 $\pm$ 2	= 1,00	3
UR-MD-2	-6,32 $\pm$ 0,13 <sup>***</sup>	68 $\pm$ 5 <sup>###</sup>	= 1,00	5

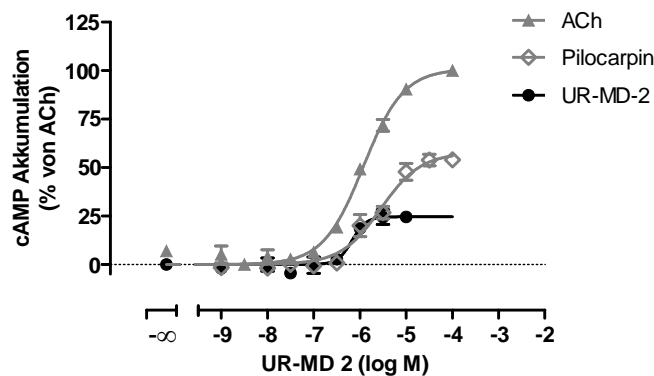
**Tabelle 4.85: Kenngrößen der in Abbildung 4.108 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch UR-MD-2 induzierten IP1-Akkumulation.** logEC<sub>50</sub>: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des Liganden, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. E<sub>max</sub>: Maximale IP1-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve). n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*,\*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße für ACh (t-Test, \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). ###: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße für Pilocarpin (t-Test, ### $p < 0,01$ ).

#### 4.3.2.2.2 UR-MD-2 besitzt auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg eine schwächere intrinsische Aktivität, aber eine höhere Wirksamkeit als der Partialagonist Pilocarpin

Neben der Fähigkeit zur G<sub>q</sub>-Signalwegaktivierung, sollte untersucht werden, ob UR-MD-2 über die Fähigkeit verfügt, als potenziell allosterischer Agonist, auch den G<sub>s</sub>-Signalweg zu aktivieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.109 und Tabelle 4.86 dargestellt. Der Vollagonist ACh und der Partialagonist Pilocarpin, dienten auch in diesen Experimenten zum Vergleich mit dem für UR-MD-2 ermittelten Effekt. UR-MD-2 zeigte eine Wirkstärke, die sich nicht signifikant von ACh unterschied (t-Test,  $p > 0,05$ ). Gegenüber dem Partialagonisten Pilocarpin zeigte UR-MD-2 eine vierfach höhere

Wirkstärke. Das obere Plateau von UR-MD-2 betrug  $E_{\max} = 25 \pm 2\%$  und wies damit auf ein partialagonistisches Verhalten mit geringem Maximaleffekt des Liganden hin, das signifikant geringer war, als der Maximaleffekt induziert durch den Partialagonisten Pilocarpin (t-Test,  $p < 0,05$ ).

Die durch UR-MD-2 induzierte Wirkstärke für den  $G_q$ - und den  $G_s$ -Signalweg, zeigte keinen signifikanten Unterschied (t-Test,  $p > 0,05$ ). Der von C.Zimmermann (Masterarbeit 2012) ermittelte Wert für die Wirkstärke von UR-MD-2 in  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Experimenten ( $\log EC_{50} = -7,17 \pm 0,31$ ) und damit für den  $G_i$ -Signalweg, zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit der auf dem  $G_q$ - und dem  $G_s$ -Signalweg (*one-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test*  $p > 0,05$ ). Zur Quantifizierung einer tatsächlichen Signalwegbevorzugung, wurde die bereits im ersten und zweiten Ergebnisteil dieser Arbeit erläuterte Methode der „Bias“-Berechnung verwendet (vgl. 3.5 und 4.1.6). Die Ergebnisse werden im nächsten Abschnitt (vgl. 4.3.2.3) ausführlich erläutert.



**Abbildung 4. 109: Durch UR-MD-2 induzierte cAMP-Akkumulation in CHO-hM<sub>1</sub>-wt-Zellen.** Ordinate: cAMP-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  Acetylcholin). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration von UR-MD-2. Die in der Abbildung dargestellten Daten für ACh und Pilocarpin stammen aus Abbildung 4.20 in Kapitel 4.1.4.2.1 und werden hier zu Vergleichszwecken, in grau dargestellt, mitgeführt. Die Zellzahl betrug 50.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	$\log EC_{50}$	$E_{\max}$ (%)	$n_H$	n
ACh	$-5,89 \pm 0,04$	$102 \pm 2$	$= 1,00$	3
Pilocarpin	$-5,61 \pm 0,08$	$55 \pm 2$	$= 1,00$	3
UR-MD-2	$-6,17 \pm 0,08^{##}$	$25 \pm 2^{***###}$	$2,83 \pm 1,04$	3

**Tabelle 4. 86. Kenngrößen der in Abbildung 4.109 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven für die durch UR-MD-2 induzierte cAMP-Akkumulation.**  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der Konzentration des Liganden, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $E_{\max}$ : Maximale IP1-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße für ACh (t-Test,  $***p < 0,001$ ). ##, ###: Wert signifikant verschieden zu der entsprechenden Kenngröße von Pilocarpin (t-Test,  $##p < 0,01$ ,  $###p < 0,001$ ).

### 4.3.2.3 Quantifizierung einer durch UR-MD-2 induzierten bevorzugten Signalwegaktivierung („Ligand-Bias“)

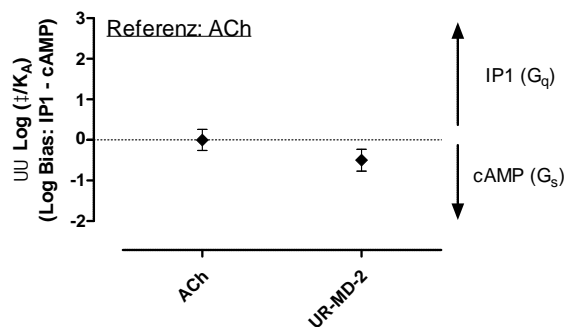
Die Prüfung und Quantifizierung einer Signalwegbevorzugung („Ligand-Bias“), erfolgte wie unter 4.1.6 erläutert. Als Referenzagonist diente der endogene Neurotransmitter ACh. Mit Hilfe einer von Shonberg et al. 2014 modifizierten Gleichung (vgl. 3.5, Gleichung 37) des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983) wurden Transduktionskoeffizienten ( $\log(\tau/K_A)$ ) ermittelt und in der nachfolgenden Tabelle 4.87 sowohl für den  $G_q$ - als auch für den  $G_s$ -Signalweg aufgeführt.

Der Transduktionskoeffizient von Acetylcholin war für den  $G_q$ -Signalweg ( $\log(\tau/K_A)$  von  $7,25 \pm 0,04$ ) zwanzigfach höher als für den  $G_s$ -Signalweg ( $\log(\tau/K_A) = 5,95 \pm 0,18$ ) (t-Test,  $p < 0,05$ ). Demgegenüber war der Transduktionskoeffizient von UR-MD-2 für den  $G_q$ -Signalweg ( $\log(\tau/K_A)$  von  $6,32 \pm 0,12$ ) nur sechsfach höher als für den  $G_s$ -Signalweg ( $\log(\tau/K_A) = 5,52 \pm 0,16$ ) (t-Test,  $p < 0,05$ ). Wie bereits in vorangegangenen Kapiteln erläutert, handelt es sich bei diesem Parameter der „Bias“-Berechnung jedoch nicht um den „Ligand-Bias“, sondern um einen „System Bias“. Dieser wurde deshalb in einem nachfolgenden Schritt durch Subtraktion des für den Referenzagonisten ACh ermittelten Transduktionskoeffizienten entfernt. Die Differenz zwischen dem Transduktionskoeffizient für UR-MD-2 und dem Referenzagonisten sowohl für den  $G_q$ - als auch für den  $G_s$ -Signalweg, führte zu normalisierten  $\log(\tau/K_A)$ -Werten. Diese normalisierten Transduktionskoeffizienten ( $\log(\tau/K_A)$ ) erlaubten dann einen direkten Vergleich zwischen den zwei Signalwegen, da keine systemabhängige Beeinflussung mehr vorlag. Bei Verwendung des Referenzagonisten Acetylcholin zeigte sich, dass der allosterische Agonist UR-MD-2 den  $G_q$ -Signalweg neunfach, und den  $G_s$ -Signalweg dreifach schwächer aktiviert, als der Referenzagonist Acetylcholin (vgl. Tab. 4.87, t-Test,  $p < 0,05$ ).

Referenzagonist: Acetylcholin										
	$G_q$ - Signalweg		$G_s$ - Signalweg		$G_q$ - Signalweg		$G_s$ - Signalweg		$G_q$ - $G_s$ - Signalweg	
Substan z	$\log(\tau/K_A)$	n	$\log(\tau/K_A)$	n	$\log(\tau/K_A)$	n	$\log(\tau/K_A)$	n	$\log(\tau/K_A)$	n
ACh	$7,25 \pm 0,04$	3	$5,95 \pm 0,18^{**}$	3	$0,00 \pm 0,07$	3	$0,00 \pm 0,10$	3	$0,00 \pm 0,26$	6
URMD2	$6,32 \pm 0,12^{\#\#}$	3	$5,52 \pm 0,16^*$	3	$-0,93 \pm 0,13$	3	$-0,43 \pm 0,24$	3	$-0,50 \pm 0,27$	6

**Tabelle 4. 87: Zusammenfassung der  $\log(\tau/K_A)$ ,  $\log(\tau/K_A)$ , und  $\log(\tau/K_A)$ -Werte des allosterischen Fragmentes UR-MD-2 für den  $G_q$ - und den  $G_s$ -Signalweg an CHO- $hM_1$ -wt-Zellen.**  $\log(\tau/K_A)$ : Transduktionskoeffizient nach Kenakin et al. 2012, die Werte wurden ermittelt mit Hilfe von Gleichung 37;  $\log(\tau/K_A)$ : normalisierter Transduktionskoeffizient  $\log(\tau/K_A)$  der zu untersuchenden Substanzen nach Kenakin et al. 2012, die Werte wurden ermittelt mit Hilfe von Gleichung 38;  $\log(\tau/K_A)$ : Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$ - und  $G_s$ -Signalwegsaktivierung, die Werte wurden ermittelt mit Hilfe von Gleichung 39; n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde mit Hilfe von Gleichung 40 und 41. \*, \*\*: Wert signifikant verschieden von dem korrespondierenden Wert für die  $G_q$ -Signalwegaktivierung (t-Test,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ )  $\#\#$ : Wert signifikant verschieden zum Referenzagonisten ACh (t-Test,  $\#p < 0,01$ ).

Zur Quantifizierung einer Ligand-spezifischen Bevorzugung eines Signalweges, erfolgte anschließend eine Subtraktion der für die zwei verglichenen Signalwege normalisierten Transduktionskoeffizienten ( $\log(\tau/K_A)$ -Werte). Diese Differenz erlaubte den direkten Vergleich von UR-MD-2 hinsichtlich eines „Ligand-Bias“. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.110 dargestellt. Der ermittelte  $\log(\tau/K_A)$ -Wert =  $-0,50 \pm 0,27$  für UR-MD-2 belegte, dass auf Grund des hohen Standardfehlers keine signifikante Abweichung vom Nulleffekt des Referenzagonisten Acetylcholin vorlag. Somit zeigte UR-MD-2 keine Bevorzugung des  $G_q$ -Weges gegenüber dem  $G_s$ -Signalweg (d.h. keinen „Ligand-Bias“), bezogen auf den Referenzagonisten ACh.



**Abbildung 4. 110:** Graphische Darstellung der  $\log(\tau/K_A)$ -Werte zur Ermittlung eines „Ligand-Bias“ für das allosterische Fragment UR-MD-2 in CHO- $hM_1$ -wt-Zellen. Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$  und  $G_s$ -Signalwegaktivierung, dargestellt für ACh und UR-MD-2. Die  $\log(\tau/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 39 ermittelt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus sechs unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde mit Hilfe von Gleichung 41 berechnet.

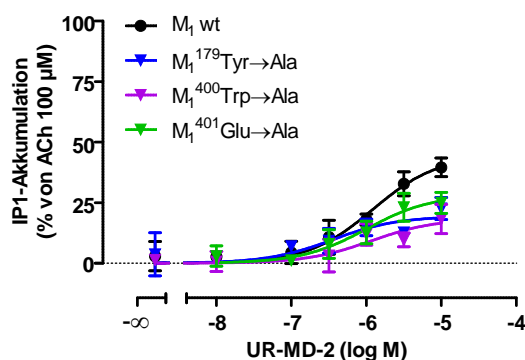
#### 4.3.2.4 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen des $hM_1$ -Rezeptors auf durch UR-MD-2 induzierte sekundäre Botenstoffe

##### 4.3.2.4.1 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im allosterischen Bereich des $hM_1$ -Rezeptors auf die durch UR-MD-2-induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp-Zellen

Wie bereits unter 4.3.2.2.1 (IP1-Akkumulation) und 4.3.2.2.2 (cAMP-Daten) beschrieben, ist das allosterische Fragment UR-MD-2 sowohl auf dem  $G_q$ - als auch auf dem  $G_s$ -Signalweg ein Partialagonist. Im Folgenden wurde untersucht, ob ausgewählte Punktmutationen im potentiell allosterischen Bereich des muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptors einen möglichen Einfluss auf die durch UR-MD-2 induzierte Signalinduktion auf dem  $G_q$ - oder dem  $G_s$ -Signalweg besitzen.

In Abbildung 4.111 und Tabelle 4.88 ist die durch UR-MD-2 induzierte IP1-Akkumulation am  $hM_1$ -Flp-wt-Rezeptor sowie an drei  $hM_1$ -Rezeptoren mit Punktmutationen in Epitopen der putativen allosterischen Bindungsstelle dargestellt. Wie bereits beschrieben, wurden die  $hM_1$ -Rezeptoren mit unterschiedlichen Punktmutationen in einem anderen Expressionsvektor (Flp-In-System) exprimiert. Um die Effekte der unterschiedlichen Mutationen eindeutig vergleichen zu können, wurde der  $hM_1$ -wt-

Rezeptor zu Kontrollzwecken ebenfalls in demselben Flp-In-Expressionssystem (vgl. 2.6.2) wie die Rezeptormutanten untersucht. UR-MD-2 zeigte, wie mit dem in Kapitel 4.1. vorgestellten System, auch an mit dem Flp-In-System exprimierten  $hM_1$ -wt-Rezeptoren ein deutlich partialagonistisches Verhalten. Der Austausch der Aminosäure Tyrosin 179 zu Alanin, in der zweiten extrazellulären Schleife, führte zu keiner Änderung der Wirkstärke. Verglichen mit dem  $hM_1$ -Flp-wt-Rezeptor, führte diese Rezeptormutation aber zu einer Absenkung des oberen Plateaus von 45 auf 19% (vgl. Abb. 4.111, Tab. 4.88) Die Mutation  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  zeigte ebenfalls keine signifikante Änderung der Wirkstärke von UR-MD-2, jedoch konnte wie am  $hM_1$ -Flp-wt-Rezeptor eine Reduktion der intrinsischen Aktivität von  $45 \pm 5\%$  auf  $18 \pm 6\%$  verzeichnet werden (t-Test,  $p < 0,05$ ). Der Austausch der negativ geladenen Aminosäure  $^{401}\text{Glu Alanin}$  zeigte, bezogen auf die Wirkstärke und den Maximaleffekt, keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyprezeptor. (t-Test,  $p > 0,05$ , Tab. 4.88 ).



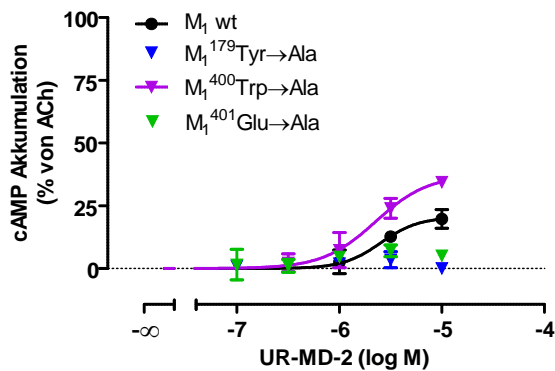
**Abbildung 4. 111: Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptors auf die durch UR-MD-2 induzierte IP1-Akkumulation in CHO-Flp- $hM_1$ -Zellen.** Ordinate: IP1-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  Acetylcholin). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration von UR-MD-2. Die Zellzahl betrug 100.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

	log EC <sub>50</sub>	log EC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)	n <sub>H</sub>	n
<b>M<sub>1</sub>-wt</b>	-5,91 $\pm$ 0,18		45 $\pm$ 5	=1,00	3
<b>M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala</b>	-6,45 $\pm$ 0,44	0,54	19 $\pm$ 4*	=1,00	3
<b>M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala</b>	-5,94 $\pm$ 0,46	0,03	18 $\pm$ 6*	=1,00	4
<b>M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala</b>	-6,00 $\pm$ 0,28	0,09	28 $\pm$ 5	=1,00	3

**Tabelle 4. 88: Kenngrößen der in Abbildung 4.111 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch UR-MD-2 induzierten IP1-Akkumulation.** logEC<sub>50</sub>: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des Liganden, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. logEC<sub>50</sub>: Differenz zwischen dem logEC<sub>50</sub>-Wert an der jeweiligen M<sub>1</sub>-Rezeptormutante und dem logEC<sub>50</sub>-Wert am M<sub>1</sub>-Wildtyprezeptor. E<sub>max</sub>: Maximale IP1-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve). n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des  $hM_1$ -wt-Rezeptors (t-Test, \* $p < 0,05$ ).

#### 4.3.2.4.2 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen im allosterischen Bereich des $hM_1$ -Rezeptors auf die durch UR-MD-2-induzierte cAMP-Akkumulation in CHO-Flp-Zellen

Der Einfluss der Rezeptormutationen im allosterischen Bereich des  $M_1$ -Rezeptors auf die durch UR-MD-2 induzierte cAMP-Akkumulation ist in Abbildung 4.112 sowie in Tabelle 4.89 zusammengefasst. Wie in IP1-Akkumulationsexperimenten, konnte für UR-MD-2 auch in cAMP-Akkumulationsexperimenten am  $hM_1$ -Flp-wt-Rezeptor (Flp-In-System, vgl. 2.6.2) ein partialagonistisches Verhalten, mit einem Maximaleffekt von  $36 \pm 21\%$  detektiert werden. Die Mutationen  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  und  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$  führten gegenüber dem  $G_q$ -Signalweg zu einem vollständigen Funktionsverlust, mit einem maximalen Effekt nicht signifikant verschieden von 0% (F-test,  $p > 0,05$ ). Aus diesem Grund war eine weitere nichtlineare Kurvenanalyse der Daten nicht möglich. Der Austausch der Aminosäure Tryptophan 400 gegen Alanin zeigte, verglichen mit dem  $hM_1$ -Flp-wt, keine signifikante Änderung in der Wirkstärke ( $\log EC_{50}$ ) und des Maximaleffektes ( $E_{\max}$ ) (t-Test,  $p > 0,05$ ).



**Abbildung 4. 112: Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen der potentiellen allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptors auf die UR-MD-2-induzierte cAMP-Akkumulation in CHO-Flp- $hM_1$ -Zellen.** Ordinate: cAMP-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (in Gegenwart von 100  $\mu\text{M}$  Acetylcholin). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration von UR-MD-2. Die Zellzahl betrug 50.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

	$\log EC_{50}$	$\log EC_{50}$	$E_{\max}$ (%)	$n_H$	n
<b><math>M_1</math>-wt</b>	$-5,11 \pm 0,47$	-	$36 \pm 21$	$=1,00$	3
<b><math>M_1^{179}\text{Tyr Ala}</math></b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3
<b><math>M_1^{400}\text{Trp Ala}</math></b>	$-5,33 \pm 0,31$	0,22	$54 \pm 20$	$=1,00$	3
<b><math>M_1^{401}\text{Glu Ala}</math></b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3

**Tabelle 4. 89: Kenngrößen der in Abbildung 4.112 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven der durch UR-MD-2 induzierten cAMP-Akkumulation.**  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der Konzentration des Liganden, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $\log EC_{50}$ : Differenz zwischen dem  $\log EC_{50}$ -Wert an der jeweiligen  $M_1$ -Rezeptormutante und dem  $\log EC_{50}$ -Wert am  $M_1$ -Wildtyprezeptor.  $E_{\max}$ : Maximale IP1-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve).  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12).



#### 4.3.2.5 Einfluss von Punktmutationen des muskarinischen $hM_1$ -Rezeptors auf die Signalwegelektivität („Ligand-Bias“) des allosterischen Fragmentes UR-MD-2

Wie bereits unter 4.3.2.3 gezeigt, lieferte die Quantifizierung eines „Ligand-Bias“ keine Hinweise auf eine durch UR-MD-2 induzierte Signalwegelektivität an CHO- $hM_1$ -wt-Zellen. In diesem Abschnitt sollte nun überprüft werden, ob die Mutationen im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptors in der Lage sind, eine Ligand-spezifische Bevorzugung des  $G_q$ - oder  $G_s$ -Signalweges zu induzieren. Somit könnten Einblicke darüber gewonnen werden, welche Aminosäuren bzw. Bindungsareale des Rezeptors möglicherweise an der Bindung unterschiedlicher G Proteine sowie der Beeinflussung bestimmter Rezeptorkonformation durch UR-MD-2 beteiligt sind. Die Berechnung des „Ligand-Bias“ erfolgte, wie unter 4.1.6 erläutert, durch die Berechnung der Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  mit Hilfe einer nach Schonberg et al. 2014 modifizierten Gleichung (Gleichung 37) des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983). Nachfolgend werden die Ergebnisse für das allosterische Fragment UR-MD-2, hinsichtlich seiner Fähigkeit dargestellt eine eventuelle Signalwegelektivität ( $G_q$ - oder  $G_s$ ) an den Mutationen  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  und  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$  zu induzieren. Eine Berechnung eines „Ligand-Bias“ für UR-MD-2 an der Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  war nicht möglich, da sich die Daten der  $G_s$ -Signalwegaktivierung auf Grund eines nicht von Null unterschiedlichen Signales, nicht analysieren ließen. Dieses Phänomen konnten Keov et al. (2014) für die Muttersubstanz TBPB beschreiben. Wie in der vorliegenden Arbeit für UR-MD-2 auf dem  $G_s$  Weg beobachtet, führte die Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  in Agonist-stimulierten funktionellen pERK1/2-Experimenten, zu einem vollständigen Funktionsverlust (Keov et al. 2014).

Die für UR-MD-2 ermittelten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$  und  $G_s$  vermittelten Signalwege sind in Tabelle 4.90 aufgeführt. Als Referenzagonist diente der endogene Agonist ACh. Bei den ermittelten Transduktionskoeffizienten für ACh handelt es sich um die bereits im zweiten Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigten Werte. Aus diesem Grund wurden diese Werte nachfolgend in grau dargestellt. Der für den Referenzagonisten Acetylcholin am  $hM_1$ -Flp-wt-Rezeptor ermittelte Transduktionskoeffizient  $\log(\tau/K_A) = 6,71 \pm 0,04$  war, wie bereits unter 4.3.2.3 gezeigt, für den  $G_q$ -Signalweg signifikant größer, als der  $\log(\tau/K_A) = 5,80 \pm 0,09$  für die Aktivierung des  $G_s$ -Signalweges (t-Test,  $p < 0,05$ ). UR-MD-2 wies demgegenüber keinen signifikanten Unterschied seiner Transduktionskoeffizienten für beide Signalwege auf (vgl. Tab. 4.90) (t-Test,  $p > 0,05$ ). Die mit Hilfe des Referenzagonisten Acetylcholin am  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  Rezeptor ermittelten  $\log(\tau/K_A)$ -Werte, zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Signalwegen (vgl. Tab. 4.90). Nicht signifikant verschieden voneinander waren auch die für UR-MD-2 ermittelten Transduktionskoeffizienten auf dem  $G_q$ - und dem  $G_s$ -Signalweg (vgl. Tab.4.90)(t-Test,  $p > 0,05$ ). Die Mutation  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$  lieferte für Acetylcholin auf dem  $G_q$  Signalweg ( $\log(\tau/K_A) = 6,36 \pm 0,05$ ) im Vergleich zum  $G_s$ -Signalweg ( $\log(\tau/K_A) = 6,64 \pm 0,06$ ) einen zweifach höheren Transduktionskoeffizienten (t-Test,  $p < 0,05$ ). Das

allosterische Fragment UR-MD-2 dagegen zeigte an dieser Mutante keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Transduktionskoeffizienten beider Signalwege (t-Test,  $p > 0,05$ ) (vgl. Tab. 4.90).

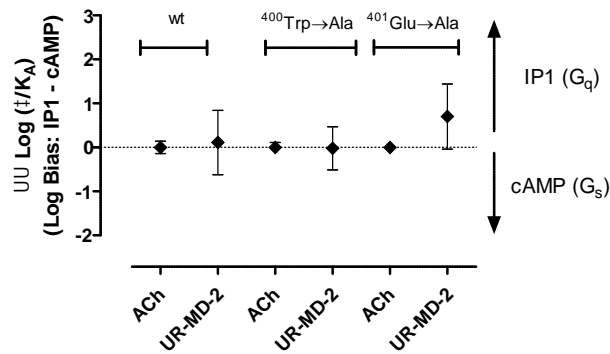
Um den Einfluss des Systems auszuschließen erfolgte im nächsten Schritt die Normalisierung der  $\log(1/K_A)$ -Werte. Dazu wurden auf beiden Signalwegen die Transduktionskoeffizienten des Referenzagonisten ACh, von dem Transduktionskoeffizienten der Testsubstanz, subtrahiert. Die daraus resultierende Differenz lieferte den normalisierten Transduktionskoeffizienten ( $\log(\tau/K_A)$ ), die ebenfalls mit in Tabelle 4.90 aufgenommen wurden.

Referenzagonist: Acetylcholin								
	$G_q$ - Signalweg	$G_s$ - Signalweg	$G_q$ - Signalweg	$G_s$ - Signalweg	$G_q$ - Signalweg	$G_s$ - Signalweg	$G_q$ - Signalweg	$G_s$ - Signalweg
<u>CHO-Flp-M<sub>1</sub>-wt</u>								
Substanz	$\log(1/K_A)$	n	$\log(1/K_A)$	n	$\log(1/K_A)$	n	$\log(1/K_A)$	n
ACh	6,71 ± 0,04	6	5,80 ± 0,09***	3	0,00 ± 0,06	6	0,00 ± 0,13	3
UR-MD-2	5,68 ± 0,16 <sup>###</sup>	3	4,66 ± 0,36	3	-1,03 ± 0,16	3	-1,14 ± 0,71	3
<u>CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala</u>								
Substanz	$\log(1/K_A)$	n	$\log(1/K_A)$	n	$\log(1/K_A)$	n	$\log(1/K_A)$	n
ACh	6,13 ± 0,04	4	5,21 ± 0,09***	3	0,00 ± 0,06	4	0,00 ± 0,13	3
URMD2	6,31 ± 0,37	3	n.d.	3	0,18 ± 0,41	3	n.d.	3
<u>CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala</u>								
Substanz	$\log(1/K_A)$	n	$\log(1/K_A)$	n	$\log(1/K_A)$	n	$\log(1/K_A)$	n
ACh	5,20 ± 0,06	5	5,04 ± 0,06	3	0,00 ± 0,08	5	0,00 ± 0,08	3
URMD2	5,20 ± 0,37	3	5,06 ± 0,19	3	0,00 ± 0,45	3	0,02 ± 0,20	3
<u>CHO-Flp-M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala</u>								
Substanz	$\log(1/K_A)$	n	$\log(1/K_A)$	n	$\log(1/K_A)$	n	$\log(1/K_A)$	n
ACh	6,36 ± 0,05	3	6,64 ± 0,06*	3	0,00 ± 0,07	3	0,00 ± 0,08	3
URMD2	5,45 ± 0,24 <sup>#</sup>	3	5,03 ± 0,70	3	-0,91 ± 0,25	3	-1,61 ± 0,70	3

**Tabelle 4. 90: Zusammenfassung der  $\log(1/K_A)$ ,  $\log(1/K_A)$ , und  $\log(\tau/K_A)$ -Werte des allosterischen Fragmentes UR-MD-2 am CHO-Flp-M<sub>1</sub>-wt, M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala, M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala und M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala Rezeptor.**  $\log(1/K_A)$ : Transduktionskoeffizient nach Kenakin et al. 2012, die Werte wurden ermittelt mit Hilfe von Gleichung 37;  $\log(\tau/K_A)$ : normalisierter Transduktionskoeffizient  $\log(\tau/K_A)$  der zu untersuchenden Substanzen nach Kenakin et al. 2012, die Werte wurden ermittelt mit Hilfe von Gleichung 38;  $\log(\tau/K_A)$ : Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$ - und  $G_s$ -Signalwegsaktivierung, die Werte wurden ermittelt mit Hilfe von Gleichung 39; n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde mit Hilfe von Gleichung 40 und 41. \*, \*\*\*, Wert signifikant verschieden von dem Wert für die  $G_q$ -Signalwegaktivierung (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ), #, ###: Wert signifikant verschieden von dem des Referenzagonisten ACh (t-Test, # $p < 0,05$ , ### $p < 0,001$ ).

Die Ergebnisse für  $\log(1/K_A)$  zeigten, dass UR-MD-2 am  $hM_1$ -Flp-wt-Rezeptor den  $G_q$ -Signalweg 14-fach und den  $G_s$ -Signalweg 11-fach schwächer aktiviert, als der Referenzagonist Acetylcholin (t-Test,  $p < 0,05$ , vgl. Tab. 4.90). Am  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  Rezeptor zeigte UR-MD-2 gegenüber ACh weder auf dem  $G_q$ -Signalweg, noch auf dem  $G_s$ -Signalweg, einen signifikanten Unterschied in der bezüglich  $\log(1/K_A)$  der Signalwegaktivierung (t-Test,  $p > 0,05$ ). Der Austausch der Aminosäure  $^{401}\text{Glu Ala}$  führte zu  $\log(1/K_A)$  Werten, die bedeuten, dass UR-MD-2 den  $G_q$ -Signalweg 8-fach- und den  $G_s$ -Signalweg sogar 41-fach schwächer aktiviert als der Referenzagonist ACh (t-Test,  $p < 0,05$ ).

Zur Quantifizierung einer Ligand-spezifischen Bevorzugung eines Signalweges gegenüber einem anderen, erfolgte schließlich die Subtraktion der für die jeweiligen Signalwege normalisierten Transduktionskoeffizienten ( $\log(1/K_A)$ ). Auf diesem Wege konnte durch den direkten Vergleich der Substanzen, eine Aussage hinsichtlich der Bevorzugung eines Signalweges stattfinden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.113 zusammengefasst. Die zugehörigen Parameterwerte finden sich in Tabelle 4.90. Der Vergleich der  $\log(1/K_A)$ -Werte zeigte, dass relativ zum Referenzagonisten Acetylcholin, der Modulator UR-MD-2 nur an der Mutation  $^{401}\text{Glu Ala}$  eine Abweichung der Nulllinie aufwies, die aber auf Grund des hohen Standardfehlers nicht signifikant war (t-Test,  $p > 0,05$ ). Der im  $G_s$ -Signalweg detektierte Funktionsverlust von UR-MD-2 an der Rezeptormutation  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  zeigte zudem, dass der Austausch der Aminosäure Tyrosin in der zweiten extrazellulären Schleife anscheinend zu einem vollständigen Verlust der  $G_s$  Proteinbindung führt.



**Abbildung 4. 113:** Graphische Darstellung der  $\log(1/K_A)$ -Werte zur Ermittlung eines durch das allosterische Fragment UR-MD-2 an CHO-Flp- $M_1$ -wt,  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  und  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$ -Rezeptoren induzierten „Ligand-Bias“. Differenz der normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$  und  $G_s$ -Signalwegaktivierung, dargestellt für ACh und UR-MD-2. Die  $\log(1/K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung 39 ermittelt. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus sechs unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde mit Hilfe von Gleichung 41 berechnet.

## 5 Diskussion

### 5.1 Der dynamische Wechsel zwischen der aktiven und der inaktiven Bindungsorientierung dualsterischer Hybridliganden erlaubt ein rationales Design von Partialagonismus am muskarinischen $hM_1$ -Rezeptor

#### 5.1.1 Charakterisierung der Bindungseigenschaften dualsterischer Iperoxo/BQCAd-Hybridliganden am muskarinischen $hM_1$ -Rezeptor

Dualsterische, agonistische Hybridliganden sind dadurch gekennzeichnet, dass sie über einen orthosterischen und einen allosterischen Molekülteil verfügen, welche über eine Zwischenkette miteinander verbunden sind. Eine Besonderheit dieser Liganden liegt in ihrer Fähigkeit, in zwei unterschiedlichen Orientierungen mit dem Rezeptorprotein interagieren zu können; der dualsterischen oder der rein allosterischen Bindungsorientierung (Antony et al. 2009; Mohr et al. 2010; Valant et al. 2012; Bock et al. 2014a; Bock et al. 2016). Liegt die dualsterische Bindungsorientierung vor, so bindet der orthosterische Baustein an der orthosterischen und der allosterische Baustein im Bereich der allosterischen Bindungsstelle, wohingegen im Fall der rein allosterischen Bindungsorientierung nur der allosterische Baustein des Hybrides mit der allosterischen Bindungsstelle interagiert, die orthosterische Bindungsstelle jedoch unbesetzt bleibt (Antony et al. 2009; Mohr et al. 2010; Valant et al. 2012). Zwischenzeitlich konnte für den muskarinischen  $hM_2$ -Rezeptor beschrieben werden, dass die Bindungsorientierung eines dualsterischen Liganden nicht festgelegt ist, sondern zwischen dem dualsterischen und dem rein allosterischen Bindungsmodus wechseln kann (Bock et al. 2014a; Bock et al. 2016). Wird angenommen, dass die dualsterische Bindungsorientierung die aktive Rezeptorkonformation ist und die G Protein-Aktivierung bewirkt und die rein allosterische Bindungsorientierung die inaktive Rezeptorkonformation bewirkt und stabilisiert, so ist die Bindungsorientierung dieser Liganden nicht nur wichtig für die Affinität der *Rezeptorbindung* der Hybride, sondern ebenfalls von großer Bedeutung in Bezug auf die *Rezeptoraktivierung* und die Beeinflussung nachfolgender Effektor-Moleküle (Bock et al. 2014a). Am muskarinischen  $M_2$ -Rezeptor konnte der dynamische Wechsel zwischen der dualsterischen (also der aktiven) und der rein allosterischen (der inaktiven Bindungsorientierung) dualsterischer Hybridliganden als ein neues Werkzeug zum, bis heute nur selten erreichten, Design von Partialagonismus identifiziert werden (Bock et al. 2014a). Das Phänomen der dynamischen Ligandbindung konnte erstmals an Östrogen-Rezeptoren nachgewiesen werden (Bruning et al. 2010). Bruning und Kollegen konnten zeigen, dass manche Liganden in der Lage sind, durch eine unterschiedliche Ligand-Orientierung eine gemischte Population von Rezeptorkonformationen zu induzieren, die im Kollektiv die biologische Ligand-Aktivität bestimmt (Bruning et al. 2010). Anhand der von Bock und Mitarbeitern gewonnenen Erkenntnisse, dass der Wechsel der zwei funktionell völlig unterschiedlichen Bindungsorientierungen

dualsterischer Liganden am  $M_2$ -Rezeptor die Fähigkeit besitzt, abgestufte intrinsische Aktivität bzw. gezielten Partialagonismus zu induzieren, ist es ihnen gelungen, das Konzept der dynamischen Ligandbindung auf die therapeutisch hoch relevante Klasse A der GPCRs zu übertragen (Bock et al. 2014a). Molekular-dynamische (MD)-Simulationen konnten bestätigen, dass der von Bock und Kollegen untersuchte dualsterische Ligand Iper-6-naph in der Lage ist, in zwei komplett unterschiedlichen Bindungsmodi mit ein und demselben Rezeptorprotein zu interagieren: der dualsterische Iper-6-naph-Komplex führt zur Induktion eines aktiven Rezeptors, wohingegen der rein allosterische Iper-6-naph- $M_2$ -Rezeptor-Komplex eindeutig inaktiv ist (Bock et al. 2016). Zudem konnten die Autoren Belege dafür anführen, dass beide Typen von Agonist-Rezeptor-Komplexen in einer Rezeptorpopulation zur selben Zeit vorhanden sein können und sich in einem dynamischen Gleichgewicht befinden (Bock et al. 2016). Die Charakterisierung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgestellten dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden sollte zeigen, ob dieses Verhalten auch am muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptor beobachtet werden kann. Selektive Partialagonisten für den muskarnischen  $hM_1$ -Rezeptor könnten einen neuen Ansatz in Bezug auf die Entwicklung  $hM_1$ -selektiver parasympathomimetischer Anti-Alzheimer-Arzneimittel darstellen, da bekannt ist, dass die Verwendung von Partialagonisten an GPCR beispielsweise die Agonist-induzierte Rezeptorinternalisierung reduziert (January et al. 1997; January et al. 1998), die zu einer Abschwächung der mimetischen Wirkung führen kann. Zudem ist bekannt, dass der Einsatz von Partialagonisten neben der Desensitisierung auch die Anpassung der Zelle hinsichtlich Rezeptor-vermittelter Wirkstoffaktivitäten wie Toleranz und Abhängigkeit minimieren kann (January et al. 1997). Darüber hinaus ist bekannt, dass Partialagonismus ein derzeit diskutiertes Konzept in der Entwicklung weiterer über GPCR antipsychotisch wirkender Liganden darstellt (Mailman und Murthy 2010).

Ergebnisse aus funktionellen Experimenten zur dynamischen Massenumverteilung (DMR) einer vorangegangenen Arbeit (Holze, Masterarbeit 2013) konnten bereits zeigen, dass es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden um partialagonistisch wirkende Liganden am  $hM_1$ -Rezeptor handelt, die in der löslichkeitsbedingt höchsten einsetzbaren Konzentration einen Maximaleffekt  $E_{max}$  von 55-80% zeigten. In der vorliegenden Arbeit galt es erstmalig, einen Einblick in die Bindungsneigung und Bindungsorientierung der zu charakterisierenden Hybridsubstanzen am muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptorprotein zu erhalten, um Rückschlüsse über den von Bock und Mitarbeiter für den  $M_2$ -Rezeptor beschriebenen Mechanismus hinsichtlich eines durch dynamische Bindung dualsterischer Liganden induzierten Partialagonismus zu bekommen (Bock et al. 2014a). Um eine sichere Einschätzung darüber treffen zu können, welche Bindungsorientierung von den sieben Hybridliganden favorisiert wird, musste im Vorfeld sichergestellt sein, dass die dualsterischen Hybridliganden und die korrespondierenden allosterischen Fragmente in der Lage sind, mit Bereichen der allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptorproteins zu interagieren. Um eine Differenzierung der beiden

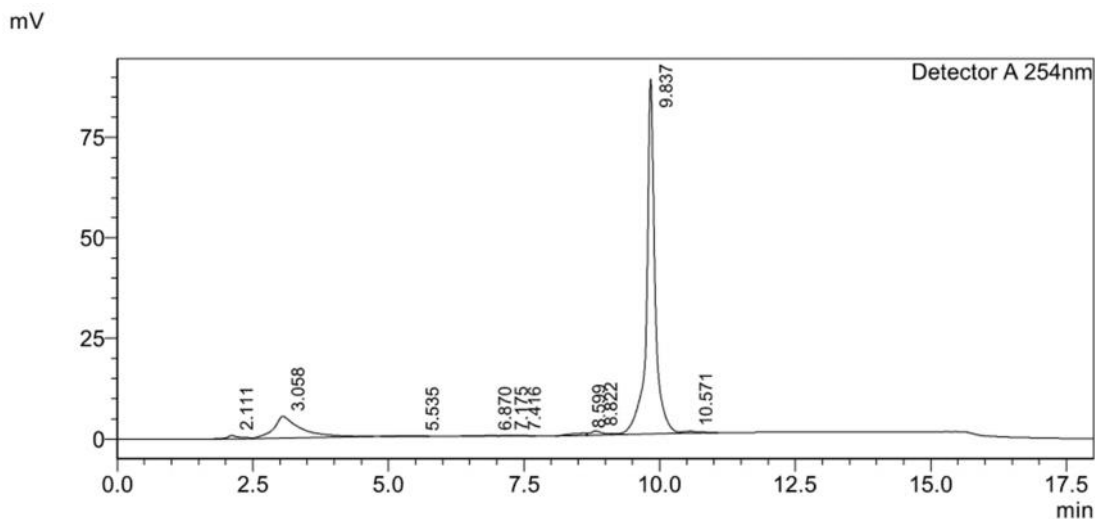
Bindungsorientierungen zu ermöglichen, sollte zudem sichergestellt sein, dass der orthosterische Baustein nicht mit der allosterischen Bindungsstelle interagiert (Antony et al. 2009; Bock et al. 2014a). Hierzu wurden die sieben Iperoxo/BQCAD-Hybride sowie die korrespondierenden Fragmente (BQCAD) dahingehend untersucht, ob sie in der Lage sind, die Dissoziation eines orthosterischen Liganden zu verzögern oder sogar vollständig zu inhibieren. Auf Grund der Tatsache, dass Liganden, die mit der allosterischen Bindungsstelle interagieren, typischerweise die Kinetik der Dissoziation orthosterischer Liganden verändern (zumeist verzögern), wurde schon früh für  $M_2$ -Rezeptoren postuliert, dass sich die allosterische Bindungsstelle im Gegensatz zur orthosterischen Bindungsstelle im extrazellulären Bereich des Rezeptorproteins befinden muss (Jakubik und Tucek 1994). Somit lässt sich die auftretende Dissoziationsverzögerung auf die Bildung sogenannter ternärer Komplexe, bestehend aus dem Rezeptor, dem orthosterischen und dem allosterischen Liganden zurückführen (bzw. im Falle von dualsterischen Liganden: des allosterischen Fragmentes oder der allosterischen Bindungsorientierung des dualsterischen Liganden); ein Phänomen, das hinsichtlich der Bindung allosterischer Liganden bereits für eine Vielzahl muskarinischer, allosterischer Liganden gezeigt werden konnte (Stockton et al. 1983; Nedoma et al. 1986; Jepsen et al. 1988; Ellis et al. 1991; Gnagey und Ellis 1996; Kostenis und Mohr 1996; Grossmuller et al. 2006). Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten kinetischen Experimente bestätigten, dass alle sieben dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden sowie ihre korrespondierenden allosterischen Fragmente in der Lage waren, die [ $^3$ H]NMS-Dissoziation signifikant zu verzögern. Ein Vergleich der Affinität der dualsterischen Hybride zum [ $^3$ H]NMS-besetzten Rezeptor mit derjenigen ihrer allosterischen Fragmente, zeigte in keinem Fall einen signifikanten Unterschied. Dies lieferte einen Hinweis darauf, dass sowohl das dualsterische Hybrid als auch das zugehörige allosterische Fragment mutmaßlich in der gleichen Bindungsorientierung mit dem  $hM_1$ -Rezeptor interagieren. Aus diesem Grund drängte sich im Rahmen dieser Arbeit die Annahme auf, dass sowohl die dualsterischen Hybride als auch die allosterischen Fragmente zu einer allosterischen Interaktion mit dem [ $^3$ H]NMS-besetzten  $hM_1$ -Rezeptor in der Lage sind. Festzustellen ist jedoch, dass die beiden allosterischen Bausteine JK 372-1 (gekennzeichnet durch einen Fluor-Substituenten) und JK 469 (gekennzeichnet durch eine Brom Substitution am Benzolring des allosterischen Fragmentes) mit  $n_{H,JK372-1} = -3,95 \pm 1,61$  und  $n_{H,JK469} = -3,21 \pm 0,87$  im Rahmen dieser Dissoziationsexperimente eine Kurvensteilheit signifikant kleiner als  $n_H = -1$  aufwiesen und dies auch in ihren Gleichgewichtsbindungsexperimenten taten (vgl. 4.1.2.1 und 4.1.3.1). Anders als bei den kinetischen Experimenten trat das Phänomen steiler Kurven bei den [ $^3$ H]NMS-Gleichgewichtsbindungsexperimenten sogar bei der Mehrzahl der charakterisierten allosterischen Hybrid-Fragmente (BQCAD) auf.

Auf Grund der schlechten Löslichkeit sowohl der allosterischen Fragmente (BQCAD) als auch der korrespondierenden dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybride musste das Lösungsmittel DMSO verwendet werden. Ein Löslichkeitsproblem als Ursache für die extrem steilen Kurvenverläufe der Substanzen ist jedoch unwahrscheinlich, da sie in Dissoziationsexperimenten und

Gleichgewichtsbindungsexperimenten nicht immer korrespondierend zu beobachten waren. Die steilen Kurvenverläufe in den Dissoziationsexperimenten zeigten sich nur bei zwei der sieben allosterischen Fragmente (JK 372-1, JK 496), wohingegen bei den Gleichgewichtsbindungsexperimenten bei fünf der sieben allosterischen Fragmente (JK 372-1, JK 496, JK 551, JK 544; JK 596) entsprechend steile Kurvenverläufe detektiert werden konnten. Zudem traten die steilen Kurven (bei gleichem DMSO Gehalt der jeweiligen Verdünnung) auch bei geringeren oder gleichen Wirkkonzentrationen auf, verglichen mit den Kurven deren Steigung sich nicht signifikant von einem Hillkoeffizienten von  $n_H = -1$  unterschieden. Dieser Befund spricht ebenfalls nicht für ein Löslichkeitsproblem der allosterischen Fragmente als Ursache ihrer steilen Kurven.

Da in allen Experimenten intakte, lebende Zellen verwendet wurden, könnte dies eine weitere, mögliche Erklärung für die hohen Kurvensteilheiten sein. Die höchsten eingesetzten Konzentrationen der allosterischen Fragmente (100  $\mu\text{M}$ ) lagen im Reaktionsansatz beispielsweise in 20%igem DMSO vor. In Kontrollexperimenten im Arbeitskreis mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen konnte während eines Zeitraumes von zwei bis neun Stunden kein messbarer Effekt hinsichtlich veränderter Gleichgewichtsbindungseigenschaften der Rezeptoren in den verwendeten Zellen nachgewiesen werden (mündliche Mitteilung M. Kepe). Weitere denkbare Erklärungen für die hohen Kurvensteilheiten wären eine Interaktion der allosterischen Fragmente mit weiteren Proteinen, oder aber eine im Rahmen der Versuche auftretende chemische Zyclisierungs-Reaktion. Die Reaktion der allosterischen Fragmente mit Iperoxo (zur Synthese der dualsterischen Hybride), wurde in der Gegenwart einer Base bei einer Temperatur von 55°C (6 bis 10 Tage) durchgeführt. Ein Ringschluss wurde im Rahmen dieser Synthese zu keinem Zeitpunkt detektiert (mündliche Mitteilung, Prof. Dr. M. Decker und Dr. X. Chen). Dies wiederum macht es unwahrscheinlich, dass die Reaktion der Bromo-Verbindungen des allosterischen Bausteins JK 532 (vgl. 2.11.5) in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten stattgefunden haben kann, bei denen es sich in der Regel um Inkubationszeiten von zwei bis neun Stunden bei 28 °C handelte (vgl. 3.2.4.2). Des Weiteren handelt es sich bei den allosterischen Bausteinen (BQCAD) weder um reaktive Zwischenprodukte noch verfügen sie über eine schnelle Reaktivität (mündliche Mitteilung, Prof. Dr. M. Decker, Dr. X. Chen). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass, auch wenn die Alkyl-Bromide der allosterischen Fragmente eher träge sind, sie nicht doch mit stärkeren Nukleophilen, wie den Seitenketten der Aminosäuren Lysin oder Cystein des Rezeptorproteins interagieren. Allerdings würde dies unrealistische Reaktionsbedingungen erfordern. In keinem der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnte dieser Fall nachgewiesen werden, da die Ganzzellexperimente stets bei Temperaturen von 28°C und in einem physiologischen Versuchsmedium bei pH 7,4 durchgeführt wurden. Um dennoch solche Interaktionen auszuschließen, wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. M. Decker Interaktionsuntersuchungen HPLC mit GC/MS Detektion durchgeführt, welche die Reaktivität der Fragmente mit dem Tripeptid Glutathion als

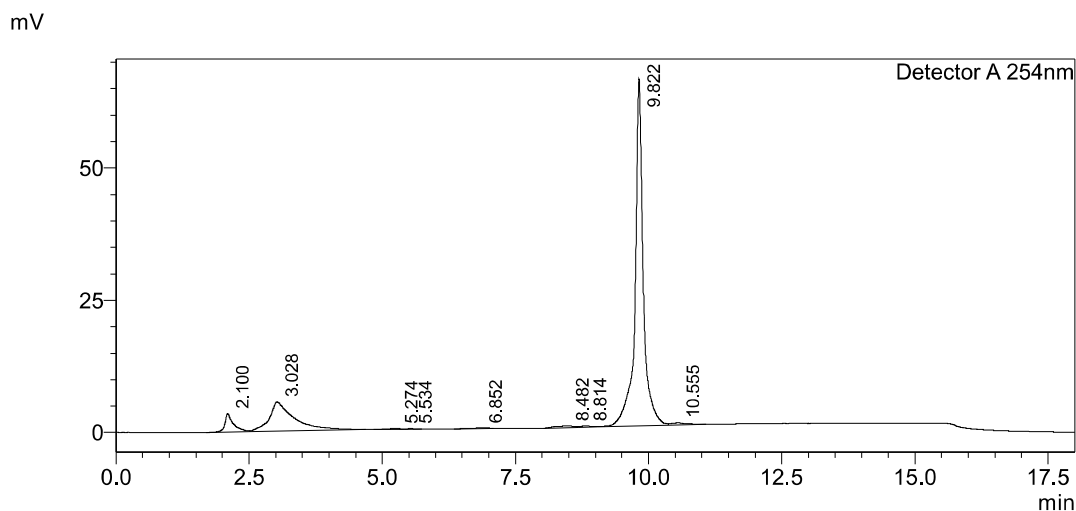
Substitut für das Rezeptorprotein zeigen sollten. Wäre hierbei eine Interaktion nachweisbar gewesen, hätten die hohen Kurvensteilheiten auf eine chemische Interaktion der Bausteine mit dem Rezeptorprotein zurückgeführt werden können. Als Referenz der sieben allosterischen BQCAD-Fragmente diente JK 532. Als Puffer diente der im Rahmen dieser Arbeit in den Bindungsexperimenten an ganzen Zellen verwendete HBSS + Hepes (20 mM)-Puffer (L14). Die Herstellung der Testlösungen der zu untersuchenden Substanz JK 532 erfolgte in DMSO (1 mM) die von Glutathion in H<sub>2</sub>O (1 mM). (Methode: Wasser/Methanol, 1 ml/min Durchflussrate, Gradient 5-90%, 18min, MS Scan 100-1000). Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.1 unter Kontrollbedingungen und in Abb. 5.2 nach der Inkubation mit Glutathion dargestellt. Der Peak mit RT 2,11 in Abbildung 5.1 zeigt die Blindprobe, die im Falle dieses Experimentes dem verwendeten Puffer entspricht. Der Wert bei 3,06 entspricht der Basallinie, wohingegen der RT-Wert von 9,84 dem allosterischen Fragment JK 532 entspricht.



**Abbildung 5. 1: Ergebnis der HPLC mit GC/MS Detektion des allosterischen Fragmentes JK 532 nach vierstündiger Inkubation bei 28°C.** Verwendete Methode: Wasser/Methanol, 1 ml/min Durchflussrate, Gradient 5-90%, 18min, MS Scan 100-1000. Beschreibung der Ergebnisse, vgl. Text.

In Abbildung 5.2 ist das Ergebnis der HPLC GC/MS Detektion von JK 532 zusammen mit Glutathion nach einer vierstündigen Inkubation bei 28°C und konstantem Schütteln mit 400 rpm dargestellt. Auch hier entsprechen der RT-Wert bei 2,10 der Blindprobe und der RT-Wert von 3,03 der Basislinie. Der RT-Wert von 9,82 kann dem allosterischen Fragment JK 532 zugeordnet werden.





**Abbildung 5. 2:** Ergebnis der HPLC mit GC/MS Detektion des allosterischen Fragmentes JK 532 und Glutathion nach vierstündiger Inkubation bei 28 °C. Verwendete Methode: Wasser/Methanol, 1 ml/min Durchflussrate, Gradient 5-90%, 18 min, MS Scan 100-1000. Beschreibung der Ergebnisse, vgl. Text.

Zusammenfassend konnten diese Experimente zeigen, dass sich nach einer Inkubation von vier Stunden bei 28 °C weder eine Veränderung in den LC-Graphen ergab noch irgendwelche mutmaßlichen Produkte wie Ether, Amine oder Ester, abgeleitet aus kovalenten Reaktionen des untersuchten allosterischen Fragmentes JK 532 mit Glutathion, detektiert werden konnten. Somit konnte auch dieser Erklärungsansatz ausgeschlossen werden.

Vor dem Hintergrund, dass in allen Experimenten intakte, lebende Zellen verwendet wurden, bleibt die Ursache für die große Kurvensteilheit vorläufig unklar. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Kontrollexperimente zur Rezeptorbindung des Antagonisten [<sup>3</sup>H]NMS über acht Stunden können dennoch nicht ausschließen, dass es im Laufe der Experimente zu Internalisierungen von Rezeptoren gekommen ist. Auf Grund der auch nach 8 Stunden nicht veränderten Bindungsparameter  $\log K_D$  und  $B_{\max}$  wurde zwar geschlossen, dass es keine Veränderungen in Bezug auf die Gesamtrezeptorzahl auf der Zelle gab, jedoch waren dies Bindungsexperimente mit einem Antagonisten, die im Vergleich zu Agonisten nicht oder nur in geringem Umfang Internalisierungen unterworfen sind (Maloteaux und Hermans 1994)

#### ***5.1.1.1 Die dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden weisen eine schwächere Bindungsneigung auf als ihr orthosterischer Baustein Iperoxo***

Ein Vergleich der Bindungsneigung in der dualsterischen Bindungspose ( $K_A$ , ermittelt mit Analyse a), b) und c), vgl. 3.2.4.2) der sieben untersuchten dualsterischen Hybridliganden ergab durchgehend Affinitäten, die niedriger waren, als die ihres orthosterischen Bausteines Iperoxo (vgl. Anhang, Kapitel 9.1, Abb. 9.1 (B)). Eine Beobachtung, die auch bei dualsterischen Liganden wie McN-A-343 (Valant et al. 2008) und Iper-6-naph sowie Iper-6-phth (Antony et al. 2009) am muskarinischen  $hM_2$ -Rezeptor

gemacht werden konnte. Die Besetzung des  $hM_1$ -Rezeptors durch das dualsterische Hybrid an zwei Bindungsstellen könnte zu der Annahme führen, dass es durch die Verbindung eines orthosterischen Agonisten mit hoher Affinität wie Iperoxo mit einem zusätzlichen allosterischen Baustein zu einer Zunahme der Affinität gegenüber Iperoxo allein kommt. Steinfeld und Kollegen konnten diese These mit den dualsterischen Antagonisten THRX-160209 und THRX-198321 bestätigen (Steinfeld et al. 2007; Steinfeld et al. 2011). Die dort detektierte Zunahme der Bindungsneigung führten die Autoren auf eine ansteigende Zahl von Anlagerungspunkten dieser heterobivalenten Liganden mit dem Rezeptor zurück. Eine weitere Erklärung für eine derartige Zunahme wäre eine positive, intramolekulare orthosterisch/allosterische Kooperativität (Bock und Mohr 2013). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Abnahme der Affinität der dualsterischen Liganden gegenüber dem orthosterischen Baustein lässt sich durch zwei Mechanismen erklären. Eine Möglichkeit besteht darin, dass es durch die beiden unterschiedlichen Bausteine zur Induktion unterschiedlich funktioneller Rezeptorkonformationen kommt. Während der orthosterische Baustein Iperoxo eine aktive Rezeptorkonformation induziert, führt der allosterische Baustein (BQCAD) vermutlich zur Induktion einer inaktiven Rezeptorkonformation. Ein Befund, der auch durch die Gleichgewichtsbindungsexperimente mit dem Radioagonisten [ $^3H$ ]Iperoxo und den unterschiedlichen allosterischen Fragmenten (BQCAD) gestützt werden konnte (vgl. 4.1.8.2.3). Die dort nachgewiesene Inhibition des Radioagonisten [ $^3H$ ]Iperoxo durch die allosterischen Fragmente lässt es wahrscheinlich erscheinen, dass die negative Kooperativität der Bausteine auch intramolekular in den dualsterischen Hybriden mit dem vorhandenen orthosterischen Baustein Iperoxo auftritt. Auch Untersuchungen am durch ACh besetzten  $hM_1$ -Rezeptor konnten für das ausgewählte Hybridpaar JK 550 und JK 537 bestätigen, dass sowohl die Bindung des allosterischen Fragmentes, als auch des jeweiligen dualsterischen Hybrides zu einer negativen Kooperativität sowohl mit der Bindung von [ $^3H$ ]NMS als auch mit derjenigen von ACh führte (vgl. 4.1.8.1). In Hinsicht auf die Entwicklung dualsterischer Liganden als neue Arzneistoffe stellt die Verwendung allosterischer Bausteine, die eine negative Kooperativität mit orthosterischen Agonisten aufweisen insofern einen Vorteil dar, als dass die Bildung ternärer Komplexe (bestehend aus Rezeptor, dualsterischem Hybrid in der allosterischen Bindungsorientierung und dem endogenen Agonisten) reduziert wird (Antony et al. 2009).

Die zweite mögliche Ursache für die im Vergleich zum orthosterischen Baustein Iperoxo reduzierte Affinität der sieben untersuchten Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden könnte auch eine nicht optimale Länge der verwendeten Zwischenkette sein, die den allosterischen und den orthosterischen Baustein verbindet. Der Verlust hinsichtlich der Bindungsneigung des Hybrides gegenüber Iperoxo könnte beispielsweise durch die Verlängerung der Zwischenkette kompensiert werden. So konnte für den  $hM_2$ -Rezeptor gezeigt werden, dass die Verlängerung der Zwischenkette in Iper-6-naph sowie Iper-6-phth um zwei Kohlenstoffatome zu Iper-8-naph, Iper-8-phth zu höheren Affinitäten führte (Bock et al. 2012). In Übereinstimmung mit diesen Befunden konnten Steinfeld und Kollegen für das dualsterische Antagonist-Hybrid THRX-198321 ebenfalls eine höhere apparente Gesamtbindungsneigung ( $pK_{i,app}$ )

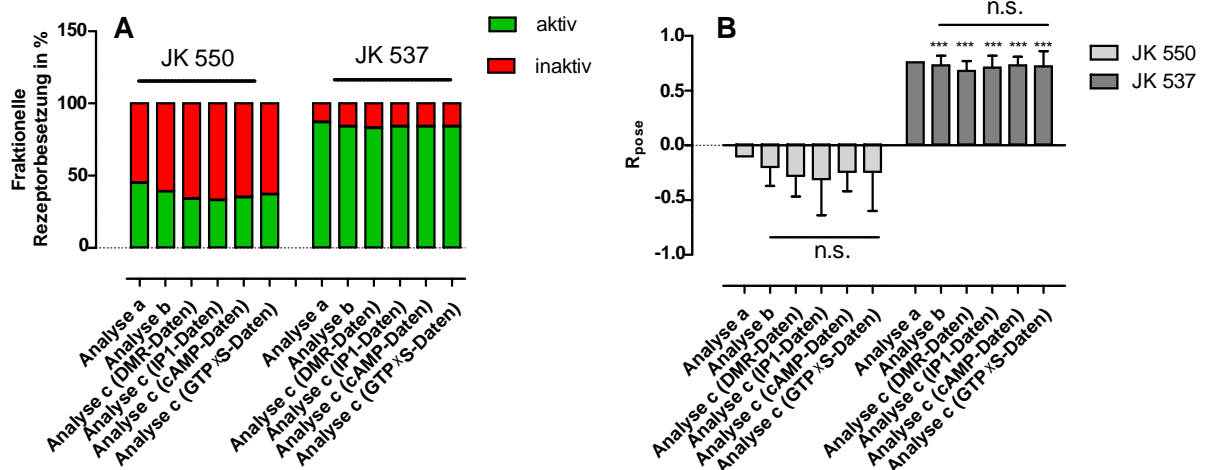
finden als für seine kürzeren Derivate ( $< C_9$  Zwischenkette) (Steinfeld et al. 2011). Dualsterische Liganden (bestehend aus dem  $M_1/M_4$ -selektiven orthosterischen Agonisten Xanomelin und dem allosterischen Agonisten 77-LH-28-1) liefern ebenfalls Hinweise auf den Zusammenhang zwischen dem  $pK_i$ -Wert des Liganden und Länge der verwendeten Zwischenkette (Bonifazi et al. 2014). Eine Zwischenkette bestehend aus sieben oder sogar neun Kohlenstoffatomen, bewirkte in dieser Substanzbibliothek die höchste Rezeptorbindungsneigung, die am muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptor signifikant höher war als diejenige des orthosterischen Bausteines Xanomelin. Zwischenkettenlängen von fünf und von elf Kohlenstoffatomen führten zu Affinitäten, die nicht verschieden waren von der des Xanomelins, wohingegen Zwischenkettenlängen von drei und 13 Kohlenstoffatomen zu einem signifikanten Verlust gegenüber der Affinität von Xanomelin führten (Bonifazi et al. 2014). Hinsichtlich der  $hM_1$ -Rezeptoraktivierung (maximale Ligand-induzierte FRET-Antwort in Prozent) konnten Messerer und Mitarbeiter kürzlich in FRET-Experimenten zeigen, dass eine Zwischenkette bestehend aus sechs Kohlenstoffatomen zwischen dem orthosterischen Baustein Iperoxo und einem allosterischen Fragment - abgeleitet von dem  $M_1$ -selektiven positiven allosterischen Modulator BQCA - verglichen mit Kettenlängen von  $C_4$  und  $C_8$  die optimale Länge darstellt (Messerer et al. 2017). So zeigt sich auch hier wieder die Bedeutung der in Bezug auf die Synthese dualsterischer Hybridliganden verwendeten Zwischenkette.

### **5.1.2 Der Parameter $R_{pose}$ als Maß für das Verhältnis zwischen aktiver und inaktiver Bindungspose bestätigt den dynamischen Wechsel der Orientierung zwischen JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ )**

Werden dualsterische Liganden mit partialagonistischem Verhalten in einem System mit dem Modell der dynamischen Ligandbindung (Bock et al. 2014a) untersucht, das über identische Bedingungen verfügt, bestimmen zwei Faktoren den resultierenden Grad des induzierten Partialagonismus, nämlich erstens das Ausmaß der Bindung und zweitens das Ausmaß der Signalwegaktivierung (Bock et al. 2014a). Ersteres umfasst den Unterschied in der Affinität für die aktive und die inaktive Bindungspose, parametrisiert durch die Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_A$  und  $K_B$  des dynamischen Liganden in der dualsterischen und der inaktiven Bindungspose, welcher die fraktionelle Größe der aktiven versus der inaktiven Rezeptorpopulation bestimmt. Die Berechnung der fraktionellen Rezeptorbesetzung für beide Orientierungen (vgl. 3.2.4.2) erlaubt es, diesbezügliche Änderungen struktur- und signalwegabhängig zu vergleichen. Bindet das dualsterische Hybrid beispielweise mit einer höheren Bindungsneigung in der dualsterischen Bindungspose als in der allosterischen Bindungsorientierung, liegt die aktive Rezeptorfraktion über 50%. Bindet das dualsterische Hybrid jedoch überwiegend mit einer höheren Bindungsneigung in der rein allosterischen Bindungspose, liegt die aktive Rezeptorfraktion unter 50% (Bock et al. 2014a). Ein statistischer Vergleich der fraktionellen Rezeptorbesetzungen ist aufgrund der Fehlerfortpflanzung der zu ihrer Berechnung notwendigen Parameterfehler jedoch erschwert. Eine alternative Möglichkeit

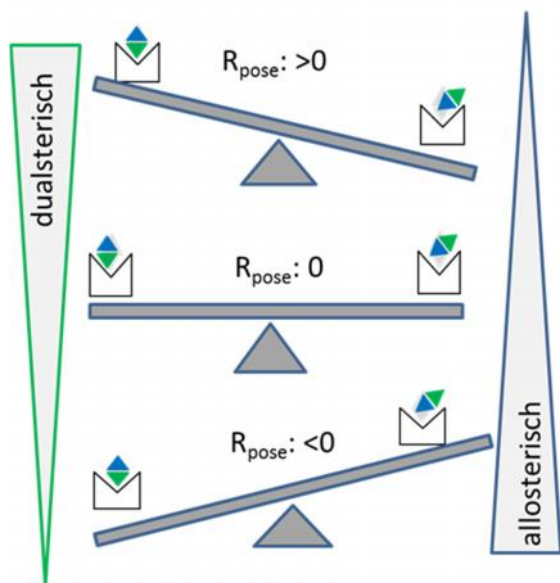
besteht darin, die Unterschiede in den Affinitäten mit Hilfe des Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Rezeptorbindungsorientierung  $R_{\text{pose}} = -\log(K_A/K_B)$  zu quantifizieren (Bock et al. 2014a). Alle drei im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Modelle erlaubten es, den Parameter  $R_{\text{pose}}$  zu bestimmen, jedoch konnte mit Hilfe von Analyse a) (Nichtlineare Datenanalyse einzelner Bindungskurven (vgl. 3.2.4.2)) auf Grund des in der Analyse als Konstante behandelten Parameters  $K_B$  kein Standardfehler angegeben werden, wodurch ein statistischer Vergleich und eine gesicherte Aussage über einen Unterschied in der Bindungsorientierung/Rezeptorfraction unmöglich waren. Die zweite und dritte im Rahmen dieser Arbeit neu vorgestellte globale, analytische Anwendung des Modells der dynamischen Ligandbindung (Analyse b) und c), vgl. 3.2.4.2) ermöglichte es erstmals, den Parameter  $K_B$  nicht als Konstante festzusetzen, sondern ihn mit einem Standardfehler (SEM) abzuschätzen. Somit war es möglich, einen statistischen Vergleich der  $R_{\text{pose}}$ -Werte unter den dualsterischen Hybriden durchzuführen, was in Bezug auf JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) eine Neuerung für dieses Hybridpaar in der vorliegenden Arbeit darstellt (Cheng, Klöckner und Holze et al. 2015)

Die Berechnung der maximalen, fraktionellen, orientierungsabhängigen Rezeptorbesetzung lieferte (bezogen auf das Hybridpaar JK 550 und JK 537) Hinweise auf einen durch die Verlängerung der Zwischenkette um zwei Kohlenstoffatome ( $C_2$ ) induzierten Orientierungswechsel von der überwiegend dualsterischen JK 537 ( $C_6$ ) in die allosterische JK 550 ( $C_4$ ) Bindungsorientierung (vgl. Abb. 5.3 (A)). Zeigte das kürzere dualsterische Iperoxo/BQCAD-Hybrid JK 550 durch die höhere Bindungsneigung der allosterischen Bindungsorientierung eine inaktive Rezeptorpopulation von über 50%, so sank diese bei JK 537 auf unter 20% ab. Um jedoch hinsichtlich dieses Ergebnisses eine eindeutige Aussage hinsichtlich einer statistischen Signifikanz treffen zu können, wurden neben der fraktionellen Rezeptorbesetzung auch die zuvor beschriebenen  $R_{\text{pose}}$ -Werte für JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) verglichen, die mit Hilfe der Analysen (b) und (c) (vgl. 3.2.4.2) ermittelten Gleichgewichtsdissoziationskonstanten  $K_A$  und  $K_B$  berechnet werden konnten (vgl. Abb. 5.3 (B)). Die auf diese Weise ermittelten  $R_{\text{pose}}$ -Werte bekräftigten die Vorstellung eines dynamischen Wechsels der Bindungsorientierung durch eine Zwischenkettenverlängerung bei diesem Hybridpaar und belegten damit, dass nicht nur die einzelnen Bausteine, sondern auch die Zwischenkette eine wichtige Rolle in der Generierung dualsterischer Liganden besitzt. Darüber hinaus ist dieser Orientierungswechsel der Hybridbindung unabhängig vom Signalweg, den der  $hM_1$ -Rezeptor aktiviert (vgl. 5.3 B).



**Abbildung 5. 3: Graphische Darstellung des Vergleichs der maximalen, fraktionellen Rezeptorbesetzung sowie der  $R_{\text{pose}}$ -Werte der dualsterischen Hybridliganden JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ), ermittelt mit den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten drei Analysemethoden (a, b und c).** (A): Maximale, fraktionelle Rezeptorbesetzung der beiden Hybride, berechnet auf Grundlage der mit Analyse a, b und c (vgl. 3.2.4.2) ermittelten Parameterwerte  $K_A$  und  $K_B$ . Grün: aktive Rezeptorkonformation, rot: inaktive Rezeptorkonformation. (B):  $R_{\text{pose}}$ -Werte der beiden Hybride JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ), berechnet auf Grundlage der mit Analyse a, b und c ermittelten Parameterwerte  $K_A$  und  $K_B$  (vgl. 3.2.4.2). n.s.: nicht signifikant verschieden (*one-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test*,  $p > 0,05$ ). \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der korrespondierenden Kenngröße  $R_{\text{pose}}$  des kürzeren Hybrides JK 550 ( $C_4$ ) (*t-Test*, \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Werden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Analysen b) und c) ermittelten Parameterschätzwerte für  $R_{\text{pose}}$  mit den Ergebnissen der jeweiligen fraktionellen Rezeptorbesetzung verglichen, konnten ferner folgende Zusammenhänge gefunden werden (vgl. Abb. 5.4): Besitzt  $R_{\text{pose}}$  einen positiven Wert, spricht dies für eine 50% übersteigende aktive Rezeptorpopulation, wohingegen ein negativer  $R_{\text{pose}}$ -Wert, wie er für JK 550 ermittelt werden konnte, für eine über 50%ige inaktive Rezeptorpopulation steht. Bindet der Ligand mit gleicher Bindungsneigung in der dualsterischen und allosterischen Bindungsorientierung, beträgt das Verhältnis zwischen aktiver und inaktiver Rezeptorpopulation (50/50%). Liegt dieser Zustand vor, so ist der  $R_{\text{pose}}$ -Wert Null (vgl. Abb. 5.4). Somit konnte demonstriert werden, dass die Berechnung des Orientierungsverhältnisses ( $R_{\text{pose}}$  durch globale Datenanalyse) es erlaubt, die Größe der Populationen der Rezeptororientierungen eines Hybridliganden abschätzen und statistisch miteinander vergleichen zu können.

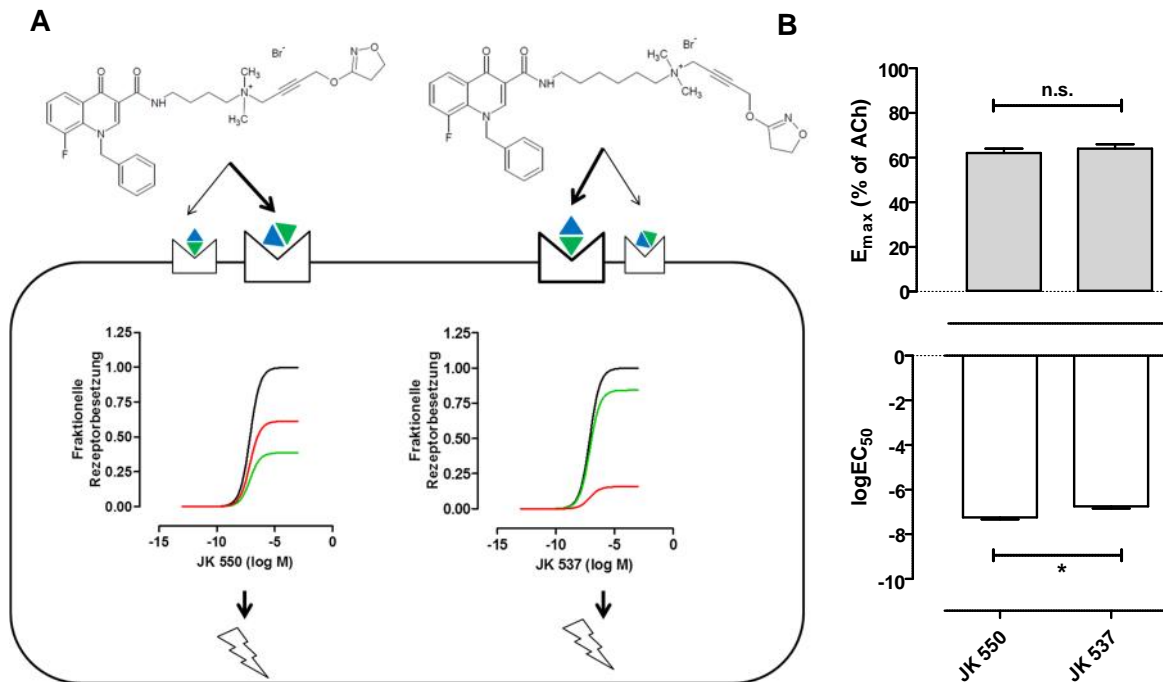


**Abbildung 5. 4: Schematisch Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem Parameter  $R_{\text{pose}}$  und der fraktionellen Rezeptorbesetzung induziert durch die Bindung dualsterischer Hybridliganden.** Beträgt die aktive Rezeptorfraktion mehr als 50%, nimmt der Parameter  $R_{\text{pose}}$  einen positiven Wert an. Bindet der Ligand mit gleicher Bindungsneigung in der dualsterischen und allosterischen Bindungsorientierung, liegt ein Gleichgewicht zwischen aktiver (50%) und inaktiver (50%) Rezeptorpopulation vor. Beträgt die aktive Rezeptorkonformation weniger als 50%, nimmt der Parameter  $R_{\text{pose}}$  einen negativen Wert an.

### 5.2.2 Der Wechsel der Bindungsorientierung zwischen JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) zeigt keinen Effekt auf den induzierten Maximaleffekt

Werden die Eigenschaften dualsterischer Liganden hinsichtlich der Interaktion mit dem Zielrezeptor betrachtet, konnten Bock und Mitarbeiter an  $M_2$ -Rezeptoren zeigen, dass - wie im vorherigen Abschnitt für neuartige Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden an  $hM_1$ -Rezeptoren bestätigt werden konnte - die Fraktion der jeweiligen Subpopulation von Rezeptoren durch das Affinitätsverhältnis zwischen dualsterischer (also aktiver signalfähiger) ( $K_A$ ) und allosterischer (und damit inaktiver) Bindungsorientierung ( $K_B$ ) des dualsterischen Liganden bestimmt wird (Bock et al. 2014a). Vorausgesetzt, dass nur der Ligand-Rezeptor-Komplex in der aktiven dualsterischen Pose an intrazelluläre Effektorproteine koppelt und daraus resultierend eine Signalantwort induzieren kann, ist der gemessene biologische Effekt eine Funktion des Orientierungsverhältnisses  $R_{\text{pose}}$  (Bock et al. 2014a). Dieser Arbeit vorangegangene Untersuchungen konnten, wie bereits erläutert, mit Hilfe der dynamischen Massenumverteilung (DMR) zeigen, dass es sich bei den zu charakterisierenden dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden um partial-agonistisch wirkende Substanzen am  $hM_1$ -Rezeptor handelt. Für die zuvor vorgestellten Hybridpaare JK 550 und JK 537 konnte für JK 550 ( $C_4$ ) ein  $E_{\text{max}}$ -Wert von  $62 \pm 2\%$  und für das längere Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) ein  $E_{\text{max}}$ -Wert von  $64 \pm 2\%$  ermittelt werden, die sich nicht signifikant voneinander unterschieden (t-Test,  $p > 0,05$ ) (vgl. Abb. 5.5 sowie Holze, Masterarbeit 2013). Ein Vergleich der Wirkstärke ( $\log EC_{50}$ ) in den dort durchgeführten Experimenten zeigte zudem, dass das kürzere Hybrid JK 550 ( $C_4$ ) sogar über eine signifikant höhere Wirkstärke (kleinerer  $\log EC_{50}$ ) verfügte (t-Test,  $p < 0,05$ , vgl. Abb. 5.5 (B)). Bock und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Zunahme inaktiver Hybrid-Rezeptor-Komplexe zu einer Reduktion der maximalen Hybrid-induzierten-Wirksamkeit „*efficacy*“ und die Zunahme dualsterischer Hybrid-Rezeptor-Komplexe zu einer Zunahme der Hybrid induzierten maximalen intrinsischen Wirksamkeit

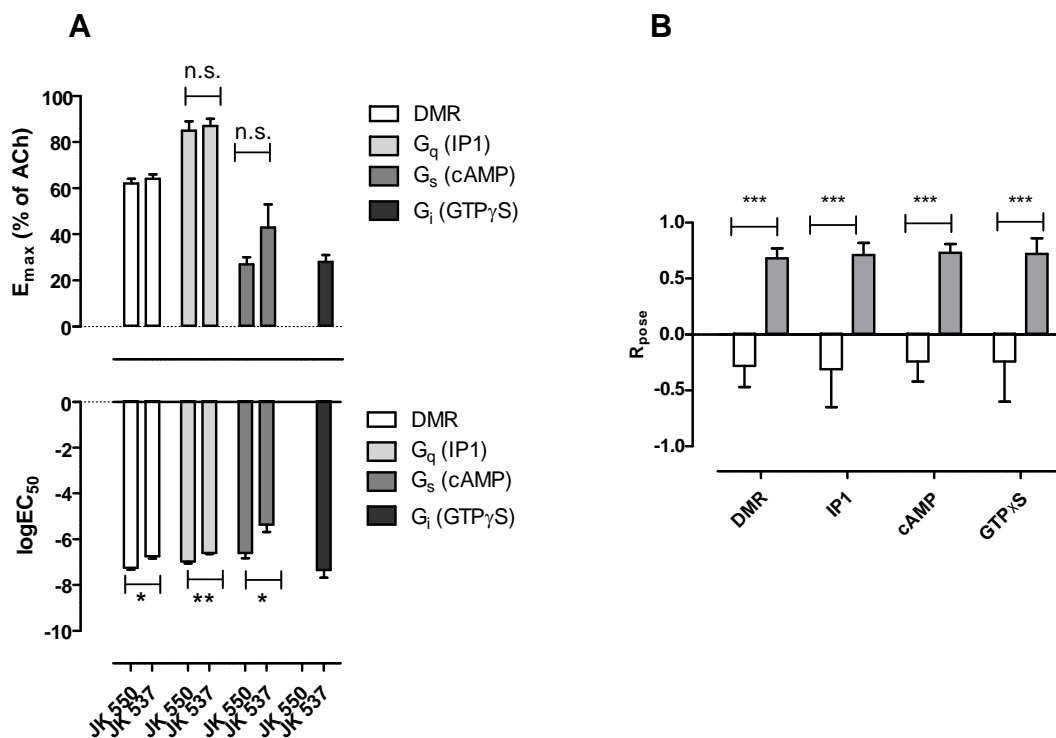
„*efficacy*“ führte. Auf Grund dieser Beobachtung schlussfolgerten sie, dass die Neigung des dualsterischen Liganden, eine rein allosterische Bindungsorientierung einzunehmen, ausschlaggebend sein muss für die von ihnen induzierte maximale intrinsische Wirksamkeit „*efficacy*“ (Bock et al. 2016). Ein Bild, das mit sich mit den für JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) ermittelten DMR-Daten interessanterweise nicht bestätigen ließ (vgl. Abb. 5.5 (A, B)).



**Abbildung 5. 5: Das dualsterische Hybridpaar JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) induziert signifikant unterschiedliche Fraktionen aktiver Rezeptoren, zeigt jedoch keine Unterschiede hinsichtlich der maximalen Rezeptoraktivierung ( $E_{max}$ ) im DMR Experiment.** (A): Das kürzere Hybrid JK 550 ( $C_4$ ) induziert eine signifikant geringere aktive Rezeptorfraktion (grüne Kurven; inaktive Fraktion: rote Kurven) im Vergleich mit dem um zwei Kohlenstoffatome längeren Hybrid JK 537 ( $C_6$ ). (B): Graphische Darstellung der in DMR-Experimenten durch modellunabhängige Datenanalyse ermittelten Parameterschätzwerte  $E_{max}$  und  $\log EC_{50}$  (Gleichung 12).  $E_{max}$ : Hybrid-induzierter Maximaleffekt und  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. \*: Wert signifikant verschieden von der jeweiligen Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 550 ( $C_4$ ) (t-Test, \*  $p < 0,05$ ); n.s.: Wert nicht signifikant verschieden von der jeweiligen Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 550 ( $C_4$ ) (t-Test,  $p > 0,05$ ).

Obwohl bekannt war, dass der muskarinische  $hM_1$ -Rezeptor nach der Bindung eines Agonisten eine  $G_q$ -abhängige Aktivierung der Phospholipase C bewirkt, konnte bereits vor einigen Jahren gezeigt werden, dass der  $hM_1$ -Rezeptor neben  $G_{q/11}$  auch  $G_{i/o}$ - (Offermanns et al. 1994; Akam et al. 2001), und  $G_s$ -Proteine (Burford und Nahorski 1996) aktivieren kann. Um den Einfluss der Bindungsorientierung der dualsterischen Hybridliganden auf die Rezeptoraktivierung weiter zu verifizieren und Hinweise auf den Mechanismus zu erhalten, der es JK 550 ( $C_4$ ) ermöglicht, trotz seiner signifikant geringeren dualsterischen Bindungsorientierung den  $hM_1$ -Rezeptor in gleichem Ausmaß zu aktivieren wie JK 537 ( $C_6$ ), wurden weitere, für die einzelnen Signalwege  $G_q$ ,  $G_s$  und  $G_i$  charakteristische Experimente durchgeführt.

In den Experimenten zur Detektion der spezifisch  $G_q$  Protein-vermittelten Hybrid-induzierten IP1-Akkumulation und der  $G_s$  Protein-vermittelten Hybrid-induzierten cAMP-Akkumulation fanden sich für dieses Hybridpaar im Vergleich zu den in DMR-Experimenten ebenfalls gleiche Maximaleffekte (vgl. Abb. 5.6 (A)). Zudem bestätigte sich auf beiden Signalwegen die signifikant höhere Wirkstärke des kürzeren dualsterischen Hybrides JK 550 (vgl. Abb. 5.6 (A)), das eine höhere inaktive Rezeptorfraktion induziert (vgl. Abb. 5.6 (B)).



**Abbildung 5. 6:** Trotz des niedrigeren  $R_{pose}$ -Wertes zeigt das dualsterischen Hybrid JK 550 ( $C_4$ ) die gleiche maximale Wirksamkeit und sogar eine signifikant höhere Wirkstärke auf dem  $G_q$ - und  $G_s$ -Signalweg als JK 537 ( $C_6$ ). Gegenüberstellung der Parameter (A)  $E_{max}$ : Hybrid-induzierter Maximaleffekt in Prozent des Effektes von ACh (100  $\mu$ M) und  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft und (B)  $R_{pose}$  Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Rezeptorbindungsorientierung,  $R_{pose} = -\log(K_A/K_B)$  aus globaler Kurvenanalyse nach Analyse c) (vgl. 3.2.4.2), der Hybride JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) unter Verwendung von DMR-Daten, Daten zur IP1-Akkumulation ( $G_q$ ), cAMP-Akkumulation- ( $G_s$ ) und der Förderung der [ $^{35}$ S]GTP S-Bindung ( $G_i$ ). Die Datenanalyse erfolgte im Falle von A mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) und B mit Hilfe der globalen Kurvenanalyse c) von Sets aus jeweils vier Kurven, für Details vgl. 3.2.4.2. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. n.s.: nicht signifikant verschieden von der jeweiligen Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 550 (t-Test,  $p > 0,05$ ), \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der jeweiligen Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 550 (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

Ein Unterschied zeigte sich dagegen bezüglich der mit Hilfe von [ $^{35}$ S]GTP S-Bindungsexperimenten ermittelten  $G_i$  Protein-Aktivierung. Hier konnte interessanterweise für das kürzere Hybrid kein Hinweis auf eine Signalwegaktivierung detektiert werden (vgl. Abb. 5.6 (A)). Zusammen mit der ebenfalls für JK 550 festgestellten bevorzugten allosterischen Bindungsorientierung (vgl. Abb. 5.6



(B)) ließ dies die Vermutung zu, dass JK 550 hinsichtlich der  $G_i$  Protein-Kopplung eine im Vergleich zu den sechs übrigen Hybridliganden verschiedenartige Konformation generiert.

Die Durchführung von [ $^{35}\text{S}$ ]GTP S-Experimenten wird zwar zum Nachweis der  $G_i$  Protein-Kopplung herangezogen, da G Proteine der  $G_i$ -Familie nachweislich über eine wesentlich höhere Rate des basalen Nukleotid-Austauschs aufweisen als andere G Proteine (Milligan, 2003), jedoch ist es aber wahrscheinlich, dass es gerade bei einem präferenziell  $G_q$ -gekoppelten Rezeptor zusätzlich zur Kopplung an weitere G Proteine kommen kann. So konnte C. Zimmermann zeigen, dass das mittels in [ $^{35}\text{S}$ ]GTP S-Bindungsexperimenten an CHO- $hM_1$ -Rezeptoren vermessene Signal sich zu 40% aus einem  $G_i$ -vermittelten Signalweg, zu etwa 17% aus einem  $G_s$  und etwa 43% aus dem  $G_q$  Protein vermittelten Signalweg zusammensetzt (Zimmermann, Masterarbeit 2012). Wäre dies der Fall, so hätte für JK 550 zumindest in [ $^{35}\text{S}$ ]GTP S-Bindungsexperimenten, entgegen dem gefundenen Ergebnis, ein deutliches Signal vorhanden sein müssen. Um eine eindeutige Aussage über die  $G_i$  Protein-Kopplung unter den Versuchsbedingungen treffen zu können, hätten spezielle [ $^{35}\text{S}$ ]GTP S-Bindungsexperimente mit nachfolgender Immunopräzipitation durchgeführt werden müssen (Milligan 2003). Alternativ könnten auch Experimente auf Basis von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) (Hein et al. 2005) oder Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET) (Galés et al. 2005; Audet et al. 2008; Galandrin et al. 2008) durchgeführt werden, die es ermöglichen, die Interaktion unterschiedlicher G Proteine zu untersuchen. Da der  $G_i$ -Signalweg nicht im Fokus der  $hM_1$ -Rezeptor vermittelten Wirkungen steht, wurde in der vorliegenden Arbeit die Ursache für das diesbezügliche Fehlen eines JK 550-Effektes jedoch nicht detaillierter untersucht.

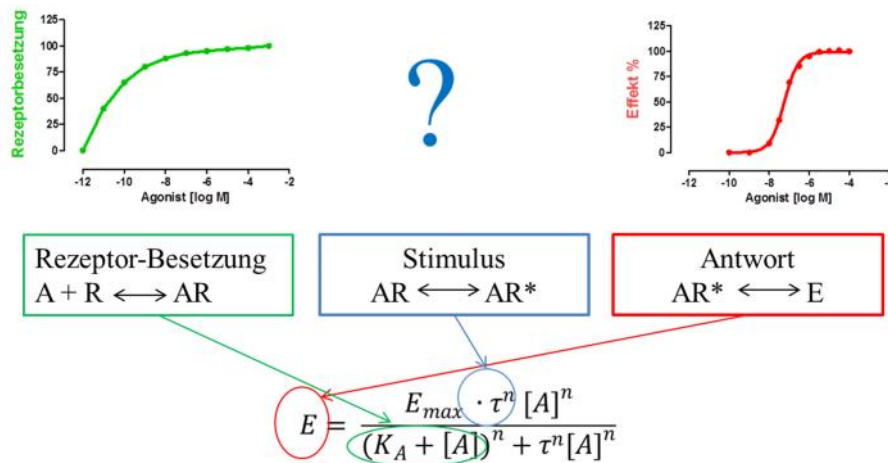
Da sich die allosterischen Bausteine der dualsterischen Liganden von dem positiven allosterischen Modulator BQCA ableiten, könnte ein dem BQCA analoges Verhalten der allosterischen Bausteine einen Ansatz zur Erklärung des nicht vorhandenen Unterschiedes zwischen JK 550 und JK 537 hinsichtlich ihrer Maximaleffekte liefern. Neben der Fähigkeit einer Steigerung der ACh- und CCh-induzierten Signalwegaktivierung (Shirey et al. 2009; Ma et al. 2009; Canals et al. 2012; Mistry et al. 2013; Yeatman et al. 2014) verfügt BQCA ebenfalls über die Fähigkeit, ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  den  $hM_1$ -Rezeptor allosterisch agonistisch ohne Anwesenheit eines orthosterischen Liganden zu aktivieren (Shirey et al. 2009; Ma et al. 2009; Mistry et al. 2013; Yeatman et al. 2014), ein Befund, der ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit sowohl in DMR- als auch in IP1-Akkumulations-Experimenten bestätigt werden konnte (vgl. Anhang, Kapitel 9.5.1; Abb. 9.7). Würden die allosterischen Fragmente wie BQCA über ein allosterisch agonistisches Verhalten verfügen, wäre die Annahme falsch, dass die Bindung der dualsterischen Iperoxo/BQCA-Hybridliganden in der rein allosterischen Bindungsorientierung eine rein inaktive Rezeptorpopulation induziert. Unter dieser Vorstellung würde sowohl die dualsterische, als auch die rein allosterische Bindungsorientierung des dualsterischen Hybrides zur Induktion der aktiven Rezeptorkonformation und damit zu einer Aktivierung nachfolgender Effektorproteine führen (Bock et al. 2014a). Um sicherzustellen, dass die dualsterischen

Iperoxo/BQCA-Hybridliganden, vor allem aber JK 550 und JK 537 die Aktivierung des  $hM_1$ -Rezeptors ausschließlich durch ihren orthosterischen Baustein auslösen, wurden die allosterischen Fragmente ebenfalls hinsichtlich ihrer Fähigkeit überprüft, den  $hM_1$ -Rezeptor ohne die simultane orthosterische Bindung eines Agonisten zu aktivieren. Die Ergebnisse zeigten, dass alle untersuchten allosterischen Fragmente weder in Gegenwart einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  noch der höchsten eingesetzten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ , einen von Null signifikant unterschiedlichen Effekt aufwiesen (vgl. 4.1.7, t-Test,  $p > 0,05$ ). Werden diese Ergebnisse bezüglich der Effekte der allosterischen Fragmente mit ihren Gleichgewichtsbindungskurven verglichen (vgl. 4.1.3.1), zeigt sich für alle Substanzen ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  ein unteres Plateau, welches auf die Bildung ternärer Komplexe bestehend aus Rezeptor, Radioligand und allosterischem Fragment zurückzuführen ist. Demnach ist davon auszugehen, dass bei den in den funktionellen Experimenten eingesetzten Konzentrationen von 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  eine volle Besetzung des  $hM_1$ -Rezeptors durch die allosterischen Fragmente vorlag und damit ein potentieller allosterisch agonistischer Effekt hätte auffallen können. Im Falle von JK 550 kann somit davon ausgegangen werden, dass die ermittelten Maximaleffekte sowie Wirkpotenzen nicht auf eine Aktivierung des Rezeptors durch die allosterische Bindungsorientierung des Hybrides zurückzuführen sind. Da der orthosterische Baustein Iperoxo auf allen untersuchten Signalwegen ein vollagonistisches Verhalten aufwies, bestätigten diese Befunde zudem die dualsterische Interaktion der Hybridliganden.

Daher blieben auch nach diesen Befunden die zwei bereits erläuterten Fragen offen:

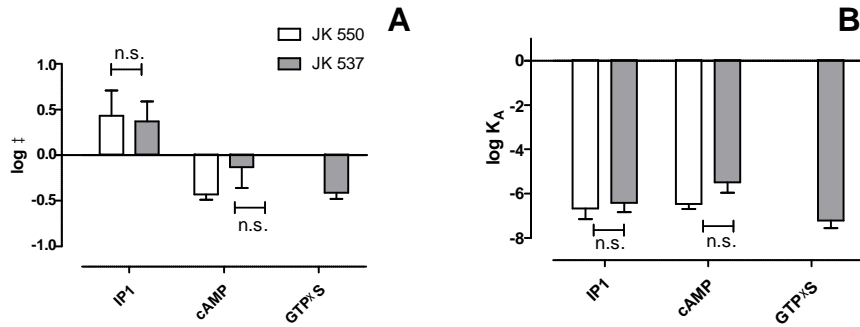
1. Warum zeigt sich bei dem dualsterischen Hybridliganden JK 550, dass eine signifikant höhere inaktive Rezeptorpopulation induzierte, sowohl in den zuvor durchgeführten DMR-Experimenten (Holze, Masterarbeit 2013) und auch auf dem  $G_q$ - und  $G_s$ -Signalweg kein erkennbarer Unterschied hinsichtlich des induzierten Maximaleffektes gegenüber JK 537 ?
2. Warum konnte sowohl im  $G_q$ - und  $G_s$ -Signalweg für JK 550 eine signifikant höhere Wirksamkeit detektiert werden?

Zur weiteren Auflösung und Erklärung dieser Fragen wurden die funktionellen Daten mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983) isoliert analysiert (vgl. Abb. 5.7). Diese Analyse erlaubt es, sowohl die Kopplungseffizienz als auch eine funktionelle Affinität der dualsterischen Hybride zu ermitteln. Mit dem Wissen, dass der  $EC_{50}$ -Wert, der mit Hilfe einer modellunabhängigen Gleichung („Vier-Parameter-logistische-Gleichung“; Gleichung 12) bestimmt wird, weder die Affinität  $K_A$  noch die Kopplungseffizienz zugänglich macht, war es unumgänglich, mit Hilfe eines Modells, das diese Parameter enthält, weitere Hinweise über den Mechanismus von JK 550 zu erlangen.



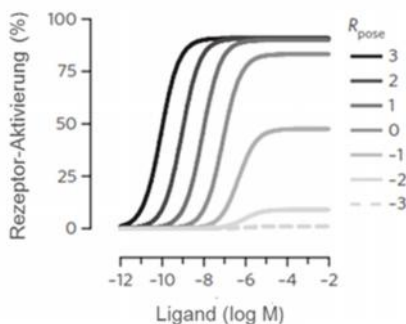
**Abbildung 5. 7: Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Rezeptorbesetzung, induziertem Stimulus und daraus resultierender Zellantwort in Bezug auf das „Operational Model of agonism“ (Black und Leff, 1983).** A: Ligand; R: Rezeptor (inaktiv); R\*: Rezeptor (aktiv);  $E_{max}$ : Maximal mögliche Antwort des Systems;  $\tau$ : Kopplungskonstante, ein Maß für Kopplungseffizienz;  $K_A$ : Funktionelle Affinität des Partialagonisten; n: Maß für die Steilheit der Kopplungsbeziehung („transducer slope“). Modifiziert nach Pineyro 2014.

Die Kopplungseffizienz beschreibt, wie effizient die Bindung eines agonistisch wirkenden Pharmakons in eine Zellantwort übertragen wird (Black und Leff 1983). Die Hypothese zur überschüssigen rein allosterischen Bindungspose des kürzeren dualsterischen Hybrides JK 550 ( $C_4$ ) bei gleichem Maximaleffekt ( $E_{max}$ ) in DMR-Messungen und auf dem  $G_q$ - und  $G_s$ -Signalweg ist, dass die Kopplungseffizienz zwischen dem am  $hM_1$ -Rezeptor gebundenen Hybrid JK 550 und dem  $G_q$  bzw  $G_s$  Protein deutlich höher sein muss als im Falle des dualsterischen Hybrides JK 537. In diesem Fall würde die höhere Kopplungseffizienz die kleinere aktive Rezeptorpopulation von JK 550 ausgleichen und damit helfen, den im Vergleich zu JK 537 gleichen Maximaleffekt zu erklären. Interessanterweise konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Hybriden hinsichtlich der von ihnen induzierten Kopplungseffizienz ausgemacht werden. Auch in Bezug auf die funktionelle Affinität  $K_A$ , ermittelt mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983), ließen sich keine Hinweise auf ein unterschiedliches Verhalten beider Hybride erhalten (vgl. Abb. 5.8 (A,B)).



**Abbildung 5. 8: Weder die Kopplungseffizienz noch die funktionelle Affinität lieferte eine Begründung für die durch JK 550 und JK 537 induzierten identischen Maximaleffekte auf dem G<sub>q</sub>- und dem G<sub>s</sub>-Signalweg.** Gegenüberstellung (A) des Parameters log τ: Kopplungseffizienz und (B) logK<sub>A</sub>: funktionelle Affinität der Hybride JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) unter Verwendung von Daten der IP1-Akkumulation, cAMP-Akkumulation- und der Förderung der [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindung. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983) und Gleichung 36, für Details vgl. 3.4. Die Datenpunkte sind Tabelle 4.21 (vgl. Kapitel 4.1.5) entnommen Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. n.s.: Wert signifikant verschieden von der jeweiligen Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 550 (t-Test, p>0,05).

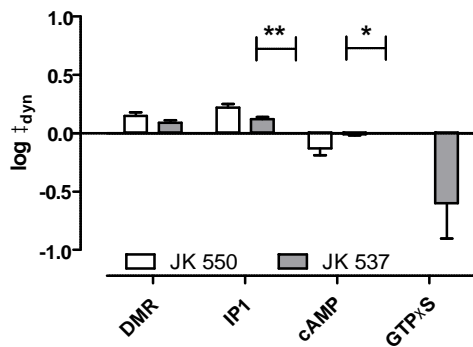
Dass dualsterische Liganden in mindestens zwei unterschiedlichen Orientierungen mit dem Rezeptorprotein interagieren können, die auf das Ausmaß der Rezeptoraktivierung unterschiedliche Auswirkungen haben können (verg. Abb. 5.9), ist mit Hilfe des Orientierungsverhältnisses R<sub>pose</sub> aktiver und inaktiver Rezeptorzustände beschrieben worden (Bock et al. 2014a). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist daher zusätzlich das von Bock und Mitarbeitern entwickelte „Operational Model of agonism for dynamic ligands“ angewendet worden (Bock et al. 2014a)(vgl. Abb. 5.9)



$$R_{pose} = -lg \left( \frac{K_{aktiv}}{K_{inaktiv}} \right)$$

**Abbildung 5. 9: Die Simulation von Konzentrations-Effekt-Kurven zeigen, dass die Aktivierung des Rezeptors durch dualsterische Liganden abhängig ist gemäß dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“ vom Orientierungsverhältnis R<sub>pose</sub>.** Modifiziert nach Bock et al. 2014a.

Dieses auf dem „Operational Model of Agonism“ von Black und Leff, (1983) fußende modifizierte Modell berücksichtigt den Wechsel zwischen aktiver und inaktiver Bindungspose eines dualsterischen Liganden R<sub>pose</sub>, da es neben K<sub>A</sub> auch K<sub>B</sub> berücksichtigt (vgl. Gleichung 20, 3.2.4.2). Die Analyse mit Hilfe dieses Modells erlaubte es, numerische Schätzwerte für  $\tau_{dyn}$ , den dynamischen Transduktionskoeffizienten zu ermitteln (vgl. Abb. 5.10).



**Abbildung 5. 10: Die dynamische Kopplungseffizienz liefert keine Hinweise auf den durch JK 550 induzierten identischen Maximaleffekt im G<sub>q</sub>- und G<sub>s</sub>- Protein vermittelten Signalweg.** Gegenüberstellung des Parameters log τ<sub>dyn</sub>: dynamische Transduktionskoeffizient der Hybride JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) unter Verwendung von Daten zur DMR, IP1-Akkumulation, cAMP-Akkumulation und [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindung. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der globalen Kurvenanalyse von Sets aus jeweils vier Kurven, für Details vgl. 3.2.4.2. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Datenpunkte sind Tabelle 4.43 (vgl. Kapitel 4.1.9.2) entnommen. \*, \*\*: Wert signifikant verschieden von der jeweiligen Kenngröße des kürzeren Hybrides JK 550 (t-Test, \*p<0,05; \*\*p<0,01). Weitere Details im Text.

Die Untersuchung der dualsterischen Hybride hinsichtlich ihrer Fähigkeit der Rezeptoraktivierung in unterschiedlichen Signalwegen erlaubte es, dynamische Transduktionskoeffizienten für DMR-Messungen sowie für den G<sub>q</sub>-, den G<sub>s</sub>- und G<sub>i</sub>-Signalweg zu ermitteln und zu vergleichen. Interessanterweise zeigte der dynamische Transduktionskoeffizient des kurzen dualsterischen Hybrides JK 550 (C<sub>4</sub>) auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg einen signifikant höheren Wert als der des längeren Hybrides JK 537 (C<sub>6</sub>). Das liefert keine Erklärung für die in diesem Signalweg nicht signifikant unterschiedliche, maximale Wirksamkeit E<sub>max</sub>, (vgl. Abb. 5.6). Anders als es bei der G<sub>q</sub> Protein-Kopplung beobachtet werden konnte, zeigte das längere dualsterische Hybrid JK 537 (C<sub>6</sub>) eine signifikant höhere Kopplungseffizienz auf dem G<sub>s</sub>-Weg als das kürzere Hybrid JK 550. Dieser Befund liefert aber keine Erklärung für die in diesem Signalweg nicht signifikant unterschiedliche intrinsische Wirksamkeit E<sub>max</sub>. Der dynamische Transduktionskoeffizient, der auf Basis der DMR-Daten ermittelt wurde (vgl. Chen, Klöckner und Holze et al. 2015), zeigte keine signifikanten Unterschiede, vermutlich, weil es sich bei dem im Rahmen dieser Experimente ermittelten Signal um ein Mischsignal (G<sub>q</sub>: positiv gerichtete Signalsignaturen; G<sub>s</sub>; negativ gerichtete Signalsignaturen) aus G<sub>q</sub>- und G<sub>s</sub>-Signalweg handelt, dessen Komponenten entgegenlaufend sind (Schroder et al. 2010; Schröder et al. 2011).

Die Tatsache, dass die Signalauslösung durch dualsterische Liganden nicht nur von der Bindungswahrscheinlichkeit in der dualsterischen und damit aktiven Rezeptorkonformation abhängig ist, sondern auch von der rezeptorvermittelten, intrinsischen Aktivität, die durch den Liganden in der dualsterischen Rezeptorbindungspose generiert wird (Bock et al. 2014a), lieferte uns einen weiteren Ansatzpunkt, den Mechanismus des durch die dualsterischen Iperoxo/BQCAAd-Hybride JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) induzierten Partialagonismus aufdecken zu können.

Die Effizienz eines Liganden nach seiner Rezeptorbesetzung einen Signalweg zu aktivieren, wird auch durch den Parameter  $\tau$  ausgedrückt und ko-dominiert das Ausmaß sowie den Grad des induzierten Partialagonismus (Bock et al. 2014a). Zeigt beispielsweise ein dualsterischer Ligand dieselbe intrinsische Wirksamkeit „*efficacy*“ (E<sub>max</sub>) wie ein klassischer Vollagonist, wird hauptsächlich das

beobachtete Orientierungsverhältnis  $R_{\text{pose}}$  das Maß der Rezeptoraktivierung bestimmen (Bock et al. 2014a). Weist ein dualsterischer Ligand an einem Rezeptor eine geringere Wirksamkeit „*efficacy*“ als Vollagonisten auf (beispielsweise auf Grund einer geringeren Stabilisierung des aktiven Rezeptorzustandes), dann wird auch die volle Besetzung der Rezeptoren in der aktiven Rezeptorkonformation nur zu einem Partialagonismus führen (Bock et al. 2014a). Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die intrinsische Aktivität eines dualsterischen Liganden entsprechend der theoretischen Vorgaben des „*Operational Model of agonism for dynamic ligands*“ (Bock et al. 2014a) auf experimenteller Ebene noch weiter zu differenzieren. Betrachten wir den Parameter  $\tau_{\text{dyn}}$  und seine Definition genauer, zeigen sich folgende Zusammenhänge (Bock et al. 2014a):

$$\tau_{\text{dyn}} = \tau_{\text{max}} \cdot \frac{K_B}{K_A + K_B}$$

Maximale intrinsische Aktivität; wenn  $R_T/K_E = 1$   $\epsilon_{\text{max}}^*$

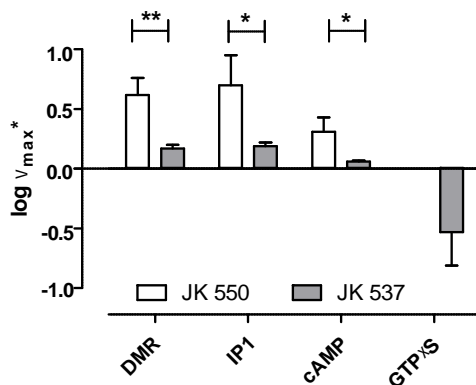
$$\frac{\epsilon_{\text{max}} \cdot R_T}{K_E} \cdot \frac{K_B}{K_A + K_B}$$

Rezeptorreserve

**Abbildung 5. 11: Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen dem dynamischen, bzw. maximalen Transduktionskoeffizienten und der maximalen intrinsischen Aktivität, induziert durch einen dualsterischen Liganden am Rezeptorprotein.**  $\tau_{\text{dyn}}$ : dynamischer Transduktionskoeffizient des Liganden.  $\tau_{\text{max}}$ : maximaler Transduktionskoeffizient des dynamischen Hybridliganden bei 100%iger Besetzung der Rezeptoren in der aktiven (dualsterischen) Pose.  $\epsilon_{\text{max}}^*$ : systemunabhängige maximale intrinsische Aktivität des dynamischen Hybridliganden bei 100%iger Besetzung der Rezeptoren in der aktiven Pose.  $K_A$ : kennzeichnet die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des aktiven Hybrid-Rezeptorkomplexes und repräsentiert die Affinität des Hybridliganden in der aktiven Bindungspose.  $K_B$ : kennzeichnet die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des inaktiven Hybrid-Rezeptorkomplexes und repräsentiert die Affinität des Hybridliganden in der inaktiven Bindungspose. Weitere Erläuterungen, vgl. Text.

Demnach ist die dynamische Kopplungseffizienz ein Produkt aus  $\tau_{\text{max}}$ , dem maximalen Transduktionskoeffizienten, der sich aus der 100%igen Rezeptorbesetzung des Hybridliganden in der aktiven Pose ergibt (Bock et al. 2014a) und der Fraktion der Ligand-Rezeptor Komplexe in der aktiven Bindungspose. Der Parameter  $\tau_{\text{max}}$  wiederum lässt sich weiter untergliedern in die systemunabhängige maximale intrinsische Aktivität des dynamischen Liganden bei 100%iger Besetzung in der dualsterischen Pose  $\epsilon_{\text{max}}^*$  und die systemabhängige Komponente  $R_T/K_E$  (vgl. Abb. 5.11). Gleiche Versuchsbedingungen sowie Zelllinien erlaubten uns, zur Berechnung einer systemunabhängigen maximalen intrinsischen Aktivität  $\epsilon_{\text{max}}^*$  den Quotienten  $R_T/K_E$  als eine Variable auf einen Wert von 1 festzusetzen, um auf diese Weise die Rezeptorreserve darzustellen. Durch dieses Vorgehen war es mit Hilfe der globalen Datenanalyse möglich, erstmalig einen numerischen Schätzwert für den Parameter  $\tau_{\text{max}}$  zu ermitteln, der auf Grund der zuvor beschriebenen Festlegung der Rezeptorreserve im Rahmen dieser Arbeit als  $\tau_{\text{max}}^*$  bezeichnet wurde (vgl. Abb. 5.11). Dieser neu definierte Parameter erlaubte es erstmalig, die dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden hinsichtlich ihrer rezeptorvermittelten, systemunabhängigen maximalen intrinsischen Aktivität des dualsterischen Hybrides bei 100%iger Besetzung in der dualsterischen Pose sowohl zwischen den unterschiedlichen Signalwegen als auch

unter den Hybriden zu vergleichen. Wie in Abbildung 5.12 dargestellt, konnte für das kürzere Hybrid JK 550 mit Zugrundelegung der DMR-Daten ( entnommen aus Chen, Klöckner und Holze et al. 2015) und auch der IP1 ( $G_q$ )- und cAMP ( $G_s$ )-Akkumulationsexperimente eine im Vergleich zu JK 537 signifikant höhere intrinsische Aktivität ermittelt werden, die erstmalig eine Erklärungsmöglichkeit lieferte, wie es dem überwiegend allosterisch orientiert bindenden Hybrid möglich war, die gleiche maximale Wirksamkeit ( $E_{max}$ -Werte) zu generieren wie JK 537.



**Abbildung 5. 12: Die höhere systemunabhängige maximale intrinsische von JK 550 ( $C_4$ ) bei 100%iger Rezeptorbesetzung in der dualsterischen Pose  $_{max}^*$  kompensiert dessen durch eine geringere dualsterische Bindungsorientierung induzierte geringere aktive Rezeptorfraktion.** Gegenüberstellung des Parameters  $\log V_{max}^*$ : systemunabhängige, maximale intrinsische Wirksamkeit, in Abwesenheit einer Rezeptorreserve der Hybride JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) unter Verwendung der DMR-, IP1-Akkumulations-, cAMP-Akkumulations- und [ $^{35}$ S]GTP S-Bindungs-Daten. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der globalen Kurvenanalyse von Sets aus jeweils vier Kurven, für Details vgl. 3.2.4.2. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die Datenpunkte sind Tabelle 4.38 (vgl. Kapitel 4.1.9.2) entnommen. \*,\*\*: Wert signifikant verschieden von der jeweiligen Kenngröße des kürzeren Hybrides JK550 (t-Test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

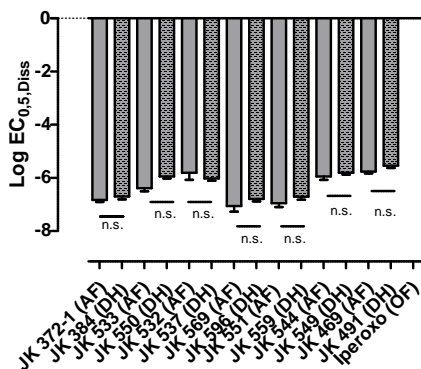
Somit konnte gezeigt werden, dass eine höhere rezeptorvermittelte, systemunabhängige maximale intrinsische Aktivität von JK 550 ( $C_4$ ) bei vollständiger (100%) Rezeptorbindung in der dualsterischen Pose  $_{max}^*$ , die durch die geringere dualsterische Bindungsorientierung induzierte geringere aktive Rezeptorfraktion kompensiert. Anders als es von Bock und Mitarbeitern zuvor postuliert worden war (Bock et al. 2016), ist somit nicht allein die dualsterische Bindung eines allosterisch/orthosterischen Liganden ausschlaggebend für den von dieser Substanz induzierten Maximaleffekt. Vielmehr belegen die Befunde, dass eine Reduktion der dualsterischen Bindung und damit der aktiven Rezeptorpopulation durch ein höheres  $_{max}^*$  kompensiert werden kann und damit das geringere Ausmaß dualsterischer Bindung auszugleichen vermag. Mit anderen Worten konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Wirksamkeit dualsterischer Liganden differenziert werden muss in die maximale Wirksamkeit  $E_{max}$ , die rezeptorvermittelte, maximale intrinsische Aktivität  $_{max}$  und die fraktionelle Rezeptorbesetzung der dualsterischen Bindung.



## 5.2 Einführung und Validierung von drei aufeinander aufbauenden Datenanalysemethoden (Analysen a, b und c) zur Ermittlung von Bindungs- und Funktionsparametern dualsterischer Hybridliganden

### 5.2.1 Besonderheiten der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Analysemethoden

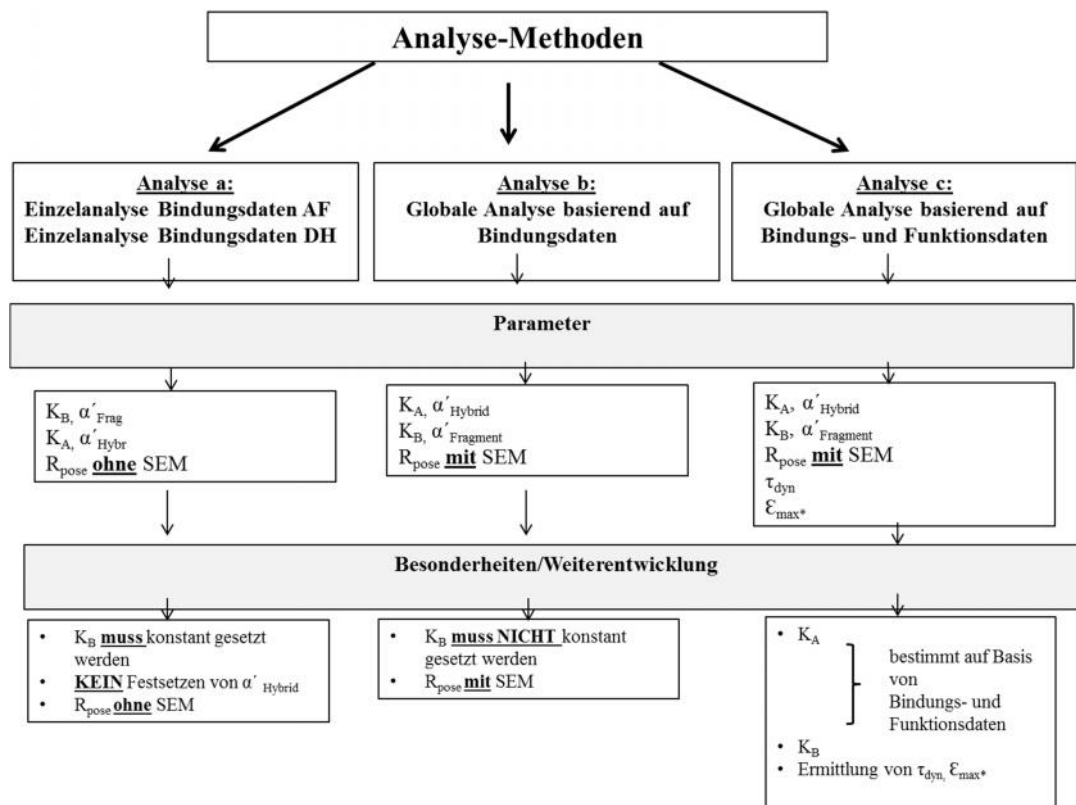
Die Ermittlung der unterschiedlichen Bindungsorientierungen, die von dualsterischen Hybridliganden eingenommen werden können, erfolgte bisher mit einer von Antony und Mitarbeitern etablierten Gleichung (Antony et al. 2009), die auf Basis eines von May und Mitarbeitern entwickelten Modells beruht (May et al. 2007b). Nach diesem Modell kann die Bindungsneigung eines allosterisch/orthosterischen Hybridliganden zum freien Rezeptorprotein differenziert werden in eine Affinitätskonstante bei gleichzeitiger Bindung an die allosterische und orthosterische Bindungsstelle ( $K_{B,dual}$  (May et al. 2007b, Antony et al. 2009) =  $K_B$  (Bock et al. 2014a)) sowie eine Affinitätskonstante für die alleinige Bindung an die allosterische Bindungsstelle ( $K_{B,allo}$  (May et al. 2007b, Antony et al. 2009) =  $K_A$  (Bock et al. 2014a)). Bei dieser Analyse wird angenommen, dass sowohl die Affinität  $K_B$  als auch der Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  des allosterischen Fragmentes dem  $K_B$ -Wert und dem Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  des dualsterischen Hybrides entsprechen, d.h. der ermittelte Affinitätswert des allosterischen Fragmentes wird dem Affinitätswert des dualsterischen Hybrides in der allosterischen Bindungspose gleichgesetzt. Die Argumentation für diese Strategie entstand aus der Beobachtung, dass die Bindungsneigung der allosterischen Fragmente sich von derjenigen der sie enthaltenden Hybride (z.B. Iper-6-naph an NMS-besetzten  $hM_2$ -Rezeptoren) nicht signifikant unterscheiden (Bock et al. 2012). Das zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit beim Vergleich der Bindungsneigung der  $\log EC_{0,5, Diss}$ -Werte der allosterischen Fragmente (BQCAd) an NMS-besetzten  $hM_1$ -Rezeptoren sowie an den dualsterischen Iperoxo-BQCAd-Hybriden (vgl. Abb. 5.13). Infolgedessen kann davon ausgegangen werden, dass sowohl die allosterischen Fragmente als auch die dualsterischen Hybride in gleicher Weise mit dem orthosterisch durch NMS besetzten  $hM_1$ -Rezeptor interagieren.



**Abbildung 5. 13: Graphische Darstellung der  $\log EC_{0,5, Diss}$ -Werte der allosterischen Fragmente sowie der dualsterischen Hybride. Die jeweiligen Parameterwerte unterscheiden sich nicht signifikant was ein Indiz für die gleiche allosterische Bindungsorientierung an NMS besetzten  $hM_1$ -Rezeptoren spricht.  $\log EC_{0,5, Diss}$ : Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [ $^3H$ ]NMS-Dissoziation führt. Dargestellt sind die Datenpunkte als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus drei bis sechs unabhängigen Experimenten, die als Vierfachbestimmungen ausgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eine "Vier-Parameter-logistischen-Gleichung" (Gleichung 12). Die Datenpunkte sind Tabelle 4.4 und 4.5 (vgl. Kapitel 4.1.2.1) entnommen. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich zwischen allosterischem Fragment und dualsterischem Hybrid, *one-way ANOVA mit Tukey's Multiple Comparison Test*,  $p > 0,05$ ).**



Ein großer Nachteil der bisher verwendeten sequentiellen Bindungsanalyse von allosterischem Baustein und Hybrid wurde jedoch darin gesehen, dass die zwei wesentlichen Parameter Bausteinaffinität und Kooperativität in der Modell-Analyse auf einen bestimmten Parameterwert „konstant“ gesetzt werden mussten, um einen Schätzwert für die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des dualsterischen Hybrides und damit einen Affinitätswert für das dualsterische Hybrid in der dualsterischen Bindungspose ermitteln zu können. Ein eigener Kooperativitätswert für das Hybrid in der allosterischen Bindungsorientierung konnte bislang in Gleichgewichtsbindungsexperimenten nicht ermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit ist es erstmalig gelungen, auf der Basis der nach Antony und Mitarbeitern bekannten Gleichung (May et al. 2007b; Antony et al. 2009), die Analyse zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten dualsterischer Hybridliganden in mehreren Schritten weiter zu differenzieren und damit Schätzwerte der genannten Parameter für Baustein und Hybrid zu finden, die sich näher an der Modellbotschaft bewegen (vgl. Abb. 5.14).



**Abbildung 5. 14:** Graphische Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit vorgestellten Datenanalyseverfahren zur Analyse von Experimenten zu Bindung- und Funktion dualsterischer Hybridliganden. In dieser Übersicht dargestellt ist eine Gegenüberstellung der zu ihrer Anwendung benötigten Daten (Bindungs-/Funktionsdaten), die gewinnbaren Parameterschätzwerte sowie die mit den unterschiedlichen Analysen einhergehenden Besonderheiten, bzw. Weiterentwicklungen sowohl in der Anwendung, als auch hinsichtlich der bestimmbaren Parameter. AF: allosterisches Fragment. DH: dualsterisches Hybrid.  $K_A$ : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des dualsterischen Hybrides in der dualsterischen Bindungsorientierung.  $K_B$ : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des dualsterischen Hybrides in der rein allosterischen Bindungsorientierung.  $R_{pose}$ : Orientierungsverhältnis von aktiver versus inaktiver Rezeptorbindungsorientierung,  $R_{pose} = -\log(K_A/K_B)$ .  $\alpha'_{Fragment}$ : Kooperativitätsfaktor des allosterischen Bausteines mit [ $^3H$ ]NMS.  $\alpha'_{Hybrid}$ : Kooperativitätsfaktor des dualsterischen Hybrides in der allosterischen Bindungspose mit [ $^3H$ ]NMS.  $\tau_{dyn}$ : dynamische Transduktionskoeffizient des Hybrides.  $\epsilon_{max}^*$ : systemunabhängige maximale intrinsische Wirksamkeit, in Abwesenheit einer Rezeptorreserve. SEM: Standardfehler. Weitere Erläuterungen, vgl. Text.

### **Analyse a) Einzelanalyse der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten von Hybrid und allosterischem Fragment:**

Das erste im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Modell zur Ermittlung der beiden unterschiedlichen Bindungsaffinitäten des dualsterischen Hybrides gliedert sich, wie bereits bei Antony und Mitarbeitern angewendet, in zwei unterschiedliche Schritte (Antony et al. 2009). In einem ersten Schritt wurde auf Grund der Annahme einer allosterischen Interaktion der allosterischen Fragmente mit dem *hM<sub>1</sub>*-Rezeptor - festgestellt durch zuvor durchgeführte Experimente zu ihrem Effekt auf die [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation - die Gleichgewichtsdissoziations-Konstante  $K_B$  ermittelt (Gleichung 16, vgl. 3.2.4.2). In einem zweiten Schritt wurde anhand einer von uns modifizierten, d.h. parameterreduzierten Gleichung (17, vgl. 3.2.4.2) basierend auf der nach Antony und Mitarbeitern (2009) verwendeten Analyse die Gleichgewichtsdissoziationskonstante des dualsterischen Hybrides  $K_A$  bestimmt. Durch den Austausch der Variable  $R_T$ , welche die Gesamtzahl der Bindungsstellen für den eingesetzten Radioliganden bezeichnet, war es durch folgende Gleichung 21 (vgl. 3.2.4.2)

$$R_T = B_0 \cdot \frac{(K_L + L_{hybrin})}{L_{hybrin}}$$

erstmalig möglich, einen Kooperativitätsfaktor für das Hybrid  $\alpha'_{(Hybrid)}$  in der allosterischen Bindungspose zu ermitteln (Gl. 17 mit 21, vgl. 3.2.4.2). Durch die Betrachtung des Parameters  $K_B$  als Konstante ist die Analyse in der Lage, den Wert des Hybrides für  $K_A$  mit Hilfe der in Gleichung 17 enthaltenen Gesamtbindungskonstante  $K_A \times K_B / (K_A + K_B)$  zu berechnen. Infolgedessen war es möglich, neben dem Affinitätswert des dualsterischen Hybrides in der dualsterischen Bindungspose  $K_A$  auch einen Wert für die Kooperativität  $\alpha'_{(Hybrid)}$  zwischen dem dualsterischen Hybridliganden (in der allosterischen Bindungspose) und dem verwendeten orthosterischen Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS zu ermitteln (vgl. Abb. 5.14 (Analyse a)). Dies war zuvor aufgrund von Überparametrisierung und Abhängigkeiten zwischen den Variablen in der ursprünglichen Gleichung 17 unmöglich (May et al. 2007b, vgl. 3.2.4.2).

### **Analyse b) Globale Analyse der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten des Fragmentes und des Hybrides**

Um die Analyse des Bindungsgeschehens noch weiter zu vereinfachen und es zu ermöglichen, die für das allosterische Fragment ermittelten Dissoziationskonstanten  $K_B$  nicht als Konstante betrachten zu müssen, wurde das zuvor beschriebene Modell nach May et al. 2007b (bestehend aus zwei Einzelanalysen) erstmals zu einer einzigen globalen nichtlinearen Datenanalyse kombiniert. Dieses Vorgehen sollte es ermöglichen, sowohl [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten für das allosterische Fragment als auch für das korrespondierende dualsterische Hybrid simultan zu analysieren und einen Parameterwert für  $K_B$ , also die Bindungsneigung der reinen allosterischen Bindungspose des dualsterischen Hybridliganden unter den beiden Gleichungen zu *teilen* und dafür numerische

Schätzwerte zu finden, welche die Anforderungen beider Gleichungen und Datensätze erfüllen (Gleichung 17 mit 21 sowie 22, vgl. 3.2.4.2). Dies bedeutet jedoch nicht, wie unter Analyse a) beschrieben, den Parameterwert  $K_B$  auf einen bestimmten Wert konstant zu setzen, sondern ihn als Variable zu behandeln. Dieses Vorgehen ermöglicht es, dass beide Datensätze (Gleichgewichtsbindungsdaten des allosterischen Fragments und des dualsterischen Hybrides) durch „*Parameter-Sharing*“ beitragen können, Werte für  $K_B$  und  $K_A$  (der Bindungsneigung des dualsterischen Hybrides in der dualsterischen Bindungspose) zu finden. Im konkreten Fall (vgl. Kapitel 4.1.3.2, Abb. 4.14 und Abb. 4.15) bot die globale Anpassung mit „geteilten“ Bindungskonstanten für  $K_A$  und  $K_B$ , die Möglichkeit die (nicht geteilten) Kooperativitätsparametern  $\hat{\nu}_{\text{Fragment}}$  für das allosterische Fragment und  $\hat{\nu}_{\text{Hybrid}}$  für das dualsterische Hybrid zu bestimmen. Diese Vorgehensweise sollte es dem Programm erlauben, einen Wert für  $K_A$  zu finden, der dem wahren Wert von  $K_A$  näher kommt als derjenige, der durch Festlegung von  $K_B$  und  $\log \hat{\nu}_{\text{Hybrid}}$  (auf in separaten Bindungsexperimenten mit den allosterischen Fragmenten erhaltene Werte) während der globalen Kurvenanpassung erhalten werden kann (vgl. Abb. 5.14 (Analyse b)).

### **Analyse c) globale Analyse basierend auf [<sup>3</sup>H]NMS Bindungs- und Funktionsdaten**

Als dritte Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Modell entwickelt, das auf der zuvor beschriebenen globalen Analyse b) der Gleichgewichtsbindungsdaten des allosterischen Fragmentes und des dualsterischen Hybrides basiert. Zusätzlich zu den Bindungsdaten erlaubte es dieses dritte Modell, durch die Einbeziehung funktioneller Daten des dualsterischen Hybrides, anders als Analyse b), einen noch genaueren numerischen Schätzwert für die Bindungsneigung des dualsterischen Hybrides in der dualsterischen Bindungspose  $K_A$  zu bestimmen (Chen, Klöckner und Holze et al. 2015). Auf Grund dieser globalen Analyse bestehend aus Bindungs- und Funktionsdaten unterscheidet sich diese Analyse von dem bereits von Bock und Mitarbeitern (2014a) beschriebenen Modell. Das Grundprinzip dieser Herangehensweise war die zuvor beschriebene globale Analyse mit geteilten Affinitäten für das Hybrid in der dualsterischen und rein allosterischen Pose, aber individuell unterschiedlichen Kooperativitäten  $\hat{\nu}_{\text{(Hybrid)}}$  und  $\hat{\nu}_{\text{(Fragment)}}$  des dualsterischen Liganden und seines allosterischen Fragmentes im ternären Komplex mit NMS und dem  $hM_1$ -Rezeptor. Die Analyse der [<sup>3</sup>H]NMS-Bindungsdaten des allosterischen Fragmentes liefert eine Schätzung für  $K_B$  und nachfolgend einen Parameterschätzwert für  $K_A$ . Die Schätzung von  $K_A$  ist durch die Verwendung des Terms  $K_A \cdot K_B / (K_A + K_B)$  in Gleichung 17 (3.2.4.2) der Regressionsanalyse abhängig von der Kenntnis von  $K_B$ , da es sonst zu einer unendlich großen Möglichkeit an Kombinationen von  $K_A$  und  $K_B$  kommen kann. Jedoch ist es mit Hilfe der globalen Analyse möglich, den Wert für  $K_B$  als Variable zu behandeln, sodass es dem Modell ermöglicht wird, aus den Bindungsdaten des Fragmentes einen Schätzwert für  $K_B$  zu ermitteln. Die Besonderheit dieser Analyse c) liegt jedoch in der zusätzlichen Inkorporation des von Bock und Mitarbeitern entwickelten „*Operational Model of agonism for dynamic ligands*“ (Bock et al. 2014a). Die Verwendung von Bindungsdaten des dualsterischen Hybrides sowie des allosterischen Fragmentes *plus* Daten aus funktionellen Experimenten mit dem

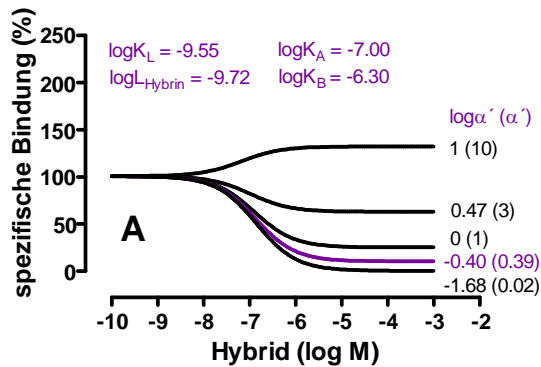
dualsterischen Hybrid und einem Referenzagonisten ermöglicht es, mit einer einzigen Analyse neben dem Schätzwert für die Parameterwerte der Bindungskonstanten  $K_A$  und  $K_B$ ,  $\alpha_{\text{Hybrid}}$ ,  $\alpha_{\text{Fragment}}$  und  $n_{\text{Frag}}$  (Kurvensteilheit von Gleichung 22 von KEK4, vgl. 3.2.4.2) zudem noch die Parameter  $R_{\text{dyn}}$  und  $R_{\text{max}}^*$  sowie (als „zu berichtende Umrechnung“)  $R_{\text{pose}}$  zu ermitteln. Der Parameter  $R_{\text{max}}^*$  stellt einen von uns neu definierten Parameter dar, der es erstmalig erlaubt, die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten dualsterischen Iperoxo/BQCA-d-Hybridliganden hinsichtlich ihrer rezeptorvermittelten, system-unabhängigen maximalen intrinsischen Aktivität des dualsterischen Hybrides bei 100%iger Besetzung der Rezeptoren in der dualsterischen Pose bestimmen zu können (vgl. Abb. 5.14 (Analyse c)).

### 5.2.2 Vergleich der mit Hilfe der drei Modelle analysierten Parameterwerte

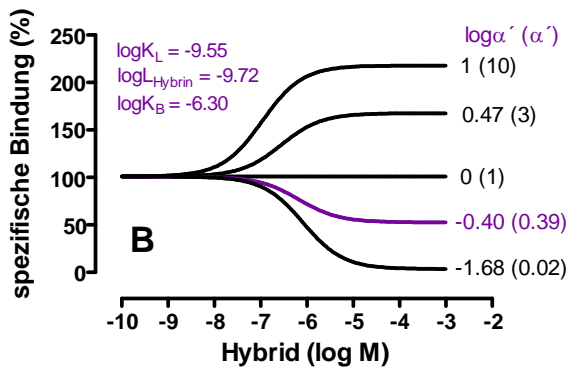
Neben der Konzeption und Anwendung dieser Datenanalysen war es ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit, ihre Anwendbarkeit zu prüfen und die Resultate der Analysen zu vergleichen. Ein wesentlicher Befund der vorliegenden Arbeit lag darin, dass alle erhobenen Gleichgewichtsbindungsdaten sowohl der dualsterischen Hybridliganden (Substanzserie 1), als auch der korrespondierenden allosterischen Bausteine mit Hilfe der drei vorgestellten Analysen erfolgreich mit mehrheitlich korrespondierenden Ergebnissen analysiert werden konnten. Die Regressionskurven beschrieben die Datenpunkte plausibel und waren zwischen den Analysen fast identisch. Die Hinzunahme der funktionellen Daten in Analyse c) zu denen für die globale Bindungsdatenanalyse b), ergab bezüglich der Bindungskonstanten  $K_A$  und  $K_B$  keine signifikanten Unterschiede. Die Hinzunahme der Bindungsdaten zu den funktionellen Daten in Analyse c) erlaubt es zudem erstmals erfolgreich funktionelle Modellparameter, wie z.B.  $R_{\text{max}}^*$  zu bestimmen, die bislang numerisch nicht schätzbar waren. Neben der Möglichkeit Schätzwerte für die Bindungsparameter  $K_A$  und  $K_B$  zur erhalten, lieferten zudem alle drei Analysen erstmalig die Möglichkeit durch nichtlineare Regression einen Kooperativitätsfaktor  $\alpha$  für die Interaktion zwischen dem dualsterischen Hybridliganden und dem Radioantagonisten [ $^3\text{H}$ ]NMS im ternären Komplex mit dem  $hM_1$ -Rezeptor zu ermitteln. Dies war in der ursprünglich von May und Mitarbeitern (2007b) publizierten nichtlinearen Einzelbindungskurvenanalyse mit Gleichung 17 (vgl. 3.2.4.2) nicht möglich (Prof. Dr. A. Christopoulos, Monash University, Australien, persönliche Mitteilung, 2007), mutmaßlich aufgrund von Überparametrisierung und Parameterabhängigkeiten. Die Analyse a) und die globalen Analysen b) und c) der vorliegenden Arbeit (vgl. 3.2.4.2), in denen in Gleichung 17 der Parameter  $R_i$  durch Gleichung 21 als eine Untervariable ersetzt wurde, erlaubten erstmals die Bestimmung von  $\alpha_{\text{(Hybrid)}}$  und ergaben, dass ein Großteil der dualsterischen Hybride einen Kooperativitätsfaktor  $\alpha_{\text{(Hybrid)}}$  aufwies, der ein unteres Plateau der Inhibitionsbindungskurven im Gleichgewicht bewirkte, das deutlich niedriger ausfiel, als es unter der Annahme einer rein allosterischen Rezeptorinteraktion gemäß des Ehlert Modells (Ehlert, 1988, vgl. Kapitel 3.2.4.2 Gleichung 15) erwartet worden wäre. Das dualsterische Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) zeigte beispielsweise einen  $\log \alpha$ -Wert von -0,40 (ermittelt durch Analyse c). Dieser Kooperativitätsfaktor würde, nach Ehlert (1988), ein unteres Plateau der korrespondierenden Bindungskurve liefern, welches (im Sinne

geringerer negativer Kooperativität) deutlich über dem für JK 537 ( $C_6$ ) detektierten unteren Plateau liegen sollte, das nicht von Null verschieden war (vgl. magentafarbene Kurven in Abb. 5.15 A und C mit derjenigen in B). Da es sich jedoch bei JK 537 nicht um einen rein allosterischen, sondern um einen dualsterischen Liganden handelt, kann das niedrigere Plateau der Bindungshemmung durch die zusätzlich orthosterische Interaktion und Bindungshemmung erklärt werden, wie ein Vergleich anhand von Simulationen mit beiden genannten Modellen verdeutlicht (vgl. Abb. 5.15). Ausgehend von einer dualsterischen Bindung von JK 537 unter Verwendung des allosterischen ternären „Fünf-Zustands“-Modells für dualsterische/bitopische Liganden (May et al. 2007b) (vgl. Abb. 5.15 (A)) im Vergleich mit einer Simulation unter Anwendung des klassischen allosterischen ternären „Vier-Zustands“-Modells (Ehlert 1988) (Abb. 5.15 (B)), wird der durch die orthosterische Bindungskomponente eines dualsterischen Hybridliganden (i.e. Wert von  $K_A$ ) zusätzlich eingeführte, auf das untere Plateau der Gleichgewichtsbindungskurve für die Inhibition verringernd wirkende Einfluss (= Anwachsen der negativen Kooperativität mit [ $^3\text{H}$ ]NMS), durch dualsterische Liganden sichtbar und belegt (Abb. 5.15 (C)). Der für jedes dualsterische Hybrid ermittelte Parameterwert für  $K_A$  ist somit in der Lage, auf das untere Plateau der Inhibitionskurve Einfluss zu nehmen (Abb. 5.15 (C)) und erklärt die im Rahmen dieser Arbeit detektierte stärker negativen Kooperativitätswerte der dualsterischen Hybridliganden im Vergleich zu ihren jeweiligen allosterischen Bausteinen. Die detaillierte modellabhängige Betrachtung verdeutlicht, dass die mit Hilfe der drei neuen Analysemethoden (a, b und c; vgl. 3.2.4.2) erstmalig individuell bestimmten Kooperativitätsfaktoren für dualsterische Hybridliganden von denjenigen der allosterischen Bausteine unterschieden werden können.

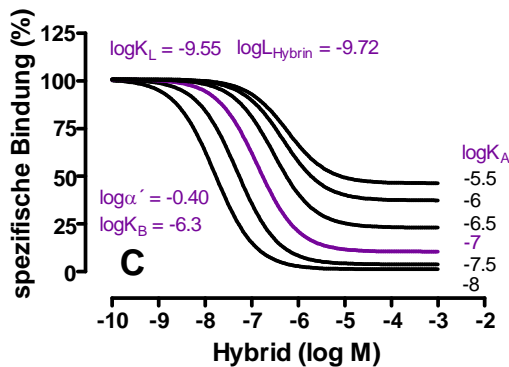
$\alpha'$  Abhängigkeit der maximalen Inhibitionsebene von JK 537 ( $C_6$ ) ausgehend von einer bitopisch/dualsterischen Bindung (May et al. 2007b)



$\alpha'$  Abhängigkeit der maximalen Inhibitionsebene von JK 537 ( $C_6$ ) - unter der Annahme einer rein allosterischen Bindung (Ehlert 1988)



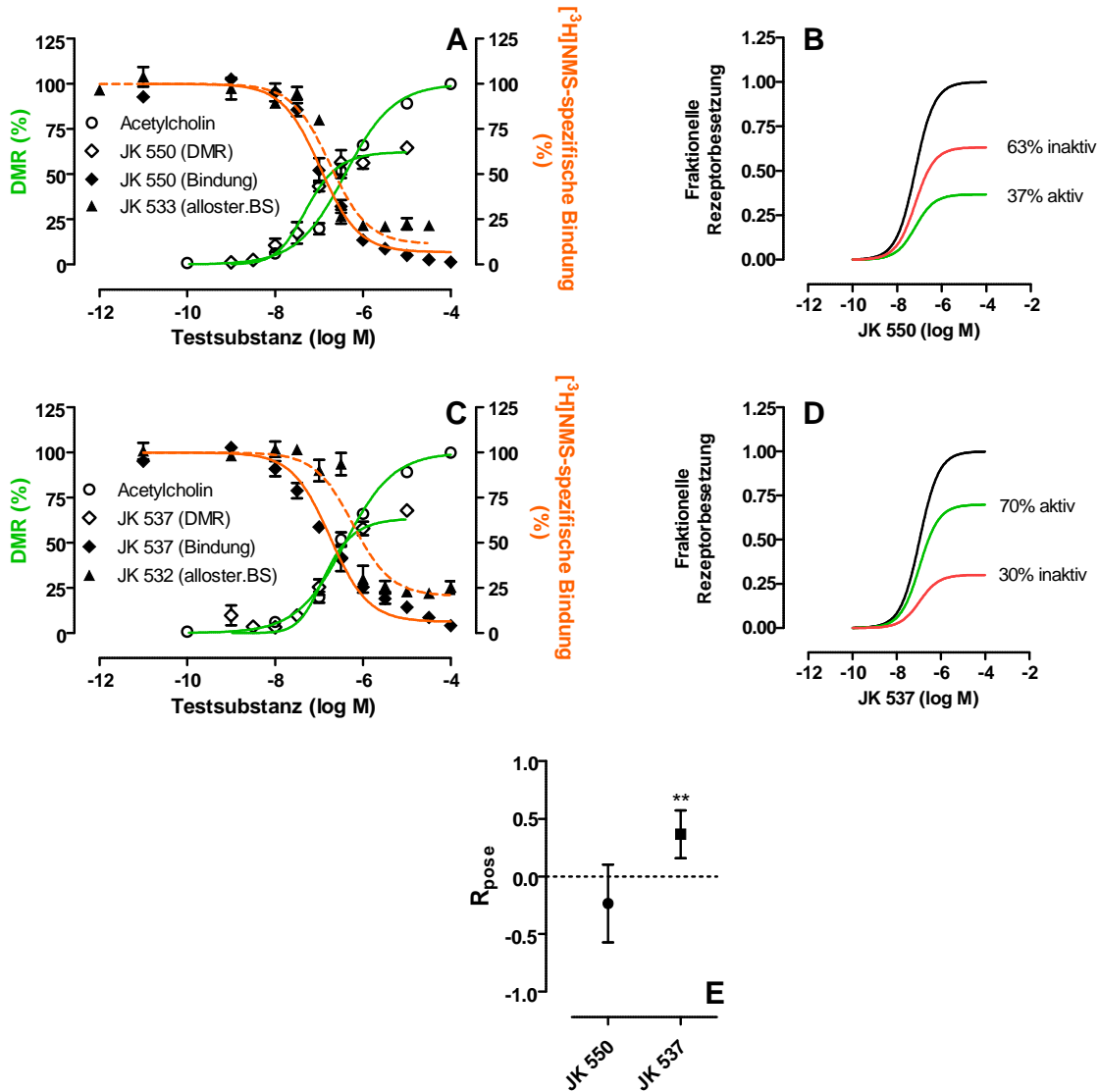
$K_A$  Abhängigkeit der maximalen Inhibitionsebene von JK 537 ( $C_6$ ) ausgehend von einer bitopisch/dualsterischen Bindung (May et al. 2007b)



**Abbildung 5. 15: Die Gleichgewichtsbindungskonstante  $K_A$  dualsterischer Hybride in der dualsterischen Bindungsorientierung reguliert das untere Plateau der Bindungsinhibition dualsterischer Hybridliganden.** Simulation der maximalen unteren Inhibitionsebene von JK 537 ( $C_6$ ) hinsichtlich der [ $^3$ H]NMS-Gleichgewichtsbindung unter Annahme unterschiedlicher Modelle. (A): Annahme des allosterischen ternären „Fünf-Zustands“-Modell für dualsterische /bitopische Liganden (May et al. 2007b). (B): Annahme des klassischen allosterischen ternären „Vier-Zustands“-Modells (Ehlert 1988). (C): Ausgehend vom allosterischen ternären „Fünf-Zustands“-Modell für dualsterische /bitopische Liganden (May et al. 2007b) lässt sich der hemmende Einfluss von  $K_A$  (i.e. der orthosterischen Bindungskomponente) auf das untere Plateau der Inhibitionskurve erklären.  $\log K_B$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des allosterischen Fragmentes.  $\log K_A$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des dualsterischen Hybrides in dualsterischer Orientierung.  $\log \alpha'$ : Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors  $\alpha'$ ;  $\log K_L$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_L$  des Radioliganden [ $^3$ H]NMS;  $\log L_{Hybrid}$ : Konzentration des Radioliganden [ $^3$ H]NMS in Gleichgewichtsbindingsexperimenten mit dem dualsterischen Hybrid. Weitere Details, vgl. Text.

### 5.2.3 Einfluss steiler Inhibitionskurven in Gegenwart allosterischer Bausteine auf die mit Hilfe der globalen Analyse c) ermittelten Parameterwerte

Auf Grund der für einige allosterischen Fragmente steilen [<sup>3</sup>H]NMS-Inhibitionskurven wurde - wie bereits erläutert - in den Modellen zur Analyse der ermittelten Bindungsdaten für diese Bindungsdaten ein Steilheits („*slope*“-)Faktor eingeführt (KEK4, Gleichung 22, vgl. 3.2.4.2). Diese im Rahmen dieser Arbeit zu Kontrollzwecken im Sinne einer Plausibilitätsprüfung verwendete, modifizierte Analyse gibt jedoch nicht die Interaktionen wieder, die mit Hilfe eines molekularen Schemas dargestellt werden kann (Trankle et al. 2003; Chen, Klöckner und Holze et al. 2015). Um dennoch die Robustheit vor allem der neuen globalen Analyse c) auch unter Verwendung von Kurvensteilheiten, die signifikant steiler sind als es  $n_H = -1$  entspricht zu bestätigen, wurde exemplarisch für JK 550 (C<sub>4</sub>) und JK 537 (C<sub>6</sub>) unter Verwendung von DMR-Daten eine zusätzliche globale Analyse c) durchgeführt (vgl. Abb. 5.16) (Chen, Klöckner Holze et al. 2015). Dazu wurden die besagten Daten unter Gegebenheiten analysiert, bei denen der Steilheitsfaktor  $n_{Frag}$  für die allosterischen Fragmente auf  $n_{Frag} = -1$  festgesetzt wurde. Zudem wurden die Parameterwerte der Kooperativität zwischen dem allosterischen Fragment ( $\rho_{(Fragment)}$ ) und dem dualsterischen Hybrid ( $\rho_{(Hybrid)}$ ) geteilt. Trotz geringer Abweichungen in den ermittelten Parameterschätzwerten (vgl. Chen, Klöckner und Holze et al 2015; Supplement, Tabelle 2) blieben wichtige Informationen, wie der signifikante Unterschied zwischen den  $R_{pose}$ -Werten von JK 550 und JK 537 bestehen (vgl. Abb. 5.16 (E)), t-Test,  $p < 0,05$ .



**Abbildung 5. 16:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“ mit geteilten Bindungskoooperativitäten zwischen dem dualsterischen Hybrid ( $\hat{\nu}_{\text{Hybrid}}$ ) und dem allosterischen Fragment ( $\hat{\nu}_{\text{Fragment}}$ ) sowie einer festgelegten Kurvensteilheit von  $n_{\text{Fragment}} = -1$  für die allosterischen Fragmente, ermittelt mit Hilfe von DMR- und  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 550 ( $C_4$ ), JK 537 ( $C_6$ ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 533 ( $C_4$ ) und JK 532 ( $C_6$ ) an intakten lebenden  $\text{CHO}h\text{M}_1\text{-wt}$ -Zellen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven (DMR: Referenzagonist ACh, dualsterisches Hybrid; Bindungsdaten: dualsterisches Hybrid und allosterisches Fragment) (entnommen aus Chen, Klöckner und Holze et al. 2015). Ordinate: Durch ACh und Hybrid induzierter Effekt der dynamischen Massenumverteilung (DMR) in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung des dualsterischen Hybrides und seines allosterischen Bausteines in Prozent der Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz an intakten  $\text{CHO}-h\text{M}_1\text{-wt}$ -Zellen (rechte Ordinate). (B,D) Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichungen 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). (E) Beachte den signifikanten Wechsel der fraktionellen Rezeptorbesetzung in die aktive dualsterische Bindungsorientierung ( $\text{MW} \pm 95\%$  KI) durch die Zwischenkettenverlängerung von JK550 ( $C_4$ ) zu JK537 ( $C_6$ ). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. \*\*: Wert signifikant verschieden von der Kenngröße  $R_{\text{pose}}$  des kürzeren Hybrides JK550 ( $C_4$ ), t-Test, \*\*  $p < 0,01$ .



### 5.3 Untersuchungen zur *hM<sub>1</sub>*-Rezeptor-vermittelten Signalwegelektivität von Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden in CHO-Zellen

#### 5.3.1 Möglichkeiten der Ermittlung einer durch Liganden induzierte Signalwegelektivität („*Ligand-Bias*“)

In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl von Liganden beschrieben werden, die in der Lage sind, rezeptorvermittelt vornehmlich einen bestimmten intrazellulären Signalweg gegenüber einem anderen zu aktivieren; ein Phänomen das auch als funktionelle Selektivität oder auch „*Ligand-Bias*“ bezeichnet wird. Zurückzuführen ist die Signalwegelektivität dieser Liganden auf Konformationen, die es dem Rezeptorprotein erlaubt, die Kontaktaufnahme mit unterschiedlichen Signalpartnern zu vermitteln (Kenakin 2005; Violin und Lefkowitz 2007; Reiter et al. 2012; Kenakin und Christopoulos 2013b). Demzufolge kann es vorkommen, dass unterschiedliche Liganden durch die Bindung an ein Rezeptorprotein bestimmte Signalwege bevorzugt regulieren, während sie auf andere Signalwege keinen, oder nur einen geringen Einfluss ausüben (May et al. 2007b; Rajagopal et al. 2010; Kenakin und Miller, 2010; Vaidehi und Kenakin 2010; Kenakin 2011; Canals et al. 2012). Der muskarinische *hM<sub>1</sub>*-Rezeptor interagiert hauptsächlich mit G Proteinen der *G<sub>q</sub>*-Familie (Wess 1996), eine Eigenschaft die qualitativ sowohl im Rahmen dieser Arbeit in funktionellen Experimenten (vgl. 4.1.4.1, 4.2.5) als auch im Rahmen einer zuvor angefertigten Arbeit (Holze, Masterarbeit 2013) bestätigt werden konnte. Mit Hilfe von DMR- (Holze, Masterarbeit 2013) sowie cAMP-Akkumulations-Experimenten (unter vorheriger Ausschaltung des *G<sub>i</sub>*-Signalweges) konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die *hM<sub>1</sub>*-Bindung von *G<sub>s</sub>* Proteinen gefunden werden (vgl. 4.1.4.2). Zusätzlich konnte mit Hilfe von [<sup>35</sup>S]GTP - Bindungsexperimenten die Kopplung an inhibitorische G Proteine (*G<sub>i</sub>*) gezeigt werden (vgl. 4.1.4.3). Diese Ergebnisse bestätigten, dass der muskarinische *hM<sub>1</sub>*-Rezeptor über die Fähigkeit verfügt, verschiedene nachgeschaltete Effektoren durch die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege (im Rahmen dieser Arbeit über *G<sub>q</sub>*, *G<sub>s</sub>* und *G<sub>i</sub>* Proteine vermittelt) anzustoßen (Offermanns et al. 1994; Wess 1996; Burford und Nahorski, 1996; Akam et al. 2001;). Dies wiederum eröffnet die Möglichkeit auch für den muskarinischen *hM<sub>1</sub>*-Rezeptor Verbindungen zu entwickeln, die neben einer Subtypselektivität für diesen Rezeptorsubtyp zudem eine Signalwegelektivität generieren könnten. Um beide Ziele zu vereinen, bietet das bereits im Rahmen dieser Arbeit vorgestellte Konzept der dualsterischer Hybridliganden ein ideales Werkzeug (Antony et al. 2009; Bock et al. 2012; Valant et al. 2014). Es wird angenommen, dass, verglichen mit ihren Einzelbausteinen, dualsterische Hybridliganden einzigartige, selektive Rezeptorkonformationen ausbilden können, die mit der Fähigkeit funktioneller Selektivität verknüpft werden können (Valant et al. 2012b; Bock et al. 2012; Lane et al. 2013). Wie bereits in dieser Arbeit beschrieben, konnte das Konzept des allosterisch/orthosterischen Agonismus erstmals für den muskarinische *hM<sub>2</sub>*-Rezeptor beschrieben werden (Disingiri et al. 2006; Valant et al. 2008). Wie der muskarinische *hM<sub>1</sub>*-Rezeptorsubtyp verfügt auch der *hM<sub>2</sub>*-Rezeptor über die Fähigkeit der Signalwegpromiskuität (Wess 1996; Mistry et al. 2005;

Griffin et al. 2007; Michal et al. 2007), wodurch dieser Subtyp ein ideales Modellsystem zur Untersuchung der durch Hybridliganden induzierten Signalwegselektivität ist. In der Tat konnte für den bitopischen orthosterisch/allosterischen Liganden McN-A-343 eine funktionelle Selektivität für eine  $G_{15}$  Protein-Aktivierung gegenüber einer  $G_i$ -vermittelten Signalwegaktivierung (Griffin et al. 2007) und eine funktionelle Selektivität der  $G_i$ -Signalwegaktivierung gegenüber einer ERK-Aktivierung (Valant et al. 2008) gezeigt werden. Für die dualsterischen Hybridliganden Iper-6-phth und Iper-6-naph (Antony et al. 2009; Bock et al. 2012; Bock et al. 2014a) konnte demgegenüber eine selektive  $G_i$  Protein-Aktivierung nachgewiesen werden. Für den ebenfalls der GPCR-Klasse A zugeordneten Adenosin  $A_1$ -Rezeptor konnte ein allosterisch/orthosterischer Ligand (VCP746) mit Signalwegselektivität beschrieben werden. Der Adenosin  $A_{1A}$ -Rezeptor ist aus therapeutischer Sicht eine wichtige Zielstruktur für die pharmakologische Kardioprotektion (Marzilli et al. 2000; Yang et al. 2002; Donato und Gelpi 2003; Reichelt et al. 2005; Minamino 2012). Der dualsterische Ligand (VCP746) - ein Hybrid aus dem endogenen Agonisten Adenosin und dem positiv allosterischen Modulator VCP171 (Valant et al. 2014), induziert nachweislich vornehmlich den  $G_i$ -Signalweg verglichen mit anderen prototypischen  $A_{1A}$ -Rezeptor Liganden (Valant et al. 2014). Interessanterweise konnten Valant und Kollegen zeigen, dass diese von VCP746 induzierte Pharmakologie (patho)physiologisch hoch relevant ist, da sie nachweisen konnten, dass diese Substanz in nativen  $A_{1A}$ -Rezeptor-exprimierenden Kardiomyoblasten und Kardiomyozyten gegen ischämische Insulte schützt, ohne die arterielle Herzrate zu beeinflussen (Valant et al. 2014; Baltos et al. 2016). Durch Studien am Dopamin  $D_2$ -Rezeptor konnten Liganden identifiziert werden, die über Signalwegselektivität verfügen, die aus einem dualsterischen Bindungsmodus resultierte (Shonberg et al. 2013; Möller et al. 2014; Szabo et al. 2014). Somit konnte bereits für drei Rezeptorfamilien (Muskarin-, Adenosin- und die Dopaminrezeptorfamilie) demonstriert werden, dass dualsterische Hybridliganden ein ideales Werkzeug sind, um neben einer Subtypselektivität auch eine Signalwegselektivität zu generieren.

### **Bestimmung einer Signalwegselektivität („Ligand-Bias“):**

Wie sich im Rahmen der letzten Jahre herauskristallisierte, fokussiert sich die Ermittlung einer möglichen Signalwegselektivität generell auf den Vergleich dreier großer Gruppen von Effektorproteinen:

- den Vergleich zwischen durch G Proteine versus  $\beta$ -Arrestin Aktivierung induzierten Signalwegen (Lovell et al. 2015, Carr et al. 2016),
- den Vergleich zwischen unterschiedlichen G Protein Subfamilien (Schrage et al. 2013; Thompson et al. 2016)
- und den Vergleich von G Protein/ $\beta$ -Arrestin Aktivierung versus weiterer nachgeschalteter Ereignisse zellulärer Signalwegaktivierung (Lovell et al. 2015)

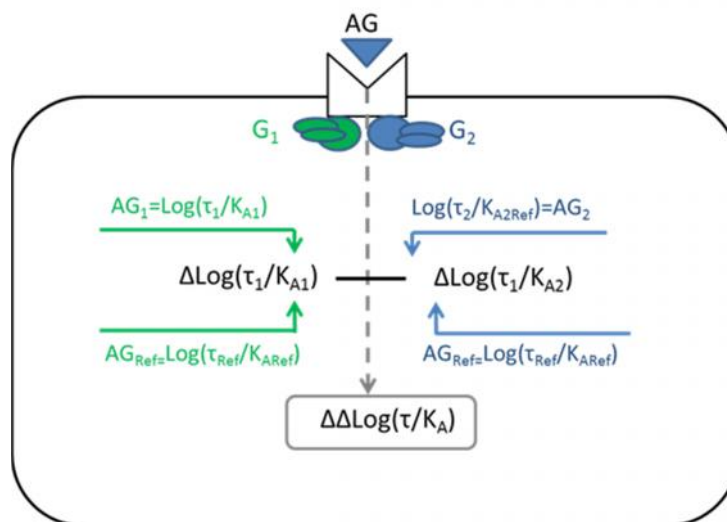
Ungeachtet dessen kann ein „Ligand-Bias“ im Prinzip zwischen jedem beliebigen Signalweg abgeschätzt werden, sei er nah oder fern dem durch einen Liganden aktivierten Rezeptor. Sogar eine

„Bias“-Abschätzung hinsichtlich unterschiedlicher Untereinheiten des einzelnen G Proteins konnte bereits beschrieben werden (Blättermann et al. 2012). Blättermann und Kollegen konnten zeigen, dass es Liganden gibt, die einen „Bias“ in Bezug auf die Bevorzugung zwischen G und G<sub>s</sub>-Untereinheit eines G Proteins induzieren können (Blättermann et al. 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab sich durch die Charakterisierung der dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden mit Hilfe funktioneller Messmethoden zur Identifikation unterschiedlicher G Protein-Kopplungen, die Möglichkeit, eine mögliche Signalwegselektivität hinsichtlich der drei prominentesten G Proteintypen G<sub>q</sub>, G<sub>s</sub> und G<sub>i</sub> zu untersuchen.

### **Auswahl des richtigen Verfahrens zur Quantifizierung der Signalwegselektivität**

Es ist bekannt, dass die Aktivität eines Agonisten genau gebunden ist an die Sensitivität des Gewebes in dem seine Aktivität gemessen wird. Somit kann die beobachtete Messung agonistischer Aktivität wie bspw. Wirkstärke („*potency*“) und Maximaleffekt („*efficacy*“) sehr komplex und mit großer Wahrscheinlichkeit systemabhängig sein (Kenakin 2012a). Genau dieses Phänomen zeigte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Zwar handelte es sich nicht um unterschiedliche Zellsysteme, jedoch führten Unterschiede zwischen den verwendeten Expressionssystemen/Vektoren (vgl. 2.6.2) zu signifikanten Differenzen hinsichtlich der Rezeptorexpression. Die daraus resultierenden Unterschiede in der Wirkstärke und dem Maximaleffekt könnten schnell zu unterschiedlichen Ansichten hinsichtlich der bevorzugten Signalwegbevorzugung der zu charakterisierenden Hybridliganden führen. Im Hinblick auf solche Schwierigkeiten war es in Bezug auf die Identifizierung potenziell, subtypselektiver Liganden wichtig, Verfahren zu verwenden, die es ermöglichen, das Phänomen der Subtypselektivität zu quantifizieren und unter verschiedenen Zelltypen vergleichen zu können. Das wiederum erfordert zum einen ein formales Verständnis darüber, was funktionelle Selektivität wirklich bedeutet und zum anderen sollte die Methode es ermöglichen, eine quantitative Aussage über einen möglichen „*Ligand-Bias*“ zu treffen. Diesbezüglich wichtig ist ein Verfahren, das zum einen experimentell durchführbar ist, und zum anderen aber auch statistisch robust ist. Ein Verfahren, das diese Kriterien erfüllt, ist die System-unabhängige Quantifizierung der Agonist-Aktivität unter Verwendung des „*Operational Model of Agonism*“ (Black und Leff 1983). Durch die Verwendung und Weiterführung des „*Operational Model of Agonism*“ (Black und Leff 1983) konnten signifikante analytische Vorteile im Bereich der „*Bias*“-Berechnung beschrieben werden (Ehlert 2008; Figueroa et al. 2009; Evans et al. 2011; Rajagopal et al. 2011; Kenakin et al. 2012; Kenakin und Christopoulos 2013b). Ein Vorteil dieser Verfahren ist die Möglichkeit, den gemessenen Agonismus in einem systemunabhängigen Parameter zu quantifizieren, welcher die funktionelle Affinität „*operational affinity*“  $K_A$  und auch die „*efficacy*“ des Agonisten enthält. Ausgedrückt wird dieser in Form des sogenannten „*Transduktionskoeffizienten*“:  $\log(1/K_A)$ . Dieser als einzelner numerische Schätzwert behandelte Parameter kann dann dazu verwendet werden, Liganden in verschiedenen funktionellen Versuchsansätzen zu vergleichen und zu bestimmen, ob und in welchem Ausmaß sie einen „*Ligand-*

„Bias“ aufweisen (Kenakin et al. 2012; Kenakin und Christopoulos 2013b). Ein weiterer Vorteil der Verwendung von Transduktionskoeffizienten, ist die Unabhängigkeit von der im System vorliegenden Rezeptorexpression sowie die problemlose Verwendung bei Konzentrations-Effekt-Kurven für deren Steilheit  $n_H$  gilt  $n_H = 1$  (Kenakin et al. 2012; Kenakin und Christopoulos 2013b). Die Bestimmung der  $\log(\tau/K_A)$ -Schätzwerte erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe einer von Shonberg und Kollegen modifizierten Gleichung (Shonberg et al. 2014) des „Operational Model of Agonism“ (nach Black und Leff 1983). Um den Einfluss zell-abhängiger Effekte auf den detektierten Agonismus für die untersuchten Signalwege auszuschließen, wurden die ermittelten  $\log(\tau/K_A)$ -Werte auf einen Referenzagonisten ( $AG_{Ref}$ , im Rahmen dieser Arbeit ACh und Iperoxo), der ebenfalls in jedem Signalweg ( $G_q$ ,  $G_s$  und  $G_i$ , vermittelt) untersucht wurde, normalisiert. Die ligandspezifische Bevorzugung („Ligand-Bias“) wurde nachfolgend durch die Differenzbildung der „normalisierten“ Transduktionskoeffizienten ( $\log(\tau/K_A)$ ) zwischen zwei zu vergleichenden Signalwegen ( $G_1$  und  $G_2$ ) ermittelt, was resultierend zu  $\Delta\log(\tau/K_A)$ -Werten führte, die eine „Bias“-Abschätzung der Hybridliganden erlaubten (vgl. Abb. 5.17).



**Abbildung 5. 17:** Schematische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Quantifizierung einer Signalwegbevorzugung („Ligand-Bias“). Die Interaktionen der zu charakterisierenden Agonisten wurden mit Hilfe einer modifizierten Gleichung des „Operational Model of Agonism“ quantifiziert, um den Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  zweier unterschiedlicher Signalwege zu ermitteln. Modifiziert nach Kenakin, 2015. Weitere Erklärung, vgl. Text.

### Funktionelle Affinität oder Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Ligandbindung

Die Affinität von Liganden zu G Protein-gekoppelten Rezeptoren kann abhängig sein von der Interaktion des Rezeptorproteins mit anderen Signalproteinen in der Zelle, die dazu führt, Rezeptoren als allosterische Proteine anzusehen. Mit anderen Worten: stabilisieren Liganden mit einer Signalwegelektivität Rezeptorzustände, die bevorzugt mit eindeutigen Signalpartnern interagieren, implizieren allosterische Eigenschaften des Rezeptors, dass ebenfalls der umgekehrte Fall vorliegen kann, und demnach die nachgeschalteten Effektoren die Affinität des Agonisten für den Rezeptor

bedingen können (Lean et al. 1980; Lee et al. 1986; Costa und Herz 1989; Kenakin und Miller 2010; Kenakin 2012b). Um einen „Ligand-Bias“ aufzudecken, muss folglich ein Parameter verwendet werden, der die Interaktionen zwischen Agonist (bezeichnet als allosterischer Modulator des Effektes) und dem Gastprotein/Überträger (in diesem Falle das G Protein) inkorporiert enthält. Das die funktionelle Affinität  $K_A$  für das Agonist-Rezeptor Paar und den verschiedenen Signalmolekülen unterschiedlich ist, konnte bereits in Struktur- und auch in Bindungsstudien für  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren (Rasmussen et al. 2011a),  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren (Yan et al. 2008) und Ghrelin-Rezeptoren (Mary et al. 2012) gezeigt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten sich ebenfalls, dass die mit Hilfe der funktionellen Daten ermittelten  $K_A$ -Werte (Funktionelle Affinität) (OPMOD) beispielsweise für JK 596 auf dem  $G_s$ -Signalweg signifikante Abweichungen aufwies ( $\log K_{A, JK596(\text{Bindung})} = -6,84 \pm 0,08$ ,  $\log K_{A, JK596(\text{FunktionGs})} = -9,40 \pm 0,34$ ; t-Test,  $p < 0,05$ ) (vgl. 4.1.5). Somit gibt es keinen Anlass zu glauben, dass Schätzwerte für den Parameter  $K_A$ , die ausschließlich mit Hilfe von Bindungsexperimenten ermittelt wurden, Relevanz bezüglich des  $K_A$ -Wertes für das spezifische Signal-Molekül (Gast) und den dafür induzierten Signalweg in der Zelle haben (Kenakin 2012a). Demzufolge ist nicht nur die relative Effektivität für eine Ligand-induzierte Signalwegsbevorzugung verantwortlich, sondern ebenfalls die Ligand induzierte Affinität  $K_A$  für den Rezeptorzustand, der die zu untersuchende Zellantwort vermittelt (Charfie et al. 2015).

### **„Bias“ Berechnung auf Basis von Transduktionskoeffizienten bestätigt die Systemunabhängigkeit**

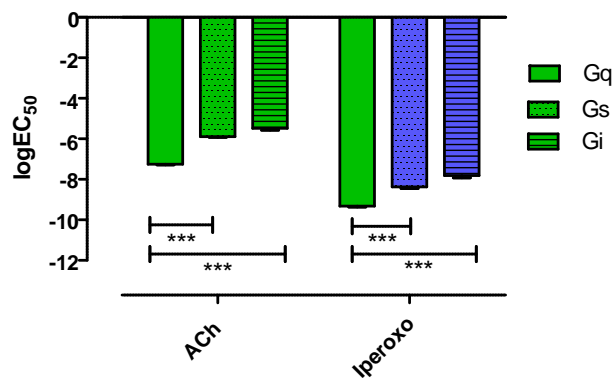
Kenakin und Mitarbeiter konnten experimentell zeigen, dass Transduktionskoeffizienten ( $\log \tau / K_A$ ) über eine große Spanne von Veränderungen hinsichtlich der Rezeptorexpression konstant bleiben (Kenakin et al. 2012). Die aus diesen Transduktionskoeffizienten ermittelten  $\log(\tau / K_A)$ -Werte von Agonisten sind demnach abhängig von den allosterischen Kooperativitäts-Konstanten welche die Interaktion von Agonist, Rezeptor und individuellem Signalmolekül kontrolliert (Kenakin 2013). Somit reflektiert  $K_A$  des Agonisten, wie bereits erläutert, eine Veränderung in der naturgemäßen Affinität des Rezeptors für das Signalmolekül in der Abwesenheit versus der Anwesenheit eines Agonisten in Form des allosterischen Parameters  $\tau$  (Stockton et al. 1983; Ehlert 1988) und der Veränderung in der intrinsischen Wirksamkeit „*efficacy*“, also der Interaktion zwischen Rezeptor und Signalmolekül in Abwesenheit oder Anwesenheit des Agonisten (bekannt als  $\tau$  im funktionellen allosterischen Modell, vgl. Ehlert 2005; Kenakin 2005; Price et al. 2005). Unter diesen Umständen ist der Transduktionskoeffizient einzigartig für den allosterischen Vektor/Überträger aus dem Agonisten, dem Rezeptor und dem Signalmolekül zusammengesetzt und ist somit unabhängig vom Zelltyp und System (Kenakin 2015). Auf Grund dieser Eigenschaft müsste es somit möglich sein, die für den „Bias“ ermittelten Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Iperoxo/BQCA-Hybridliganden an CHO- $hM_1$ -Zellen des ersten Ergebnisteils mit den Ergebnissen zu vergleichen, die an in CHO-Flp-In-Zellen (geringere Rezeptorexpression, vgl. 4.2.1) exprimierten  $hM_1$ -wt-Rezeptoren ermittelt wurden. Die Untersuchung einer durch die dualsterischen Liganden JK 550 und JK 537

induzierten Signalwegsbevorzugung auf Basis von Transduktionskoeffizienten in CHO-K<sub>1</sub>-Zellen, die durch eine höhere Rezeptorexpression gekennzeichnet sind, zeigten keinerlei Hinweise auf eine Signalwegelektivität hinsichtlich der G<sub>q</sub> oder G<sub>s</sub> Protein-Kopplung (vgl. Abb. 5.19). Wird davon ausgegangen, dass die Verwendung von Transduktionskoeffizienten wie von Kenakin und Mitarbeitern (2012) postuliert system-unabhängig ist, so dürfte sich trotz der deutlichen Unterschiede in Rezeptorexpression, Affinität und Fähigkeit hinsichtlich der Rezeptoraktivierung kein Unterschied zu den CHO-Flp-*hM<sub>1</sub>*-wt-Zellen, die durch eine geringe Rezeptorexpression gekennzeichnet sind, finden lassen. Die Ergebnisse ermittelt an *hM<sub>1</sub>*-wt-Rezeptoren in beiden Expressionssystemen (vgl. Kapitel 4.1.9 und 4.2.8) bestätigten genau diese Hypothese und belegen damit die von Kenakin postulierte Systemunabhängigkeit des „Transduktionskoeffizienten“  $1/K_A$ . Diese Eigenschaft macht die Verwendung von Transduktionskoeffizienten in der vorliegenden Arbeit zu einem wertvollen Werkzeug hinsichtlich der Ermittlung eines „*Ligand-Bias*“. In Bezug auf eine therapeutische Verwendung von Agonisten muss nämlich davon ausgegangen werden, dass es in unterschiedlichen Geweben zu einer variierenden Rezeptordichte an der Zelloberfläche kommen kann (Kenakin und Christopoulos, 2013b).

#### **Auswahl des Referenzagonisten:**

Wie schon im Ergebnisteil dieser Arbeit beschrieben, ist es bei der Ermittlung einer Ligand-induzierten Signalwegelektivität („*Ligand-Bias*“) wichtig, diese als einen relativen Term zu sehen. Ohne den Vergleich mit einem Referenzagonisten, dem Ausschluss des Einflusses des Systems und dem damit verbundenen Beobachtungs-„*Bias*“, kann der durch einen Liganden induzierte tatsächliche „*Bias*“ nicht bestimmt werden (Kenakin und Christopoulos, 2013b). In den meisten Fällen dient der endogene Ligand des zu untersuchenden Rezeptors als Referenzagonist (Kenakin et al. 2012). Diesbezüglich ist jedoch zu beachten, dass die aktive Konformation eines Rezeptors, der den endogenen Liganden gebunden trägt, nicht zwangsläufig die unterschiedlichen Zweige der multimodalen Signalwege gleich aktivieren muss. Dieser mit dem „*System-Bias*“ behafteten "natürliche *Bias*" beinhaltet den physiologisch relevanten Zustand des aktiven Rezeptors und kann somit definitionsgemäß nicht als derselbe betrachtet werden, der mit einem durch „Ersatz-Agonisten“ wiedergegebenen „*Stimulus-Bias*“ assoziiert wird. Stattdessen reflektiert die Kopplungseffizienz ( $\tau$ ) des mit dem endogenen Liganden besetzten Rezeptor, den Zustand, mit dem das Signal (induziert durch den zu untersuchenden Liganden) verglichen werden soll (Gregory et al. 2010; Gregory et al. 2012). Auf Grund der Beobachtung, dass der endogene Ligand ACh am *hM<sub>1</sub>*-Rezeptor in den für die jeweiligen G Protein-spezifischen Signalwege ermittelten Wirkstärken EC<sub>50</sub> signifikante Differenzen aufwies (vgl. Abb. 5.18) und damit deutliche Hinweise auf einen natürlichen „*Bias*“ lieferte, wurde in den Berechnungen ein zweiter Referenzagonist verwendet. Da Iperoxo sich als orthosterische Komponente in den zu untersuchenden dualsterischen Iperoxo/BQCA<sub>d</sub> Hybridliganden wiederfindet, erschien es sinnvoll diesen Agonisten als zweiten Referenzagonisten zu verwenden. Für Iperoxo zeigte

sich zwar ebenfalls ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Wirkstärke („*potency*“) auf den durch die drei G Proteine ( $G_q$ ,  $G_s$  und  $G_i$ ) induzierten Signalwegen, jedoch lag diese nur bei einer Dekade, wohingegen es bei ACh zu einem Wirksamkeitsverlust von über einer Dekade kam (vgl. Abb. 5.18). Hinsichtlich der schon durch einen Referenzagonisten vermittelten Signalwegsbevorzugung, muss demnach immer im Hinterkopf behalten werden, dass ein synthetischer Ligand zwar gegenüber dem Referenzagonisten eine Signalwegsselektivität aufweisen kann. Dies muss jedoch nicht zwangsläufig bedeuten, dass der endogene Ligand bzw. der ausgewählte Referenzagonist keine Signalwegsselektivität besitzt (Kenakin und Christopoulos, 2013b). Diese Tatsachen verdeutlichen die Komplexität der Zusammenhänge, die eindeutige Aussagen über eine Signalwegsselektivität erschwert und die unterstreicht, dass es wichtig ist, einen „*Ligand-Bias*“ immer nur gegenüber dem verwendeten Referenzagonisten zu betrachten (d.h. Agonist X weist eine Signalwegsselektivität gegenüber der  $G_q$  Protein-Kopplung im Vergleich zum Referenzagonist Y).



**Abbildung 5. 18:** Graphische Gegenüberstellung der durch die Referenzagonisten ACh und Iperoxo induzierten Wirkstärken („*potencies*“) auf den drei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Signalwegen ( $G_q$ ,  $G_s$  und  $G_i$ ).  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus drei bis fünf unabhängigen Experimenten, die in Form einer Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. \*\*\*: Wert signifikant verschieden von der jeweiligen Kenngröße des  $G_q$ -Signalweges (t-Test, \*\*\* $p < 0,001$ ).

### Sonderfall: Funktionelle Selektivität von Vollagonisten

Die Verwendung des Parameters  $\log (1/K_A)$  hat den zusätzlichen Vorteil, ein weiteres Problem zu umgehen, das sich in Bezug auf Vollagonisten häufig stellt; die Tatsache, dass eine unendliche Vielfalt an Kombinationen von „*efficacies*“ und „*affinities*“ möglich ist, welche ein und diesselbe Konzentrations-Effekt-Kurve eines Vollagonisten beschreiben kann. Auf Grund einer Redundanz verschiedener Modell-Parametern im Hinblick auf die durch sie beschriebene Kurve, ist es somit nicht möglich, durch eine direkte Datenanalyse einer Konzentrations-Effekt-Kurve eines Vollagonisten mit Hilfe des „*Operational Model of Agonsim*“ separate verlässliche Werte mit kleinem Fehler für die Kopplungskonstante oder die funktionelle Affinität  $K_A$  zu erhalten. Sollen diese derart bestimmt werden, so ist es ohne Transduktionskoeffizienten notwendig, weiterführende Experimente zur

Bestimmung von  $E_{\max}$ , wie beispielsweise eine Rezeptor-Alkylierung zur Reduktion der maximalen Empfindlichkeit des vorliegenden Systems durchzuführen. Die im Rahmen dieser Arbeit als *ein* Parameter analysierte Variable ( $E/E_{\max}$ ) (Gleichung 37, vgl. Kapitel 3.6), kann jedoch auch mit Hilfe von Konzentrations-Effekt-Kurven von Vollagonisten bestimmt werden, da er sich vom  $EC_{50}$ -Wert der Konzentrations-Effekt-Kurve herleiten lässt. Hier gilt:

$$EC_{50} = \frac{K_A}{[(2+\tau^n)^{\frac{1}{n}}-1]} \quad (\text{Black et al. 1985}) \quad \text{Gleichung 48}$$

Für Substanzen wie Vollagonisten, die über eine hohe intrinsische Wirkstärke („*efficacy*“) verfügen und damit ebenfalls hohe  $\tau$ -Werte aufweisen, reduziert sich diese Formel zu

$$EC_{50} = \frac{K_A}{(\tau^n)^{\frac{1}{n}}} \quad \text{Gleichung.49}$$

Für Vollagonisten mit hoher Wirksamkeit (d.h. mit hohen  $\tau$ -Werte), ist somit der  $EC_{50}$ -Wert ein limitierender Faktor für die Berechnung von  $K_A$ , z.B. würde eine erste Iteration der Kurvenanpassung den Parameter  $K_A$  auf Werte  $> EC_{50}$  einstellen. Die nachfolgende Iteration ist demzufolge in der Lage ein eindeutiges  $E/E_{\max}$ -Verhältnis zu identifizieren, das die Antwort des Vollagonisten charakterisiert (Kenakin 2013). Da es bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Vollagonisten trotzdem zu Schwierigkeiten kam, wurde der  $\log K_A$ -Wert auf einen Wert von Null ( $K_A = 0$ ) konstant gesetzt. Unterscheidet sich der „*transducer slope*“  $n$  sich nicht signifikant von  $n = 1$ , so entspricht das Verhältnis  $E/E_{\max}$  dem reziproken Wert des  $EC_{50}$ -Wertes des Vollagonisten. Die Festlegung des Parameters  $\log K_A$  in der Verwendung des „*Operational Model of Agonism*“ (Black und Leff 1983) auf einen willkürlich kleinen „*dummy*“-Wert, wie im Fall der vorliegenden Arbeit auf Null, gewährleistet die das Auffinden eines für Vollagonisten korrekten  $E/E_{\max}$ -Wert (van der Westhuizen et al. 2014).

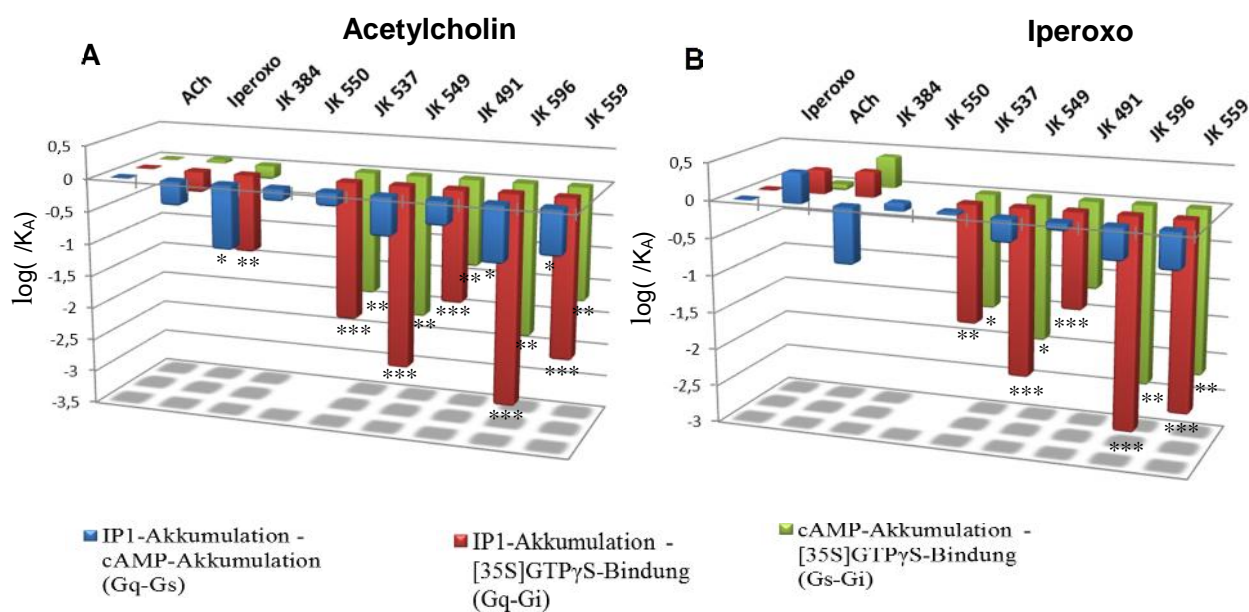
### 5.3.2 Dualsterische Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden zeigen Hinweise auf eine $G_s$ -oder $G_i$ -Signalwegselektivität

Manche Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden, wie beispielsweise JK 596 und JK 559, zeigten große Unterschiede im Bereich der Wirksamkeit ( $EC_{50}$ -Werte) in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Signalwegen. Dies liefert im Allgemeinen ein Hinweis darauf, dass die Beschaffenheit der Rezeptor-Effektor-Komplexe die relative Affinität der Substanzen für eine spezifische Rezeptor Konformation beeinflusst (van der Westhuizen et al. 2014). Diese Annahme bestätigte sich durch die mit Hilfe des „*Operational Model of Agonism*“ (Black und Leff 1983) ermittelten funktionellen Affinitäten  $K_A$ , die den Verdacht untermauerten, dass manche dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden eine funktionelle Selektivität hinsichtlich eines Signalweges gegenüber einem anderen induzieren könnten.



Mit dem zuvor beschriebenen Verfahren und der Bestimmung der Transduktionskoeffizienten wurden alle sieben dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybride (Substanzserie 1, vgl. Kapitel 2.11.5 und Abb. 4.1) hinsichtlich einer möglichen Signalwegelektivität gegenüber drei verschiedenen Signalwegen, darunter der  $G_q$ -Signalweg (Daten der IP1-Akkumulation), der  $G_s$ -Signalweg (Daten der cAMP-Akkumulation) und der  $G_i$ -Signalweg (Daten der  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -S-Bindungsexperimente), untersucht.

Die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden zeigten am  $hM_1$ -Rezeptor entgegen unserer Erwartung einer  $G_q$ -Bevorzugung, eine signifikante Verschiebung der Signalwegsbevorzugung zur  $G_s$  bzw.  $G_i$  Protein-Kopplung (vgl. Abb. 5.19). Eine Signalwegsbevorzugung hinsichtlich der für  $M_1$ -Rezeptoren typischen  $G_q$ -Kopplung (Offermanns et al. 1994; Akam et al. 2001) konnte interessanterweise bei keinem der sieben Hybride nachgewiesen werden. Bezüglich der beobachteten  $G_i$ - oder  $G_s$ -Signalwegsbevorzugung schien ein Unterschied der Zwischenkettenlänge keine Rolle zu spielen.



**Abbildung 5. 19: Grafische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Signalwegelektivitäten  $\log( /K_A)$  der sieben dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden.** (A): Differenz der auf den Referenzagonisten ACh normalisierten Transduktionskoeffizienten für die  $G_q$ ,  $G_i$ - und  $G_s$ -Signalwegaktivierung, dargestellt für Iperoxo und die dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden. (B): für die  $G_q$ ,  $G_i$ - und  $G_s$ -Signalwegaktivierung, dargestellt für ACh und die dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden. Die  $\log( /K_A)$ -Werte wurden auf der Basis von Gleichung (39) errechnet. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus sechs bis acht unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde mit Hilfe von Gleichung (41) errechnet. \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant unterschiedlich vom  $\log( /K_A)$ -Wert des verwendeten Referenzagonisten (t-Test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Da der orthosterische Baustein Iperoxo zumindest hinsichtlich der  $G_q$  und  $G_s$  Protein-Kopplung gegenüber dem Referenzagonisten ACh keine Signalwegsbevorzugung induziert, kann, zusammen mit dem Nachweis, dass, bis auf das dualsterische Hybrid JK 550, für alle dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden eine überwiegend dualsterischen Bindungspose vorausgesagt werden konnte, die

Hypothese aufgestellt werden, dass die Bindung des Hybrides in der dualsterischen Pose ausschlaggebend für eine Signalwegselektivität ist. Eine Beobachtung die auch schon Antony und Mitarbeiter (2009) für dualsterische Hybride an muskarinischen  $M_2$ -Rezeptoren machen konnte. Sie stellten die Hypothese auf, dass die Signalisierungsspezifität des dualsterischen Liganden vom allosterischen Baustein abhängen muss, da der orthosterische Agonist Iperoxo keine Signalwegselektivität am muskarinischen  $M_2$ -Rezeptor aufwies. Zudem kann auf Grund der Annahme, dass der allosterische Baustein mit extrazellulären Regionen des Rezeptors interagiert davon ausgegangen werden, dass diese Regionen einen entscheidenden Einfluss auf die Ligand-induzierte Signalwegaktivierung zu besitzen scheint (Antony et al. 2009). Bock und Mitarbeiter konnten darauf aufbauend nachweisen, dass die Aktivierung des  $hM_2$ -Rezeptors durch die auf Iperoxo-basierenden dualsterische Liganden Iper-6-naph und Iper-6-phth mit Konformationsänderungen im extrazellulären allosterischen Bereich interferiert. Infolgedessen soll es intrazellulär zu einer geminderten Außenbewegung von Transmembran VI (TM 6) kommen und die Signalwegaktivierung entsprechend verhindert, bzw. einschränkt werden können (Bock et al. 2012). Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass, je größer der allosterische Baustein und je kürzer die verwendete Zwischenkette war, desto größer wurde die induzierte  $G_i$ -Signalwegselektivität. Sie schlussfolgerten, dass die Verlängerung der Zwischenkette den allosterischen Baustein in einen Bereich platzieren würde, der nicht an dem extrazellulär stattfindenden allosterischen Umbau beteiligt ist und somit die Fähigkeit der Rezeptor/Signalwegaktivierung fördert (Bock et al. 2012; Bock et al. 2014a). Am muskarinischen  $hM_3$ -Rezeptor führten die dualsterischen Liganden Iper-6-naph und Iper-6-phth zu keiner nachweisbaren Bevorzugung der  $G_q$  bzw.  $G_s$  Protein-vermittelten Signalwege (Vogel, Dissertationsschrift 2015).

Generell kann man sich GPCRs als oszillierende Proteine vorstellen, die in einer Serie aus konformativen Intermediaten assoziiert mit einer komplexen „*energy landscape*“ einhergehen (Deupi und Kobilka 2010; West et al. 2011; Abrol et al. 2011; Kofuku et al. 2012; Orban et al. 2012; Nygaard et al. 2013; Abrol et al. 2013). Diese „*energy landscape*“ ist beeinflusst durch sowohl den Liganden, als auch durch die an den Rezeptor gebundenen Effektorproteine (Mary et al. 2012; Nygaard et al. 2013). Pharmakologisch unterschiedliche Liganden regulieren die Rezeptoraktivität durch eine Verschiebung des konformativen Gleichgewichtes und der damit verbundenen Gestalt dieser „Landschaft“. Ein Ligand der eine Signalwegselektivität aufweist, verschiebt somit dieses konformative Gleichgewicht des Rezeptors zu einem spezifischen Zustand bzw. Zuständen, die bevorzugt spezielle Signale an die Netzwerke innerhalb der Zelle senden, die sich von der Aktivierung anderer unterscheiden. Eine große Anzahl experimenteller Daten konnten demonstrieren, dass sich Konformationen, die durch G Protein selektive,  $\beta$ -Arrestin selektive oder Liganden die keine Selektivität aufwiesen, induziert wurden, sich voneinander unterscheiden (Rasmussen et al. 2011a; Kahsai et al. 2011; Lebon et al. 2011; Xu et al. 2011; Rahmeh et al. 2012). Somit könnte es sein, dass die allosterischen Fragmente der dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden in der dualsterischen

Bindungspose durch die Interaktion mit Bereichen der allosterischen Bindungsstelle und der daraus resultierenden Beeinflussung der dort stattfindenden Umstrukturierung, die Energielandschaft in einen spezifischen Zustand verschiebt, der trotz der sonst für den  $M_1$ -Rezeptor präferenziellen  $G_q$  Protein Kopplung die  $G_s$  Protein-Kopplung favorisiert.

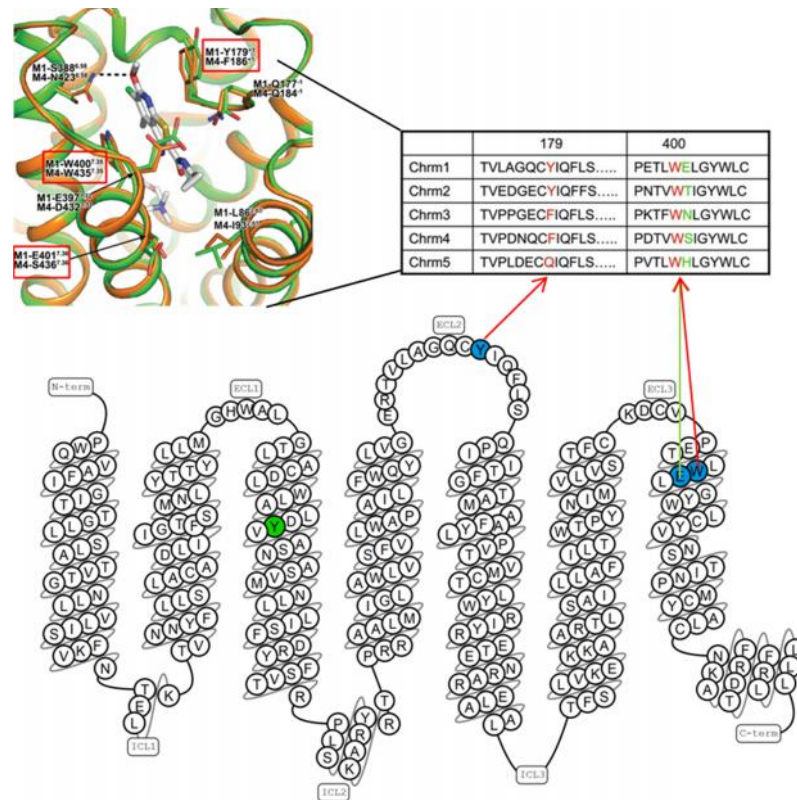
Trotz der aufgestellten Hypothesen und dem Wissen, dass mittlerweile auch nachgewiesen werden konnte, dass  $M_1$ -Rezeptoren in der Lage sind,  $G_i$  Untereinheiten (Offermanns et al. 1994; Akam et al. 2001), und  $G_s$ -Untereinheiten (Burford und Nahorski 1996) zu aktivieren, sollte nicht unberücksichtigt gelassen werden, dass bei keinem der für die verschiedenen Signalwege verwendeten Experimentalansätze ausschließlich das zu untersuchende G Protein, bzw. der von dem zu untersuchenden G Protein induzierte Signalweg detektiert wurde. Hinsichtlich des  $G_s$ -Signalweges konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass die Rezeptoraktivierung in CHO-Zellen sowohl durch die Aktivierung von Calcium Einstrom als auch durch einen Calcium-abhängige Effekt auf Isoformen der Adenylatcyclase indirekt die Adenylatcyclase-Aktivität beeinflussen kann (Cooper et al. 1995). Ein solcher „*Crosstalk*“ zwischen verschiedenen Effektoren induziert durch verschiedene G Proteine kann somit nicht ausgeschlossen werden. Die Verwendung von EGTA (100  $\mu$ M), welches das Calcium aus dem Medium entfernt, könnte eventuell die Möglichkeit bieten, einen durch einen Calcium Einstrom-vermittelten Effekt auszuschließen (Thomas et al. 2008). Auch bei den zur Detektion der  $G_i$  Protein-Kopplung verwendeten [ $^{35}$ S]GTP S-Bindungsexperimenten kann, wie bereits erläutert wurde, (vgl. 5.2.2) nicht sichergestellt werden, dass es sich bei den Ergebnissen ausschließlich um das Resultat einer  $G_i$  Protein-Kopplung handelt. Um zu gewährleisten, dass es sich bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Hybridliganden wirklich zu einer  $G_s$ , bzw.  $G_i$ -Signalwegsbevorzugung kommt, müssten weiterführende Experimente durchgeführt werden (vgl. 5.2.2).

#### **5.4 Punktmutationen im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstelle des $hM_1$ -Rezeptors beleuchten die Bindungstopographie der dualsterischen Iperoxo/BQCAD Hybride und der daraus resultierenden Rezeptoraktivierung**

Wenn es darum geht, Einblicke in die Bindungstopographie von Liganden am Rezeptorprotein zu erhalten, stellt die zielgerichtete Mutagenese mitunter die Methode der ersten Wahl dar (Javitch et al. 1995; Clackson und Wells 1995). Die Verwendung verschiedener Punktmutationen sowohl in der orthosterischen als auch in Bereichen der putativ allosterischen Bindungsstelle des muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptors sollten es erlauben, den im Rahmen dieser Arbeit aufgedeckten Wechsel der Bindungsorientierung des Hybridpaares JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) vertiefend zu untersuchen. Auf der Basis der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass JK 550 ( $C_4$ ), für welches eine nur 30%ige dualsterische Interaktion vorhergesagt wurde, einen höheren Affinitätsverlust bei Punktmutationen im Bereich der allosterischen Bindungsstelle zeigen müsste, da

die allosterische Bindungsorientierung bei diesem Hybrid zu überwiegen scheint. Weiter wurde angenommen, dass eine Mutation im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle die Bindungsneigung des orthosterischen Bausteins Iperoxo reduzieren würde, was folglich auch die Fraktion der durch JK 537 (C<sub>6</sub>) bevorzugte dualsterischen Bindungspose reduzieren sollte. Als Mutation im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle des muskarinischen *hM*<sub>1</sub>-Rezeptors, wurde eine Punktmutation der unter den fünf Subtypen konservierten Aminosäure Tyrosin 106 zu Alanin, lokalisiert in der Transmembrandomäne III (TM 3) gewählt (vgl. Abb. 5.20). Auf Grund des durch diese Mutation verursachten Abfalls der Bindungsneigung für den Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS konnte auch nach einer Erhöhung der Radioligand-Konzentration (von 0,2 nM auf 1 oder 2 nM) sowie einer Erhöhung der eingesetzten Zellzahl (auf 100.000 oder 150.000 Zellen) keine spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung dargestellt werden. Zurückzuführen ist dieser Affinitätsabfall wahrscheinlich darauf, dass die Seitenkette der zu untersuchenden Aminosäure, der durch den Austausch zu Alanin entfernt wurde, Bestandteil der NMS-Bindungsstelle ist. In diesen Fällen ist es ratsam, den ebenfalls hoch affinen, aber strukturverschiedenen Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]QNB zu verwenden, der gegenüber NMS einen unterschiedlichen Bindungsmodus aufweist (Spalding et al. 1994). Zwar zeigt auch [<sup>3</sup>H]QNB bei dieser Mutation einen 31-fachen Affinitätsabfall, ist aber im Gegensatz zu der von [<sup>3</sup>H]NMS (100-facher Affinitätsverlust), signifikant geringer (Hulme und Lu 1998). Da [<sup>3</sup>H]QNB im Rahmen dieser Arbeit nicht zu Verfügung stand, wurde auf die weiteren Untersuchungen dieser M<sub>1</sub>-Mutation im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle verzichtet. Infolgedessen konnte die zuvor angeführte Hypothese nicht dahingehend untersucht werden, ob die durch JK 537 vornehmlich induzierte aktive Rezeptorfraktion durch eine Punktmutation von Tyrosin 106 zu Alanin in der orthosterischen Bindungsstelle reduziert werden könnte. Somit blieb nur die Untersuchung des Einflusses verschiedener Punktmutationen im Bereich der allosterischen Bindungsstelle. Bei diesen allosterischen Einzelort-Mutationen wurden Rezeptormutanten eingesetzt, die entweder einen Austausch der Aminosäuren M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr, M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp oder M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu zu Alanin aufwiesen (vgl. Abb. 5.20). Alle drei dieser ausgewählten Epitope konnten am *hM*<sub>2</sub>-Rezeptor als Aminosäuren identifiziert werden, die an der Bindung „typischer“ allosterischer Modulatoren beteiligt sind (Buller et al. 2002; Voigtländer et al. 2003; Prilla et al. 2006). Die Aminosäure M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp ist nachweislich an der Bindung des allosterischen Liganden Gallamin beteiligt und führte nach dem Austausch zu Alanin zu einer 10-fachen Abnahme von dessen Affinität (Matsui et al. 1995). Ferner sind alle drei der genannten Aminosäuren am *hM*<sub>1</sub>-Rezeptor nachweislich an der Bindung und der Vermittlung von Kooperativität mit orthosterischen Liganden des M<sub>1</sub>-hochselektiven positiv allosterischen Modulators BQCA beteiligt (Ma et al. 2009; Abdul-Ridha et al. 2014a; Abdul-Ridha et al. 2014b). Mit dem Wissen, dass es sich bei den allosterischen Fragmenten (BQCA<sub>d</sub>) der beiden dualsterischen Liganden JK 550 und JK 537 um Derivate dieses M<sub>1</sub>-selektiven allosterischen Modulators handelt, wurde auf Grund der oben genannten Hypothese angenommen, dass es bei dem überwiegend rein allosterisch bindenden Hybrid JK 550 (vgl. Kapitel 4.1.3 und 4.1.9), zu einem deutlichen Verlust der allosterischen Bindungsorientierung

kommen muss. Neben der aufgestellten Hypothese sollten die zur Verfügung stehenden CHO-Flp-*hM<sub>1</sub>*-Rezeptor-Mutanten ebenfalls Erkenntnisse darüber erbringen, welchen weiteren Einfluss die Epitope M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr, M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp und M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu auf die Bindung und / oder Rezeptoraktivierung der dualsterischen Hybridliganden besitzen.



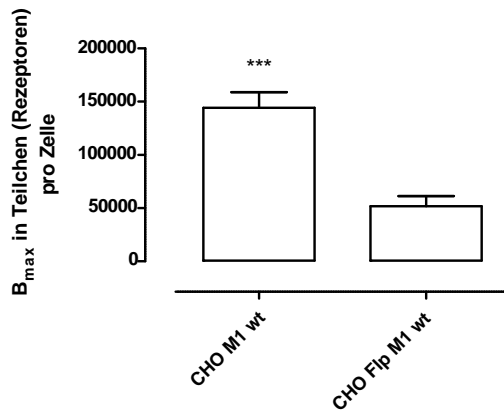
**Abbildung 5. 20:** Graphische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *hM<sub>1</sub>*-Rezeptoren mit Punktmutationen in der orthosterischen, bzw. im putativ allosterischen Bindungsareal. ● Punktmutation im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle des *hM<sub>1</sub>*-Rezeptors; ● Punktmutation im Bereich des putativ allosterischen Bindungsareals des *hM<sub>1</sub>*-Rezeptor (Snake-Plot (*gpcrdb.org*); Ma et al. 2009; Thal et al. 2016). Weitere Erläuterungen im Text.

#### 5.4.1 Einfluss putativ allosterischer Punktmutationen auf die [<sup>3</sup>H]NMS Gleichgewichtsbindung dualsterischer Hybridliganden am muskarinischen *hM<sub>1</sub>*-Rezeptor

Anzumerken ist an dieser Stelle, dass alle der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *hM<sub>1</sub>*-Rezeptormutationen in einem, gegenüber den zuvor verwendeten CHO-*hM<sub>1</sub>*-wt-Zellen, anderen Expressionssystem/Vektor vorlagen (vgl. 2.6.2). Aus diesem Grund, wurden die dualsterischen Hybride zur korrekten Vergleichbarkeit zusätzlich am *hM<sub>1</sub>*-Wildtyprezeptor untersucht, der in dem Flp-In-Expressionssystem (vgl. 2.6.2) exprimiert wurde, in dem auch die zu untersuchenden Rezeptoren mit Punktmutationen im Bereich des allosterischen Bindungsareals vorlagen. In Bezug auf den in beiden Expressionssystemen vorliegenden *hM<sub>1</sub>*-Wildtyp-Rezeptor, wurden keine Unterschiede hinsichtlich der von JK 550 und JK 537 favorisierten Bindungsorientierung vermutet, da es sich in

beiden Fällen um denselben Wildtyprezeptor ( $hM_1$ -wt-Rezeptor) handelte. Anders als erwartet, konnte jedoch der für JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) am  $hM_1$ -wt-Rezeptor detektierte Wechsel zwischen der vornehmlich allosterischen (JK 550) bzw. dualsterischen (JK 537) Bindungsorientierung am CHO-Flp- $M_1$ -wt-Rezeptor nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigten beide Hybride eine fast 100%ige Bindung in der dualsterischen Bindungspose (vgl. Abb. 5.22 (A,B)). Eine mögliche Erklärung dieses Befundes, besteht in der für beide Expressionssysteme detektierten signifikant unterschiedlichen Rezeptorexpression. Ein Vergleich der  $B_{max}$ -Werte für [ $^3$ H]NMS konnte zeigen, dass die Rezeptorexpression der  $hM_1$ -wt-Rezeptoren auf den CHO-Flp-In-Zellen nur einem Viertel derjenigen auf den verwendeten CHO- $K_1$ -Zellen entsprach (vgl. Abb. 5.21). Zudem muss berücksichtigt werden, dass alle Gleichgewichtsbindungsexperimente an lebenden, intakten Zellen durchgeführt wurden. Anders als bei der Verwendung von Homogenaten, kann es bei der Verwendung lebender Zellen zu einer Vielzahl von Ereignissen kommen, die einen Einfluss auf das Bindungsgeschehen von Liganden haben können. So gibt es beispielsweise Daten die belegen, dass eine wesentliche Anzahl an Rezeptoren während des Bindungsexperiments synthetisiert oder abgebaut wird. Die basale Rate der Synthese und Degeneration konnte für eine Vielzahl von Rezeptoren gemessen werden. Unter basalen Konditionen lag die Halbwertszeit von Rezeptoren an der Zelloberfläche typischerweise bei Stunden bis hin zu mehreren Tagen (Motulsky et al. 1985). Diese Werte legen nahe, dass eine signifikante Menge der im Rahmen eines Experimentes zu charakterisierenden Rezeptoren, dass wie im Rahmen dieser Arbeit über mehrere Stunden unter physiologischen Bedingungen durchgeführt wird, an der Zelloberfläche vorhanden sind oder internalisieren und wieder recycelt werden (Motulsky et al. 1985). In manchen Systemen ist die Situation komplizierter, da die Anwesenheit eines Agonisten die Internalisierung von Rezeptoren von der Zelloberfläche beschleunigen kann, so dass die Halbwertszeit sich auf Minuten oder Stunden reduziert. Dieser Prozess ist verantwortlich für Rezeptor „*down-regulation*“, die zu einem Verlust der detektierbaren Rezeptoren auf der Zelloberfläche führt (Mahan et al. 1985; Chun et al. 1984). Somit bleibt es im Hinterkopf zu behalten, dass in manchen Fällen die „Kompetition“ der Bindung eines Radioliganden durch einen unmarkierten Agonisten größtenteils einen Agonist-vermittelten Verlust an Rezeptoren widerspiegeln kann (Motulsky et al. 1985). Studien an kultivierten Herzzellen (Galper et al. 1987; Nathanson 1983) sowie an Neuroblastomzellen (Feigenbaum und El-Fakahany 1985) konnten zeigen, dass die Verwendung der beiden Radioantagonisten [ $^3$ H]NMS (nicht zellpermeabel) und [ $^3$ H]QNB (zellpermeabel) in intakten Zellen verwendet werden kann, um muskarinische Rezeptoren zu unterscheiden, die sich an der Zelloberfläche befinden (zugänglich für [ $^3$ H]NMS und [ $^3$ H]QNB oder internalisierte Rezeptoren nur zugänglich für [ $^3$ H]QNB). Mit Hilfe dieser beiden Radioantagonisten könnte somit überprüft werden, ob tatsächlich die Gesamtmenge an Rezeptoren verringert ist, oder ob nur die Rezeptormenge auf der Zelloberfläche verringert ist. Zusätzlich könnten ebenfalls Ereignisse wie die auf Grund hoher Rezeptorexpression vorkommende Spontanaktivität (Ligt et al. 2000) und daraus resultierende

Ereignisse wie Bildung von Dimer- oder Oligomeren in Betracht gezogen werden (Hern et al. 2010; Pediani et al. 2016).



**Abbildung 5. 21: Die Verwendung unterschiedlicher Expressionssysteme/Vektoren führt zu signifikanten Unterschieden der  $hM_1$ -Rezeptorexpression.** Die Verwendung des Flp-In-Systems führt zu einer fast 60%igen Reduktion des Expressionslevels von Oberflächenrezeptoren. Ordinate:  $B_{max}$ : Anzahl der spezifischen Bindungsstellen für  $[^3H]NMS$  ermittelt nach nach DeBlasi (1989) unter Berücksichtigung der verwendeten Zellzahl von 75.000 Zellen pro Vertiefung und der Avogadro-Konstante. Die Daten wurden Tab. 4.43 in Kapitel 4.2.1.1 entnommen. \*\*\* signifikant unterschiedlich von CHO-Flp- $hM_1$ -wt (t-Test,  $p < 0,001$ ).

Trotz des im Flp-In Rezeptorexpressionssystem nicht reproduzierbaren Ergebnisses des „*Flip-Flop*“-Mechanismus von JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) an muskarinischen  $hM_1$ -wt-Rezeptoren, konnten dennoch hinsichtlich des Einflusses der drei unterschiedlichen Mutationen mehrere erwähnenswerte Befunde erhoben werden (vgl. Abb. 5.22). In Gleichgewichtsbindungsuntersuchungen mit dem Radioantagonisten  $[^3H]NMS$  zeigte das in JK 550 ( $C_4$ ) verwendete allosterische Fragment JK 533 ( $C_4$ ), anders als erwartet, an der Rezeptormutation  $M_1^{179}Tyr \rightarrow Ala$  keine Affinitätsabnahme, sondern eine signifikante Zunahme der Bindungsneigung ( $\log K_B$  wurde kleiner, t-Test,  $p < 0,05$ ). Die daraufhin aufgestellte Hypothese lautete, dass die Zunahme der Affinität des allosterischen Bausteins mit einer erhöhten, rein allosterischen Bindung des dualsterischen Hybrides einhergeht. Das korrespondierende dualsterische Hybrid JK 550 ( $C_4$ ) wies in der Tat eine signifikante Abnahme der dualsterischen Bindungsorientierung ( $\log K_A$ , vgl. Kapitel 4.2.4.3) auf. Zusätzlich zeigte die Inhibitionskurve für JK 550 ( $C_4$ ) ein unteres Plateau von  $10 \pm 3\%$ , das sich signifikant von Null unterschied (F-Test,  $p < 0,05$ ) und einen zusätzlichen Hinweis auf die Bildung ternärer Komplexe bestehend aus Rezeptor, Radioligand und dualsterischem Ligand (in der rein allosterischen Bindungspose) gab, der die unvollständige Inhibition erklärte. Die Folge dieser Beobachtungen wäre demnach eine Zunahme der allosterischen (inaktive Rezeptorfraction) und eine Abnahme der dualsterischen (aktiven Rezeptorfraction) Bindungspose. Durch die Berechnung der korrespondierenden fraktionellen Rezeptorbesetzungen konnte genau diese Hypothese bestätigt werden. Der Verlust der aromatischen Seitenkette führte zu einer fast 50%igen Zunahme der inaktiven und Abnahme der aktiven Rezeptorfraction (vgl. Abb. 5.22). Dieser durch eine fehlende Seitenkette in der zweiten extrazellulären Schleife des  $hM_1$ -wt-Rezeptors induzierte Wechsel der vornehmlich dualsterische Bindungsorientierung am  $hM_1$ -wt-Rezeptor, zu einer überwiegend allosterischen Bindungsorientierung, konnte durch die Betrachtung der  $R_{pose}$ -Werte als statistisch signifikant belegt werden. Interessanterweise zeigte sich mit dieser Mutation ( $M_1^{179}Tyr \rightarrow Ala$ ) dasselbe Bild, wie im zuvor verwendeten Expressionssystem in welchem JK 550 an  $hM_1$ -wt-Rezeptoren untersucht worden

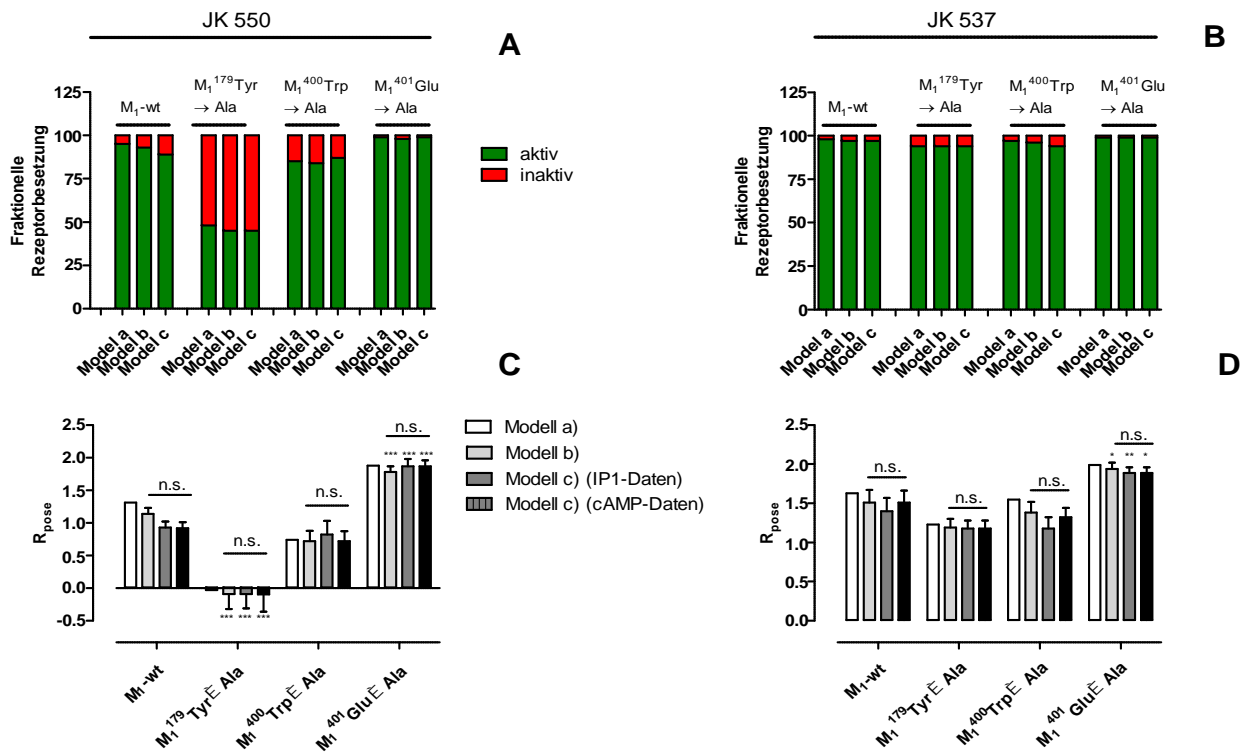
war. Ob sich diesbezüglich ein Zusammenhang mit dem Auftreten von Spontanaktivität, der Bildung von Dimer- oder Oligomeren oder einem Protean-Agonismus finden lässt, müsste weiter überprüft werden.

Das ebenfalls bis auf die Zwischenkette identische Hybrid JK 537 ( $C_6$ ), sowie sein allosterisches Fragment JK 532 ( $C_6$ ) zeigten interessanterweise keinerlei Veränderung hinsichtlich der Bindungsneigung an der  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  Rezeptormutation (vgl. Kapitel 4.2.4.3). Einzig das untere Plateau der Inhibitionskurve des korrespondierenden dualsterischen Hybrides JK 537 ( $C_6$ ) war mit  $12 \pm 2\%$  signifikant von Null unterschiedlich. Dieses nicht bei Null Prozent spezifischer [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung auslaufende Plateau, liefert somit auch bei JK 537 Hinweise auf die Bildung ternärer Komplexe. Anders als bei JK 550, kann dies jedoch nicht auf eine Zunahme der Bindungsneigung des allosterischen Fragmentes und einer damit verbundene Abnahme des dualsterischen Bindungsmodus erklärt werden. Ein Ansatz für eine Erklärung bietet die ebenfalls mit der Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  beobachtete Abnahme der Affinität des orthosterischen Agonisten und zugleich orthosterischen Hybridbausteines Iperoxo (vgl. Abbildung 5.23). Die Abnahme der Affinität des orthosterischen Bausteins könnte somit zu einer (geringen) Abnahme der vornehmlich für dieses Hybrid postulierten Bindungsneigung in der dualsterischen Bindungsorientierung führen. Daraus folgte eine geringfügig höhere Bindungsneigung in der allosterischen Pose und damit die vermehrte Bildung ternärer Komplexe, die wiederum das leicht erhöhte untere Plateau der [ $^3\text{H}$ ]NMS Inhibitionskurve von JK 537 erklärte (vgl. Kapitel 4.2.4.3) (Holze et al. 2016).

Anders als bei dem Austausch der Aminosäure  $M_1^{179}\text{Tyr}$ , zeigte die Mutation  $M_1^{400}\text{Tryptophan}$  zu Alanin, der mit dem Verlust eines aromatischen Ringsystems einhergeht, überraschenderweise keinen Einfluss auf die Bindungsaffinität der beiden allosterischen Fragmente JK 533 und JK 532. Auf Grund der Tatsache, dass Tryptophan 400 im Beginn der siebten Transmembran (TM7) an der Bindung von BQCA beteiligt ist (Abdul-Ridha et al. 2014b), lag die Vermutung nahe, dass es durch den Verlust des aromatischen Ringsystems an dieser Position ebenfalls zu einem deutlichen Affinitätsabfall der allosterischen Fragmente (BQCA-Derivate) kommt. Trotz des nicht vorhandenen Einflusses auf die Bindungsneigung der allosterischen Fragmente, führte die Mutation  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  im Falle von JK 550 ( $C_4$ ) jedoch zu einer signifikanten Abnahme der Bindungskonstanten  $K_A$  (Bindungsneigung des dualsterischen Hybrides in der dualsterischen Bindungsorientierung). Dieser Befund könnte ebenfalls durch den von Iperoxo in Gegenwart dieser Mutation detektierten Affinitätsverlust von fast zwei Dekaden erklärt werden (vgl. Abb. 5.23). Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der  $R_{\text{pose}}$ -Werte konnte nicht ausgemacht werden. Dies wurde als Hinweis auf eine durch diese Mutation unveränderte Bindungsorientierung von JK 550 interpretiert (vgl. Abb. 5.22). Interessanterweise konnte für JK 537 ( $C_6$ ) weder eine Abnahme der Bindungsneigung, noch ein von Null Prozent signifikant verschiedenes Plateau spezifischer [ $^3\text{H}$ ]NMS-Bindung ermittelt werden (vgl. Kapitel 4.2.4.3). Somit scheint das aromatische Ringsystem der Seitenkette von Tryptophan im oberen Bereich der siebten



Transmembrandomäne ebenfalls keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten und die Bindungsorientierung des längeren Hybrides zu besitzen.

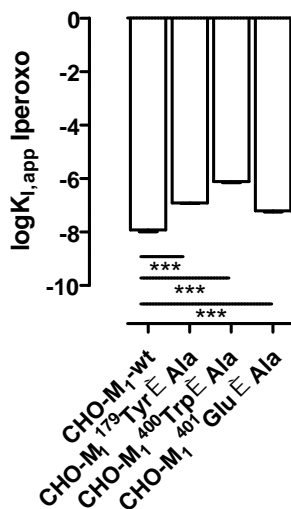


**Abbildung 5. 22:** Vergleich der mit Hilfe von Analyse a, b und c der für die dualsterischen Hybridliganden JK 550 und JK 537 an  $hM_1$ -Rezeptoren mit Punktmutationen im Bereich des allosterischen Bindungsareals ermittelten (A) maximalen fraktionellen Rezeptorbesetzungen und (B)  $R_{\text{pose}}$ -Werte. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. \*,\*\*,\*\*\* signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße für den  $hM_1$ -wt-Rezeptor (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). n.s.: nicht signifikant verschieden zwischen den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Analysen b und c (t-Test,  $p > 0,05$ ).

Der Austausch der Aminosäure  $M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$  zeigte bei dem allosterischen Fragment JK 533 eine um den Faktor vier verringerte Bindungsneigung  $K_B$ . Somit wurde geschlussfolgert, dass die Abnahme der Affinität des allosterischen Bausteins mit einer erhöhten rein dualsterischen Bindung des zugehörigen Hybrides JK 550 einhergeht. Die Berechnung der fraktionellen Rezeptorbesetzung in der aktiven und der inaktiven Orientierung aus den Bindungskonstanten, die mit allen drei Analysen (Analyse a, b, c) für JK 550 an der Mutation  $M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$  zu Alanin ermittelt wurden, bestätigten diese Hypothese durch einen Anstieg der aktiven Rezeptorpopulation auf 99, bzw 98% (vgl. Abb. 5.22 (A)). Zusätzliche Bestätigung für die Zunahme der dualsterischen Bindung lieferte der signifikante Unterschied der  $R_{\text{pose}}$ -Werte für den  $hM_1$ -Wildtyprezeptor und der Mutation  $M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$ , ermittelt aus den Analysen b, c) (vgl. Abb. 5.22 (C) und Kapitel 4.2.4.3 und 4.2.7.4). Neben dem kurzen allosterischen Fragment JK 533 zeigte auch das längere allosterische Fragment JK 532 eine signifikant geringere Bindungsneigung am  $M_1^{401}\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$ -Rezeptor. Würde die oben aufgestellte Hypothese stimmen, so müsste sich dies auch in diesem Fall in einer Zunahme der dualsterischen

Bindungsorientierung des Hybrides JK 537 widerspiegeln. Da jedoch für JK 537 am Wildtyprezeptor bereits eine hohe aktive Rezeptorpopulation von 98% (Analyse a)/ 97% (Analyse b)/ 97% (Analyse c) ermittelt werden konnte, war der Spielraum für eine weitere Zunahme folglich deutlich begrenzt (vgl. Abb. 5.22 (B)). Dennoch ergab die Berechnung der fraktionellen Rezeptorbesetzung mit allen drei Analysen aus den Bindungskonstanten für JK 537 an der Mutation  $M_1^{401}$  Glu zu Alanin einen 99% Anteil für die aktive dualsterische Rezeptorpopulation. Trotz dieser sehr geringen Veränderung, konnte auch hier der signifikante Unterschied des  $R_{\text{pose}}$ -Wertes zwischen dem Wildtyprezeptor und der Mutation  $M_1^{401}$  Glu Ala (ermittelt aus Analyse b und c) die Zunahme der dualsterischen Bindung bestätigen (vgl. Abb. 5.22 (D) und Kapitel 4.2.4.3 und 4.2.7.4).

Schlussfolgernd konnte für den muskarinischen  $M_1$ -Rezeptorsubtyp gezeigt werden, dass die Aminosäuren  $M_1^{179}$  Tyrosin,  $M_1^{400}$  Tryptophan und  $M_1^{401}$  Glutaminsäure nicht nur eine Bedeutung für die Bindung allosterischer Modulatoren haben, sondern auch die Bindung orthosterischer/dualsterischer Liganden auf unterschiedliche Weise beeinflussen können. Es konnten Erkenntnisse darüber erlangt werden, welche Epitope die dualsterischen Iperoxo/BQCA-d-Hybridliganden JK 550 und JK 537 für ihre Interaktion mit dem CHO- $hM_1$ -Rezeptorprotein nutzen. Eindeutige Aussagen über die für die Bindung von diesen Liganden verwendeten Aminosäurereste können jedoch nicht getroffen werden, da die experimentelle Unterscheidung zwischen einem direkten, durch Mutationen bestimmter Aminosäuren ausgelösten Effekt auf die Bindung von Liganden und einem Effekt der aus indirekten Störungen in der Energetik Ligand-induzierter Konformationsänderungen resultiert, schwierig ist (Shortle et al. 1992). Eine Möglichkeit weitere Informationen über die von den dualsterischen Iperoxo/BQCA-d-Hybridliganden verwendete Epitope zu erhalten, wären neben der Untersuchung weiterer  $hM_1$ -Mutantionen, MD-Simulationen auf Basis der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten [ $^3$ H]NMS-Bindungsdaten.



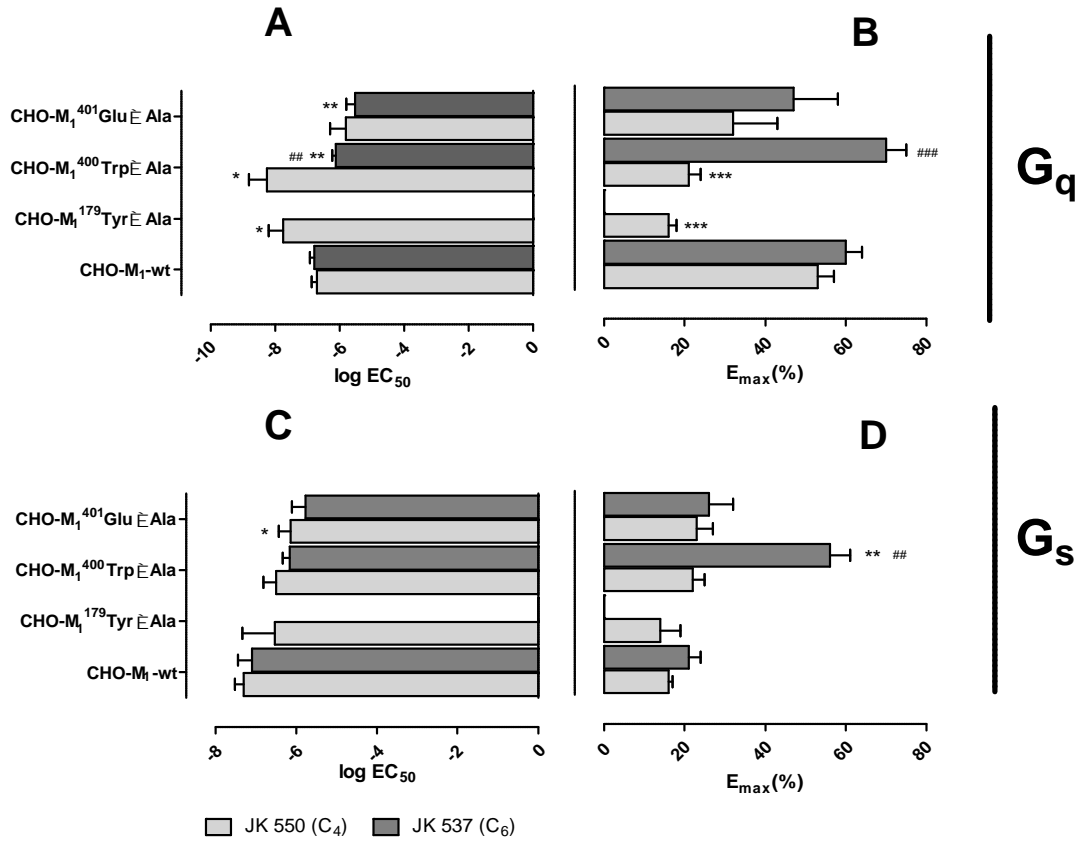
**Abbildung 5. 23: Punktmutationen im Bereich des allosterischen Bindungsareals führen zu einem deutlichen Verlust der Bindungsneigung des orthosterischen Agonisten Iperoxo.**  $\log K_{1,app}$ : dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsinhibitionskonstante  $K_1$  ( $K_{I/app}$  bei von  $n_H = -1$  abweichender Kurvensteilheit) der Testsubstanz, (vgl. 3.2.4.1, Gl. 8) Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus drei bis vier unabhängigen Experimenten, die in Form von Dreifachbestimmungen ausgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*\*\*: signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Rezeptors (t-Test, \*\*\* $p < 0,001$ ).

### 5.4.2 Einfluss unterschiedlicher Punktmutationen des $hM_1$ -Rezeptors auf die Produktion sekundärer Botenstoffe

Neben der durch die Mutationen im Bereich des allosterischen Bindungsareals induzierten Beeinflussung der  $hM_1$ -Bindung, sollte erstmals auch die Beeinflussung der durch die dualsterischen Iperoxo/BQCAAd-Hybridliganden induzierten Fähigkeit zur Rezeptoraktivierung untersucht werden. Interessanterweise, zeigte das kurze dualsterische Hybrid JK 550 an der Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr} \rightarrow \text{Ala}$  auf dem  $G_q$ -Signalweg eine signifikante *Zunahme* der Wirkstärke (i.e. einen kleineren  $\log EC_{50}$  (t-Test,  $p < 0,05$ )), jedoch eine im Vergleich zum Wildtyp signifikante *Abnahme* der intrinsischen Wirksamkeit, d.h. ein kleineres  $E_{\max}$  (Abb. 5.24, t-Test,  $p < 0,05$ ). Auf Grund der für JK 550 an dieser Mutation beobachtete Abnahme der aktiven, dualsterischen Bindung (vgl. Abb. 5.22) und auch der beobachteten Abnahme der Wirkstärke des orthosterischen Bausteins Iperoxo (vgl. Abb. 5.23), erschien es umso erstaunlicher, dass für JK 550 eine *Zunahme* bezüglich der Wirkstärke verzeichnet werden konnte. Die beobachtete höhere Wirksamkeit auf dem  $G_q$ -Signalweg konnte für dieses Hybrid durch eine signifikant höhere funktionelle Affinität  $K_A$ , die mit Hilfe des „Operational Model of Agonism“ (Black und Leff 1983) ermittelt werden konnte (vgl. Kapitel 4.2.6, Tab. 4.63) bestätigt werden. Unter dem Gesichtspunkt, dass JK 550 trotz einer maximalen dualsterischen Bindungsneigung von unter 50% eine erhöhte Wirkstärke gegenüber dem Wildtyprezeptor induzierte, ist es umso erstaunlicher, dass die Mutation  $M_1^{179}\text{Tyrosin}$  zu Alanin bei dem um nur zwei Kohlenstoffatome längeren Hybrid JK 537 mit einer dualsterischen Bindungsneigung von maximal 94% zu einem vollständigen Verlust der Rezeptoraktivierung sowohl auf dem  $G_q$ - als auch auf dem  $G_s$ -Signalweg führte (vgl. Abb. 5.24). Wird von der von Bock und Kollegen aufgestellte Hypothese ausgegangen, dass am muskarinischen  $M_2$ -Rezeptor Bereiche der allosterischen Bindungsstelle in den Vorgang der Rezeptoraktivierung involviert sind (Bock et al. 2012), so lässt sich diese auf den  $M_1$ -Rezeptorsubtyp übertragen.

Eine Besonderheit dieser  $M_1^{179}\text{Tyrosin}$  zu Alanin Mutation war zudem, dass die fehlende Seitenkette des Tyrosins zwar zu einer starken Abnahme der Wirkstärke (größerer  $\log EC_{50}$ ) des in den dualsterischen Hybriden JK 550 und JK 537 vorhandenen orthosterischen Bausteins Iperoxo führte, die fehlende aromatischen Seitenkette jedoch die Fähigkeit eines für Iperoxo am  $hM_1$ -Rezeptor bisher nicht detektierten Superagonismus (Schrage et al. 2013) induzierte. Dieses Phänomen des Superagonismus beschreibt die Fähigkeit eines Agonisten einen Rezeptor mit einer höheren intrinsischen Wirksamkeit „*efficacy*“ zu aktivieren als der endogene Agonist des jeweiligen Rezeptors (Smith et al. 2011; Schrage et al. 2016). Weitaus interessanter ist jedoch, dass die Zunahme der intrinsischen Wirksamkeit  $E_{\max}$  nur auf dem  $G_s$ -Signalweg detektiert werden konnte. Auf dem für den  $hM_1$ -Rezeptor präferenziell induzierten  $G_q$ -Signalweg, konnte keine Zunahme beobachtet werden (vgl. Abb. 5.25). Diese Ergebnisse liefern erstmalig mögliche Hinweise auf Interaktionsmechanismen, bzw. induzierte Rezeptorkonformationen, die Aufschlüsse über das Phänomen „Superagonismus“ geben könnten.

Die Aminosäure  $M_1^{400}\text{Trp}$  ist oberhalb der orthosterischen Bindungsstelle, im Übergang zwischen der dritten extrazellulären Schleife (ECL3) und der siebten Transmembran (TM7) lokalisiert und ist unter den fünf Muskarinrezeptor-Subtypen konserviert. Kruse und Mitarbeiter (2013) konnten für den muskarinischen  $M_2$ -Rezeptor zeigen, dass die Mutation von  $M_2^{422}\text{Trp}$  (korrespondiert mit der AS  $^{400}\text{Trp}$  am  $hM_1$ -Rezeptor) die in der aktiven Rezeptorkonformation notwendige Verengung im oberen Bereich der transmembranären Domänen ermöglicht. Dies unterstreicht eindeutig die Bedeutung dieser Aminosäure hinsichtlich der Rezeptoraktivierung. Die Mutation  $M_1^{400}\text{Tryptophan}$  zu Alanin bewirkte für JK 550 eine um 1,5 Dekaden höhere Wirkstärke (geringerer  $\log EC_{50}$ ) aber, wie im Falle des Austausches von  $M_1^{179}\text{Tyrosin}$  zu Alanin beobachtet, eine Reduktion der intrinsischen Wirksamkeit  $E_{\max}$  um den Faktor 2,5 (vgl. Abb. 5.24). Interessanterweise bedingt das Fehlen des aromatischen Restes, dass das kürzere Hybrid 550 in der Lage ist, die gleiche Wirksamkeit  $\log EC_{50}$  zu erzielen, wie es Iperoxo am Wildtyprezeptor (vgl. Abb. 5.25) vermag. Werden jedoch die Auswirkungen der Mutation  $M_1^{400}\text{Tryptophan}$  zu Alanin auf die durch Iperoxo induzierte Fähigkeit der  $G_q$  Protein vermittelten Rezeptoraktivierung betrachtet, so zeigt sich ein komplett gegenteiliges Bild mit einem Wirksamkeitsverlust von über zwei Dekaden der Konzentrationsachse (vgl. Abb. 5.25). Es scheint, als wenn der fehlende aromatische Rest es dem kurzen Hybrid JK 550 ermöglicht, in die Position zu „rutschen“ und mit Aminosäureresten zu interagieren, mit denen am Wildtyprezeptor der orthosterische Ligand Iperoxo interagiert. Der allosterische Teil von JK 550 scheint das Hybrid in dieser Bindung zu halten, während Iperoxo alleine auf Grund der fehlenden aromatischen Seitenkette des Tryptophans wahrscheinlich nicht in der richtigen Position gehalten werden kann. Wie bereits bei der Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  zeigte sich für Iperoxo auch mit der Rezeptormutation  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  der Hinweis auf die Fähigkeit der sonst nur für den  $M_2$  (Michal et al. 2001; Bock et al. 2012; Schrage et al. 2013) und den  $M_4$ -Rezeptor (Dittman et al. 1994; Mistry et al. 2005) detektierten Fähigkeit eines Superagonismus, der bei dieser Mutation auch auf dem  $G_q$  Protein vermittelten Signalweg detektiert werden konnte ( $E_{\max} = 109 \pm 2\%$ ). Wie zuvor beobachtet, war die Zunahme des oberen Plateaus auf dem  $G_s$ -Signalweg dennoch deutlich größer, verglichen mit dem  $G_q$ -Signalweg (vgl. Abb. 5.25). Schrage und Mitarbeiter postulierten in Bezug auf den am  $M_2$ -Rezeptor detektierten Superagonismus, dass Iperoxo im Vergleich zu ACh voluminöser ist, wodurch es vermutlich zu zahlreicheren Interaktionen mit dem Rezeptorprotein kommt, die infolgedessen zu einer höheren intrinsischen Wirksamkeit Anlass geben (Schrage et al. 2013). Eventuell führen die fehlenden Seitenketten der Aminosäuren  $M_1^{179}\text{Tyr}$  und  $M_1^{400}\text{Trp}$  dazu, dass Iperoxo mit mehr Interaktionspunkten des  $M_1$ -Rezeptors interagieren kann, um daraufhin eine höhere intrinsische Wirkstärke  $E_{\max}$  zu bewirken. Um zu klären ob diese Hypothese zutrifft und warum die Zunahme auf dem durch  $G_s$  Proteine vermittelten Signalweg höher ist, als auf dem durch  $G_q$  Proteine vermittelten Signalweg, bedarf es weiterer Untersuchungen.

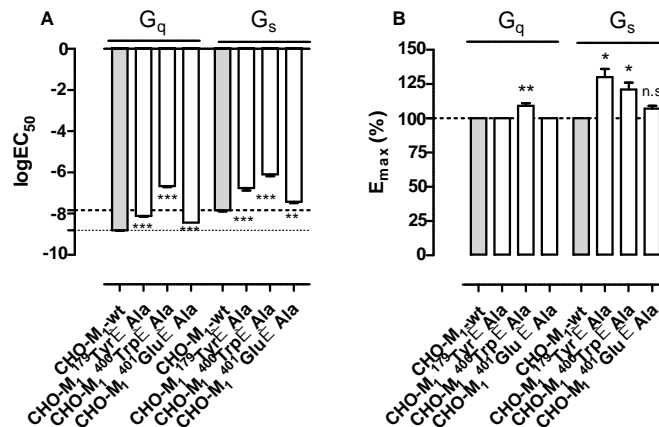


**Abbildung 5. 24:** Vergleich der durch JK 550 und JK 537 induzierten Wirkstärke  $\log EC_{50}$  und ihrer intrinsischen Wirksamkeit  $E_{max}$  hinsichtlich der  $G_q$  und  $G_s$  Protein-Kopplung an  $hM_1$ -Rezeptoren mit Punktmutationen im allosterischen Bindungsareal.  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der Hybridligand-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $E_{max}$ : Maximale  $IP_1$ -/ $cAMP$ -Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungskurve, in Prozent des durch  $100 \mu M$  ACh verursachten Maximizeffektes (vgl. Kapitel 4.2.5.3 und 4.2.5.7). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwertes aus drei bis sieben unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. \*, \*\*, \*\*\* signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des  $hM_1$ -wt Rezeptors (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). ##, ### signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des kürzeren Hybrid JK 550 (t-Test, ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ ).

Anders als bei der Mutation  $M_1^{179}Tyr Ala$ , führte die Mutation  $M_1^{400}Trp Ala$  nicht zu einem völligen Verlust der durch das dualsterische Hybrid JK 537 vermittelte  $G_q$ , bzw.  $G_s$  Protein Aktivierung. Wie sein orthosterischer Baustein Iperoxo, konnte für JK 537 auf dem  $G_q$  Protein-vermittelten Signalweg eine signifikante Abnahme der Wirkstärke (höherer  $\log EC_{50}$ ) detektiert werden (t-Test,  $p < 0,05$ ) (vgl. Abb. 5.24). Anders als bei Iperoxo, kam es auf dem  $G_s$ -vermittelten Signalweg zu keiner Veränderung hinsichtlich der Wirkstärke, jedoch ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der intrinsischen Wirksamkeit (t-Test,  $p < 0,05$ ). Diese Daten liefern Hinweise darauf, dass der Aminosäure  $M_1^{400}Trp$  am Übergang zwischen der dritten extrazellulären Schleife und der siebten Transmembrandomäne bezüglich der von JK 537 und seinem orthosterischer Baustein Iperoxo verursachten Rezeptoraktivierungen entscheidende Bedeutung zukommt.

Der Austausch der Aminosäure  $M_1^{401}Glutaminsäure$  zu Alanin führte für JK 537 hinsichtlich der  $G_q$  Protein-induzierten Signalwegaktivierung zu einer signifikanten Abnahme der Wirkstärke. Auf

dem  $G_s$  Protein-vermittelten Signalweg zeigte sich für das kürzere dualsterische Hybrid JK 550 dagegen eine signifikante Zunahme der Wirksamkeit von über einer Dekade. Angesichts eines Anstieges der dualsterischen Bindungsorientierung gegenüber dem  $hM_1$ -wt-Rezeptor um 5-10% (je nach Analysemethode, b oder c) auf fast 100% für beide Hybride nach der Entfernung der negativen Ladung in Position 401 von  $M_1^{401}\text{Glu}$  (vgl. Abb. 5.23), sprechen diese Befunde für einen nur begrenzten Einfluss dieses Zuwachses auf die Wirkpotenz  $EC_{50}$  und das Fehlen eines Einflusses auf die intrinsische Wirksamkeit  $E_{\max}$  (vgl. Abb. 5.24 (B und C)).



**Abbildung 5.25: Vergleich der von Iperoxo induzierten Wirkstärke  $\log EC_{50}$  und intrinsischen Wirksamkeit  $E_{\max}$  hinsichtlich der  $G_q$  und  $G_s$  Protein-Kopplung an  $hM_1$ -Rezeptoren mit Punktmutationen im allosterischen Bindungsareal.**  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft.  $E_{\max}$ : Maximale IP<sub>1</sub>-cAMP-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve, vgl. Kapitel 4.2.5.2 und 4.2.5.6). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus drei bis sieben unabhängigen Experimenten, die in Form von in Dreifachbestimmungen ausgeführt wurden. \*, \*\*, \*\*\* signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des  $hM_1$ -wt Rezeptors (t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , n.s.: nicht signifikant  $p > 0,05$ ).

Wie schon für die Affinitätsveränderung der Hybride durch die Mutation der drei Aminosäuren  $M_1^{179}\text{Tyr}$ ,  $M_1^{400}\text{Trp}$  und  $M_1^{401}\text{Glu}$  erläutert, kann auch die Interpretation der Befunde hinsichtlich der Rezeptoraktivierung nur unter Vorbehalt erfolgen, da keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden kann, ob die beobachtete Veränderung auf Grund einer direkten Interaktion mit den Aminosäureresten des Rezeptorproteins entsteht, oder aber als Resultat der Erzeugung konformativ-induzierter Rezeptoreffekte entsteht (Matsui et al. 1995).

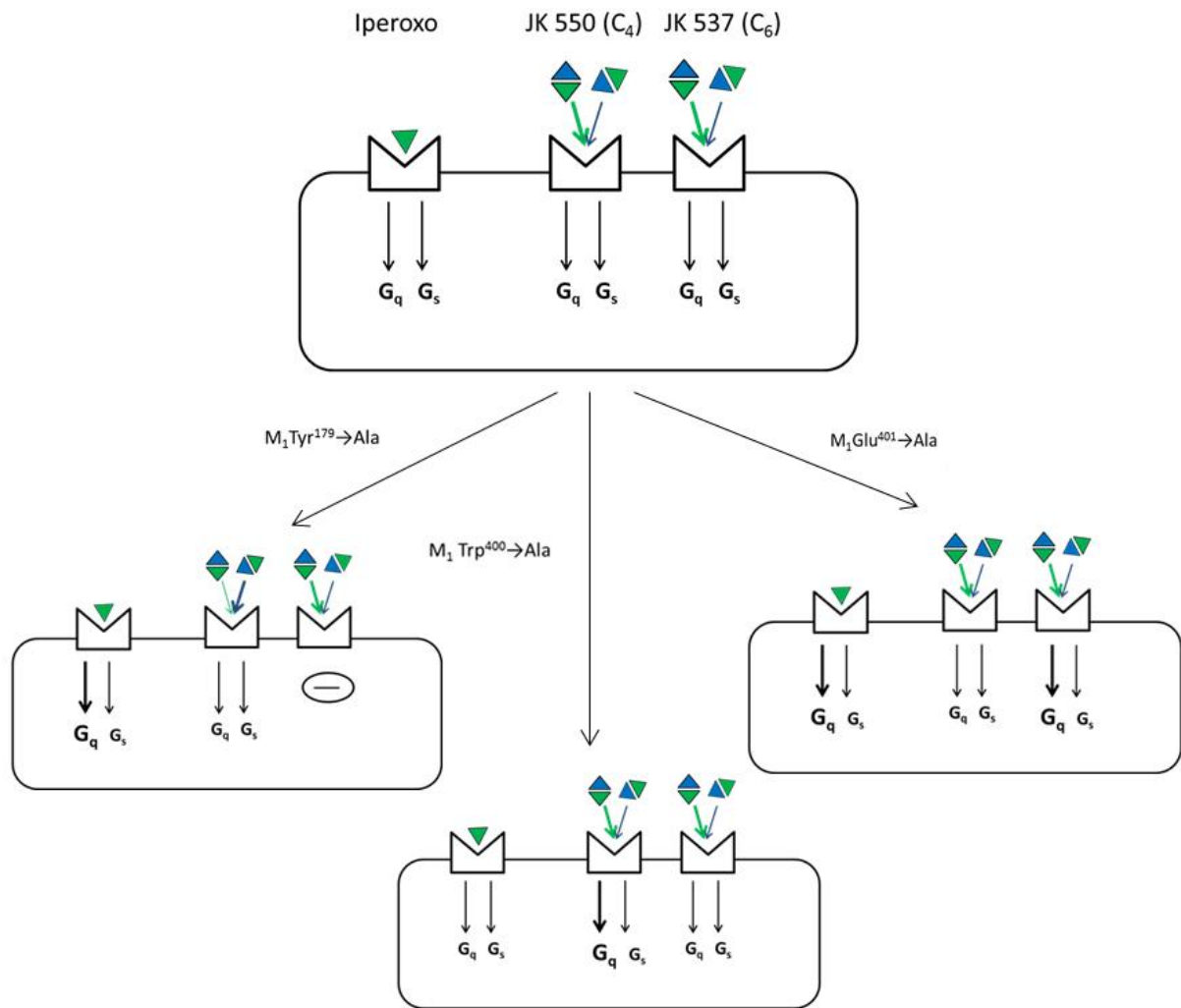
### 5.4.3 Punktmutationen im putativ allosterischen Bereich des $hM_1$ -Rezeptors induzieren Signalwegelektivität von Vollagonisten sowie von dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zudem überprüft werden, ob die untersuchten Mutationen im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptors in der Lage sind, eine ligandspezifische Bevorzugung eines bestimmten Signalweges zu induzieren. Auf diese Weise sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, welche Aminosäuren möglicherweise an der Bindung unterschiedlicher G Proteine sowie der Beeinflussung signalwegrelevanter Rezeptorkonformation beteiligt sind.

Diesbezüglich konnte z.B. für den Chemokin-Rezeptor (CCR5) beobachtet werden, dass Mutationen in der Verbindungstelle zwischen TM VI (TM6) und TM VII (TM7) die Bewegung, die für die G Protein-selektive Signalwegaktivierung verantwortlich ist, sterisch verhindern (Steen et al. 2013). Im Gegensatz dazu konnte in Thromboxan Rezeptoren durch eine Störung eines GxxGxxxL helikalen Interaktionsmotifs in TM5 eine Unterdrückung der G Protein-vermittelte Signalwegaktivierung gefunden werden (Frey et al. 2013). Mutationen im Bereich der allosterischen Bindungsstelle des muskarinischen M<sub>2</sub>-Rezeptors (M<sub>2</sub><sup>80</sup>Tyr und M<sub>2</sub><sup>99</sup>Trp; korrespondierend am M<sub>1</sub>: M<sub>1</sub><sup>82</sup>Tyr und M<sub>1</sub><sup>101</sup>Trp) konnten eine Signalwegsbevorzugung („*Ligand-Bias*“) eines sonst nicht selektiven Agonisten induzieren, was Hinweise darauf lieferte, dass diese Aminosäuren als molekulare Schalter bzw. eine Art Pfortner in Bezug auf funktionelle Selektivität fungieren (Gregory et al. 2012). Auf Grund der im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Hinweise auf die Auswirkungen von Mutationen im Bereich des allosterischen Bindungsareals des muskarinischen hM<sub>1</sub>-Rezeptors sowohl auf die Bindung als auch auf die Rezeptoraktivierung orthosterischer Agonisten sowie dualsterischer Liganden, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die drei Aminosäuren M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr in der zweiten extrazellulären Schleife (ECL2) sowie M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp und M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu im Beginn der siebten Transmembran (TM7) möglicherweise an der Beeinflussung signalwegrelevanter Rezeptorkonformation beteiligt sind. Am Wildtyprezeptor konnte für die dualsterischen Hybride JK 550 und JK 537 zwischen dem G<sub>q</sub>- und dem G<sub>s</sub>-Signalweg keine Signalwegbevorzugung (vgl. 4.2.8;  $\log\tau/K_A$ ) festgestellt werden, was zu dem Schluss führte, dass die gleichzeitige Besetzung der orthosterischen und der allosterischen Bindungsstelle, zumindest hinsichtlich der G<sub>q</sub> und G<sub>s</sub> Protein-Kopplung, es nicht verhinderte, eine bestimmte Rezeptorkonformation zu induzieren, bzw. zu inhibieren wie es beispielsweise Bock und Mitarbeiter (2012) für die beiden dualsterischen Liganden Iper-6-phthal und Iper-6-naph am hM<sub>2</sub>-Rezeptor zeigen konnten. Wie bereits unter 5.3.2 erläutert, konnten die Autoren nachweisen, dass diese beiden dualsterischen Liganden durch die Besetzung der allosterischen Bereiches des hM<sub>2</sub>-Rezeptors eine für den G<sub>s</sub>-Signalweg notwendige Rezeptorkonformation nur eingeschränkt vorhanden war, während die Rezeptorkonformation für die G<sub>i</sub>-Proteinkopplung unbeeinflusst blieb. Diese Umstände führten zu einer funktionellen Selektivität für den von hM<sub>2</sub>-Rezeptoren präferierten G<sub>i</sub>-Signalweg (Bock et al. 2012). Interessanterweise führte eine Verlängerung der Zwischenkette dieser Hybridliganden an hM<sub>2</sub>-Rezeptoren zu einer Aufhebung der G<sub>i</sub>-Signalwegprävalenz. Eine Begründung lag in der größeren Entfernung der voluminösen allosterischen Bausteine von den kritischen Interaktionsarealen des allosterischen Bereiches. Dies wiederum führte zu einer Wiedererlangung der nötigen Flexibilität, die in der Folge zu einem vollständigen G Proteinkopplungsrepertoire führte (Bock et al. 2012). Am muskarinischen hM<sub>3</sub>-Rezeptor führten die dualsterische Liganden Iper-6-naph und Iper-6-phthal zu keiner Signalwegsbevorzugung (G<sub>q</sub>, G<sub>s</sub>)(Vogel, Dissertationsschrift 2015). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit am hM<sub>1</sub>-Rezeptor untersuchten Hybride JK 550 und JK 537 sind demnach weitere Beispiele für Hybride ohne Signalwegselektivität gegenüber G<sub>q</sub> und G<sub>s</sub> Proteinen an M-Rezeptoren.

Gregory und Kollegen konnte durch Punktmutation im Bereich der allosterischen Bindungsstelle des muskarinischen  $hM_2$ -Rezeptors ( $M_2$ Tyr<sup>177</sup> Ala;  $M_1$ <sup>179</sup>Tyr Ala) Ligand-selektive und Signalweg-selektive Effekte demaskieren, die Hinweise auf die Existenz von Signalweg-spezifischen Rezeptorkonformationen lieferten. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass potenzielle Mechanismen, die diesem detektierten „Bias“ zugrunde liegen, das unterschiedliche Engagement spezifischer Beschränkungen sowohl in der orthosterischen als auch in der allosterischen Bindungsstelle dieses GPCR waren (Gregory et al. 2010; Gregory et al. 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ließ die am muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptor korrespondierende Mutation (Tyr<sup>179</sup> Ala) ebenfalls eine Signalwegelektivität des orthosterischen Agonisten Iperoxo gegenüber dem Referenzagonisten ACh für den  $G_q$ -Signalweg detektieren (vgl. Abb. 5.26). Für das dualsterische Hybrid JK 550 zeigte sich kein Hinweis auf eine Signalwegelektivität gegenüber dem  $G_q$ - oder dem  $G_s$ -Signalweg. Dies schließt jedoch nicht aus, dass eine Signalwegelektivität gegenüber einem anderen Signalweg z.B.  $G_i$  oder  $\beta$ -Arrestin vermittelt vorliegen kann. Der geringe Anteil von unter fünfzig Prozent dualsterischer Bindungsorientierung für JK 550, könnte erklären, dass sich die Signalwegelektivität, die für den orthosterischen Baustein Iperoxo gefunden wurde mit dem dualsterischen Hybrid JK 550 nicht finden ließ. Offenbar „quenched“ an dieser Mutante der allosterische Baustein mit der kürzeren Zwischenkette nicht nur die „efficacy“ von Iperoxo, sondern auch dessen  $G_q$ -Signalwegelektivität. Bemerkenswert war in diesem Zusammenhang, dass, wie bereits erläutert, das längere dualsterische Hybrid JK 537 aufgrund seines Anteil an Bindung in der dualsterischen Bindungsorientierung von mehr als neunzig Prozent überhaupt nicht mehr in der Lage war, eine Rezeptoraktivierung (weder  $G_q$  noch  $G_s$ ) zu induzieren; dieses Hybrid erlaubte daher keine Aussage über seine Signalwegelektivität .





**Abbildung 5. 26:** Graphische Darstellung der durch Punktmutationen allosterischer Epitope des  $hM_1$ -Rezeptors induzierten Signalwegbevorzugung durch die Bindung des orthosterischen Agonisten Iperoxo sowie den dualsterischen Hybriden JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ). Am  $hM_1$ -wt-Rezeptor zeigt weder Iperoxo noch eines der dualsterischen Hybride eine Signalwegsbevorzugung. Die Mutation  $M_1^{Tyr^{179}} \rightarrow Ala$  führt zu einer Bevorzugung von Iperoxo für den  $G_q$ -Signalweg, während der Austausch der Aminosäure  $^{400}Trp \rightarrow Ala$  eine Bevorzugung einer JK 550 ( $C_4$ ) für den  $G_q$ -Signalweg anstieß. Die Mutation  $M_1^{Glu^{401}} \rightarrow Ala$  führte für Iperoxo und JK 537 ( $C_6$ ) zu einer  $G_q$ -Signalwegbevorzugung. Weitere Erläuterungen, vgl. Text.

Woo und Kollegen konnten zeigen, dass der Agonist (R,R')-4'-aminofenoterol an  $\alpha_2$ - und  $\alpha_2^{308}Tyr \rightarrow Ala$ -Rezeptoren exprimiert in Kardiomyozyten aus  $\alpha_2$ -Rezeptor „*knockout*“ Mäusen über eine  $G_s$ -Signalwegselektivität verfügt, die den Rezeptor an einer  $G_i$ -Protein-Kopplung hindert und damit vor einer damit verbundenen ERK-Aktivierung schützt (Woo et al. 2014). Die gezielte Mutation von  $Tyr^{308}$  zu Phenylalanin führte interessanterweise zu einem Verlust dieser Fähigkeit. Daraus schlussfolgerten sie, dass spezifische Interaktionen zwischen Ligand und der Seitenkette der Aminosäure  $Tyr^{308}$  des  $\alpha_2$ -Adrenorezeptors eine Rezeptorkonformation zu induzieren vermag, die die  $G_s$  Protein-Kopplung favorisiert und darauf folgend zu einer  $G_s$ -Signalwegsbevorzugung führt (Woo et al. 2014). Interessanterweise ist die Aminosäure  $Tyr^{308}$  im  $\alpha_2$ -Rezeptor homolog zur Aminosäure  $M_2Trp^{422}$  im  $hM_2$ -Rezeptor, welche als Epitop identifiziert werden konnte, das für die  $G_i$ -

Signalwegfavorisierung dualsterischer Hybridliganden verantwortlich zu sein scheint (Bock et al. 2012). Anders als es am  $hM_2$ -Rezeptor beobachtet werden konnte, führte der Austausch der im  $hM_1$ -Rezeptor homologen Aminosäure  $M_1\text{Trp}^{400}$  Ala am Beginn der siebten Transmembrandomäne nicht zu einer Aufhebung, sondern für das kürzere der beiden untersuchten Hybride JK 550 zur Induktion einer Signalwegselektivität für  $G_q$  Proteine (vgl. Abb. 5.26). Möglicherweise führt der durch das fehlende Tryptophan erlangte Freiraum im Übergang zwischen orthosterischer und allosterischer Bindungsstelle dazu, dass das kürzere Hybrid weiter in die Bindungstasche „rutschen“ kann. Der voluminöse allosterische Baustein könnte somit weiter nach unten rutschen, wodurch die eventuell notwendige konformationsbedingte Änderung für die  $G_s$  Protein-Kopplung verringert, die für die  $G_q$  Protein-Kopplung notwendige Änderung jedoch gefördert würde. Das längere dualsterische Hybrid JK 537 änderte seine Bindungseigenschaften an der  $M_1\text{Trp}^{400}$  Mutante nicht (vgl. Kapitel 4.2.4.3 und 4.2.4.4), wodurch zumindest hinsichtlich der  $G_q$  und  $G_s$  Protein-Kopplung das Fehlen der Bevorzugung einer Rezeptorkonformation erklärbar wird (vgl. Abb. 5.26).

Ein Austausch der neben der Aminosäure Tryptophan 400 lokalisierten, negativ geladenen Glutaminsäure 401 gegen die neutrale Aminosäure Alanin führte zu einem völlig gegensätzlichen Bild hinsichtlich einer durch die Hybride induzierten Signalwegbevorzugung. Sowohl der orthosterische Agonist und orthosterischer Baustein Iperoxo als auch das längere Hybrid JK 537 zeigten durch diese Mutation eine signifikante Bevorzugung des  $G_q$ -Signalweges, wohingegen für das kürzere Hybrid keine Bevorzugung festgestellt werden konnte (vgl. Abb. 5.26). Dieser Befund deutet darauf hin, dass sowohl für JK 537, als auch für Iperoxo die Interaktion mit dieser Aminosäure Signalwegrelevant ist. Zudem ist dieses Ergebnis kompatibel mit der Hypothese, dass der orthosterische Baustein (Iperoxo) von JK 550, für das an dieser Mutation, wie auch JK 537, eine dualsterische Bindungsorientierung von 99% postuliert wurde, auf Grund der kürzeren Zwischenkette die orthosterische Bindungsstelle nicht vollständig erreicht. Der der „Ligand-Bias“ von JK 537 aber nicht von JK 550 an dieser  $M_1^{401}\text{Glu}$  Ala-Mutante bestätigt das Bild, dass die dualsterischen Liganden mit unterschiedlichen Bereichen des Rezeptorproteins interagieren.

Somit beeinflussen  $M_1^{400}\text{Trp}$  und  $M_1^{401}\text{Glu}$  nicht nur die Bindung orthosterischer und allosterischer Liganden, sondern auch die aktive Rezeptorkonformation in Gegenwart des orthosterischen Vollagonisten Iperoxo sowie des längeren dualsterischen Hybrides JK 537. Im  $hM_1$ -Wildtyprezeptor behindert dieser Aminosäurerest offenbar eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins, die den  $G_q$  Signalweg anstößt. Ein Fehlen der negativen Ladung in diesem Bereich, erlaubt es dem Rezeptorprotein diese Konformationsänderung einzugehen, die im Falle von Iperoxo und JK 537 zu einer  $G_q$ -Signalwegselektivität führt. In diesem Zusammenhang wäre es überlegenswert, in einer nachfolgenden Arbeit zu prüfen, wie die fünf weiteren Iperoxo/BQCA-Hybridliganden auf Punktmutationen in den beschriebenen Epitopen reagieren. Angesichts der unterschiedlichen Halogensubstitutionen im allosterischen Molekülteil dieser Hybride könnten sich dadurch weitere

Rückschlüsse auf die Interaktion des orthosterischen und allosterischen Teils mit dem  $hM_1$ -Rezeptorprotein ergeben.

## 5.5 Charakterisierung putativ dualsterischer AF292/BQCAD-Hybridliganden

Die Entwicklung dualsterischer Hybridliganden bietet die Möglichkeit zur Generierung neuer Arten von Liganden an muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren, die als attraktive Werkzeuge für die Erforschung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen dienen können. Die Kombinationen verschiedenster orthosterischer und allosterischer Bausteine sowie die Verwendung unterschiedlicher Zwischenkettenlängen, können Einblicke in den Mechanismus dieser besonderen Liganden bringen. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit, neben den bereits besprochenen dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden (Substanzserie 1), ein weiteres Paar dualsterischer Hybridliganden (UR-MD-13 und UR-MD-14) (vgl. Abb. 4.91) charakterisiert. Dieses Hybridpaar verfügt über den putativ orthosterischen Agonisten AF292 (US-Patent: US7049321) als orthosterisches Fragment (vgl. Abb. 4.91). Die verwendeten allosterischen Bausteine UR-MD-5 und UR-MD-6 (vgl. Abb. 4.91, BQCAD) leiten sich ebenfalls von dem  $M_1$ -Rezeptor selektiven, positiven allosterischen Modulator BQCA (Shirey et al. 2009; Ma et al. 2009; Mistry et al. 2013; Yeatman et al. 2014) ab, unterscheiden sich aber von den bereits vorgestellten allosterischen Bausteinen aus Substanzserie 1 (vgl. Abb. 4.1). Die Verknüpfung der beiden Bausteine erfolgte anders als bei den Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden entweder über eine  $C_3$ - oder eine  $C_8$ -Zwischenkette. Wie sich Eigenschaften bezogen auf die Bindung und Rezeptoraktivierung dieser dualsterischen Hybridliganden auf Grund der Verwendung unterschiedlicher Bausteine/Kettenlängen ändern können, wird nachfolgend diskutiert.

### 5.5.1 Putativ dualsterische AF292/BQCAD-Hybridliganden weisen eine nicht eindeutig definierbare Bindungsorientierung am muskarinischen $hM_1$ -Rezeptor auf

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, besteht ein essentieller Schritt zur Anwendung der Modelle zur Analyse und Differenzierung der Bindungsorientierung dualsterischer Hybridliganden in der Untersuchung ihrer Fähigkeit, mit Bereichen allosterischer Bindungsareale interagieren zu können. In kinetischen Experimenten zur [ $^3H$ ]NMS-Dissoziation konnte diese Eigenschaft sowohl für die allosterischen Fragmente UR-MD-5 ( $C_1$ ) und UR-MD-6 ( $C_8$ ) als auch für die korrespondierenden dualsterischen Hybride UR-MD-13 ( $C_3$ ) und 14 ( $C_8$ ) nachgewiesen werden. Auch wenn alle vier Substanzen in der höchst eingesetzten Konzentration von 100  $\mu M$  nicht in der Lage waren, die [ $^3H$ ]NMS-Dissoziation komplett zu inhibieren, zeigten sie aber dennoch eine deutliche Dissoziationsverzögerung, die auf eine allosterische Rezeptorinteraktion schließen lässt (vgl. 5.1.1), und die Ausbildung ternärer Komplexe bestehend aus Ligand, [ $^3H$ ]NMS und dem  $hM_1$ -Rezeptor unterstreicht. Der Vergleich der maximalen Dissoziationshemmung (unteres Plateau des

Hemmeffektes der Verbindungen auf die Geschwindigkeitskonstante  $k_{-1}$  der Dissoziation) sowie der ermittelten halbmaximalen Hemmung ( $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ ) durch die dualsterischen Hybridliganden und ihrer korrespondierenden allosterischen Fragmente zeigte keinen signifikanten Unterschied, weder untereinander noch hinsichtlich des allosterischen Fragments und des dualsterischen Hybrides. Um zu überprüfen, ob die dualsterischen Hybride nicht auch über die Bindung mit dem orthosterischen Baustein mit der allosterischen Bindungsstelle interagieren, wurde das orthosterische Fragment AF292 bezüglich seiner Fähigkeit zur [ $^3\text{H}$ ]NMS-Dissoziationshemmung/-verzögerung untersucht. Wie bereits erläutert (vgl. 3.2.4.2), diente die Bestimmung der Bindungsneigung  $K_B$  des allosterischen Fragmentes in Gleichgewichtsbindungsexperimenten zur Ermittlung der allosterischen Bindungsorientierung des dualsterischen Hybrides als Bestandteil der Berechnung von  $R_{\text{pose}}$ . Käme es zu einer Interaktion des orthosterischen Bausteins mit der allosterischen Bindungsstelle, wäre diese Annahme falsch. Anders als der Iperoxo Baustein in den Iperoxo/BQCA-Hybridliganden, verzögerte das orthosterische Fragment AF292 die Dissoziation des Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]NMS deutlich. Zwar kam es nicht zu einer vollständigen Inhibition der Dissoziation von [ $^3\text{H}$ ]NMS, jedoch lag das untere Plateau der Hemmkurve von  $k_{-1}$  bei  $47 \pm 2\%$ , was etwa einer Verdopplung der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Dissoziationshalbwertszeit unter Kontrollbedingungen entspricht. Aus diesem Ergebnis könnte geschlossen werden, dass es sich bei AF292 nicht um eine Substanz handelt, die nicht nur mit der orthosterischen sondern auch mit Epitopen eines allosterischen Haftareals des  $hM_1$ -Rezeptors interagiert. Eine konkrete Aussage über die Bindungstopographie von AF292 konnte jedoch auf Grund dieser Befunde nicht getroffen werden, da bekannt ist, dass andere orthosterische Liganden, wie der inverse Agonist Atropin (Waelbroeck et al. 1992; Tränkle et al. 1996) sowie der inverse Agonist NMS und der Vollagonist Oxotremorin M (Redka et al. 2008) ebenfalls einen dissoziationsverzögernden Effekt des Radioliganden [ $^3\text{H}$ ]NMS aufweisen. Anders als bei AF292 ( $\log EC_{0,5, \text{Diss}} = -5,82 \pm 0,07$ ) konnte bei den zuvor erwähnten Substanzen ein solcher Effekt jedoch erst bei sehr hohen Konzentrationen von  $100 \mu\text{M}$  und damit erst in Gegenwart einer 100-fach höheren Konzentrationen als für AF292 beschrieben, nachgewiesen werden. Diese Betrachtungen sprechen für eine spezifische allosterische Interaktion des in der Literatur als orthosterischen Agonist beschriebenen Liganden AF292. Um das Bindungsverhalten des orthosterischen Bausteines zukünftig weiter zu charakterisieren, könnten unterschiedliche Punktmutationen im Bereich der orthosterischen und allosterischen Bindungsstelle des muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptors Aufschluss über die genauen Bindungsepitope und der daraus resultierenden Bindungstopographie von AF292 geben.

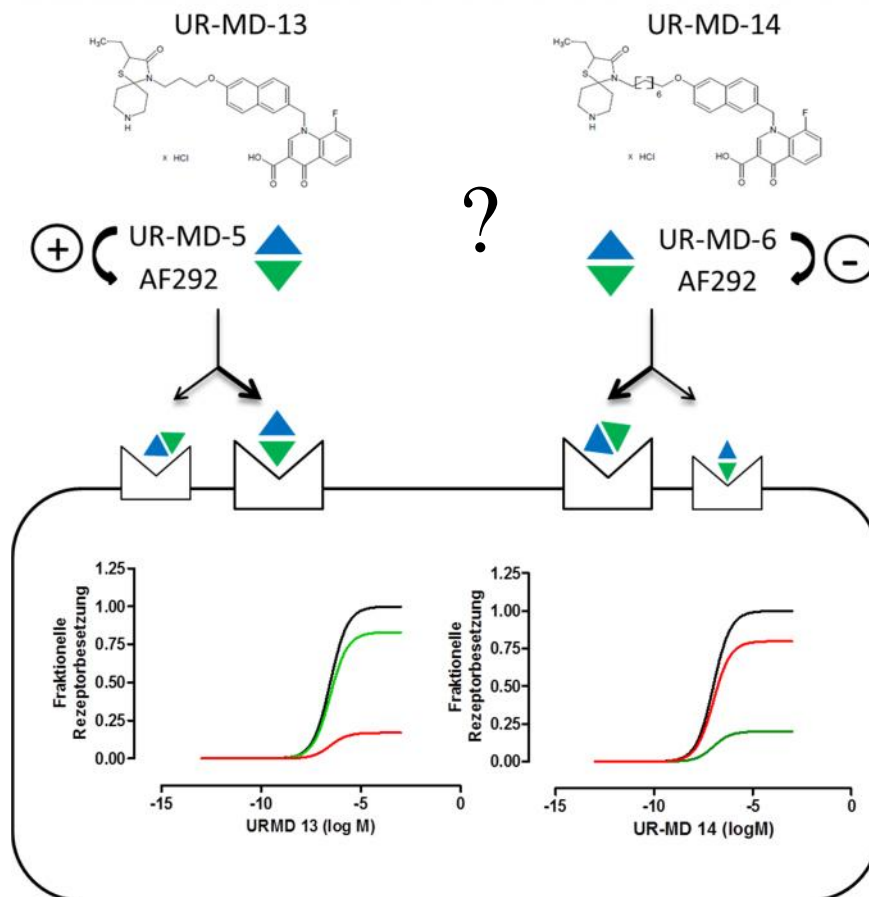
Auf Grund des nicht eindeutig bestimmbareren Bindungsareales des orthosterischen Bausteins AF292 kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass der für die dualsterischen Hybride UR-MD-13 und UR-MD-14 ermittelte  $\log EC_{0,5, \text{Diss}}$ -Wert allein aus der Interaktion ihres allosterischen Molekülteils mit der allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptors resultiert. Vielmehr könnte auch die Bindung des putativ orthosterischen AF292 für eine Verzögerung der [ $^3\text{H}$ ]NMS-Dissoziation verantwortlich sein (vgl. Abb. 4.93). Weitere Hinweise für eine komplexe Rezeptorinteraktion geben die sehr hohen

Kurvensteilheiten von AF292 und UR-MD-13, die ( $n_{H,AF292} = -3,47 \pm 1,07$  und  $n_{H,UR-MD-13} = -4,91 \pm 3,61$ ) signifikant steiler ausfielen als es für  $n_H = -1$  entspricht (F-Test,  $p < 0,05$ ). Wie bereits erläutert, handelt es sich bei AF292 um den orthosterischen Baustein des dualsterischen Hybrides UR-MD-13. Folglich stellt sich die Frage, ob die hohen Kurvensteilheiten ein weiterer Hinweis auf ein komplexeres Bindungsverhalten dieser dualsterischen Liganden im Sinne einer Interaktion beider Molekülbausteine mit der allosterischen Bindungsstelle sind. Sollte dies der Fall sein, wäre die Anwendung der unterschiedlichen Modelle zur Ermittlung der Bindungsorientierung im Sinne des „*dualsteric dynamic ligand binding*“ am  $hM_1$ -Rezeptorprotein bzw. die Verwendung und Interpretation der ermittelten Daten auf der Basis der korrespondierenden Modelle nicht möglich. Dies traf für die dualsterischen Hybride UR-MD-13 und UR-MD-14 zu.

Die Fragmente UR-MD-5 und UR-MD-6 verhielten sich in Gleichgewichtsbindungsexperimenten gegenüber dem Radioantagonisten [ $^3H$ ]NMS negativ kooperativ und unterschieden sich hinsichtlich ihrer Kooperativitätsfaktoren nicht signifikant voneinander, wohingegen das längere Fragment UR-MD-6 mit einem  $\log K_B$  von  $-6,78 \pm 0,08$  eine 10-fach höhere Bindungsneigung zum freien Rezeptorprotein aufwies als sein kürzeres Pendant UR-MD-5 mit einem  $\log K_B$  von  $-5,76 \pm 0,17$  (t-Test,  $p < 0,05$ ). Beide Fragmente führten nicht zu einer kompletten Inhibition, was aus den unteren Plateaus der Gleichgewichtsbindungskurven bei  $17 \pm 5\%$  (UR-MD-5) und  $16 \pm 3\%$  (UR-MD-6) ersichtlich wurde und die Annahme einer allosterischen Bindung auf Grund der Bildung ternärer Komplexe bestehend aus Rezeptor, [ $^3H$ ]NMS und dem jeweiligen allosterischen Fragment untermauerte. Die Analyse der [ $^3H$ ]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der beiden korrespondierenden dualsterischen Hybride erfolgte mit den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Analysen a) und b) (vgl. 5.2), obgleich keine abschließende Klarheit darüber erlangt werden konnte, ob die Voraussetzungen dafür erfüllt waren. Um die Grenzen dieser Analysen und ihrer Aussagekraft auszuloten, wurden die Analysen dennoch vorgenommen. Ein Ergebnis, das eine weitere Interpretation erlaubte, konnte nur für das kürzere dualsterische Hybrid UR-MD-13 ermittelt werden. Die Daten für des dualsterischen Hybrid UR-MD-14 führten dagegen bei keiner der angewendeten Analysen zu einem Resultat (vgl. Tab. 4.75 und 4.76). Erklärungen hierfür sollen nachfolgend diskutiert werden.

Um hoch wirksame dualsterische Liganden zu entwickeln, sollte der orthosterische Baustein über eine hohe Affinität (vorzugsweise im sub-nanomolaren Bereich) für die orthosterische Bindungsstelle des Zielrezeptor verfügen, um zu verhindern, dass das dualsterische Konstrukt nicht die rein allosterische Bindungsorientierung gegenüber der dualsterischen Bindungsorientierung bevorzugt (Mohr et al. 2013). Der potenziell orthosterische Baustein AF292 verfügte mit einem ungefähren  $\log K_I$ -Wert von  $-4$  aber lediglich über eine sehr schwache Bindungsneigung (persönliche Mitteilung, Mechthild Kepe). Diese Eigenschaft des (als orthosterisches Fragment eingesetzten) AF292 könnte eine zusätzliche Erklärung für die nur schwer zu analysierenden Bindungsergebnisse der Hybridliganden

sein. Wird angenommen, dass die Bindungsneigung des orthosterischen Bausteins schwächer ist als die des jeweiligen allosterischen Fragmentes, so würde es wahrscheinlich zu einer überwiegend allosterischen Bindung der dualsterischen Liganden kommen. Um eine Erklärung dafür zu erlangen, warum trotz dieser Schwierigkeit eine formal plausible Analyse der Daten von UR-MD-13 mit Hilfe der Analysen a) und b) auf der Bindungsebene gelang, nicht aber für UR-MD-14 möglich war, wurde eine weitere Hypothese, einer intramolekularen Kooperativität aufgeworfen, die jedoch noch durch zukünftige Experimenten verifiziert werden müsste (vgl. Abb. 5.27). Werden in diesem Zusammenhang die Ergebnisse der Gleichgewichtsbindungsexperimente mit dem Radioagonisten [<sup>3</sup>H]Iperoxo betrachtet, zeigte sich ein entscheidender qualitativer Unterschied hinsichtlich der Kooperativität der beiden allosterischen Fragmente mit Iperoxo (vgl. Abb. 5.29). Wird beispielsweise davon ausgegangen, dass das allosterische Fragment UR-MD-5 nicht nur die Bindung des orthosterischen Vollagonisten Iperoxo, sondern auch die des putativ orthosterischen Agonisten AF292 fördert, so könnte diese kooperative Bindungsförderung, sofern sie auch intramolekular aufträte, die schwache Affinität des orthosterischen Bausteins erhöhen und auf diese Weise eine dualsterische Bindungsorientierung fördern. Im Falle von UR-MD-14 wäre der umgekehrte Fall anzunehmen. Anders als UR-MD-5 zeigte UR-MD-6 eine negative Kooperativität bezüglich der Gleichgewichtsbindung des Radioagonisten [<sup>3</sup>H]Iperoxo. Würde diese negative Kooperativität auch mit AF292 auftreten, wäre durch UR-MD-6 die Affinität von AF292 im Ergebnis weiter abgechwächt, wodurch eine dualsterische Bindung von UR-MD-14 unwahrscheinlicher würde. Dies böte eine Erklärung dafür, dass sich die UR-MD-14 Daten gar nicht analysieren ließen. Da jedoch bekannt ist, dass das Ausmaß und die Richtung (neutral, negativ oder positiv) der Kooperativität zwischen dem allosterischem und orthosterischem Liganden abhängig ist von dem orthosterischen Liganden, der an den Rezeptor gebunden ist („*probe dependency*“, z.B. Wootten et al. 2013), muss diese Hypothese mit Hilfe weiterer Untersuchungen verifiziert werden (z.B. durch den in Kapitel 4.1.8.1 dieser Arbeit verwendeten Experimentalansatz). Würden derartige Experimente eine Kooperativität zwischen AF292 und UR-MD-5 respektive UR-MD-6 bestätigen, spräche dies für die Richtigkeit der oben genannten Hypothese sprechen. Damit wären diese Hybride Beispiele für eine weitere Möglichkeit der Generierung spezieller dualsterischer Liganden mit einer intramolekularen Steuerbarkeit der dualsterischen/allosterischen Bindungsorientierung (vgl. Abb. 5.27).



**Abbildung 5.27: Schematische Darstellung der hypothetischen Einflussnahme der allosterischen Fragmente auf das Bindungsverhalten der entsprechenden dualsterischen Hybridliganden.** (A) Wird davon ausgegangen, dass UR-MD-5 die Bindung des orthosterischen Bausteines AF292 erhöht, würde die daraus resultierende Bindungsförderung die schwache Affinität des orthosterischen Bausteins erhöhen und auf diese Weise eine dualsterische Bindungsorientierung fördern. Im Falle von UR-MD-14, würde der umgekehrte Fall eintreten. Die negative Kooperativität von UR-MD-6 auf den orthosterischen Baustein AF292 würde dessen Affinität weiter abschwächen, wodurch im Ergebnis eine dualsterische Bindung von UR-MD-14 unwahrscheinlicher würde. (B) Kurven in B repräsentieren die illustrierte Hypothese lediglich ausschließlich qualitativ.

### 5.5.2 Die dualsterischen Hybride UR-MD-13 und 14 sind in der Lage den $hM_1$ -Rezeptor zu aktivieren

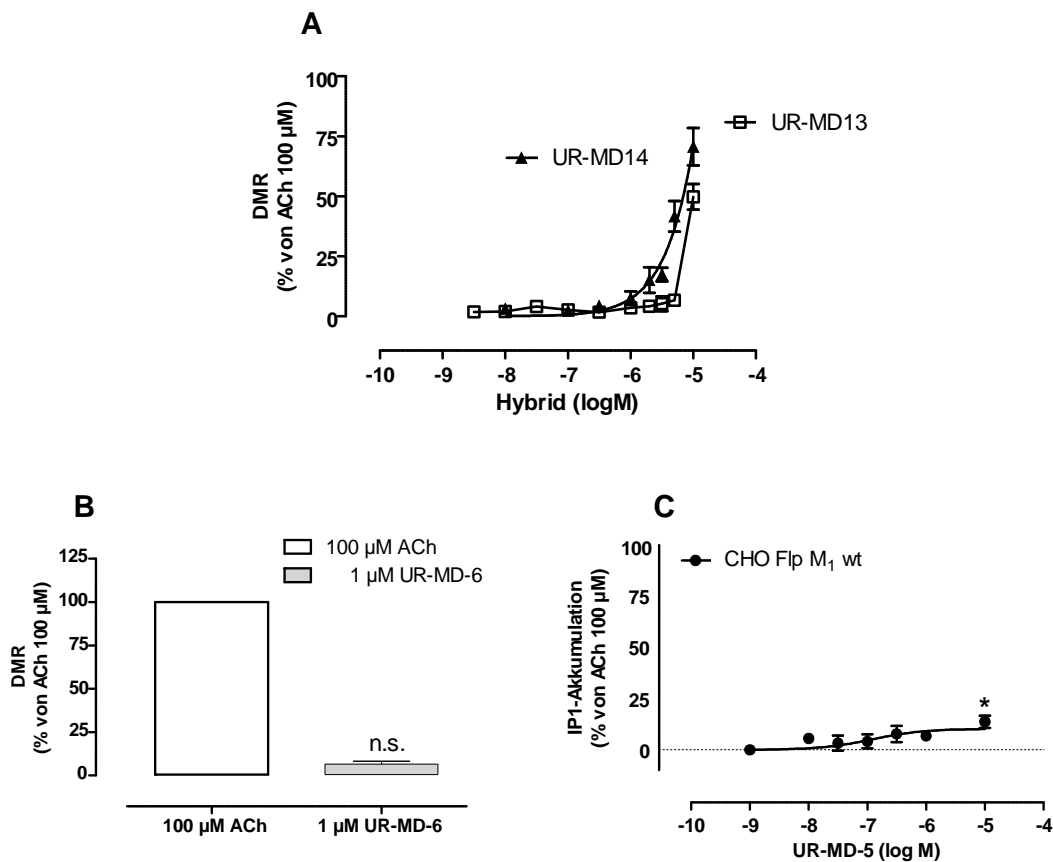
Eine wichtige Voraussetzung hinsichtlich der Generierung dualsterischer Liganden mit Blick auf den orthosterischen Baustein ist neben einer hohen Affinität für die orthosterische Bindungsstelle eine hohe intrinsische Wirksamkeit („*efficacy*“) hinsichtlich der Rezeptoraktivierung. Diese Eigenschaften sollen eine ausreichende Rezeptoraktivierung des Hybrides gewährleisten, gerade dann, wenn es sich bei den allosterischen Fragmenten um inaktive Bausteine handelt, da bekannt ist, dass diese eine inaktive und damit entgegengesetzte Rezeptorkonformation induzieren (Mohr et al. 2010; Bock und Mohr 2013). Der orthosterische Baustein AF292 zeigte in DMR-Experimenten, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, eine nur sehr schwache intrinsische Wirksamkeit ( $E_{\max} = 12 \pm 3\%$ ) in Bezug auf die Rezeptoraktivierung, ein Ergebnis, das sich nicht signifikant mit den von C.Zimmermann ermittelten Maximaleffekten ( $E_{\max} = 10 \pm 5\%$ ) unterschied (t-Test,  $p > 0,05$ ).

(Zimmermann, Masterarbeit 2012). Zusammen mit der sehr schwachen Bindungsneigung führte dieser Befund zu der Annahme, dass die korrespondierenden dualsterischen Hybride ebenfalls über eine nur sehr schwache Fähigkeit hinsichtlich der Rezeptoraktivierung verfügen würden. Interessanterweise zeigten die dualsterischen Liganden UR-MD-13 und UR-MD-14 trotz einer ebenfalls sehr schwachen Fähigkeit der Rezeptoraktivierung der parallel untersuchten Einzelbausteine UR-MD-5 und UR-MD-6 dennoch ein partialagonistisches Verhalten mit (bei 10  $\mu\text{M}$ ) Effekten von  $E_{\text{UR-MD-13}} = 55\%$  und  $E_{\text{UR-MD-14}} = 71\%$ . Entgegen der Erwartungen zeigte sogar das Hybrid UR-MD-14, für das eine überwiegend allosterische Bindungspose wahrscheinlich ist (vgl. 5.5.1), einen ausgeprägten Effekt. Zusätzlich durchgeführte DMR-Experimente bestätigten für beide Hybridliganden eine konzentrationsabhängige Aktivierung des  $h\text{M}_1$ -Rezeptor, jedoch führte die Anwendung der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) zu Ergebnissen, wie einem unrealistisch hohen Maximaleffekte  $E_{\text{maxUR-MD-14}} = 1880 \pm 9031\%$  (vgl. Abb. 5.28). Eine Kurvenanalyse der Daten des kürzeren dualsterischen Hybrides UR-MD-13 konvergierte gar nicht. Im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführte [ $^{35}\text{S}$ ]GTP S-Bindungsexperimente mit UR-MD-13 zeigten Maximaleffekte von  $1081 \pm 217\%$  (Zimmermann, Masterarbeit 2012). Diese Ergebnisse bestätigen ein im Gegensatz zu den Hybridliganden aus Substanzserie 1 komplexeres Bindungsgeschehen, das nicht eindeutig durch eine dualsterische Bindungsorientierung zu erklären ist.

Innerhalb der letzten fünfzehn Jahre konnte die Hypothese aufgestellt und gefestigt werden, dass ein allosterischer Modulator einen getrennten Effekt auf die Wirksamkeit und die Bindungsaffinität von orthosterischen Liganden nehmen kann (z.B. Zahn et al. 2002; Keov et al. 2011). Der allosterische Ligand Org27569 zeigt beispielsweise ein PAM-artiges Verhalten bezogen auf die Bindungsaffinität von CP55940, aber ein NAM-Verhalten hinsichtlich des durch CP55940 verursachten PAM-Effektes auf die  $\text{CB}_1$  Rezeptor vermittelte Expression von Luciferase (Price et al. 2005). Ein weiteres Beispiel ist CPCCOEt, ein neutral allosterischer Ligand hinsichtlich der Glutamat Bindungsaffinität, jedoch ein negativ allosterischer Modulator hinsichtlich der „*efficacy*“, der Glutamat vermittelten Akkumulation von Inositol-Phosphat (Litschig et al. 1999). Auf Grund dieser Erkenntnisse, kann bezüglich der funktionellen Experimente der dualsterischen Hybride UR-MD-13 und UR-MD-14 eine weitere Hypothese aufgestellt werden. Würden die korrespondierenden allosterischen Fragmente eine positive Kooperativität hinsichtlich der intrinsischen Wirksamkeit von AF292 aufweisen, könnte dies eine Erklärung dafür bilden, warum die Fragmente (orthosterisch und allosterisch) im Einzelnen keinen, bzw. eine sehr schwache Wirksamkeit besitzen, aber die Hybride über eine ausgeprägtere intrinsische Wirksamkeit verfügen. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass die allosterischen Fragmente in höheren Konzentrationen nicht zusätzlich über ein allosterisch agonistisches Verhalten verfügen. Der konzentrations-abhängige Effekt von UR-MD-13, ermittelt in den DMR-Experimenten, lässt erkennen, dass es erst ab einer Konzentration von 3, bzw. 10  $\mu\text{M}$  zu einem signifikanten Effekt kommt (vgl. Abb. 5.28 (A)). Das zugehörige allosterische Fragment UR-MD-5 besaß in parallel durchgeführten DMR-Experimenten (in der Konzentration von 0,3  $\mu\text{M}$ ) einen sehr geringen, aber



signifikant von Null unterschiedlichen Effekt (t-Test,  $p < 0,05$ ). Auf Grund einer hohen Sensitivität des DMR-Systems gegen das Lösungsmittel DMSO konnte UR-MD-5 nicht in noch höheren Konzentrationen untersucht werden. Ergänzende Experimente zur Bestimmung der intrazellulären IP1-Akkumulation zeigten dagegen, dass UR-MD-5 in einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  in CHO-Flp- $M_1$ -wt-Zellen (gekennzeichnet durch eine geringere Rezeptorexpression) einen signifikanten Maximaleffekt von 14 % induzieren konnte (vgl. Abb. 5.28 (C)). Somit könnte eine Kombination aus allosterischem Agonismus und PAM-Effekt von UR-MD-5 verantwortlich sein für die, verglichen mit derjenigen der Einzelkomponenten, hohen intrinsischen Aktivität von UR-MD-13 (Abb. 5.28 (A)).



**Abbildung 5. 28: Möglicher Zusammenhang zwischen allosterisch agonistischem Effekt der allosterischen Fragmente und dem partialagonistischen Effekt der putativen dualsterischen Hybridliganden UR-MD-13 und 14 and CHO- $hM_1$ -wt oder CHO-Flp- $hM_1$ -wt-Zellen.** (A): Konzentrations-Wirkungskurve für den Effekt der Zellantwort (DMR) der beiden Hybridliganden UR-MD-13 und 14 im Epic-System<sup>R</sup>. Ordinate: Um den Puffereffekt korrigierte Zellantwort in Prozent. 0% = Puffereffekt, 100% = Effekt in Gegenwart von  $100 \mu\text{M}$  ACh unter Kontrollbedingungen. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testverbindung. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis neun voneinander unabhängigen Experimenten, die als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). (B) Balkendiagramm für den Effekt der Zellantwort (DMR) des endogenen Agonisten ACh sowie des allosterischen Fragmentes UR-MD-6. Ordinate: Um den Puffereffekt korrigierte Zellantwort in Prozent des Effektes in Gegenwart von  $100 \mu\text{M}$  ACh, 0% entspricht dem Puffersignal, 100% dem Effekt von  $100 \mu\text{M}$  ACh. Abszisse: Testsubstanzen: ACh ( $100 \mu\text{M}$ ) und UR-MD-6 ( $1 \mu\text{M}$ ). (C) Konzentrations-Wirkungskurve für die IP1-Akkumulation durch das allosterische Fragment UR-MD-5. Ordinate: Um den Puffereffekt korrigierte IP1-Akkumulation in Prozent. 0% = Puffereffekt, 100% = Effekt in Gegenwart von  $100 \mu\text{M}$  ACh unter Kontrollbedingungen. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testverbindung. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die als Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). \*: Wert signifikant unterschiedlich von 0% (Einstichproben t-Test,  $p < 0,05$ ; n.s.: nicht signifikant unterschiedlich von 0% (Einstichproben t-Test,  $p > 0,05$ ). Weitere Erläuterungen, vgl. Text.

Eine ähnliche Situation ist für UR-MD-14 und seinen allosterischen Baustein UR-MD-6 denkbar. Hier zeigt der konzentrationsabhängige Effekt von UR-MD-14 bei 3  $\mu\text{M}$  den ersten von Null signifikant verschiedenen Effekt (t-Test,  $p < 0,05$ ) (Abb. 5.28 (A)). Das allosterische Fragment UR-MD-6 besaß in der lösungsmittellimitierten, höchsten einsetzbaren Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  keinen Effekt, der sich signifikant von Null unterschied (t-Test,  $p > 0,05$ ) (vgl. Abb. 5.28 (B)). Bis zu dieser Konzentration konnte auch für das dualsterische Hybrid UR-MD-14 kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass UR-MD-6 in einer Konzentration größer als 1  $\mu\text{M}$  einen agonistischen Effekt aufweist, der zusammen mit AF292 im Hybrid zu der detektierten ausgeprägten Rezeptoraktivierung von UR-MD-14 führen könnte (Abb. 5.28 (A)). Untersuchungen in für das verwendete Lösungsmittel DMSO weniger sensitiven Experimentalansätzen (z.B. Messung der IP1-Akkumulation) könnten zukünftig weitere Hinweise auf ein agonistisches Verhalten von UR-MD-6 liefern.

Auf Grund der anscheinend vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten und des daraus resultierenden komplexen Verhaltens dieser zwei putativ dualsterischen AF292/BQCA-d-Hybridliganden kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine eindeutige Aussage bezüglich ihres Mechanismus der Bindung und der daraus resultierenden Aktivierung des muskarinischen  $M_1$ -Rezeptors getroffen werden. Um die aufgestellten Hypothesen zu überprüfen, sind weitere Untersuchungen zur Bindung und Signalwegaktivierung notwendig. Auch computergestützte Werkzeuge, wie Homologie-Modellierungen, klassische Moleküldynamik-(MD)-Berechnungen und Ligand Docking Experimente zählen in diesem Zusammenhang zu bereits unschätzbaren Techniken zur Untersuchung von GPCRs (Costanzi 2012; Mortier et al. 2015; Bermudez et al. 2015; Bermudez et al. 2016).

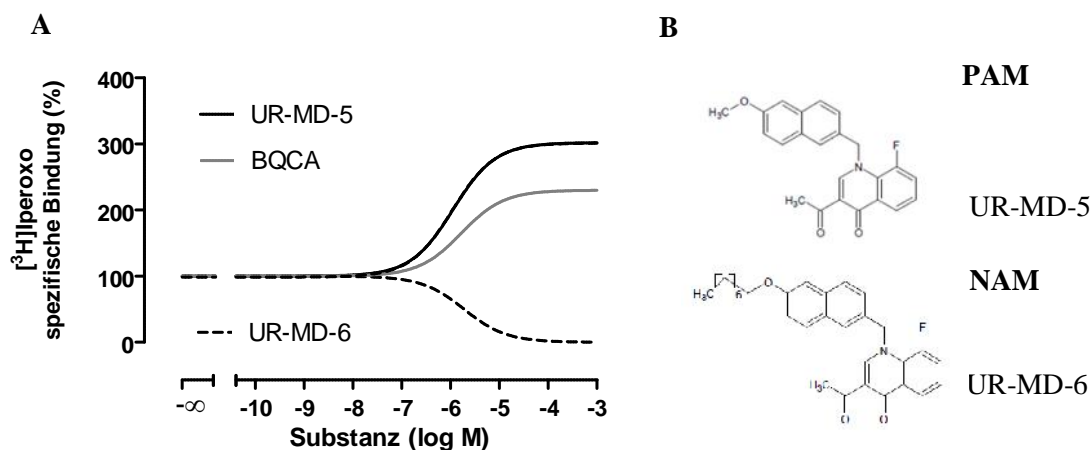
## **5.6 Das allosterische Fragment UR-MD-5 verfügt über positiv allosterische Eigenschaften hinsichtlich der Bindungsneigung des Agonisten Iperoxo am muskarinischen $hM_1$ -Rezeptor**

Die Nutzung der orthosterischen Bindungsstelle von GPCRs als Zielstruktur zur Generierung neuer Wirkstoffe kann sich, wie bereits im Rahmen dieser Arbeit erwähnt, gerade in Bezug auf Rezeptoren einer Familie, als problematisch erweisen. Üblicherweise ist die Sequenzhomologie der orthosterischen Bindungsstelle bei Rezeptoren einer Familie eine Voraussetzung für die Bindung des endogenen Liganden und erklärt die Homologie der dort vorhandenen Aminosäuren. Neben den muskarinischen Acetylcholinrezeptoren ( $M_1$ - $M_5$ ) sind in diesem Zusammenhang viele weitere Familien, wie unter anderem mGluR mit 8 Subtypen (Niswender und Conn 2010) und Serotonin Rezeptoren (5-HTRs) mit sogar 14 Subtypen (Hoyer et al. 1994) zu nennen. Die mitunter große Zahl von Subtypen innerhalb einer Rezeptorfamilie unterstreicht die Bedeutung, die der Subtypselektivität neuer Substanzen zukommen würde (Bubar und Cunningham 2008; Menniti et al. 2013). Um diese Einschränkung in Bezug auf die orthosterische Bindungsstelle zu umgehen, kann die Entwicklung

allosterischer Liganden zielführend sein. Auf Grund der weniger konservierten, extrazellulären Bereiche vieler GPCRs auch innerhalb einer Rezeptorfamilie, in denen diese allosterischen Bindungsstellen vielfach lokalisiert sind, könnten auf diese Weise neue subtypselektive Wirkstoffe entwickelt werden (Amici et al. 2010). Gerade in Bezug auf den muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptor liegen bereits vielversprechende Ansätze vor, die nachweisen konnten, dass die direkte Aktivierung dieses Rezeptorsubtyps als Ansatz zur Behandlung von Krankheiten wie Morbus Alzheimer und Schizophrenie Erfolge mit sich bringen könnte (Langmead et al. 2008; Fisher 2012; Jones et al. 2012).

### 5.6.1 Das allosterische Fragment UR-MD-5 verfügt über positiv allosterische Eigenschaften hinsichtlich der Bindungsneigung des Agonisten Iperoxo am muskarinischen $hM_1$ -Rezeptor

In allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten [ $^3H$ ]Iperoxo-Gleichgewichtsbindungsexperimenten mit zahlreichen allosterischen Fragmenten konnte lediglich ein einziges Hinweis auf ein PAM-artiges Verhalten liefern. Der Baustein UR-MD-5 (BQCA<sub>d</sub>) zeigte bezüglich der Bindung mit dem Radioagonisten [ $^3H$ ]Iperoxo eine unverkennbare positive Kooperativität (Abb. 5.29).



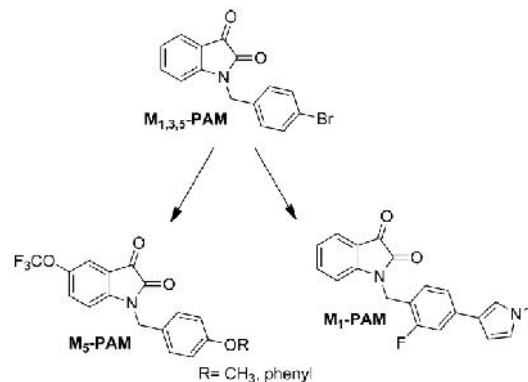
**Abbildung 5. 29: Modulatorische Effekte der BQCA-Derivate UR-MD-5 und UR-MD-6 auf die [ $^3H$ ]Iperoxo-Gleichgewichtsbindung an Membranhomogenaten aus CHO- $hM_1$ -wt-Zellen in schematischer Darstellung.** (A) Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [ $^3H$ ]Iperoxo (0,2 nM) in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen [ $^3H$ ]Iperoxo Bindung (in Anwesenheit von 10  $\mu$ M Carbachol), 100% entspricht der [ $^3H$ ]Iperoxo Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus des jeweils eingesetzten allosterischen Fragmentes (UR-MD5/UR-MD-6). (B) Strukturformeln der allosterischen Fragmente UR-MD-5 und UR-MD-6. Die Verlängerung der Kohlenstoffkette um sieben Kohlenstoffatome führt zu einem Wechsel der modulatorischen Eigenschaften der Fragmente. Für weitere Details vgl. Abb. 4.98 in Kapitel 4.3.1.3 des Ergebnisteiles dieser Arbeit

Das gleiche Verhalten konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals auch für die Muttersubstanz BQCA, einen hoch  $M_1$ -selektiven, positiven allosterischen Modulator detektiert werden. Bereits publizierte Daten konnten die positive Kooperativität zwischen BQCA und dem endogenen Agonisten ACh, sowie Carbachol nachweisen (Shirey et al. 2009; Ma et al. 2009; Mistry et al. 2013; Yeatman et al. 2014), die positive Kooperativität zwischen BQCA und dem hoch affinen und hoch wirksamen Vollagonisten Iperoxo war bis jetzt nicht bekannt. Interessanterweise konnte für das allosterische Fragment UR-MD-6, welches sich von UR-MD-5 nur durch eine um sieben Kohlenstoffatome längere

Zwischenkette unterscheidet, lediglich eine negative Kooperativität hinsichtlich der [<sup>3</sup>H]Iperoxo-Bindung gefunden werden. Somit scheint allein die Verlängerung der angehängten Kohlenstoffkette einen Wechsel der allosterischen Modulationsrichtung von positiv (PAM) zu negativ (NAM) bewirken zu können (vgl. Abb. 5.29).

Eine Änderung von Eigenschaften allosterischer Modulatoren, sei es die Kooperativität mit orthosterischen Liganden oder aber hinsichtlich ihrer Subtypselektivität, konnte bereits von anderen Gruppen an Glutamatrezeptoren beobachtet werden. So konnten beispielsweise O'Brien und Mitarbeiter (2003) am mGluR5 zeigen, dass Veränderungen im Molekül eines potenziell allosterischen Modulators zu einem molekularen Wechsel von einer NAM zu einer PAM-Wirkung führen können (O'Brien et al. 2003).

An M-Rezeptoren konnte gefunden werden, dass unterschiedliche Variationen in der Substitution von N-Benzylisatinen zu einer Veränderung eines nicht selektiven M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> und M<sub>5</sub> PAMs, je nach Art der strukturellen Veränderung, entweder zu einem selektiven PAM am muskarinischen M<sub>5</sub>-Rezeptor oder am M<sub>1</sub>-Rezeptor führte (vgl. Abb. 5.30) (Melancon et al. 2012).



**Abbildung 5. 30: Schematische Darstellung der N-benzylisatin-Derivate und ihren unterschiedlichen Subtypselektivitäten an muskarinischen Rezeptoren.** Modifiziert nach Mohr et al. 2013. Weitere Erläuterungen im Text.

Ein Wechsel von einer positiven zu einer negativ modulierenden allosterischen Interaktion von Modulatoren nach geringer Veränderung ihrer chemischen Struktur konnte auch für den metabotropen Glutamat-Rezeptor (mGLU) beschrieben werden (Wood et al. 2011). An muskarinischen Acetylcholinrezeptoren konnte anhand des Effektes auf die Bindung des Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS gezeigt werden, dass die Einfügung von Methylsubstituenten in die laterale Linker Region des Modulators (Alkanbisammonium-Verbindungen) zum Wechsel von einer negativ kooperativen Wirkung (NAM) zu einer positiv kooperativen Wirkung (PAM) mit dem orthosterischen Radioantagonisten führte (Raasch et al. 2002; Muth et al. 2003). Da allosterische Liganden ihre Effekte durch Konformationsänderungen im Rezeptorprotein vermitteln können (Kenakin und Miller 2010), scheint der längere Kohlenstoffkettenrest von UR-MD-6 zu einer, im Vergleich zu mit

UR-MD-5 und BQCA, veränderten Bindung des orthosterischen Iperoxo im ternären Komplex zu führen. Diese verschiedenartige Bindungsorientierung führt zu einer Konformationsänderung, die (anders als für UR-MD-5 und BQCA) offenbar die Affinitätszunahme des orthosterisch gebundenen Liganden Iperoxo behindert (vgl. Abb. 5.29).

Auf Grund der für BQCA von anderen Autoren postulierten Bindungsstelle, die in Bereiche der gemeinhin durch die Bindung des allosterischen Modulator Gallamin definierten „common“ allosterischen Bindungsstelle von M-Rezeptoren (Ellis 1991, Ellis und Seidenberg 1992) im extrazellulären Bereich des Rezeptorproteins lokalisiert sein soll, wurden Experimente an in diesem Bereich punktmultierten  $M_1$ -Rezeptoren durchgeführt. Darunter finden sich wichtige Epitope in der zweiten extrazellulären Schleife sowie in Beginn von Transmembran II (TM2) und VI (TM7). Diese Punktmutationen, namentlich  $M_1^{179}\text{Trp Ala}$ ,  $M_1^{400}\text{Tyr Ala}$  und  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$  wurden im Rahmen dieser Arbeit gewählt, um zu überprüfen, ob UR-MD-5 (BQCAd) und BQCA sich hinsichtlich ihrer Bindungstopographie unterscheiden.

Abdul-Ridha und Kollegen konnten zeigen, dass die Mutation  $M_1^{400}\text{Tyr Ala}$  zu einem kompletten Verlust der Bindungsneigung von BQCA führt (Abdul-Ridha et al. 2014b). Dieser Effekt konnte bei UR-MD-5 nicht beobachtet werden, vielmehr zeigte diese Mutation keinen signifikanten Effekt auf die Bindung von UR-MD-5. Auch die Aminosäure  $M_1^{179}\text{Tyrosin}$  war nicht an der Bindung von UR-MD-5 beteiligt. Anders verhielt es sich bei der negativ geladenen Aminosäure Glutaminsäure, die im oberen Bereich der siebten Transmembran (TM7) lokalisiert ist. Ein Austausch von Glutaminsäure gegen Alanin führte zu einem signifikanten aber keineswegs vollständigen Verlust der Affinität (vgl. Kapitel 4.3.1.5.2). Dieses Verhalten belegt, dass UR-MD-5 nicht wie BQCA mit denselben allosterischen Haftpunkten im extrazellulären Bereich des  $hM_1$ -Rezeptor interagiert, sondern möglicherweise an einer zweiten allosterischen Bindungsstelle bindet. Dass mAChR mit mehr als zwei allosterischen Bindungsstellen ausgestattet sein könnten, wurde verschiedenentlich postuliert (Christopoulos 2002; Mohr et al. 2003; Birdsall und Lazareno 2005). Schlüsselbefunde hierfür liefern bestimmte Indolocarbazole an  $M_1$ -Rezeptoren (Lazareno et al. 2000) und Androstanderivate an  $M_3$ -Rezeptoren (Lazareno et al. 2002), die an einer nicht orthosterischen Bindungsstelle gefunden wurden, die verschieden ist von derjenigen, an die andere typische allosterische muskarinische Liganden wie Gallamin und Strychnin binden. Für einige allosterische Modulatoren, wie beispielsweise der Acetylcholinesterase-Inhibitor Tacrin (Potter et al. 1989) und die Bis-pyridinium Derivate Duo3 (Tränkle und Mohr 1997; Schröter et al. 2000), wurden Konzentrations-Effekt-Kurven mit einem Steilheitsmaß von  $n > 1$  beschrieben, das auf ein komplexeres Bindungsverhalten im Vergleich zu konventionellen muskarinischen Liganden hindeutete. Das komplexe Bindungsverhalten dieser Modulatoren unterstützt die Hypothese einer zweiten allosterischen Bindungsstelle (Tränkle und Mohr 1997; Schröter et al. 2000; Tränkle et al. 2003), nicht nur an  $M_2$ -Rezeptoren, sondern auch an weiteren M-Rezeptorsubtypen. Tränkle und Mitarbeiter konnten daraufhin zeigen, dass zwei Moleküle des

allosterischen Liganden Tacrin sowie ein orthosterischer Ligand in der Lage sind, simultan am muskarinische  $M_2$ -Rezeptor zu binden (Tränkle et al. 2005). Die Annahme basierte auf der Interaktionsanalyse der allosterischen Modulatoren Tacrin und Duo3 mit verschiedenen anderen allosterischen muskarinischen Liganden, für die eine Bindung an der „common“ allosterischen Bindungsstelle postuliert wird. Unter letzterer wird die Bindungsstelle an M-Rezeptoren verstanden, an die Gallamin bindet (Ellis und Seidenberg 1992; Lazareno et al. 2002). Verschiedene Studien mit  $M_2/M_5$  Hybridrezeptoren sowie  $M_2$ -Rezeptormutanten zeigten, dass Epitope des  $M_2$ -Rezeptors in die Bindung von Tacrin und Duo3 nicht identisch zu sein scheinen, was die Komplexität der allosterischen Modulation noch erweitert (Wess 2005). Molekulares Modeling und Ligand Docking Studien legen nahe, dass zwei allosterische Liganden in der Lage sind, an zwei benachbarte Regionen des allosterischen Haftareals simultan zu binden. Dieses Vestibül wird im Bereich der extrazelluläre Schleifen in der Nähe des Eingangs zur orthosterischen Bindungsstelle, an  $M_2$ -Rezeptoren (Voigtländer et al. 2003), die als archetypisch für die Modulation anderer M-Rezeptorsubtypen und GPCR gelten (Dror et al. 2013) postuliert. Somit könnte der muskarinische  $M_1$ -Rezeptor sich ähnlich wie diese Rezeptorsubtypen verhalten, und wie von Espinoza-Fonseca und Mitarbeitern (2005) durch Molecular Modeling Studien postuliert, durch das Vorhandensein mehrerer allosterischer Bindungsstellen gekennzeichnet sein. Somit könnte es sein, dass das allosterische Fragment UR-MD-5 im Bereich einer anderen allosterischen Bindungsstelle des  $M_1$ -Rezeptors interagiert als BQCA.

### **5.6.2 Das allosterische Fragment UR-MD-5 verfügt nicht über positiv allosterische Eigenschaften hinsichtlich der Bindungsneigung des orthosterischen Agonisten Iperoxo am muskarinischen $hM_2$ -Rezeptor**

Muskarinische  $hM_1$ -Rezeptoren werden überwiegend in postsynaptischen Membranen des Vorderhirns, wie dem zerebralen Cortex, dem Hippocampus und dem Striatum exprimiert (Levey et al. 1991; Levey et al. 1995; Rouse et al. 1999; Miyakawa et al. 2001; Oki et al. 2005). Auf Grund seines hohen Vorkommens in diesen speziellen Bereichen des ZNS konnte dem  $hM_1$ -Rezeptor eine wichtige Funktion bei der Wahrnehmung sowie Lern- und Erinnerungsprozessen zugesprochen werden (Eglen 2005), die ihn zu einem ideales Ziel für pharmakologische Interventionen bei neurologischen und psychischen Krankheiten einschließlich Morbus Alzheimer (Langmead et al. 2008; Fisher 2012) und Schizophrenie (Jones et al. 2012) macht. Der muskarinische  $hM_2$ -Rezeptor ist post- und präsynaptisch in cholinergen und nicht-cholinergen Neuronen (Feuerstein et al. 1992; Rouse et al. 1999) in Bereichen des Gehirnstammes, dem Hypothalamus/Thalamus, dem Hippocampus, dem Striatum und dem Cortex lokalisiert (Levey et al. 1991; Levey et al. 1995; Oki et al. 2005) und weist bei präsynaptischer Lokalisation eine inhibitorische Funktion auf die Neurotransmitter-Freisetzung auf. Es wurde postuliert, dass die Erhöhung synaptischer Acetylcholin-Level durch die selektive Inhibition von  $M_2$ -Autorezeptoren bei der Behandlung von Psychosen und Krankheiten wie Morbus Alzheimer im Gegensatz zum Prinzip der Inhibition vorhandener Acteylcholinesterasen (Cummings

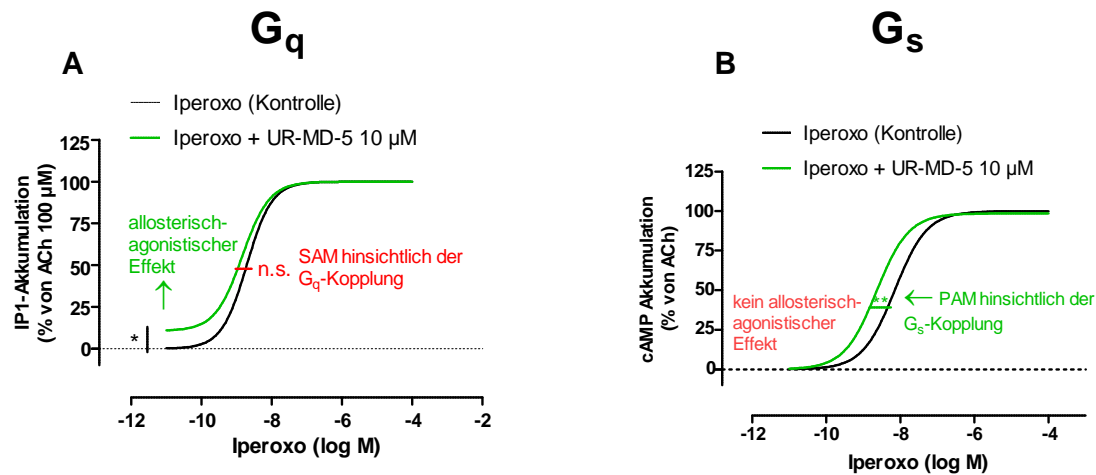
2000) hilfreich sein könnte. Da bekannt ist, dass muskarinische allosterische Modulatoren gewöhnlich die höchste Affinität für den  $hM_2$ -Rezeptor im Vergleich zu den übrigen Muskarin-Subtypen (Birdsall und Lazareno 2005) aufweisen, wurde neben dem  $hM_1$ -Rezeptor zusätzlich die Bindung und Kooperativität von UR-MD-5 mit [ $^3H$ ]Iperoxo am muskarinischen  $hM_2$ -Rezeptor untersucht (vgl. Anhang, Kapitel 9.3.2; Abb. 9.4 und Tab. 9.4). Im Vergleich zum muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptor, zeigte sich hinsichtlich der Bindungsneigung  $K_B$  kein signifikanter Unterschied, wohl aber bezüglich der Kooperativität zwischen UR-MD-5 und Iperoxo. Anders als am  $hM_1$ -Rezeptor führte UR-MD-5 am  $hM_2$ -Rezeptor zu einer Hemmung der Bindung des Radioagonisten [ $^3H$ ]Iperoxo im Sinne negativer Kooperativität. Demnach handelt es sich bei UR-MD-5 um eine Substanz, die zwar mit gleicher Affinität an die Subtypen  $M_1$  und  $M_2$  bindet, am muskarinischen  $M_1$ -Rezeptor jedoch zu einer Zunahme der Bindungsneigung und am  $M_2$ -Rezeptor zu einer Abnahme der Bindungsneigung des orthosterischen Liganden Iperoxo führt. Die gleiche Affinität für beide Rezeptorsubtypen wäre, bezogen auf die Entwicklung neuer Wirkstoffe im Therapiebereich Morbus Alzheimer, auf Grund der oben genannten Eigenschaften des  $M_2$ -Rezeptors hinsichtlich der Neurotransmitterfreisetzung und hinsichtlich der entgegengesetzten Kooperativität vorteilhaft. In nachfolgenden Untersuchungen müsste jedoch auf Grund der bekannten „*probe-dependency*“ allosterischer Modulatoren geprüft werden, wie sich UR-MD-5 und der endogene Neurotransmitter ACh am muskarinischen  $M_2$ -Rezeptor verhalten. Abdul-Ridha und Mitarbeiter (2014) postulierten, dass BQCA, welches ein dem UR-MD-5 ähnliches Grundgerüst besitzt, seine Subtypselektivität durch eine Subtyp-spezifische Kooperativität mit orthosterischen Liganden erreicht. Auch wenn das Aufspüren und Quantifizieren der zahlreichen allosterischen Effekte, die in Bezug auf die allosterische Modulation auftreten können, wenn zwei Liganden einen Rezeptor zur gleichen Zeit besetzen, bis heute immer noch eine große Herausforderung darstellt (Gregory et al. 2007), könnte UR-MD-5 helfen, die der Subtypselektivität und der Rezeptoraktivierung zugrunde liegenden Mechanismen allosterischer Substanzen weiter aufzudecken und die Entwicklung neuer Wirkstoffe voranzutreiben.

### **5.6.3 Das allosterische Fragment UR-MD-5 zeigt in ersten Pilotexperimenten PAM-Eigenschaften hinsichtlich der Iperoxo-induzierten $G_s$ -Signalwegaktivierung am muskarinischen $hM_1$ -Rezeptor**

Wie zuvor beschrieben, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass UR-MD-5 (BQCA<sub>d</sub>) in der Lage ist (so wie BQCA), die Bindungsneigung von Iperoxo durch seine Anwesenheit um ein Vielfaches zu erhöhen, wohingegen es eine negative Kooperativität mit der Bindung des Radioantagonisten [ $^3H$ ]NMS zeigt. Um zu prüfen, ob UR-MD-5 auch die durch Iperoxo-induzierte  $G_q$  Protein-vermittelte Signalwegaktivierung zu beeinflussen vermag, wurden spezielle IP1-Akkumulationsversuche durchgeführt (vgl. Anhang, Kapitel 9.3.1; Abb. 9.3 und Tab. 9.3). Interessanterweise zeigte UR-MD-5 in der löslichkeitslimitiert höchsten einsetzbaren Konzentrationen von 10  $\mu M$  keine signifikante Linksverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve von Iperoxo im

Vergleich zur Kontrollkurve (vgl. Abb. 5.31 (A)). Dies war angesichts der durch UR-MD-5 in Konkurrenzexperimenten beobachteten enormen Steigerungen der Affinität des Radioliganden [<sup>3</sup>H]Iperoxo (bereits in Konzentrationen von 10 µM) überraschend. Somit konnte UR-MD-5 im Rahmen dieser Arbeit als ein positiv allosterischer Modulator hinsichtlich der Affinität orthosterischer Agonisten, jedoch als ein „stillere“ allosterischer Modulator (SAM) hinsichtlich der Agonist-induzierten Rezeptoraktivierung identifiziert werden. Dieses Phänomen ist im Bereich der allosterischen Modulation von GPCR bereits bekannt (Burford et al. 2011; Burford et al. 2013), wie auch, dass der Effekt allosterischer Modulatoren in funktionellen Experimenten nicht immer mit dem Effekt des Modulators auf die Bindungsaffinität korreliert (z.B. Hall 2000). Mittlerweile ist die Zahl der Beispiele hierfür noch gewachsen. Org27569 beispielsweise ist ein positiv allosterischer Modulator (PAM) am Cannabinoid-Rezeptor (CB1) in Bezug auf die Bindungsaffinität von CP55940, jedoch ein NAM hinsichtlich des durch CP55940 verursachten PAM Effektes auf die CB<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelte Expression von Luciferase (Price et al. 2005). CPCCOEt ist ein neutraler allosterischer Ligand hinsichtlich der Bindungsaffinität von [<sup>3</sup>H]Glutamat am metabotropen Glutamat Rezeptor (mGlu1), aber ein NAM in Bezug auf die intrinsische Wirksamkeit von Glutamat hinsichtlich der Akkumulation von Inositol-Phosphat (Litschig et al. 1999). Neben der SAM-Eigenschaft von UR-MD-5 bezüglich der durch Iperoxo induzierten G<sub>q</sub> Protein-Kopplung bestätigte die Anhebung des unteren Plateaus (vgl. Abb. 5.31) den für UR-MD-5 zuvor detektierten allosterischen Agonismus auf diesem Signalweg (vgl. 4.3.1.6). Diese Art der ago-allosterischen Modulation ist ebenfalls kein neues Phänomen. Schon 1990 konnte am Adenosin A<sub>1</sub>-Rezeptor gezeigt werden, dass der allosterische Modulator PD81723 nicht nur die Bindung des orthosterischen Radioliganden [<sup>3</sup>H]Cyclohexyladenosin fördert, sondern auch den G<sub>i/o</sub> Signalweg aktivieren kann, wenn das Rezeptorprotein keinen orthosterischen Ligand gebunden hatte (Bruns und Fergus 1990). Seitdem konnte die ago-allosterische Modulation für eine Vielzahl an Rezeptoren beschrieben werden, so beispielsweise für den GABA<sub>B</sub>-Rezeptor (Binet et al. 2004), den Fettsäure-2-Rezeptor (Lee et al. 2008; Milligan et al. 2009), den Glucagon-like peptide 1 Rezeptor (Teng et al. 2007) und den muskarinischen M<sub>1</sub>- und M<sub>2</sub>-Rezeptor (Langmead et al. 2006; May et al. 2007a; Shirey et al. 2009; Ma et al. 2009; Mistry et al. 2013; Yeatman et al. 2014).





**Abbildung 5. 31: Das allosterische Fragment UR-MD-5 zeigt PAM-Eigenschaften hinsichtlich der Iperoxo-induzierten  $G_s$ -Signalwegaktivierung am muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptor.** (A) Repräsentatives Ergebnis eines von zwei IP1-Akkumulationsexperimenten hinsichtlich der Beeinflussung der durch Iperoxo induzierten  $G_q$  Protein-vermittelten Signalwegaktivierung. Ordinate: IP1-Akkumulation in %: 0% entspricht dem unteren Plateau (Basale IP1-Akkumulation) und 100% dem oberen Plateau (induziert durch 100  $\mu$ M Acetylcholin). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration von Iperoxo. Schwarz: Kontrollkurve Iperoxo, grün: Iperoxo plus UR-MD-5 in einer fixen Konzentration von 10  $\mu$ M. (B) Repräsentatives Ergebnis eines Experimentes zur Akkumulation von cAMP hinsichtlich der Beeinflussung der durch Iperoxo induzierten  $G_s$  Protein-vermittelten Signalwegaktivierung. Ordinate: cAMP-Akkumulation in %: 0% entspricht dem unteren Plateau (Basale cAMP-Akkumulation) und 100% dem oberen Plateau (bestimmt in Gegenwart von 100  $\mu$ M Acetylcholin). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration von Iperoxo. Schwarz: Kontrollkurve Iperoxo, grün: Iperoxo plus UR-MD-5 in einer fixen Konzentration von 10  $\mu$ M. \*,\*\* signifikanter Unterschied zwischen dem Wendepunkt der Iperoxo Kontrollkurve und der Konzentrations-Effekt-Kurve für Iperoxo unter Zugabe von 10  $\mu$ M UR-MD-5 (\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , t-Test); n.s.: nicht signifikant unterschiedlich zwischen der Iperoxo Kontrollkurve und der Iperoxo-Konzentrations-Effekt-Kurve unter Zugabe von 10  $\mu$ M UR-MD-5. Es bestätigte sich für UR-MD-5 der zuvor detektierte allosterische Agonismus auf dem  $G_q$ -Signalweg und lieferte Hinweise auf SAM-Eigenschaften hinsichtlich der Iperoxo-induzierten  $G_q$ -Signalwegaktivierung. Ein allosterisch-agonistischer Effekt auf dem  $G_s$ -Signalweg konnte nicht nachgewiesen werden, jedoch zeigte UR-MD-5 Hinweise auf PAM-Eigenschaften hinsichtlich der Iperoxo-induzierten  $G_s$ -Signalwegaktivierung. Weitere Informationen, vergl. Text.

Wird davon ausgegangen, dass die Bindung eines allosterischen Liganden zu einer Änderung der Konformation führt, ist es möglich, dass einzelne allosterische Liganden in der Lage sind, eine Signalwegselektivität orthosterischer Liganden zu provozieren, die zusätzlich am Rezeptorprotein binden. Dieses Phänomen ist sowohl abhängig vom Typ, als auch vom Ausmaß der allosterischen Modulation. So zeigte beispielsweise der allosterische Modulator CPPHA unterschiedliche Effekte hinsichtlich der Aktivierung eines Calciumeinstromes oder der Aktivierung von Erk1/2 durch Glutamat über nativen metabotropen Glutamat-Rezeptoren 5 (mGlu5) in kultivierten kortikalen Astrozyten der Ratte (Zhang et al. 2005). Der allosterische Modulator M-5MPEP führt am mGlu5-Rezeptor zu einer vollständigen Inhibition der Calciumoszillation ( $[Ca^{2+}]_i$ ) induziert durch Glutamat, Quisqualat oder DHPG, zeigt aber nur einen partiell limitierenden Effekt auf die Inositol-Phosphat-Akkumulation (Bradley et al. 2011). Der am Calcium sensitiven Rezeptor PAM Cinacalcet verfügt über einen präferentiellen Effekt auf die Modulation der ERK1/2 Aktivität im Vergleich zur intrazellulären Calcium Mobilisation in HEK293-Zellen (Davey et al. 2012).

Gao und Mitarbeiter konnten für den positiv allosterischen Modulator LUF6000 des Adenosin 3-Rezeptor ( $A_3R$ ) zeigen, dass er in der Lage ist, den durch strukturell unterschiedliche Agonisten

verursachten Maximaleffekt zu erhöhen. Interessanterweise war der Effekt höher, wenn es sich um Agonisten handelte, die einen schwachen Maximaleffekt aufwiesen im Vergleich zu Agonisten, die generell schon eine hohe intrinsische Aktivität zeigten. Darüberhinaus konnte erstmals für einen GPCR gezeigt werden, dass ein PAM (LUF6000) in der Lage ist, einen Antagonisten in einen Agonisten umzuwandeln (Gao et al. 2008). Darauf folgende Untersuchungen zeigten, dass LUF6000 sich auf diversen Signalwegen hinsichtlich dieses Effektes unterschiedlich verhält (Gao et al. 2011). Ein ähnliches Bild konnte auch für das allosterische Fragment UR-MD-5 gefunden werden. Bei ergänzend durchgeführten Experimenten zur Detektion der durch  $G_s$  Proteine vermittelten Signalwegaktivierung (cAMP-Akkumulation) bewirkte das im Kombination mit Iperoxo zugefügte allosterische Fragment UR-MD-5 (10  $\mu$ M) interessanterweise eine signifikante Linksverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve (vgl. Abb. 5.31 (B)). Ein allosterisch agonistischer Effekt zeigte sich im Gegensatz zu den IP1-Akkumulationsexperimenten nicht (vgl. Abb. 5.31); dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen der mit UR-MD-5 durchgeführten cAMP-Akkumulations-Experimenten (vgl. 4.3.1.6). Somit scheint UR-MD-5 eine Konformation zu induzieren, die die Iperoxo- $G_q$  Protein Kopplung weder positiv noch negativ beeinflusst. Im Gegensatz dazu beeinflusst die von UR-MD-5 induzierte Konformation die  $G_s$  Protein-Kopplung positiv. Interessant an diesem Befund ist zudem, dass für einige der im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Iperoxo-BQCAAd Hybridliganden ebenfalls eine  $G_s$ - gegenüber einer  $G_q$ -Signalwegselektivität nachgewiesen werden konnte. Da die allosterischen Fragmente dieser Liganden, wie UR-MD-5 über das gleiche Grundgerüst verfügen (BQCAAd), könnte die durch UR-MD-5 bewirkte Bevorzugung des  $G_s$ -Signalweges Hinweise auf die ungewöhnliche  $G_s$ -Signalwegselektivität mancher der dualsterischen Iperoxo/BQCAAd-Liganden liefern. Offenbar bewirken sowohl die allosterischen Bausteine als auch UR-MD-5 durch die Bindung in ähnlichen Bereichen Rezeptorkonformationen, die zu einer Förderung der durch Iperoxo induzierten, für den  $hM_1$ -Rezeptor nicht präferentiellen  $G_s$ -Signalwegaktivierung führt.

### **5.7 Das allosterische Fragment UR-MD-2 (TBPBd); Ein allosterischer oder „bitopischer“ Agonist?**

Wie bereits erwähnt, wird die allosterische Modulation muskarinischer Acetylcholinrezeptoren mittlerweile sehr geschätzt (Clark und Mitchelson 1976; Stockton et al. 1983; Christopoulos et al. 1998; Conn et al. 2009) und bietet neues Potenzial hinsichtlich der Entwicklung subtypselektiver Liganden (Keov et al. 2011). Zahlreiche Studien konnten einige hoch-selektive, allosterische Modulatoren von mAChR identifizieren (Chan et al. 2008; Ma et al. 2009; Marlo et al. 2009). Auf der Suche nach selektiven Aktivatoren muskarinischer  $M_1$ -Rezeptoren konnten zusätzlich eine Reihe von Substanzen als „allosterische Agonisten“ identifiziert werden (Spalding et al. 2002; Jones et al. 2008; Langmead et al. 2008; Lebois et al. 2010). Diese Art von Liganden sind in der Lage, auch in der Abwesenheit eines orthosterischen Liganden eine Konformationsänderung zu induzieren, die es ihm erlaubt, als „allosterischer“ Agonist zu fungieren (Schwartz und Holst 2007). Allosterische Agonisten

verfügen über den großen Vorteil, eine größere Selektivität auf Grund der unter den Rezeptorsubtypen deutlich weniger konservierten allosterischen Bindungsstelle aufzuweisen (Valant et al. 2012a). Für einige der als „allosterische Agonisten“ am muskarinischen M<sub>1</sub>-Rezeptor identifizierte Liganden (AC-42, 77-LH-28-1 und TBPB), die basierend auf dem allosterischen ternären Komplex-Model (Stockton et al. 1983; Ehlert, 1988) als solche eingeordnet wurden (Christopoulos und Mitchelson 1997; Jacobson et al. 2010), kann jedoch hinsichtlich ihrer Bindungstopographie nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um einen „bitopischen“ Bindungsmodus handelt (Avlani et al. 2010; Keov et al. 2013; Keov et al. 2014), der Bindungsareale der allosterischen als auch orthosterischen Bindungsstelle involviert (May et al. 2007; Antony et al. 2009; Avlani et al. 2010; Keov et al. 2013; Keov et al. 2014). In einer vorangegangenen Arbeit, in der neuartige dualsterische Hybridliganden untersucht wurden, deren allosterische Fragmente sich von dem „allosterisch/bitopischen“-Liganden TBPB ableiteten, konnte gezeigt werden, dass das allosterische Fragment UR-MD-2 in funktionellen DMR Experimenten einen hauptsächlich G<sub>q</sub> Protein-vermittelten Maximaleffekt von  $E_{\max} = 62 \pm 2\%$  induzierte (Zimmermann, Masterarbeit 2012). Angeregt durch den „bitopischen“ Charakter von TBPB (sowie AC-42 und 77-LH-28-1) stellte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Frage nach der Bindungstopographie des allosterischen Fragmentes UR-MD-2, das als Derivat von TBPB aufgefasst werden kann (TBPBd). Da Mutationen im Bereich der siebten Transmembrandomäne (M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp Ala und M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala) bereits im Zusammenhang mit der Bindung und Rezeptoraktivierung „bitopischer“ Liganden, wie 77-LH-28-1 sowie verschiedener allosterischer Modulatoren gebracht werden konnten (Matsui et al. 1995; Voigtländer et al. 2003; Ma et al. 2009; Lebon et al. 2009; Avlani et al. 2010), wurden diese Mutationen ausgewählt, um Hinweise auf die Rezeptorbindung und -aktivierung durch UR-MD-2 zu erlangen. Auf Grund ihrer relativen Lage zur orthosterischen Bindungsstelle untersuchten wir zusätzlich die Aminosäure M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala in der zweiten extrazellulären Schleife (ECL2) hinsichtlich ihrer Beteiligung an der Bindung und Rezeptoraktivierung von UR-MD-2. Diese Region ist nachweislich involviert in die Stabilisierung der Bindung orthosterischer Liganden sowie der Rezeptoraktivierung (Goodwin et al. 2007; Scarselli et al. 2007). Zusätzlich konnte dieser Region auch die Beteiligung an der Interaktion allosterischer und „bitopischer“ Liganden nachgewiesen werden (Voigtländer et al. 2003; Valant et al. 2008). Der M<sub>1</sub>-Rezeptor mit einer Punktmutation im Bereich der orthosterischen Bindungsstelle (M<sub>1</sub><sup>106</sup>Tyr Ala) hatte, wie bereits erwähnt, eine massive Reduktion der Affinität von [<sup>3</sup>H]NMS zur Folge, die leider eine weitere Untersuchung dieser Mutante verhinderte.

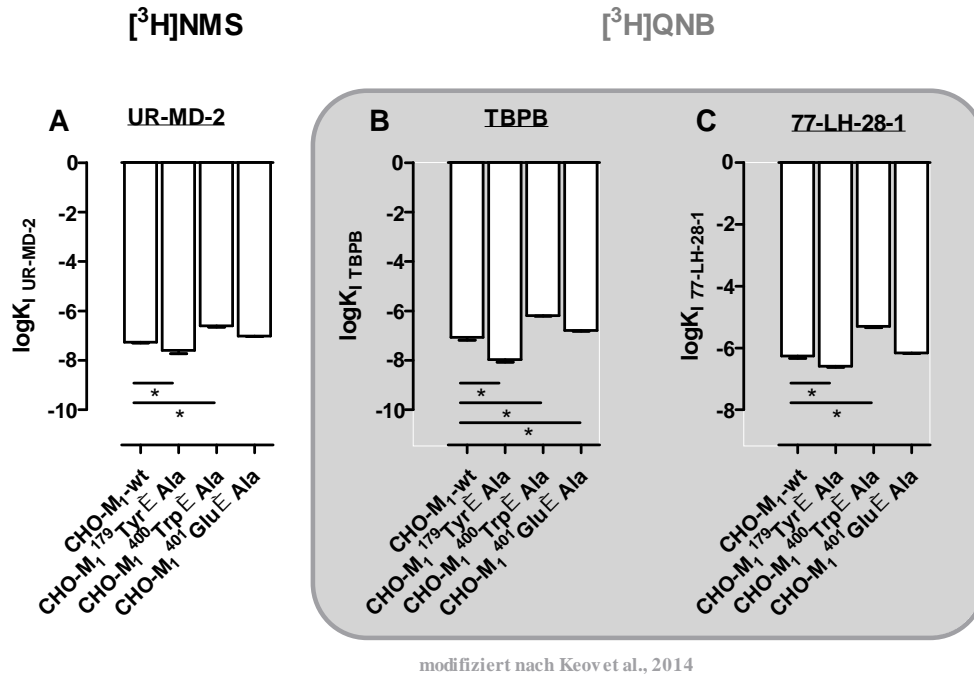
### 5.7.1 UR-MD-2: Ein rein allosterischer oder ein „bitopischer“ Agonist am hM<sub>1</sub>-Rezeptor?

In kinetischen Experimenten zeigte das allosterische Fragment UR-MD-2 (TBPBd) die Fähigkeit, am Flp-hM<sub>1</sub>-Rezeptor die Dissoziation des Radioantagonisten [<sup>3</sup>H]NMS um den Faktor 2,5 zu verzögern und bestätigte damit seine Fähigkeit der allosterischen Interaktion innerhalb eines ternären Komplexes. Dennoch kann für UR-MD-2 nicht ausgeschlossen werden, dass es am freien

Rezeptorprotein, das nicht bereits mit einem orthosterischen Liganden besetzt ist, mit Bereichen der orthosterischen Bindungsstelle interagiert. Interessanterweise ließ sich feststellen, dass die drei untersuchten Punktmutationen  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$ ,  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  und  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$  keinen signifikanten Beitrag zur Bindungsneigung von UR-MD-2 zum  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptor leisteten. In Gleichgewichtsbindungsexperimenten zeigte UR-MD-2 als ein TBPBd, anders als für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten allosterischen Fragmente vom Typ BQCA, eine vollständige Inhibition der spezifischen  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung. Diese Eigenschaft konnte ebenfalls für die Pilotverbindung TBPB gezeigt werden (Keov et al. 2013). Für die „allosterisch/bitopischen“ Liganden AC-42 und 77-LH-28-1 konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass sie die  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Bindung in einer Weise inhibieren, wie sie entweder für orthosterische Liganden oder Liganden mit einer sehr hohen negativen Kooperativität bekannt sind (Gao und Jacobson 2013). Am freien  $hM_1$ -Rezeptor beeinflusste interessanterweise die Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr}$  zu Alanin, wie bereits für die Iperoxo/BQCA-Hybridligandserie (Substanzserie 1, vgl. 2.11.4) beobachtet, die Bindungseigenschaften ( $K_I$ ) der rein orthosterischen Liganden ACh und Iperoxo und den allosterisch/“bitopischen“ Liganden ( $K_A$  und  $K_B$ ) auf unterschiedliche Weise (vgl. Kapitel 4.2.4.1, 4.2.4.2 und 4.2.4.3). Obwohl die Affinitäten von ACh und Iperoxo signifikant reduziert waren (vgl. Kapitel 4.2.4.1 und 4.2.4.2), führte die Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  in der zweiten extrazellulären Schleife (ECL2) für UR-MD-2 (TBPBd) zu einer signifikanten Zunahme der Bindungsneigung ( $\log K_{I, \text{UR-MD-2}}: hM_1\text{-wt} = -7,26 \pm 0,03$ ;  $\log K_{I, \text{UR-MD-2}}: M_1^{179}\text{Tyr Ala} = -7,60 \pm 0,13$ ) (vgl. Abb. 5.32 (A)). Ein analoger Effekt wurde zuvor von Keov und Mitarbeitern für die Pilotverbindung TBPB und dem Radioligand  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  in Gleichgewichtsbindungsversuchen an dieser Mutation beobachtet ( $\log K_I: M_1\text{-wt} = -7,06 \pm 0,12$ ;  $\log K_I: M_1^{179}\text{Tyr Ala} = -7,97 \pm 0,10$ ) (vgl. Abb. 5.32 (B)) (Keov et al. 2014).

Der Austausch der Aminosäure  $M_1^{400}\text{Trp}$  gegen die deutlich kleinere Aminosäure Alanin führte wie im Fall von TBPB unter Verwendung des Radioantagonisten  $[^3\text{H}]\text{QNB}$  (Keov et al. 2014) zu einem schwachen Verlust der Bindungsneigung von UR-MD-2 (TBPBd) ( $\log K_{I, \text{UR-MD-2}}: M_1^{400}\text{Trp Ala} = -6,60 \pm 0,06$ ) (vgl. Abb. 5.32 (A und B)). Somit könnte sowohl die Zunahme der Bindungsneigung durch den Austausch der Aminosäure  $M_1^{179}\text{Tyr}$ , als auch der Verlust der Bindungsneigung durch den Austausch der Aminosäure  $M_1^{400}\text{Trp}$  zu Alanin Hinweise auf eine mögliche Interaktion von UR-MD-2 mit der „common“ allosterischen Bindungsstelle geben. Der im Übergang zwischen der dritten extrazellulären Schleife (ECL3) und der Transmembrandomäne VII (TM 7) positionierte negative Seitenkettenrest der Aminosäure  $M_1^{401}\text{Glu}$  scheint, anders als bei dem sich von BQCA ableitenden Baustein UR-MD-5 (BQCA), nicht an der Bindung des allosterischen Fragmentes UR-MD-2 am nicht  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptor beteiligt zu sein ( $\log K_{I, \text{UR-MD-2}}: M_1^{401}\text{Glu Ala} = -7,02 \pm 0,02$ ). In diesem Punkt unterscheidet sich UR-MD-2 von seiner Muttersubstanz TBPB, die an der Mutation  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$ , allerdings ermittelt unter Verwendung von  $[^3\text{H}]\text{QNB}$ , ebenfalls eine signifikante Reduktion der Bindungsneigung aufweist (vgl. Abb. 5.32 (A und B)) (Keov et al. 2014). Die ebenfalls als „bitopischer“ Agonist eingeordnete Substanz 77-LH-28-1 (Avlani et al. 2010; Keov et al. 2013)

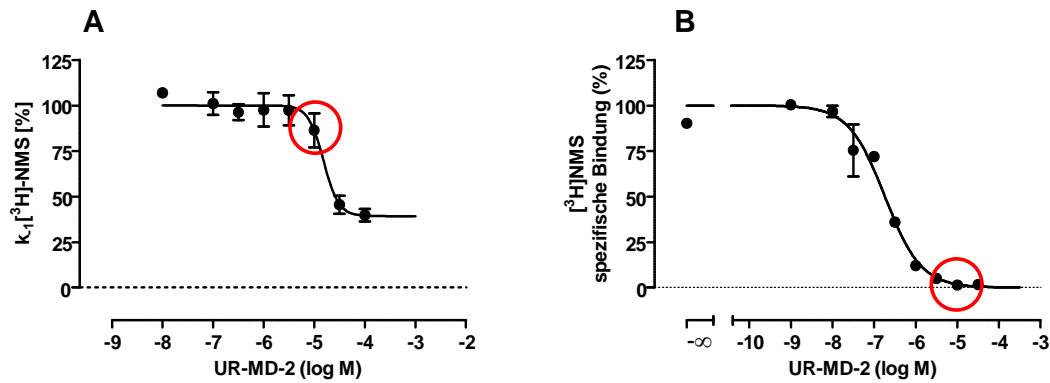
zeigt unter Verwendung von [ $^3$ H]QNB eine generell geringere Bindungsneigung ( $K_i$ ) (Keov et al. 2014), weist jedoch in Bezug mit den auftretenden Affinitätszu- ( $M_1^{179}$ Tyr Ala) und -Abnahmen ( $M_1^{400}$ Trp Ala), bzw. nicht vorhandenen Unterschieden ( $M_1^{401}$ Glu Ala), verglichen mit UR-MD-2, ein komplett identisches Verhalten auf (vgl. Abb. 5.32 (A und C)).



**Abbildung 5. 32: Graphischer Vergleich des Einflusses von Punktmutationen im Bereich des allosterischen Bindungsareals des  $hM_1$ -Rezeptors auf die Bindungsneigung von UR-MD-2 sowie der „bitopischen“ Liganden TBPB und 77-LH-28-1.** Die  $K_i$ -Werte für TBPB und 77-LH-28-1 entstammen einer Publikation von Keov und Mitarbeitern (Keov et al. 2014). (A) Ergebnisse von [ $^3$ H]NMS Gleichgewichtsbindungsexperimenten mit UR-MD-2, dargestellt in einem Balkendiagramm. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus drei bis sieben unabhängigen Experimenten, die in Form von Dreifachbestimmungen ausgeführt wurden. (B und C) Ergebnisse von [ $^3$ H]QNB Gleichgewichtsbindungsexperimenten mit TBPB oder 77-LH-28-1, dargestellt als Balkendiagramm.  $\log K_i$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante  $K_i$ . \* signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des  $hM_1$ -wt Rezeptors (*one –way ANOVA with Dunnett’s post-hoc test*, \* $p < 0,05$ ).

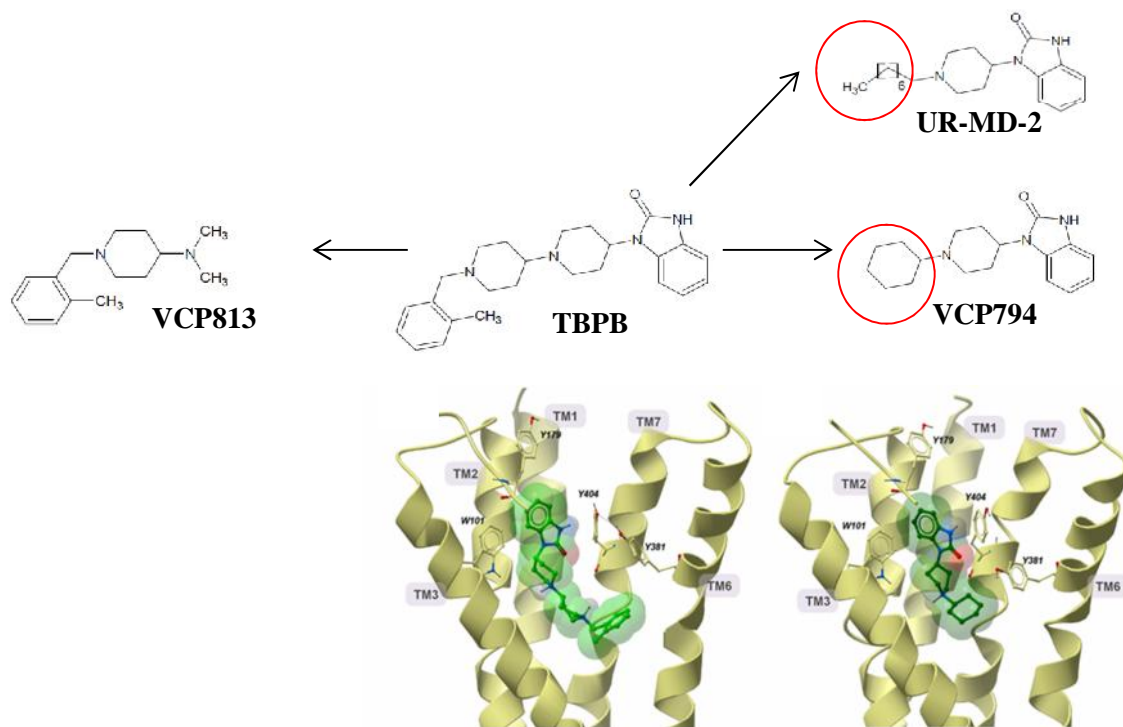
Durch die Punktmutationen im allosterischen Bindungsareal ließ sich nicht zweifelsfrei klären, ob UR-MD-2 nur mit Arealen der allosterischen Bindungsstelle interagiert, simultane Areale der orthosterischen und der allosterischen Bindungsstelle besetzt oder in geringen Konzentrationen als orthosterischer, in hohen Konzentrationen jedoch als allosterischer Ligand fungiert. Letzteres ist wahrscheinlich, da die Konzentrationen von UR-MD-2 (TBPBd), die benötigt werden, um einen allosterischen Effekt auf die Verzögerung der [ $^3$ H]NMS-Dissoziation zu erreichen, am freien Rezeptorprotein schon zu einem gesättigten Effekt auf die Gleichgewichtsbindung führen (vgl. Abb. 5.33 (A und B)). Ähnliches konnte zuvor auch für die Muttersubstanz TBPB gezeigt werden (Keov et al. 2013). Sheffler und Mitarbeiter zeigten zudem, dass eine geringe Konzentration von TBPB (50  $\mu$ M) keinen Effekt auf die [ $^3$ H]NMS-Dissoziation zeigt (Sheffler et al. 2013), was den Schluss nahelegt, dass zumindest hinsichtlich TBPB die höher affine orthosterische/bitopische Interaktion gegenüber der rein allosterischen Interaktion dominiert. Zur weiteren Untermauerung dieser These,

lässt sich der Vergleich mit dem bitopischen  $M_2$ -Rezeptor-Liganden McN-A-343 anführen, in dessen Gegenwart die Verzögerung der  $[^3H]$ NMS-Dissoziation erst bei deutlich höheren Konzentrationen beobachtet werden konnte, als am orthosterisch unbesetzten Rezeptor (May et al. 2007; Valant et al. 2008).



**Abbildung 5.33: Die Konzentration von UR-MD-2 die benötigt wird, um einen allosterischen Effekt auf die Verzögerung der  $[^3H]$ NMS-Dissoziation zu erreichen, zeigt am orthosterisch unbesetzten Rezeptorprotein bereits einen gesättigten Effekt.** (A): Interaktion von UR-MD-2 mit dem durch  $[^3H]$ NMS besetzten Flp- $hM_1$ -wt-Rezeptor. Ordinate: Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  der  $[^3H]$ NMS Dissoziation in % des Werte in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der eingesetzten Testsubstanz. (B): Interaktion von UR-MD-2 mit dem orthosterisch unbesetzten Flp- $hM_1$ -wt-Rezeptor. Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden  $[^3H]$ NMS in Prozent des Wertes in Abwesenheit von Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen  $[^3H]$ NMS Bindung (in Anwesenheit von 10  $\mu M$  Atropin), 100% entspricht der spezifischen Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug in (A) 2,0 nM bzw. in (B) 0,2 nM, die Zellzahl 75000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L16), pH 7,4, 28 °C. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Drei- oder Vierfachbestimmung ausgeführt wurden.

Die Analyse des pharmakologischen Verhaltens der Fragmente VCP794 und VCP813 (vgl. Abb. 5.34 des putativ bitopischen Liganden TBPB) lieferte bereits Hinweise auf seinen Interaktionsmechanismus mit dem Rezeptor (vgl. Abb. 5.34). Der *ortho*-tolyl Baustein (VCP813) ist wahrscheinlich von Bedeutung für die Interaktion mit einer allosterischen Bindungsstelle des muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptors, wohingegen das Benzimidazol-Ende (VCP794) für die Interaktion mit der orthosterischen Bindungsstelle sowie für die Rezeptoraktivierung benötigt wird (Keov et al. 2013).

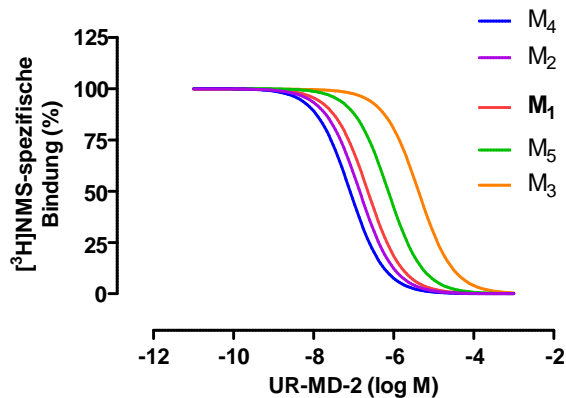


**Abbildung 5. 34: Strukturformeln von TBPB sowie dessen Einzelfragmenten VP813, VP794, dem TBPB-Derivat UR-MD-2 und die für TBPB und VCP794 postulierte Bindungstopographie am muskarinischen M<sub>1</sub>-Rezeptor.** Dargestellt sind die Strukturformeln des „bitopischen“ Liganden TBPB und seiner Einzelbausteine sowie das in der vorliegenden Arbeit untersuchte UR-MD-2. Der rote Kreis markiert den Unterschied zwischen dem TBPB-Fragment VCP794 (Cyclohexanring) und UR-MD-2 (C7-Kohlenstoffkette). Die Molecular Docking-Simulationen zeigen einen korrespondierenden Bindungsmodus von TBPB (hellgrün) und VCP794 (dunkelgrün). Weitere Erläuterungen im Text. (modifiziert nach Keov et al. 2013).

Keov und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass das Vorhandensein des aromatischen Fragmentes VCP813 unerlässlich ist für die selektive Aktivierung des M<sub>1</sub>-Rezeptors durch TBPB, nicht aber für dessen Affinität (Keov et al. 2013). Dem im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten allosterischen Fragment UR-MD-2 (TBPBd) fehlt der distale *ortho*-tolyl Baustein des VCP813, es besitzt jedoch Ähnlichkeit zum Benzimidazolol-Ende des VCP794 (vgl. Abb. 5.34). Offenbar kann der C<sub>8</sub>-Rest von UR-MD-2 nicht nur den Cyclohexylrest des VCP794 ersetzen, sondern zusätzlich die allosterische Bindungsstelle erreichen, die auch VCP813 nutzt.

Ein im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur einmalig durchgeführtes [<sup>3</sup>H]NMS-Inhibitionsexperiment mit UR-MD-2 (TBPBd) an allen fünf muskarinischen Rezeptorsubtypen (M<sub>1</sub>-M<sub>5</sub>) sollte Erkenntnisse zur Subtypeselektivität von UR-MD-2 erbringen (vgl. Anhang, Kapitel 9.4.2; Abb.9.6). Da, wie bereits zuvor erwähnt, das Fragment VCP813 (i.e. der *ortho*-tolyl-Baustein) für die selektive Aktivierung von TBPB an den M<sub>1</sub>-Rezeptor, nicht aber für dessen Affinität verantwortlich zu sein scheint (Keov et al. 2013), könnte auf Grund der Erweiterung von UR-MD-2 um eine C<sub>8</sub>-Kette über das Cyclohexyl-Ende von VCP794 hinaus, eine hM<sub>1</sub>-Subtypeselektivität möglich sein. Wie in Abbildung 5.35 dargestellt, weist UR-MD-2 die höchste Bindungsneigung für hM<sub>4</sub>/hM<sub>2</sub>-Rezeptoren auf und die schwächste

Affinität für den  $hM_3$ -Rezeptor. Budzik und Mitarbeiter (2010) konnten mit Hilfe von Inhibitionsexperimenten die schwächste Bindungsneigung für das TBPB-Fragment VCP794 ebenfalls am muskarinischen  $hM_3$ -Rezeptor detektieren (Budzik et al. 2010). Die Autoren postulierten zudem, dass die schwache Bindungsneigung von VCP794 mutmaßlich auch den an diesem Subtyp nicht vorhandenen Agonismus erklärt (Keov et al. 2013). Die Affinität von VCP794 zum muskarinischen  $M_3$ -Rezeptor wird nach Keov et al. 2013 durch die Erweiterung der *ortho*-tolyl-Gruppe (VCP813), „wiederhergestellt“. Auf Grund dieser Entdeckung postulierten Keov und Kollegen, dass der *ortho*-tolyl Baustein von TBPB, i.e.VCP813, der in UR-MD-2 nicht vorhanden ist, aber durch den Octamethylen-Substituenten ersetzt werden könnte, mit Teilen der „*common*“-allosterischen Domäne des  $M_1$ -Rezeptors interagiert, und dass die Interaktion mit dieser Domäne zusätzliche Stabilisierungskontakte ermöglicht. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Befunde für UR-MD-2 bestätigen diese Hypothese durch Hinweise auf eine mögliche Interaktion von UR-MD-2 mit der „*common*“-allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$  Rezeptors (vgl. 4.3.2.1.1 und 4.3.2.1.2). Zukünftige Untersuchungen zur Subtypselektivität, sowohl in Bezug auf die Bindung als auch auf die Rezeptoraktivierung von UR-MD-2, könnten weitere Hinweise auf seine Interaktion mit dem jeweiligen Rezeptorprotein liefern.



**Abbildung 5. 35: Inhibitionskurven aus Pilotexperimenten zur Interaktion von  $[^3H]NMS$  mit UR-MD-2 an Membransuspensionen aus CHO- $hM_1$ ,  $hM_2$ ,  $hM_3$ ,  $hM_4$  und  $hM_5$ -Rezeptoren.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden  $[^3H]NMS$  in Prozent des Wertes in Abwesenheit von Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen  $[^3H]NMS$  Bindung (in Anwesenheit von Atropin  $10 \mu M$ ), 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der eingesetzten Testsubstanz. Weitere Informationen, vgl. Text sowie Anhang, Kapitel 9.4.2, Abb. 9.6).

Ein Homologie-Modell des  $hM_1$ -Rezeptors basierend auf dem muskarinischen  $M_3$ -Rezeptor zeigte, dass TBPB und der Baustein VCP794, trotz Unterschiede in Struktur und Größe, mit gleichen Aminosäureresten in der Bindungstasche interagieren (Keov et al. 2014)(vgl. Abb. 5.34). Dabei wurde der Benzimidazol-Anteil beider Liganden zwischen TM2, TM3 und TM7 postuliert, wohingegen der andere Teil sich in Bereiche tief in die heptahelikalen Bündel erstreckt. Im Rahmen dieser Arbeit standen hinsichtlich der genannten Transmembranen nur Mutationen im Übergang zwischen der



dritten extrazellulären Schleife und TM 7 ( $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  und  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$ ) zur Verfügung. Die ermittelten Affinitätsverluste von UR-MD-2 an der Mutation  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  lieferten Hinweise auf eine eventuell ähnliche Bindungsneigung. Um diese Hypothese weiter zu untermauern, müssten jedoch weitere Mutationen in Bereichen der zweiten und dritten Transmembran untersucht werden.

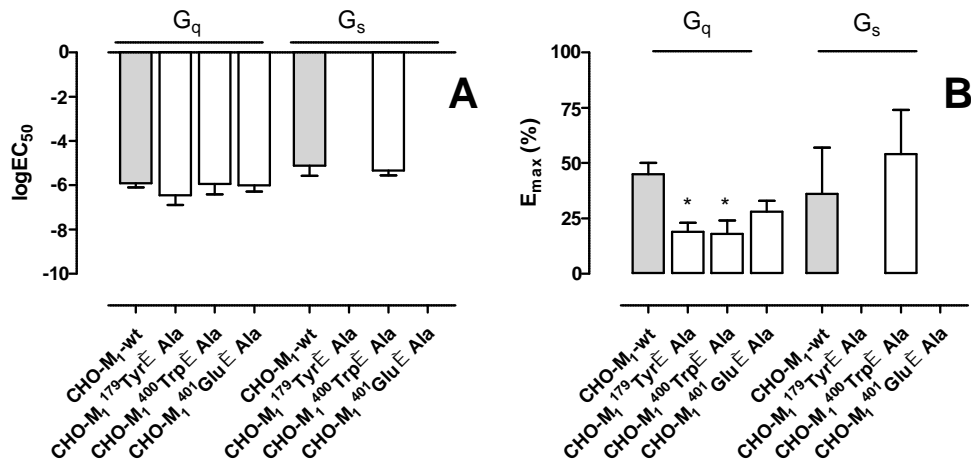
### **5.7.2 Die Punktmutationen $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$ in der zweiten extrazellulären Schleife sowie $M_1^{401}\text{Glu Ala}$ am Beginn der siebten Transmembrandomäne verhindern die durch UR-MD-2 induzierte $G_s$ Protein-Kopplung**

Die Kristallstrukturen des inaktiven  $M_1$ -,  $M_2$ - und  $M_3$ -Rezeptors sowie des aktiven  $M_2$ -Rezeptors bestätigen das Bild eines aromatischen Käfigs, der den jeweils gebundenen Antagonisten ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ) oder Agonisten ( $M_2$ ,  $M_3$ ) einschließt (Kruse et al. 2012; Haga et al. 2012; Kruse et al. 2013; Thal et al. 2016). Dies weist jedoch nicht zwangsläufig darauf hin, dass die Areale, die für die Abgrenzung der Ligandbindungsstelle zuständig sind, stabil und starr sein müssen. Darüber hinaus legten Untersuchungen mit 77-LH-28-1 (Avlani et al. 2010), TBBP und VCP794 (Keov et al. 2014) nahe, dass sich „bitopische“ Liganden durch die Flexibilität der Aminosäuren innerhalb des aromatischen Käfigs „einpassen“ können. Zusätzlich wurde gefunden, dass Aminosäurereste der orthosterischen Seite des aromatischen Käfigs notwendig für die Rezeptoraktivierung sind (Trumpp-Kallmeyer et al. 1992; Ward et al. 1999; Jacobson et al. 2010). Folglich könnten die geringeren intrinsischen Aktivitäten der „bitopischen“ Liganden, deren Bindung sich bis zu Arealen der allosterischen Bindungsstelle erstrecken kann, auf eine Störung der Struktur des aromatischen Käfigs zurückzuführen sein, deren Folge eine Zerstörung des Aktivierungsschlüssel-Netzwerks nach sich zieht (Keov et al. 2014).

Für einige allosterische Agonisten konnte gezeigt werden, dass sie über die Fähigkeit der funktionellen Selektivität verfügen. In diesem Zusammenhang konnten Thomas und Mitarbeiter (2008) am muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptor eine unterschiedliche G Protein-Kopplung nachweisen, je nachdem ob der verwendete Ligand ein allosterische Modulator, oder ein allosterischer Agonist war. In weiteren Untersuchungen fanden sie heraus, dass der „bitopische“ Ligand AC42 beispielsweise keine Rezeptorinternalisierung zu induzieren vermochte, im Unterschied zu traditionellen orthosterischen Agonisten (Thomas et al. 2009; Keov et al. 2013). Keov und Mitarbeiter (2013) konnten nachweisen, dass das als „orthosterisch“ postulierte TBPB-Fragment VCP794 eine Signalwegbevorzugung („*Ligand-Bias*“) hinsichtlich der ERK1/2 Phosphorylierung im Vergleich zur intrazellulären  $G_q$ -vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$  Mobilisation in Bezug auf den Referenzagonisten ACh aufwies. Durch die aromatische *ortho*-tolyl-Komponente in TBPB konnte dieser „*Ligand-Bias*“ aufgehoben werden. Für den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Liganden UR-MD-2 konnte hinsichtlich der  $G_q$  und  $G_s$  Protein-Kopplung keine Signalwegsbevorzugung detektiert werden. Hinsichtlich einer etwaigen Signalwegsbevorzugung in Bezug auf eine ERK1/2 Phosphorylierung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Aussage getroffen werden. Zukünftige Experimente hinsichtlich der

Aktivierung dieses Signalweges könnten wichtige Hinweise auf die Interaktion von UR-MD-2 mit dem  $hM_1$ -Rezeptorprotein liefern. Würde UR-MD-2 hinsichtlich der ERK-1/2-Phosphorylierung im Vergleich zur  $G_q$  Protein-Kopplung keine Signalwegsbevorzugung aufweisen, könnte die in UR-MD-2 im Gegensatz zu VCP794 anstelle eines Cyclohexan-Rings vorhandene  $C_8$ -Kohlenstoffkette Hinweise auf unterschiedlich induzierte Konformationen bringen.

Keov und Mitarbeiter (2014) konnten im Rahmen der von ihnen durchgeführten Untersuchungen mit Hilfe von Punktmutationen nachweisen, dass die zweite extrazelluläre Schleife (ECL2) des  $hM_1$ -Rezeptors wichtige Interaktionspunkte „bitopischer“ Liganden sowohl für deren Bindung als auch für die Rezeptoraktivierung beinhaltet. Im Gegensatz zu orthosterischen Liganden, legt die Bindungsneigung „bitopischer“ Liganden in diesem Rezeptorbereich den Schluss nahe, dass Aminosäurereste in der zweiten extrazellulären Schleife die Bindung dieser Liganden zur orthosterischen Bindungsstelle in irgendeiner Form behindern (Keov et al. 2014). Diese Befunde stehen im Einklang mit früheren Studien am muskarinischen  $M_2$ -Rezeptor, in denen die zweite extrazelluläre Schleife als eine mögliche Einschränkung für die natürlicherweise vom Rezeptor induzierte aktive Konformationen identifiziert werden konnte (Gregory et al. 2010; Gregory et al. 2012). Gregory und Kollegen postulierten, dass die Aminosäure  $^{177}$ Tyrosin im  $M_2$ -Rezeptor (korrespondierend zu  $M_1^{179}$ Tyrosin) wichtig zu sein scheint für die Fähigkeit des Rezeptorproteins bestimmte Rezeptorzustände zu generieren. An der Mutation  $M_1^{179}$ Trp Ala zeigte UR-MD-2 hinsichtlich der  $G_q$  Protein-vermittelten Signalwegaktivierung keine Abnahme bezüglich der Wirkstärke, jedoch eine signifikante Abnahme der intrinsischen Wirksamkeit (vgl. Abb. 5.36). Zusätzlich war UR-MD-2 nicht in der Lage den  $G_s$  Protein-vermittelten Signalweg anzustoßen, obwohl diese Mutation zu einer signifikanten Zunahme der Bindungsaffinität führte. Ein ähnliches Bild findet sich für diese  $M_1$ -Rezeptormutation mit TBPB in der Literatur (Keov et al. 2014). Zwar zeigte TBPB darin ein Signal hinsichtlich der Calcium-Mobilisation ( $G_q$ -Signalweg), jedoch war es nicht mehr in der Lage, eine pERK1/2-Aktivierung zu induzieren. Interessanterweise wies das als eher orthosterisch postulierte Fragment VCP794 an dieser Mutation sowohl hinsichtlich der Calcium-Mobilisation, als auch der ERK1/2-Aktivierung ein messbares Signal auf (Keov et al. 2014). Somit scheint der in VCP794 vorhandenen Cyclohexan-Ring im Gegensatz zu der in UR-MD-2 vorhandenen einfachen  $C_8$ -Kohlenstoffkette die Rezeptoraktivierung zu begünstigen, vielleicht in dem sie in gestreckter Konformation bis in den extrazellulär lokalisierten allosterischen Rezeptorbereich hinausragt.



**Abbildung 5.36: Vergleich der von UR-MD-2 (TBPBd) induzierten Wirkstärke ( $\log EC_{50}$ ) und maximalen intrinsischen Wirksamkeit ( $E_{max}$ ) an  $hM_1$ -Rezeptoren mit Punktmutationen im allosterischen Bindungsareal hinsichtlich der  $G_q$  und  $G_s$  Protein-Kopplung.** A  $\log EC_{50}$ : Dekadischer Logarithmus der Acetylcholin-Konzentration, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. B  $E_{max}$ : Maximale IP1- ( $G_q$ ) bzw. cAMP-Akkumulation ( $G_s$ ), entspricht dem oberen Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus drei bis sieben unabhängigen Experimenten, die in Form von Dreifachbestimmungen ausgeführt wurden. \*: signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des  $hM_1$ .wt Rezeptors (t- Test, \* $p < 0,05$ ).

Die Rezeptormutation  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  führte für UR-MD-2 trotz dessen nachweislich verminderter Bindungsneigung auf keinem der beiden untersuchten Signalwege zu einer signifikanten Veränderung, weder hinsichtlich der Wirkstärke noch der intrinsischen Wirksamkeit (vgl. Abb. 5.36). Dieser Befund spricht gegen eine Beteiligung dieses Epitops an der  $hM_1$ -Rezeptoraktivierung. Die Entfernung der negativ geladenen  $M_1^{401}\text{Glutaminsäure}$  führte interessanterweise, wie zuvor bei der Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$ , zu einem Verlust der  $G_s$  Protein-Kopplung (vgl. Abb. 5.36); dieses Phänomen konnte weder mit TBPB, noch mit VCP794 detektiert werden (Keov et al. 2014). Somit bestätigt sich die Annahme, dass die in UR-MD-2 vorhandene C<sub>8</sub>-Kohlenstoffkette mit anderen Aminosäuren interagiert als der in VCP794 vorhandene Cyclohexan-Ring. Hinsichtlich der durch  $G_q$  und  $G_s$  Proteine vermittelten untersuchten Signalwege, konnte an der Mutation  $M_1^{400}\text{Trp Ala}$  keine durch UR-MD-2 induzierte nachweisbare Selektivität gefunden werden. Die „Bias“-Faktoren von UR-MD-2 an den Mutationen  $M_1^{179}\text{Tyr Ala}$  und  $M_1^{401}\text{Glu Ala}$  konnten auf Grund der nicht detektierbaren  $G_s$ -Signalwegaktivierung nicht bestimmt werden, legten aber dennoch den Einfluss dieser Aminosäuren auf die Fähigkeit des  $hM_1$ -Rezeptor eine Konformation einzunehmen offen, die es dem Rezeptorprotein erlaubt, mit  $G_q$ -Proteinen zu interagieren.

Zusätzlich zu der Hypothese, dass es sich bei TBPB um einen „bitopischen Liganden handelt (Jacobson et al. 2010), wurde auf Grund der rein allosterischen Interaktion des Fragmentes VCP813 postuliert, dass TBPB in zwei unterschiedlichen Bindungsmodi mit dem Rezeptorprotein interagieren kann, was dessen (unvollständige) Verzögerung der [<sup>3</sup>H]NMS-Dissoziation vom  $M_1$ -Rezeptor erklären könnte (Jacobson et al. 2010; Keov et al. 2013; Keov et al. 2014). Auch der Befund, dass sowohl

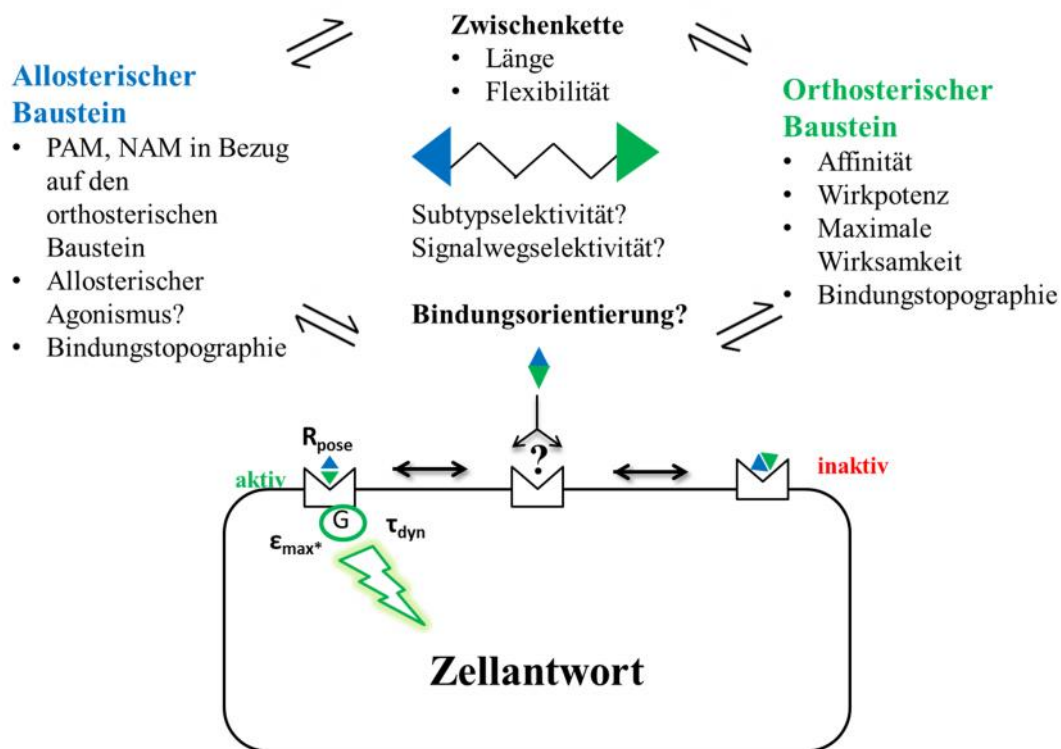
TBPB als auch VCP813 die ACh-vermittelte Rezeptorantwort kompetitiv antagonisieren kann (Lebois et al. 2010; Keov et al. 2014), stützt die These, dass TBPB mit hoch homologen orthosterischen Bindungsdomänen der Rezeptorfamilie interagieren kann. Übertragen auf die im Rahmen dieser Arbeit für dualsterische Hybridliganden nachgewiesene Fähigkeit der dynamischen Bindung könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass der für UR-MD-2 detektierte Partialagonismus auf einen dynamischen Wechsel zwischen der Bindung von UR-MD-2 an der orthosterischen und allosterischen Bindungsstelle zurückzuführen ist, weil die C<sub>8</sub>-Kohlenstoffkette von UR-MD-2 den in TBPB vorhandenen *orto*-tolyl-Baustein ersetzen kann. Für eine mögliche Interaktion von UR-MD-2 mit der „*common*“ bzw. allosterischen Bindungsstelle des hM<sub>1</sub>-Rezeptors sprechen auch die Zunahme der Bindungsneigung von UR-MD-2 durch den Austausch der Aminosäure M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr, der Verlust seiner Bindungsneigung durch den Austausch der Aminosäure M<sub>1</sub><sup>400</sup>Trp zu Alanin sowie seine Fähigkeit zur Verzögerung der Dissoziation von [<sup>3</sup>H]NMS. Die vollständige Inhibition der [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung lieferte weitere Hinweise auf die Fähigkeit der Interaktion von UR-MD-2 mit der orthosterischen Bindungsstelle, wenngleich dieser Effekt auch bei stark negativer Kooperativität zwischen orthosterischem Ligand und allosterischem Modulator angetroffen werden kann (Gregory et al. 2007).

Alle diese Erkenntnisse decken einerseits das Potenzial auf, das durch die Entwicklung „bitopischer“ Liganden in Bezug auf die Rezeptorsubtypselektivität und/oder der Signalwegeselektivität erreicht werden kann (Antony et al. 2009; Keov et al. 2014; Bock et al. 2014a). Andererseits liefern sie zusammen mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen neue Ausgangspunkte für die Entwicklung sowohl subtyp- als auch signalwegeselektiver Substanzen.

### **5.8 Fazit bezüglich der Entwicklung und Verwendung neuer dualsterischer Hybridliganden des hM<sub>1</sub>-Rezeptors**

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, viele unterschiedliche Mechanismen aufzudecken, die bei der Entwicklung neuer dualsterischer Liganden eine Rolle spielen können. Wie bereits bekannt ist, stellt die Entwicklung allosterisch/orthosterischer Hybridliganden einen multidimensionalen Ansatz dar, der neben dem eigentlichen Hybrid sowohl den Einfluss der Einzelbausteine als auch der verwendeten Zwischenkette berücksichtigen muss (Mohr et al. 2013). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Befunde konnten die Komplexität belegen, die mit dem Versuch einhergeht den Mechanismus der Bindung dualsterischer Liganden zu erhellen. Dies betrifft neben der Rezeptorbindung die durch die Hybride induzierte Rezeptoraktivierung und die Rezeptor- oder Signalwegeselektivität (vgl. Abb. 5.37). Einen signifikanten Einfluss auf die Rezeptoraktivierung besitzen sowohl alle Einzelkomponenten und die daraus resultierende Bindungsorientierung der Hybride, die mit dem Orientierungsverhältnis R<sub>pose</sub> quantifiziert werden kann als auch ihre im Rahmen dieser Arbeit erstmals bestimmte maximale intrinsische Aktivität  $_{max}^*$  in der dualsterischen Rezeptorbindungsorientierung.

GPCRs koppeln an eine Vielzahl G Protein-abhängiger und G Protein-unabhängiger Signalwege, sie unterziehen sich einer Reihe von komplexen regulatorischen Prozessen, können durch kleine Moleküle und eine Vielzahl an Proteinen allosterisch moduliert werden und sind in der Lage, Ligand-spezifische Konformationen einzugehen, die es ermöglichen eine Signalwegelektivität zu bewirken (Leach et al. 2007; May et al. 2007b; Kenakin und Miller, 2010). Obwohl all diese Phänomene auch einen neuen Zugang zur Entwicklung subtypselektiver Wirkstoffe bieten, gibt es dennoch eine Reihe von Herausforderungen, die in Bezug auf die Validierung effektiver Therapeutika gemeistert werden müssen (Jacoby et al. 2006). Hinsichtlich dualsterischer Liganden könnte die Auswahl an allosterischen Bausteinen nicht nur die Subtypselektivität und die Signalwegelektivität beeinflussen, sondern auch die Möglichkeit eröffnen, das Ausmaß der Signalwegaktivierung auf ein gewünschtes Level zu setzen (Bock et al. 2014a; Bock et al. 2014b).



**Abbildung 5. 37:** Graphische Darstellung der bei der Entwicklung dualsterischer Liganden zu berücksichtigenden Eigenschaften hinsichtlich ihrer Bindungsorientierung, der daraus resultierende Effekte bezüglich der Fähigkeit zur Rezeptoraktivierung, ihrer Signalwegelektivität und Subtypselektivität. Weitere Erläuterungen im Text. Modifiziert nach Bock et al. 2014a.

Modelle zur Berechnung von Bindungsorientierungen und dem Ausmaß der Rezeptoraktivierung, wie sie im Rahmen dieser Arbeit vorgestellt wurden, dienen dabei der Abschätzung dessen, was wirklich am Rezeptorprotein und nachfolgend in der Zelle geschieht. Sie erlauben es, die Komplexität der unterschiedlichen Mechanismen, die im Zusammenhang mit der Bindung unterschiedlicher Liganden sowie der durch sie resultierende Rezeptoraktivierung auftreten können, besser zu verstehen. Zukünftige Forschung wird zu Tage fördern, ob es gelingt, definierte Ligand-Rezeptorkonformationen auf eine vorhersehbare Art und Weise adressierbar und stabilisierbar zu machen. Die gezielte

Forschung und Weiterentwicklung unterschiedlicher Liganden (orthosterisch, allosterisch, dualsterisch) wird dazu beitragen, diesem Ziel, wie in der vorliegenden Arbeit geschehen, schrittweise näher zu kommen.

## 6 Zusammenfassung

Dualsterische Hybridliganden, bestehend aus einem allosterischen und einem orthosterischen Baustein, die über eine Zwischenkette verbunden sind, gelten als ideale Werkzeuge zur Entwicklung subtyp- und signalwegselektiver Liganden. Abhängig von den Bindungsneigungen der einzelnen Bausteine zu den für sie vorgesehenen Bindungsstellen (entweder orthosterisch oder allosterisch), können diese Liganden entweder in einer dualsterischen oder in einer rein allosterischen Bindungsorientierung mit dem Rezeptorprotein interagieren. Handelt es sich bei dem orthosterischen Baustein um eine agonistisch wirkende Substanz, induziert die dualsterische Bindungsorientierung des Hybrides die aktive Rezeptorkonformation und bewirkt z.B. eine G Protein-Aktivierung, wohingegen die rein allosterische Bindungsorientierung eine inaktive Rezeptorkonformation bewirkt. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals an muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptoren der dynamische Wechsel zwischen der dualsterischen und der rein allosterischen Bindungsorientierung dualsterischer Hybridliganden, als ein Werkzeug zum Design von neuen Partialagonisten identifiziert werden, die einen neuen Ansatz für die Entwicklung von Arzneistoffen zur Behandlung von M. Alzheimer bilden können. Ergebnisse aus früheren funktionellen Experimente zur dynamischen Massenumverteilung (DMR) konnten bereits zeigen, dass es sich bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridliganden um partialagonistisch wirkende Liganden am  $hM_1$ -Rezeptor handelt, die einen Maximaleffekt  $E_{max}$  von 55-80% zeigten (Holze, Masterarbeit 2013). Für die Charakterisierung der unterschiedlichen Bindungsorientierungen dieser Hybridliganden konnten in der vorliegenden Arbeit, durch das Auflösen von Untervariablen oder durch globale Analysen der Messdaten, erstmals zwei Gleichungen für die Datenanalyse Anwendung finden, die den Erkenntnisrahmen ihrer Vorgängerversionen nach Antony und Mitarbeitern (2009) und Bock et al. (2014a) substanziell erweiterten. Auf diese Weise gelang es, erstmals einen eigenen Kooperativitätsfaktor  $\rho$  für die Hybride in der allosterischen Bindungsorientierung und dem orthosterischen Radioliganden zu ermitteln (vgl. Analyse a) Kapitel 3.2.4.2). Weiterhin konnte die Bindungskonstante  $K_A$  für das jeweilige Hybrid in der dualsterischen Bindungspose bestimmt werden, ohne dafür die Bindungskonstante  $K_B$  des dualsterischen Hybrides in der allosterischen Bindungspose als Konstante behandeln zu müssen (vgl. Analyse b), Kapitel 3.2.4.2). Mit Hilfe von [ $^3H$ ]NMS-Gleichgewichtsbindungsexperimenten und dieser zwei neu etablierten Analysen, konnte gezeigt werden, dass die Verlängerung der Zwischenkette des dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybrides JK 550 ( $C_4$ ) um zwei Methylengruppen zu einem signifikanten Unterschied des Orientierungsverhältnisses  $R_{pose}$  und damit zu einem Wechsel von einer allosterischen zu einer überwiegend dualsterischen Bindungsorientierung für das verlängerte Hybrid JK 537 ( $C_6$ ) führt. Interessanterweise zeigten die Ergebnisse unterschiedlicher funktioneller Experimentalansätze mit lebenden  $hM_1$ -CHO-Zellen unter Vermittlung von  $G_q$ ,  $G_i$  und  $G_s$  Proteinen, dass sich mit Ausnahme

des  $G_i$ -Signalweges hinsichtlich der maximalen intrinsischen Aktivität  $E_{\max}$  beider Hybride kein signifikanter Unterschied finden ließ. Darüber hinaus zeigte das kürzere Hybrid JK 550 trotz einer postulierten dualsterischen Bindungsorientierung von unter 50%, sowohl auf dem  $G_q$ - als auch  $G_s$ -Signalweg eine signifikant höhere Wirkstärke. Dieses Verhalten erforderte eine Ausweitung der Betrachtung auf der Basis des „Operational model of agonism for dynamic ligands“ (Bock et al. 2014a) und führte zu der Entwicklung neuer globaler Datenanalysevarianten. Diese erlaubten es, die bislang, bei Einzelkurvenbetrachtung (Bock et al. 2014) durch Überparametrisierung analytisch unzugängliche Parameter  $\tau_{\max}$  und  $\tau_{\max}^*$  (vgl. 4.1.9) zu bestimmen. Dieses Vorgehen ermöglichte es erstmalig, für die Hybridliganden JK 550 ( $C_4$ ) und JK 537 ( $C_6$ ) mit  $\tau_{\max}^*$ , den systemunabhängigen Transduktionskoeffizienten bei 100% dualsterischer Rezeptorbindung in Abwesenheit einer Rezeptorreserve zu bestimmen (vgl. 4.1.9) und deren signifikanten Unterschied als potentielle Erklärung für die, trotz signifikant unterschiedlicher aktiver dualsterischer Bindungsorientierung auf allen untersuchten Signalwegen (mit Ausnahme des durch  $G_i$  Proteine vermittelten Signalweges), gleich ausgeprägten Maximaleffekte  $E_{\max}$  zu erklären: eine höherer Wert für  $\tau_{\max}^*$  von JK 550 ( $C_4$ ) kompensiert die durch eine geringere dualsterische Bindungsorientierung induzierte geringere aktive Rezeptorfraktion. Die Wirksamkeitsbetrachtung dualsterischer Liganden kann zukünftig demnach neben  $E_{\max}$  und  $R_{\text{pose}}$  nach den Befunden der vorliegenden Arbeit auch deren rezeptorvermittelte, maximale intrinsische Aktivität  $\tau_{\max}^*$  einschließen.

Alle sieben Iperoxo/BQCAAd-Hybride wurden zudem hinsichtlich einer möglichen Signalwegelektivität gegenüber den drei für den muskarinischen  $hM_1$ -Rezeptor prominentesten Signalwegen überprüft, darunter der  $G_q$ -Signalweg (Daten der IP1-Akkumulation), der  $G_s$ -Signalweg (Daten der cAMP-Akkumulation) und der  $G_i$ -Signalweg (Daten der [ $^{35}\text{S}$ ]GTP- $\gamma$ -S-Bindungsexperimente). Zwei der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Iperoxo/BQCAAd-Hybridliganden (JK 596 und JK 559), zeigten große Unterschiede im Bereich der für sie in unterschiedlichen Signalwegen ermittelten modellunabhängigen Wirkstärken  $EC_{50}$ -Werte. Die Verwendung des „Operational Model of Agonism“ lieferte Parameterschätzwerte für die funktionelle Affinität  $K_A$  der dualsterischen Hybride. Durch die zusätzliche Bestimmung der Transduktionskoeffizienten  $\tau/K_A$  mittels der Variante nach Shonberg et al. (2014), wurden alle sieben dualsterischen Iperoxo/BQCAAd-Hybride über die Berechnung ihres „Ligand-Bias“ hinsichtlich einer möglichen Signalwegelektivität gegenüber dem  $G_q$ -,  $G_s$ - und  $G_i$ -Signalweg untersucht und zeigten eine signifikante Verschiebung der Signalwegbevorzugung zu einer  $G_s$  bzw.  $G_i$  Protein-Kopplung. Eine Bevorzugung hinsichtlich der für  $hM_1$ -Rezeptoren typischen  $G_q$  Protein-Kopplung konnte interessanterweise bei keinem der sieben Hybride nachgewiesen werden.

Um weitere Einblicke in das Bindungsverhalten und die Signalwegaktivierung der dualsterischen Hybridliganden dieser Arbeit zu erlangen, wurde erstmals der Einfluss unterschiedlicher Mutationen im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstelle des humanen  $hM_1$ -Rezeptors untersucht. Ein



Austausch der Aminosäure  $M_1^{179}\text{Tyr}$  Ala in der zweiten extrazellulären Schleife (ECL2) bewirkte eine Abnahme der dualsterischen Bindungsorientierung für JK 550 nicht aber für JK 537. Hinsichtlich der Rezeptoraktivierung nahm an dieser Rezeptormutation die dualsterische Bindungspose des kürzeren dualsterischen Hybrides JK 550 im Vergleich zum  $hM_1$ -Wildtyp auf 50 % ab, auf dem  $G_q$ -Signalweg jedoch die JK 550 Wirkstärke  $\log EC_{50}$  signifikant zu und seine intrinsische Wirksamkeit  $E_{\max}$  ab. Im Fall von JK 537, dem um zwei Kohlenstoffatome längeren Hybrid, führte der Verlust der Hydroxylgruppe und des Phenylringes durch den Austausch der Aminosäure  $M_1^{179}\text{Tyr}$  Ala sowohl auf dem  $G_q$ - als auch auf dem  $G_s$ -Signalweg zu einem vollständigen Verlust der intrinsischen Wirksamkeit.

Die Aminosäure  $M_1^{400}\text{Trp}$ , lokalisiert oberhalb der orthosterischen Bindungsstelle, im Übergang zwischen der dritten extrazellulären Schleife (ECL3) und der siebten Transmembran (TM7), führte im Fall von JK 537, wie auch seinem orthosterischen Baustein Iperoxo, auf dem  $G_q$  Protein-vermittelten Signalweg zu einer signifikanten Abnahme der Wirkstärke. JK 550 zeigte bei Fehlen der Aminosäure  $M_1^{400}\text{Trp}$  am Übergang zwischen der dritten extrazellulären Schleife und der siebten Transmembrandomäne die gleiche hohe Wirkstärke  $\log EC_{50}$ , wie es für Iperoxo am Wildtyprezeptor detektiert werden konnte, ohne eine Veränderung der dualsterischen Bindungsorientierung, letzteres galt auch für JK 537. Die Mutation  $M_1^{401}\text{Glu}$  Ala führte zu einer fast vollständigen Bindung (99%) der Hybride JK 550 und JK 537 in der dualsterischen Bindungsorientierung. Hinsichtlich der  $G_q$ -Signalwegaktivierung kam es jedoch zu einer signifikanten Abnahme der Wirkstärke  $\log EC_{50}$ . Auf dem  $G_s$  Protein-vermittelten Signalweg zeigte das kürzere dualsterische Hybrid JK 550 dagegen eine signifikante Zunahme der Wirkstärke  $\log EC_{50}$  von über einer Dekade. Angesichts der auf fast 100% gesteigerten dualsterischen Bindungsorientierung im Vergleich mit dem  $hM_1$ -wt-Rezeptor, sprechen diese Befunde für einen nur begrenzten Einfluss dieses Zuwachses auf die Wirkstärke  $\log EC_{50}$  und das Fehlen eines Einflusses auf die intrinsische Wirksamkeit  $E_{\max}$ .

Neben dem Einfluss auf die Bindung und die Rezeptoraktivierung, konnte mit Hilfe von Rezeptormutationen im Bereich der putativ allosterischen Bindungsstelle des  $hM_1$ -Rezeptors zudem überprüft werden, ob sie in der Lage sind, eine Ligand-spezifische Bevorzugung eines speziellen Signalweges zu induzieren. Auf diese Weise konnten Einblicke darüber gewonnen werden, welche Aminosäuren möglicherweise an der ligandvermittelten Bindung unterschiedlicher G Proteine sowie der Ausbildung unterschiedlicher Rezeptorkonformationen beteiligt sind. Die Mutation  $M_1^{179}\text{Tyr}$  Ala führte einzig für Iperoxo, einem orthosterischen Agonisten und Baustein der Hybride zu einer gegenüber dem Referenzagonisten ACh induzierten  $G_q$ -Signalwegsselektivität. Der Austausch der Aminosäure  $M_1^{400}\text{Trp}$  führte für JK 550 zu einer Signalwegsselektivität für  $G_q$  Proteine. Das längere dualsterische Hybrid JK 537 änderte seine Bindungseigenschaften an der  $M_1\text{Trp}^{400}$  Rezeptormutante nicht und induziert keinen „Ligand-Bias“ zwischen der  $G_q$  und  $G_s$  Protein-Kopplung. Die Mutation  $M_1^{401}\text{Glu}$  Ala führte sowohl für JK 537 als auch für Iperoxo zu einer signifikanten Bevorzugung des

G<sub>q</sub>-Signalweges, wohingegen für das kürzere Hybrid keine Bevorzugung festgestellt werden konnte. Dieser Befund spricht dafür, dass sowohl für JK 537, als auch für Iperoxo die Interaktion mit dieser Aminosäure signalwegrelevant ist und bestätigt das Bild, dass diese dualsterischen Liganden mit unterschiedlichen Bereichen des Rezeptorproteins interagieren.

Neben den bereits beschriebenen dualsterischen Iperoxo/BQCAAd-Hybriden, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres Paar potentiell dualsterischer AF292/BQCAAd-Hybride hinsichtlich ihrer Bindungsmodi und der durch sie vermittelten Signalwegaktivierungen untersucht. In „Drei-Punkt“-kinetischen-Experimenten zeigten sowohl die Hybride UR-MD-13 und UR-MD-14, als auch ihre allosterischen Fragmente eine Dissoziationshemmung, die auf eine allosterische Interaktion schließen ließ. Interessanterweise zeigte die als orthosterischer Baustein postulierte Substanz AF292 im Gegensatz zu Iperoxo eine deutliche Inhibition der Dissoziation von [<sup>3</sup>H]NMS, die auf eine allosterische Rezeptorinteraktion an hM<sub>1</sub>-Rezeptoren deutete. Die Analyse der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten dieser Hybride erfolgte mit den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Analysen a) und b), obgleich keine abschließende Klarheit darüber erlangt werden konnte, ob die Voraussetzungen (z.B. kein allosterischer Agonismus des allosterischen Bausteines, vgl. Kapitel 4.3.1.4.1) dafür erfüllt waren. Es zeigte sich jedoch, dass auf Grund der offenbar vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten und des daraus resultierenden komplexen Verhaltens dieser zwei putativ dualsterischen AF292/BQCAAd-Hybridliganden es nicht möglich war, eine eindeutige Aussage bezüglich ihres Mechanismus der Bindung und der daraus resultierende Aktivierung des muskarinischen hM<sub>1</sub>-Rezeptors treffen zu können. Dennoch lieferten die beiden dualsterischen Hybridliganden UR-MD-13 und UR-MD-14 auf der Basis ihrer [<sup>3</sup>H]NMS-Bindungs- als auch ihrer Funktionsdaten Hinweise darauf, dass nicht nur die Affinität des orthosterischen und allosterischen Fragmentes sowie die Zwischenkette Einfluss nehmen können, sondern auch die Kooperativität zwischen den beiden Fragmenten: diese kann Einfluss sowohl auf das Bindungsverhalten als auch auf die Rezeptoraktivierung dualsterischer Hybride nehmen. Damit sind diese Hybride Beispiele für dualsterische Liganden mit einer Steuerbarkeit der dualsterischen/allosterischen Bindungsorientierung und Rezeptoraktivierung durch intramolekulare Kooperativität.

Neben seiner Muttersubstanz BQCA konnte auch erstmalig für den allosterische Baustein UR-MD-5 des dualsterischen Hybrides UR-MD-13 im Rahmen dieser Arbeit in Gleichgewichtsbindungsexperimenten an hM<sub>1</sub>-Rezeptoren eine positive Kooperativität mit dem Agonisten [<sup>3</sup>H]Iperoxo nachgewiesen werden. Das um sieben Kohlenstoffatome längere allosterische Fragment UR-MD-6 zeigte unter identischen Bedingungen eine negative Kooperativität mit [<sup>3</sup>H]Iperoxo. Somit konnte nachgewiesen werden, dass allein die Verlängerung des Alkylsubstituenten im UR-MD-5 einen Wechsel der allosterischen Modulationsrichtung der Agonistbindung von positiv (PAM) zu negativ (NAM) bewirken kann. In IP1-Akkumulationsexperimenten zeigte UR-MD-5, neben einem geringen allosterisch agonistischen Effekt, jedoch keinen Effekt auf die von Iperoxo

induzierte Wirkstärke  $EC_{50}$ . Bei ergänzend durchgeführten Experimenten zur Detektion der durch  $G_s$  Protein-vermittelten Signalwegaktivierung (cAMP-Akkumulation) bewirkte das in Kombination mit Iperoxo zugefügte allosterische Fragment UR-MD-5 (10  $\mu$ M) interessanterweise eine signifikante Linksverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve. Ein allosterisch agonistischer Effekt zeigte sich im Gegensatz zu den IP1-Akkumulationsexperimenten nicht. Somit konnte UR-MD-5 im Rahmen dieser Arbeit als ein positiv allosterischer Modulator hinsichtlich der [ $^3$ H]Iperoxo-Gleichgewichtsbindung, jedoch als ein „stiller“ allosterischer Modulator (SAM) hinsichtlich der durch Iperoxo induzierten  $G_q$  Protein-vermittelten und als ein positiv allosterischer Modulator hinsichtlich der durch Iperoxo induzierten  $G_s$  Protein-vermittelten Rezeptoraktivierung identifiziert werden.

Auf der Suche nach selektiven Aktivatoren muskarinischer  $M_1$ -Rezeptoren, konnte in der Literatur bereits eine Reihe von Substanzen als „allosterische Agonisten“ identifiziert werden. Für einige der dort als „allosterische Agonisten“ am muskarinischen  $M_1$ -Rezeptor identifizierte Liganden, darunter auch die Substanz TBPB, konnte hinsichtlich ihrer Bindungstopographie nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um einen „bitopischen“ Bindungsmodus handelt der Bindungsareale der allosterischen als auch orthosterischen Bindungsstelle involviert. In einer vorangegangenen Arbeit (Zimmermann, Masterarbeit 2012) konnte bereits gezeigt werden, dass UR-MD-2, ein allosterisches Fragment des dualsterischen Hybridliganden UR-MD-4 in funktionellen DMR-Experimenten ein partialagonistisches Verhalten aufwies. Auf Grund der Ähnlichkeit von UR-MD-2 mit dem allosterischen/bitopischen Agonisten TBPB erschien es interessant, den potenziell allosterischen/bitopischen Agonisten UR-MD-2 (TBPBd) weitergehend zu charakterisieren. In kinetischen Experimenten zeigte UR-MD-2 (TBPBd) die Fähigkeit, am Flp- $hM_1$ -Rezeptor die Dissoziation des Radioantagonisten [ $^3$ H]NMS zu verzögern und lieferte damit einen Beleg für eine allosterische Rezeptorinteraktion innerhalb eines ternären Komplexes ( $hM_1$ -Rezeptor/UR-MD-2/NMS). Interessanterweise ließ sich feststellen, dass die drei untersuchten Punktmutationen  $M_1^{179}$ Tyr Ala,  $M_1^{400}$ Trp Ala und  $M_1^{401}$ Glu Ala keinen signifikanten Beitrag zur Bindungsneigung von UR-MD-2 zum [ $^3$ H]NMS-besetzten Rezeptor leisteten. In Gleichgewichtsbindungsexperimenten zeigte UR-MD-2 als TBPBd, anders als für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten allosterischen Fragmente vom Typ BQCA, eine formal vollständige Inhibition der spezifischen [ $^3$ H]NMS-Bindung als Ausdruck einer stark negativen Kooperativität mit [ $^3$ H]NMS. An orthosterisch unbesetzten  $hM_1$ -Rezeptoren führte die Mutation  $M_1^{179}$ Tyr Ala in der zweiten extrazellulären Schleife zu einer signifikanten Zunahme der Bindungsneigung von UR-MD-2. Der Austausch der Aminosäure  $M_1^{400}$ Trp Alanin führte dagegen zu einem schwachen Verlust der Bindungsneigung von UR-MD-2. Die Zunahme der Bindungsneigung durch den Austausch der Aminosäure  $M_1^{179}$ Tyr, als auch der Verlust der Bindungsneigung durch den Austausch der Aminosäure  $M_1^{400}$ Trp zu Alanin geben Hinweise auf eine mögliche Interaktion von UR-MD-2 mit einer „common“ allosterischen Bindungsstelle an  $hM_1$ -Rezeptoren. Der im Übergang zwischen der dritten extrazellulären Schleife (ECL3) und der Transmembrandomäne sieben (TM7) positionierte negative Seitenkettenrest der Aminosäure  $M_1^{401}$ Glu

scheint, anders als bei dem sich von BQCA ableitenden Baustein UR-MD-5, nicht an der Bindung des allosterischen Fragmentes UR-MD-2 am orthosterisch nicht durch [<sup>3</sup>H]NMS-besetzten Rezeptor beteiligt zu sein. Hinsichtlich der Rezeptoraktivierung zeigte UR-MD-2 sowohl auf dem G<sub>q</sub>- als auch auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg ein partialagonistisches Verhalten. In diesem Zusammenhang war es interessant, dass die Mutationen M<sub>1</sub><sup>179</sup>Tyr Ala und M<sub>1</sub><sup>401</sup>Glu Ala auf dem G<sub>s</sub>-Signalweg, anders als auf dem G<sub>q</sub>-Signalweg, zu einem vollständigen Funktionsverlust von UR-MD-2 führten.

Zusammenfassend ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, viele verschiedenartige Mechanismen der Ligand-Rezeptor-Interaktion wesentlich zu erhellen bzw. aufzudecken, die sowohl bei der Entwicklung neuer dualsterischer Liganden, als auch allosterischer Modulatoren eine Rolle spielen können.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abdul-Ridha, Alaa; Lane, J. Robert; Sexton, Patrick M.; Canals, Meritxell; Christopoulos, Arthur (2013): Allosteric modulation of a chemogenetically modified G protein-coupled receptor. In: *Molecular pharmacology* 83 (2), S. 521–530. DOI: 10.1124/mol.112.083006.
- Abdul-Ridha, Alaa; Lane, J. Robert; Mistry, Shailesh N.; Lopez, Laura; Sexton, Patrick M.; Scammells, Peter J. et al. (2014a): Mechanistic insights into allosteric structure-function relationships at the M1 muscarinic acetylcholine receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (48), S. 33701–33711. DOI: 10.1074/jbc.M114.604967.
- Abdul-Ridha, Alaa; Lopez, Laura; Keov, Peter; Thal, David M.; Mistry, Shailesh N.; Sexton, Patrick M. et al. (2014b): Molecular determinants of allosteric modulation at the M1 muscarinic acetylcholine receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (9), S. 6067–6079. DOI: 10.1074/jbc.M113.539080.
- Abel, Samantha; Back, David J.; Vourvahis, Manoli (2009): Maraviroc: pharmacokinetics and drug interactions. In: *Antiviral therapy* 14 (5), S. 607–618.
- Abrol, Ravinder; Kim, Soo-Kyung; Bray, Jenelle K.; Griffith, Adam R.; Goddard, William A. (2011): Characterizing and predicting the functional and conformational diversity of seven-transmembrane proteins. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 55 (4), S. 405–414. DOI: 10.1016/j.ymeth.2011.12.005.
- Abrol, Ravinder; Kim, Soo-Kyung; Bray, Jenelle K.; Trzaskowski, Bartosz; Goddard, William A. (2013): Conformational ensemble view of G protein-coupled receptors and the effect of mutations and ligand binding. In: *Methods in enzymology* 520, S. 31–48. DOI: 10.1016/B978-0-12-391861-1.00002-2.
- Akam, E. C.; Challiss, R. A.; Nahorski, S. R. (2001): G(q/11) and G(i/o) activation profiles in CHO cells expressing human muscarinic acetylcholine receptors: dependence on agonist as well as receptor-subtype. In: *British journal of pharmacology* 132 (4), S. 950–958. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703892.
- Amici, Marco de; Dallanocce, Clelia; Holzgrabe, Ulrike; Tränkle, Christian; Mohr, Klaus (2010): Allosteric ligands for G protein-coupled receptors: a novel strategy with attractive therapeutic opportunities. In: *Medicinal research reviews* 30 (3), S. 463–549. DOI: 10.1002/med.20166.
- Antony, Johannes; Kellershohn, Kerstin; Mohr-Andra, Marion; Kebig, Anna; Prilla, Stefanie; Muth, Mathias et al. (2009): Dualsteric GPCR targeting: a novel route to binding and signaling pathway selectivity. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23 (2), S. 442–450. DOI: 10.1096/fj.08-114751.
- Audet, Nicolas; Galés, Céline; Archer-Lahlou, Elodie; Vallières, Marc; Schiller, Peter W.; Bouvier, Michel; Pineyro, Graciela (2008): Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signaling complexes containing delta-opioid

receptors and heterotrimeric G proteins. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (22), S. 15078–15088. DOI: 10.1074/jbc.M707941200.

Avlani, Vimesh A.; Langmead, Christopher J.; Guida, Elizabeth; Wood, Martyn D.; Tehan, Ben G.; Herdon, Hugh J. et al. (2010): Orthosteric and allosteric modes of interaction of novel selective agonists of the M1 muscarinic acetylcholine receptor. In: *Molecular pharmacology* 78 (1), S. 94–104. DOI: 10.1124/mol.110.064345.

Azzi, Mounia; Charest, Pascale G.; Angers, Stéphane; Rousseau, Guy; Kohout, Trudy; Bouvier, Michel; Piñeyro, Graciela (2003): Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (20), S. 11406–11411. DOI: 10.1073/pnas.1936664100.

Baldwin, J. M.; Schertler, G. F.; Unger, V. M. (1997): An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. In: *Journal of molecular biology* 272 (1), S. 144–164. DOI: 10.1006/jmbi.1997.1240.

Baltos, Jo-Anne; Paoletta, Silvia; Nguyen, Anh T. N.; Gregory, Karen J.; Tosh, Dilip K.; Christopoulos, Arthur et al. (2016): Structure-Activity Analysis of Biased Agonism at the Human Adenosine A3 Receptor. In: *Molecular pharmacology* 90 (1), S. 12–22. DOI: 10.1124/mol.116.103283.

Barker, E. L.; Westphal, R. S.; Schmidt, D.; Sanders-Bush, E. (1994): Constitutively active 5-hydroxytryptamine<sub>2C</sub> receptors reveal novel inverse agonist activity of receptor ligands. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (16), S. 11687–11690.

Barlow, R.; Blake, J. F. (1989): Hill coefficients and the logistic equation. In: *Trends in pharmacological sciences* 10 (11), S. 440–441. DOI: 10.1016/S0165-6147(89)80006-9.

Bartolomeo, A. C.; Morris, H.; Buccafusco, J. J.; Kille, N.; Rosenzweig-Lipson, S.; Husbands, M. G. et al. (2000): The preclinical pharmacological profile of WAY-132983, a potent M1 preferring agonist. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 292 (2), S. 584–596.

Bennet J.P and Yamamura H.I: Neurotransmitter, hormone or drug receptor binding methods. In: *New York, Raven Press* 1985 (2. Ausgabe).

Bermudez, Marcel; Rakers, Christin; Wolber, Gerhard (2015): Structural Characteristics of the Allosteric Binding Site Represent a Key to Subtype Selective Modulators of Muscarinic Acetylcholine Receptors. In: *Molecular informatics* 34 (8), S. 526–530. DOI: 10.1002/minf.201500025.

Bermudez, Marcel; Mortier, Jeremie; Rakers, Christin; Sydow, Dominique; Wolber, Gerhard (2016): More than a look into a crystal ball: protein structure elucidation guided by molecular dynamics simulations. In: *Drug discovery today* 21 (11), S. 1799–1805. DOI: 10.1016/j.drudis.2016.07.001.

- Berridge, M. J.; Irvine, R. F. (1984): Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. In: *Nature* 312 (5992), S. 315–321.
- Berridge, M.J. (2012): Cell Signaling Biology; doi: 10.1042/csb0001012
- Binet, Virginie; Brajon, Carole; Le Corre, Laurent; /csbAcher, Francine; Pin, Jean-Philippe; Prezeau, Laurent (2004): The heptahelical domain of GABA(B2) is activated directly by CGP7930, a positive allosteric modulator of the GABA(B) receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (28), S. 29085–29091. DOI: 10.1074/jbc.M400930200.
- Birdsall, N. J.; Farries, T.; Gharagozloo, P.; Kobayashi, S.; Lazareno, S.; Sugimoto, M. (1999): Subtype-selective positive cooperative interactions between brucine analogs and acetylcholine at muscarinic receptors: functional studies. In: *Molecular pharmacology* 55 (4), S. 778–786.
- Birdsall, N. J. M.; Lazareno, S. (2005): Allosterism at muscarinic receptors: ligands and mechanisms. In: *Mini reviews in medicinal chemistry* 5 (6), S. 523–543.
- Black, J. W.; Leff, P. (1983): Operational models of pharmacological agonism. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 220 (1219), S. 141–162.
- Black, J. W.; Leff, P.; Shankley, N. P.; Wood, J. (1985): An operational model of pharmacological agonism: the effect of E/A curve shape on agonist dissociation constant estimation. In: *British journal of pharmacology* 84 (2), S. 561–571.
- Blanpain, Cédric; Vanderwinden, Jean-Marie; Cihak, Josef; Wittamer, Valérie; Le Poul, Emmanuel; Issafras, Hassan et al. (2002): Multiple active states and oligomerization of CCR5 revealed by functional properties of monoclonal antibodies. In: *Molecular biology of the cell* 13 (2), S. 723–737. DOI: 10.1091/mbc.01-03-0129.
- Blättermann, Stefanie; Peters, Lucas; Ottersbach, Philipp Aaron; Bock, Andreas; Konya, Viktoria; Weaver, C. David et al. (2012): A biased ligand for OXE-R uncouples G<sub>s</sub> and G<sub>i</sub> signaling within a heterotrimer. In: *Nature chemical biology* 8 (7), S. 631–638. DOI: 10.1038/nchembio.962.
- Blecker, Eugene R.; Yancey, Steven W.; Baitinger, Leslie A.; Edwards, Lisa D.; Klotsman, Michael; Anderson, Wayne H.; Dorinsky, Paul M. (2006): Salmeterol response is not affected by beta2-adrenergic receptor genotype in subjects with persistent asthma. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 118 (4), S. 809–816. DOI: 10.1016/j.jaci.2006.06.036.
- Bock, Andreas; Merten, Nicole; Schrage, Ramona; Dallanoce, Clelia; Batz, Julia; Klockner, Jessica et al. (2012): The allosteric vestibule of a seven transmembrane helical receptor controls G-protein coupling. In: *Nature communications* 3, S. 1044. DOI: 10.1038/ncomms2028.
- Bock, Andreas; Mohr, Klaus (2013): Dualsteric GPCR targeting and functional selectivity: the paradigmatic M(2) muscarinic acetylcholine receptor. In: *Drug discovery today. Technologies* 10 (2), S. e245-52. DOI: 10.1016/j.ddtec.2012.12.003.

- Bock, Andreas; Chirinda, Brian; Krebs, Fabian; Messerer, Regina; Batz, Julia; Muth, Mathias et al. (2014a): Dynamic ligand binding dictates partial agonism at a G protein-coupled receptor. In: *Nature chemical biology* 10 (1), S. 18–20. DOI: 10.1038/nchembio.1384.
- Bock, Andreas; Kostenis, Evi; Trankle, Christian; Lohse, Martin J.; Mohr, Klaus (2014b): Pilot the pulse: controlling the multiplicity of receptor dynamics. In: *Trends in pharmacological sciences* 35 (12), S. 630–638. DOI: 10.1016/j.tips.2014.10.002.
- Bock, Andreas; Bermudez, Marcel; Krebs, Fabian; Matera, Carlo; Chirinda, Brian; Sydow, Dominique et al. (2016): Ligand Binding Ensembles Determine Graded Agonist Efficacies at a G Protein-coupled Receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (31), S. 16375–16389. DOI: 10.1074/jbc.M116.735431.
- Bodick, N. C.; Offen, W. W.; Levey, A. I.; Cutler, N. R.; Gauthier, S. G.; Satlin, A. et al. (1997a): Effects of xanomeline, a selective muscarinic receptor agonist, on cognitive function and behavioral symptoms in Alzheimer disease. In: *Archives of neurology* 54 (4), S. 465–473.
- Bodick, N. C.; Offen, W. W.; Shannon, H. E.; Satterwhite, J.; Lucas, R.; van Lier, R.; Paul, S. M. (1997b): The selective muscarinic agonist xanomeline improves both the cognitive deficits and behavioral symptoms of Alzheimer disease. In: *Alzheimer disease and associated disorders* 11 Suppl 4, S. S16-22.
- Bokoch, G. M.; Gilman, A. G. (1984): Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by pertussis toxin. In: *Cell* 39 (2 Pt 1), S. 301–308.
- Bond, R. A.; Leff, P.; Johnson, T. D.; Milano, C. A.; Rockman, H. A.; McMinn, T. R. et al. (1995): Physiological effects of inverse agonists in transgenic mice with myocardial overexpression of the beta 2-adrenoceptor. In: *Nature* 374 (6519), S. 272–276. DOI: 10.1038/374272a0.
- Bonifazi, Alessandro; Yano, Hideaki; Del Bello, Fabio; Farande, Aniket; Quaglia, Wilma; Petrelli, Riccardo et al. (2014): Synthesis and biological evaluation of a novel series of heterobivalent muscarinic ligands based on xanomeline and 1-3-(4-butylpiperidin-1-yl)propyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-2-one (77-LH-28-1). In: *Journal of medicinal chemistry* 57 (21), S. 9065–9077. DOI: 10.1021/jm501173q.
- Bonner, T. I.; Buckley, N. J.; Young, A. C.; Brann, M. R. (1987): Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. In: *Science (New York, N.Y.)* 237 (4814), S. 527–532.
- Bonner, T. I.; Young, A. C.; Brann, M. R.; Buckley, N. J. (1988): Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. In: *Neuron* 1 (5), S. 403–410.
- Bourne, H. R.; Sanders, D. A.; McCormick, F. (1991): The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. In: *Nature* 349 (6305), S. 117–127. DOI: 10.1038/349117a0.



- Bradley, Sophie J.; Langmead, Christopher J.; Watson, Jeannette M.; Challiss, R. A. John (2011): Quantitative analysis reveals multiple mechanisms of allosteric modulation of the mGlu5 receptor in rat astroglia. In: *Molecular pharmacology* 79 (5), S. 874–885. DOI: 10.1124/mol.110.068882.
- Briand, Lisa A.; Gritton, Howard; Howe, William M.; Young, Damon A.; Sarter, Martin (2007): Modulators in concert for cognition: modulator interactions in the prefrontal cortex. In: *Progress in neurobiology* 83 (2), S. 69–91. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2007.06.007.
- Bridges, Thomas M.; Lindsley, Craig W. (2008): G-protein-coupled receptors: from classical modes of modulation to allosteric mechanisms. In: *ACS chemical biology* 3 (9), S. 530–541. DOI: 10.1021/cb800116f.
- Bruning, John B.; Parent, Alexander A.; Gil, German; Zhao, Min; Nowak, Jason; Pace, Margaret C. et al. (2010): Coupling of receptor conformation and ligand orientation determine graded activity. In: *Nature chemical biology* 6 (11), S. 837–843. DOI: 10.1038/nchembio.451.
- Bruns, R. F.; Fergus, J. H. (1990): Allosteric enhancement of adenosine A1 receptor binding and function by 2-amino-3-benzoylthiophenes. In: *Molecular pharmacology* 38 (6), S. 939–949.
- Bubar, Marcy J.; Cunningham, Kathryn A. (2008): Prospects for serotonin 5-HT<sub>2R</sub> pharmacotherapy in psychostimulant abuse. In: *Progress in brain research* 172, S. 319–346. DOI: 10.1016/S0079-6123(08)00916-3.
- Budzik, Brian; Garzya, Vincenzo; Shi, Dongchuan; Walker, Graham; Woolley-Roberts, Marie; Pardoe, Joanne et al. (2010): Novel N-Substituted Benzimidazolones as Potent, Selective, CNS-Penetrant, and Orally Active M1 mAChR Agonists. In: *ACS medicinal chemistry letters* 1 (6), S. 244–248. DOI: 10.1021/ml100105x.
- Buller, Stefan; Zlotos, Darius Paul; Mohr, Klaus; Ellis, John (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. In: *Molecular pharmacology* 61 (1), S. 160–168.
- Burford, N. T.; Nahorski, S. R. (1996): Muscarinic m1 receptor-stimulated adenylate cyclase activity in Chinese hamster ovary cells is mediated by G<sub>s</sub> alpha and is not a consequence of phosphoinositidase C activation. In: *The Biochemical journal* 315 (Pt 3), S. 883–888.
- Burford, Neil T.; Watson, John; Bertekap, Robert; Alt, Andrew (2011): Strategies for the identification of allosteric modulators of G-protein-coupled receptors. In: *Biochemical pharmacology* 81 (6), S. 691–702. DOI: 10.1016/j.bcp.2010.12.012.
- Burford, Neil T.; Clark, Mary J.; Wehrman, Tom S.; Gerritz, Samuel W.; Banks, Martyn; O'Connell, Jonathan et al. (2013): Discovery of positive allosteric modulators and silent allosteric modulators of

the  $\mu$ -opioid receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (26), S. 10830–10835. DOI: 10.1073/pnas.1300393110.

Bymaster, Frank P.; McKinzie, David L.; Felder, Christian C.; Wess, Jürgen (2003): Use of M1-M5 muscarinic receptor knockout mice as novel tools to delineate the physiological roles of the muscarinic cholinergic system. In: *Neurochemical research* 28 (3-4), S. 437–442.

Caccamo, Antonella; Oddo, Salvatore; Billings, Lauren M.; Green, Kim N.; Martinez-Coria, Hilda; Fisher, Abraham; LaFerla, Frank M. (2006): M1 receptors play a central role in modulating AD-like pathology in transgenic mice. In: *Neuron* 49 (5), S. 671–682. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.01.020.

Caccamo, Antonella; Fisher, Abraham; LaFerla, Frank M. (2009): M1 agonists as a potential disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. In: *Current Alzheimer research* 6 (2), S. 112–117.

Canals, Meritxell; Lane, J. Robert; Wen, Adriel; Scammells, Peter J.; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur (2012): A Monod-Wyman-Changeux mechanism can explain G protein-coupled receptor (GPCR) allosteric modulation. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (1), S. 650–659. DOI: 10.1074/jbc.M111.314278.

Carr, Richard; Schilling, Justin; Song, Jianliang; Carter, Rhonda L.; Du, Yang; Yoo, Sungsoo M. et al. (2016):  $\beta$ -arrestin-biased signaling through the  $\beta_2$ -adrenergic receptor promotes cardiomyocyte contraction. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (28), S. E4107-16. DOI: 10.1073/pnas.1606267113.

Caulfield, M. P. (1993): Muscarinic receptors--characterization, coupling and function. In: *Pharmacology & therapeutics* 58 (3), S. 319–379.

Caulfield, M. P.; Birdsall, N. J. (1998): International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Pharmacological reviews* 50 (2), S. 279–290.

Chan, W. Y.; McKinzie, D. L.; Bose, S.; Mitchell, S. N.; Witkin, J. M.; Thompson, R. C. et al. (2008): Allosteric modulation of the muscarinic M4 receptor as an approach to treating schizophrenia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (31), S. 10978–10983. DOI: 10.1073/pnas.0800567105.

Charfi, I.; Audet, N.; Bagheri Tudashki, H.; Pineyro, G. (2015): Identifying ligand-specific signalling within biased responses: focus on delta opioid receptor ligands. In: *British journal of pharmacology* 172 (2), S. 435–448. DOI: 10.1111/bph.12705.

Chen, Xinyu; Klockner, Jessika; Holze, Janine; Zimmermann, Cornelia; Seemann, Wiebke K.; Schrage, Ramona et al. (2015): Rational design of partial agonists for the muscarinic m1 acetylcholine receptor. In: *Journal of medicinal chemistry* 58 (2), S. 560–576. DOI: 10.1021/jm500860w.

- Cheng, Y.; Prusoff, W. H. (1973): Relationship between the inhibition constant (K<sub>1</sub>) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I<sub>50</sub>) of an enzymatic reaction. In: *Biochemical pharmacology* 22 (23), S. 3099–3108.
- Cherezov, Vadim; Rosenbaum, Daniel M.; Hanson, Michael A.; Rasmussen, Søren G. F.; Thian, Foon Sun; Kobilka, Tong Sun et al. (2007): High-resolution crystal structure of an engineered human beta<sub>2</sub>-adrenergic G protein-coupled receptor. In: *Science (New York, N.Y.)* 318 (5854), S. 1258–1265. DOI: 10.1126/science.1150577.
- Chisari, Mariangela; Saini, Deepak Kumar; Cho, Joon-Ho; Kalyanaraman, Vani; Gautam, N. (2009): G protein subunit dissociation and translocation regulate cellular response to receptor stimulation. In: *PLoS one* 4 (11), S. e7797. DOI: 10.1371/journal.pone.0007797.
- Christopoulos, A.; Mitchelson, F. (1997): Application of an allosteric ternary complex model to the technique of pharmacological resultant analysis. In: *The Journal of pharmacy and pharmacology* 49 (8), S. 781–786.
- Christopoulos, Arthur; Lanzafame, Alfred; Mitchelson, Fred (1998): ALLOSTERIC INTERACTIONS AT MUSCARINIC CHOLINOCEPTORS. In: *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 25 (3-4), S. 185–194. DOI: 10.1111/j.1440-1681.1998.t01-4-.x.
- Christopoulos, Arthur (2002): Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. In: *Nature reviews. Drug discovery* 1 (3), S. 198–210. DOI: 10.1038/nrd746.
- Christopoulos, Arthur; Kenakin, Terry (2002): G protein-coupled receptor allosterism and complexing. In: *Pharmacological reviews* 54 (2), S. 323–374.
- Christopoulos, A.; May, L. T.; Avlani, V. A.; Sexton, P. M. (2004): G-protein-coupled receptor allosterism: the promise and the problem(s). In: *Biochemical Society transactions* 32 (Pt 5), S. 873–877. DOI: 10.1042/BST0320873.
- Chun, P. W.; Kim, J. D.; Lee, C. W.; Shireman, R. B.; Cantarini, W. F. (1984): Up- and down-regulation of insulin receptors. Kinetic models. In: *Journal of Biological Chemistry* 259 (4), S. 2161–2165.
- Chung, Ka Young; Rasmussen, Søren G. F.; Liu, Tong; Li, Sheng; DeVree, Brian T.; Chae, Pil Seok et al. (2011): Conformational changes in the G protein G<sub>s</sub> induced by the β<sub>2</sub> adrenergic receptor. In: *Nature* 477 (7366), S. 611–615. DOI: 10.1038/nature10488.
- Clackson, T.; Wells, J. A. (1995): A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. In: *Science (New York, N.Y.)* 267 (5196), S. 383–386.
- Clapham, D. E.; Neer, E. J. (1993): New roles for G-protein beta gamma-dimers in transmembrane signalling. In: *Nature* 365 (6445), S. 403–406. DOI: 10.1038/365403a0.

- Clark, A. L.; Mitchelson, F. (1976): The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. In: *British journal of pharmacology* 58 (3), S. 323–331.
- Clark, R. B.; Knoll, B. J.; Barber, R. (1999): Partial agonists and G protein-coupled receptor desensitization. In: *Trends in pharmacological sciences* 20 (7), S. 279–286.
- Conn, P. Jeffrey; Jones, Carrie K.; Lindsley, Craig W. (2009): Subtype-selective allosteric modulators of muscarinic receptors for the treatment of CNS disorders. In: *Trends in pharmacological sciences* 30 (3), S. 148–155. DOI: 10.1016/j.tips.2008.12.002.
- Cooper, D. M.; Mons, N.; Karpen, J. W. (1995): Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. In: *Nature* 374 (6521), S. 421–424. DOI: 10.1038/374421a0.
- Costa, T.; Herz, A. (1989): Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (19), S. 7321–7325.
- Costanzi, Stefano (2012): Homology modeling of class a G protein-coupled receptors. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 857, S. 259–279. DOI: 10.1007/978-1-61779-588-6\_11.
- Cummings, Jeffrey L. (2000): The role of cholinergic agents in the management of behavioural disturbances in Alzheimer's disease. In: *The international journal of neuropsychopharmacology* 3 (7), S. 21–29. DOI: 10.1017/S1461145700001917.
- Dallanoce, C.; Conti, P.; Amici, M. de; Micheli, C. de; Barocelli, E.; Chiavarini, M. et al. (1999): Synthesis and functional characterization of novel derivatives related to oxotremorine and oxotremorine-M. In: *Bioorganic & medicinal chemistry* 7 (8), S. 1539–1547.
- Dasari, Sameera; Gullledge, Allan T. (2011): M1 and M4 receptors modulate hippocampal pyramidal neurons. In: *Journal of neurophysiology* 105 (2), S. 779–792. DOI: 10.1152/jn.00686.2010.
- Davey, Anna E.; Leach, Katie; Valant, Celine; Conigrave, Arthur D.; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur (2012): Positive and negative allosteric modulators promote biased signaling at the calcium-sensing receptor. In: *Endocrinology* 153 (3), S. 1232–1241. DOI: 10.1210/en.2011-1426.
- Davis, Albert A.; Fritz, Jason J.; Wess, Jürgen; Lah, James J.; Levey, Allan I. (2010): Deletion of M1 muscarinic acetylcholine receptors increases amyloid pathology in vitro and in vivo. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (12), S. 4190–4196. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6393-09.2010.
- Dean, Brian (2004): M1 receptor agonism, a possible treatment for cognitive deficits in schizophrenia. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 29 (8), S. 1583-4; author reply 1585-6. DOI: 10.1038/sj.npp.1300508.

- DeBlasi, A.; O'Reilly, K.; Motulsky, H. J. (1989): Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. In: *Trends in pharmacological sciences* 10 (6), S. 227–229.
- Dencker, Ditte; Weikop, Pia; Sørensen, Gunnar; Woldbye, David P. D.; Wörtwein, Gitta; Wess, Jürgen; Fink-Jensen, Anders (2012): An allosteric enhancer of M<sub>2</sub> muscarinic acetylcholine receptor function inhibits behavioral and neurochemical effects of cocaine. In: *Psychopharmacology* 224 (2), S. 277–287. DOI: 10.1007/s00213-012-2751-8.
- Deupi, Xavier; Kobilka, Brian K. (2010): Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function. In: *Physiology (Bethesda, Md.)* 25 (5), S. 293–303. DOI: 10.1152/physiol.00002.2010.
- Disingrini, Teresa; Muth, Mathias; Dallanoce, Clelia; Barocelli, Elisabetta; Bertoni, Simona; Kellershohn, Kerstin et al. (2006): Design, synthesis, and action of oxotremorine-related hybrid-type allosteric modulators of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Journal of medicinal chemistry* 49 (1), S. 366–372. DOI: 10.1021/jm050769s.
- Dittman, Andrew H.; Weber, Jed P.; Hinds, Thomas R.; Choi, Eui Ju; Migeon, Jacques C.; Nathanson, Neil M.; Storm, Daniel R. (1994): A Novel Mechanism for Coupling of m<sub>4</sub> Muscarinic Acetylcholine Receptors to Calmodulin-Sensitive Adenylyl Cyclases: Crossover from G Protein-Coupled Inhibition to Stimulation. In: *Biochemistry* 33 (4), S. 943–951. DOI: 10.1021/bi00170a013.
- Donato, Martín; Gelpi, Ricardo J. (2003): Adenosine and cardioprotection during reperfusion--an overview. In: *Molecular and cellular biochemistry* 251 (1-2), S. 153–159.
- Dror, Ron O.; Green, Hillary F.; Valant, Celine; Borhani, David W.; Valcourt, James R.; Pan, Albert C. et al. (2013): Structural basis for modulation of a G-protein-coupled receptor by allosteric drugs. In: *Nature* 503 (7475), S. 295–299. DOI: 10.1038/nature12595.
- Eckstein Niels (2004): Pharmakologische und biochemische Untersuchungen zur allosterischen Modulation Agonist-induzierter Wirkungen an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren. Dissertationsschrift. Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn, Bonn. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät.
- Eglen, R. M. (2006): Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. In: *Autonomic & autacoid pharmacology* 26 (3), S. 219–233. DOI: 10.1111/j.1474-8673.2006.00368.x.
- Eglen, Richard M. (2005): Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. In: *Progress in medicinal chemistry* 43, S. 105–136. DOI: 10.1016/S0079-6468(05)43004-0.
- Ehlert, F. J. (1988): Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. In: *Molecular pharmacology* 33 (2), S. 187–194.

- Ehlert, Frederick J. (2005): Analysis of allosterism in functional assays. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 315 (2), S. 740–754. DOI: 10.1124/jpet.105.090886.
- Ehlert, Frederick J. (2008): On the analysis of ligand-directed signaling at G protein-coupled receptors. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 377 (4-6), S. 549–577. DOI: 10.1007/s00210-008-0260-4.
- Ellis, J.; Huyler, J.; Brann, M. R. (1991): Allosteric regulation of cloned m1-m5 muscarinic receptor subtypes. In: *Biochemical pharmacology* 42 (10), S. 1927–1932.
- Ellis, J.; Seidenberg, M. (1992): Two allosteric modulators interact at a common site on cardiac muscarinic receptors. In: *Molecular pharmacology* 42 (4), S. 638–641.
- Ellis, John (1997): Allosteric binding sites on muscarinic receptors. In: *Drug Development Research* 40 (2), S. 193–204. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2299(199702)40:2<193::AID-DDR9>3.0.CO;2-G.
- Espinoza-Fonseca, L. Michel; Trujillo-Ferrara, José G. (2005): Identification of multiple allosteric sites on the M1 muscarinic acetylcholine receptor. In: *FEBS letters* 579 (30), S. 6726–6732. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.10.069.
- Espinoza-Fonseca, L. Michel; Trujillo-Ferrara, José G. (2006): The existence of a second allosteric site on the M1 muscarinic acetylcholine receptor and its implications for drug design. In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 16 (5), S. 1217–1220. DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.11.097.
- Evans, Bronwyn A.; Broxton, Natalie; Merlin, Jon; Sato, Masaaki; Hutchinson, Dana S.; Christopoulos, Arthur; Summers, Roger J. (2011): Quantification of functional selectivity at the human alpha(1A)-adrenoceptor. In: *Molecular pharmacology* 79 (2), S. 298–307. DOI: 10.1124/mol.110.067454.
- Evans, Bronwyn A.; Sato, Masaaki; Sarwar, Mohsin; Hutchinson, Dana S.; Summers, Roger J. (2010): Ligand-directed signalling at beta-adrenoceptors. In: *British journal of pharmacology* 159 (5), S. 1022–1038. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00602.x.
- Fang, Ye; Ferrie, Ann M.; Fontaine, Norman H.; Mauro, John; Balakrishnan, Jitendra (2006): Resonant waveguide grating biosensor for living cell sensing. In: *Biophysical journal* 91 (5), S. 1925–1940. DOI: 10.1529/biophysj.105.077818.
- Fang, Ye; Li, Guangshan; Ferrie, Ann M. (2007): Non-invasive optical biosensor for assaying endogenous G protein-coupled receptors in adherent cells. In: *Journal of pharmacological and toxicological methods* 55 (3), S. 314–322. DOI: 10.1016/j.vascn.2006.11.001.
- Feigenbaum, P.; El-Fakahany, E. E. (1985): Regulation of muscarinic cholinergic receptor density in neuroblastoma cells by brief exposure to agonist: possible involvement in desensitization of receptor function. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 233 (1), S. 134–140.

- Felder, C. C. (1995): Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (8), S. 619–625.
- Felder, C. C.; Bymaster, F. P.; Ward, J.; DeLapp, N. (2000): Therapeutic opportunities for muscarinic receptors in the central nervous system. In: *Journal of medicinal chemistry* 43 (23), S. 4333–4353.
- Felder, C. C.; Porter, A. C.; Skillman, T. L.; Zhang, L.; Bymaster, F. P.; Nathanson, N. M. et al. (2001): Elucidating the role of muscarinic receptors in psychosis. In: *Life sciences* 68 (22-23), S. 2605–2613.
- Ferré, Sergi; Casadó, Vicent; Devi, Lakshmi A.; Filizola, Marta; Jockers, Ralf; Lohse, Martin J. et al. (2014): G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. In: *Pharmacological reviews* 66 (2), S. 413–434. DOI: 10.1124/pr.113.008052.
- Feuerstein, T. J.; Lehmann, J.; Sauermaun, W.; van Velthoven, V.; Jackisch, R. (1992): The autoinhibitory feedback control of acetylcholine release in human neocortex tissue. In: *Brain research* 572 (1-2), S. 64–71.
- Figuroa, Katherine W.; Griffin, Michael T.; Ehlert, Frederick J. (2009): Selectivity of agonists for the active state of M1 to M4 muscarinic receptor subtypes. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 328 (1), S. 331–342. DOI: 10.1124/jpet.108.145219.
- Fisher, Abraham; Brandeis, Rachel; Bar-Ner, Rachel Haring Nira; Kliger-Spatz, Michal; Natan, Niva; Sonogo, Hagar et al. (2002): AF150(S) and AF267B: M1 muscarinic agonists as innovative therapies for Alzheimer's disease. In: *Journal of molecular neuroscience : MN* 19 (1-2), S. 145–153. DOI: 10.1007/s12031-002-0025-3.
- Fisher, Abraham (2012): Cholinergic modulation of amyloid precursor protein processing with emphasis on M1 muscarinic receptor: perspectives and challenges in treatment of Alzheimer's disease. In: *Journal of neurochemistry* 120 Suppl 1, S. 22–33. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2011.07507.x.
- Fredriksson, Robert; Lagerström, Malin C.; Lundin, Lars-Gustav; Schiöth, Helgi B. (2003): The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. In: *Molecular pharmacology* 63 (6), S. 1256–1272. DOI: 10.1124/mol.63.6.1256.
- Frey, Alexander J.; Ibrahim, Salam; Gleim, Scott; Hwa, John; Smyth, Emer M. (2013): Biased suppression of TP homodimerization and signaling through disruption of a TM GxxxGxxxL helical interaction motif. In: *Journal of lipid research* 54 (6), S. 1678–1690. DOI: 10.1194/jlr.M036673.
- Furlong, R.; Brogden, R. N. (1988): Xamoterol. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use. In: *Drugs* 36 (4), S. 455–474.

Galandrin, Ségolène; Bouvier, Michel (2006): Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy. In: *Molecular pharmacology* 70 (5), S. 1575–1584. DOI: 10.1124/mol.106.026716.

Galandrin, Ségolène; Oligny-Longpré, Geneviève; Bonin, Hélène; Ogawa, Koji; Galés, Céline; Bouvier, Michel (2008): Conformational rearrangements and signaling cascades involved in ligand-biased mitogen-activated protein kinase signaling through the beta1-adrenergic receptor. In: *Molecular pharmacology* 74 (1), S. 162–172. DOI: 10.1124/mol.107.043893.

Galés, Céline; Rebois, R. Victor; Hogue, Mireille; Trieu, Phan; Breit, Andreas; Hébert, Terence E.; Bouvier, Michel (2005): Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. In: *Nature methods* 2 (3), S. 177–184. DOI: 10.1038/nmeth743.

Galper, J. B.; Haigh, L. S.; Hart, A. C.; O'Hara, D. S.; Livingston, D. J. (1987): Muscarinic cholinergic receptors in the embryonic chick heart: interaction of agonist, receptor, and guanine nucleotides studied by an improved assay for direct binding of the muscarinic agonist 3Hcismethyldioxolane. In: *Molecular pharmacology* 32 (1), S. 230–240.

Gao, Zhan-Guo; Ye, Kai; Göblyös, Anikó; Ijzerman, Adriaan P.; Jacobson, Kenneth A. (2008): Flexible modulation of agonist efficacy at the human A3 adenosine receptor by the imidazoquinoline allosteric enhancer LUF6000. In: *BMC pharmacology* 8, S. 20. DOI: 10.1186/1471-2210-8-20.

Gao, Zhan-Guo; Verzijl, Dennis; Zweemer, Annelien; Ye, Kai; Göblyös, Anikó; Ijzerman, Adriaan P.; Jacobson, Kenneth A. (2011): Functionally biased modulation of A(3) adenosine receptor agonist efficacy and potency by imidazoquinolinamine allosteric enhancers. In: *Biochemical pharmacology* 82 (6), S. 658–668. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.06.017.

Gao, Zhan-Guo; Jacobson, Kenneth A. (2013): Allosteric modulation and functional selectivity of G protein-coupled receptors. In: *Drug discovery today. Technologies* 10 (2), S. e237-43. DOI: 10.1016/j.ddtec.2012.08.004.

Gerber, D. J.; Sotnikova, T. D.; Gainetdinov, R. R.; Huang, S. Y.; Caron, M. G.; Tonegawa, S. (2001): Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (26), S. 15312–15317. DOI: 10.1073/pnas.261583798.

Gether, U. (2000): Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. In: *Endocrine reviews* 21 (1), S. 90–113. DOI: 10.1210/edrv.21.1.0390.

Gilman, A. G. (1987): G proteins: transducers of receptor-generated signals. In: *Annual review of biochemistry* 56, S. 615–649. DOI: 10.1146/annurev.bi.56.070187.003151.



- Gnagey, A.; Ellis, J. (1996): Allosteric regulation of the binding of 3Hacetylcholine to m2 muscarinic receptors. In: *Biochemical pharmacology* 52 (11), S. 1767–1775.
- Goodwin, J. Alex; Hulme, Edward C.; Langmead, Christopher J.; Tehan, Ben G. (2007): Roof and floor of the muscarinic binding pocket: variations in the binding modes of orthosteric ligands. In: *Molecular pharmacology* 72 (6), S. 1484–1496. DOI: 10.1124/mol.107.038265.
- Greenlee, W.; Clader, J.; Asberom, T.; McCombie, S.; Ford, J.; Guzik, H. et al. (2001): Muscarinic agonists and antagonists in the treatment of Alzheimer's disease. In: *Farmaco (Societa chimica italiana : 1989)* 56 (4), S. 247–250.
- Gregory, Karen J.; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur (2007): Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Current neuropharmacology* 5 (3), S. 157–167. DOI: 10.2174/157015907781695946.
- Gregory, Karen J.; Hall, Nathan E.; Tobin, Andrew B.; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur (2010): Identification of orthosteric and allosteric site mutations in M2 muscarinic acetylcholine receptors that contribute to ligand-selective signaling bias. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (10), S. 7459–7474. DOI: 10.1074/jbc.M109.094011.
- Gregory, Karen J.; Sexton, Patrick M.; Tobin, Andrew B.; Christopoulos, Arthur (2012): Stimulus bias provides evidence for conformational constraints in the structure of a G protein-coupled receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (44), S. 37066–37077. DOI: 10.1074/jbc.M112.408534.
- Griffin, Michael T.; Figueroa, Katherine W.; Liller, Sarah; Ehlert, Frederick J. (2007): Estimation of agonist activity at G protein-coupled receptors: analysis of M2 muscarinic receptor signaling through Gi/o, Gs, and G15. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 321 (3), S. 1193–1207. DOI: 10.1124/jpet.107.120857.
- Grossmuller, Maren; Antony, Johannes; Trankle, Christian; Holzgrabe, Ulrike; Mohr, Klaus (2006): Allosteric site in M2 acetylcholine receptors: evidence for a major conformational change upon binding of an orthosteric agonist instead of an antagonist. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 372 (4), S. 267–276. DOI: 10.1007/s00210-005-0023-4.
- Guitart, Xavier; Navarro, Gemma; Moreno, Estefania; Yano, Hideaki; Cai, Ning-Sheng; Sánchez-Soto, Marta et al. (2014): Functional selectivity of allosteric interactions within G protein-coupled receptor oligomers: the dopamine D1-D3 receptor heterotetramer. In: *Molecular pharmacology* 86 (4), S. 417–429. DOI: 10.1124/mol.114.093096.
- Gulledge, Allan T.; Bucci, David J.; Zhang, Sunny S.; Matsui, Minoru; Yeh, Hermes H. (2009): M1 receptors mediate cholinergic modulation of excitability in neocortical pyramidal neurons. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (31), S. 9888–9902. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1366-09.2009.

- Gurevich, Vsevolod V.; Gurevich, Eugenia V. (2003): The new face of active receptor bound arrestin attracts new partners. In: *Structure (London, England : 1993)* 11 (9), S. 1037–1042.
- Haga, Kazuko; Kruse, Andrew C.; Asada, Hidetsugu; Yurugi-Kobayashi, Takami; Shiroishi, Mitsunori; Zhang, Cheng et al. (2012): Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. In: *Nature* 482 (7386), S. 547–551. DOI: 10.1038/nature10753.
- Hall, D. A. (2000): Modeling the functional effects of allosteric modulators at pharmacological receptors: an extension of the two-state model of receptor activation. In: *Molecular pharmacology* 58 (6), S. 1412–1423.
- Hamilton, S. E.; Loose, M. D.; Qi, M.; Levey, A. I.; Hille, B.; McKnight, G. S. et al. (1997): Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (24), S. 13311–13316.
- Hamilton, S. E.; Nathanson, N. M. (2001): The M1 receptor is required for muscarinic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase in murine cerebral cortical neurons. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (19), S. 15850–15853. DOI: 10.1074/jbc.M011563200.
- Hamm, H. E. (1998): The many faces of G protein signaling. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (2), S. 669–672.
- Hanania, Nicola A.; Sharafkhaneh, Amir; Barber, Roger; Dickey, Burton F. (2002): Beta-agonist intrinsic efficacy: measurement and clinical significance. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 165 (10), S. 1353–1358. DOI: 10.1164/rccm.2109060.
- Hansen, Richard A.; Gartlehner, Gerald; Webb, Aaron P.; Morgan, Laura C.; Moore, Charity G.; Jonas, Daniel E. (2008): Efficacy and safety of donepezil, galantamine, and rivastigmine for the treatment of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. In: *Clinical interventions in aging* 3 (2), S. 211–225.
- Hasselmo, Michael E. (2006): The role of acetylcholine in learning and memory. In: *Current opinion in neurobiology* 16 (6), S. 710–715. DOI: 10.1016/j.conb.2006.09.002.
- Hein, Peter; Frank, Monika; Hoffmann, Carsten; Lohse, Martin J.; Bünemann, Moritz (2005): Dynamics of receptor/G protein coupling in living cells. In: *The EMBO journal* 24 (23), S. 4106–4114. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600870.
- Hepler, J. R.; Gilman, A. G. (1992): G proteins. In: *Trends in biochemical sciences* 17 (10), S. 383–387.
- Hern, Jonathan A.; Baig, Asma H.; Mashanov, Gregory I.; Birdsall, Berry; Corrie, John E. T.; Lazareno, Sebastian et al. (2010): Formation and dissociation of M1 muscarinic receptor dimers seen by total internal reflection fluorescence imaging of single molecules. In: *Proceedings of the National*

*Academy of Sciences of the United States of America* 107 (6), S. 2693–2698. DOI: 10.1073/pnas.0907915107.

Hilf, G.; Gierschik, P.; Jakobs, K. H. (1989): Muscarinic acetylcholine receptor-stimulated binding of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) to guanine-nucleotide-binding proteins in cardiac membranes. In: *European journal of biochemistry* 186 (3), S. 725–731.

Hill, Stephen J. (2006): G-protein-coupled receptors: past, present and future. In: *British journal of pharmacology* 147 Suppl 1, S. S27-37. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706455.

Hill A.V. (1910): The possible effects of the aggregation of the molecules of hæmoglobin on its dissociation curves. In: *Journal of physiologie* 40, S. i--vii.

Holze, Janine (2013): Charakterisierung der Signalwegaktivierung durch Hybridliganden aus dem orthosterischen Agonisten Iperoxo und potenziell allosterischen PAM-Strukturen in hM1-CHO-Zellen. Masterarbeit. Rheinische Friedrich Willhelms-Universität, Bonn. Pharmakologie.

Holze J; Klöckner J; Holzgrabe U; Decker M; Mohr K; Traenkle C (2016): Differential modulation by allosteric receptor epitopes of dualsteric ligand binding and signaling at human muscarinic M1 acetylcholine receptors. Posterpräsentation. Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG). München, 2016.

Hoyer, D.; Clarke, D. E.; Fozard, J. R.; Hartig, P. R.; Martin, G. R.; Mylecharane, E. J. et al. (1994): International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). In: *Pharmacological reviews* 46 (2), S. 157–203.

Huang, Jianyun; Chen, Shuai; Zhang, J. Jillian; Huang, Xin-Yun (2013): Crystal structure of oligomeric 1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. In: *Nature structural & molecular biology* 20 (4), S. 419–425. DOI: 10.1038/nsmb.2504.

Huang, Weijiao; Manglik, Aashish; Venkatakrisnan, A. J.; Laeremans, Toon; Feinberg, Evan N.; Sanborn, Adrian L. et al. (2015): Structural insights into  $\mu$ -opioid receptor activation. In: *Nature* 524 (7565), S. 315–321. DOI: 10.1038/nature14886.

Hulme, E. C. (1990): Muscarinic acetylcholine receptors: typical G-coupled receptors. In: *Symposia of the Society for Experimental Biology* 44, S. 39–54.

Hulme, E. C.; Lu, Z. L. (1998): Scanning mutagenesis of transmembrane domain 3 of the M1 muscarinic acetylcholine receptor. In: *Journal of physiology, Paris* 92 (3-4), S. 269–274.

Hulme, E. C.; Lu, Z. L.; Bee, M. S. (2003): Scanning mutagenesis studies of the M1 muscarinic acetylcholine receptor. In: *Receptors & channels* 9 (4), S. 215–228.

Hulme und Birdsall (1992): Strategy and tactics in receptor-binding studies. IN: Hulme EC, editor. Receptor-Ligand Interactions - A Practical Approach. In: *Oxford: IRL Press*, S. 63–176.

- Ikäheimo, M. J.; Takkunen, J. T. (1984): The effects of beta 1-adrenoceptor partial agonist ICI 118.587 on left ventricular function in patients with coronary heart disease. In: *International journal of cardiology* 5 (3), S. 339–349.
- Insel, P. A.; Snead, A.; Murray, F.; Zhang, L.; Yokouchi, H.; Katakia, T. et al. (2012): GPCR expression in tissues and cells: are the optimal receptors being used as drug targets? In: *British journal of pharmacology* 165 (6), S. 1613–1616. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01434.x.
- Jaakola, Veli-Pekka; Griffith, Mark T.; Hanson, Michael A.; Cherezov, Vadim; Chien, Ellen Y. T.; Lane, J. Robert et al. (2008): The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist. In: *Science (New York, N.Y.)* 322 (5905), S. 1211–1217. DOI: 10.1126/science.1164772.
- Jacobson, Marlene A.; Kretsoulas, Constantine; Pascarella, Danette M.; O'Brien, Julie A.; Sur, Cyrille (2010): The M1 muscarinic receptor allosteric agonists AC-42 and 1-1'-(2-methylbenzyl)-1,4'-bipiperidin-4-yl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-one bind to a unique site distinct from the acetylcholine orthosteric site. In: *Molecular pharmacology* 78 (4), S. 648–657. DOI: 10.1124/mol.110.065771.
- Jacoby, Edgar; Bouhelal, Rochdi; Gerspacher, Marc; Seuwen, Klaus (2006): The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. In: *ChemMedChem* 1 (8), S. 761–782. DOI: 10.1002/cmdc.200600134.
- Jager, Dorothea; Schmalenbach, Caroline; Prilla, Stefanie; Schrobang, Jasmin; Kebig, Anna; Sennwitz, Matthias et al. (2007): Allosteric small molecules unveil a role of an extracellular E2/transmembrane helix 7 junction for G protein-coupled receptor activation. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (48), S. 34968–34976. DOI: 10.1074/jbc.M705563200.
- Jakubik, J.; Tucek, S. (1994): Protection by alcuronium of muscarinic receptors against chemical inactivation and location of the allosteric binding site for alcuronium. In: *Journal of neurochemistry* 63 (5), S. 1932–1940.
- January, B.; Seibold, A.; Whaley, B.; Hipkin, R. W.; Lin, D.; Schonbrunn, A. et al. (1997): beta2-adrenergic receptor desensitization, internalization, and phosphorylation in response to full and partial agonists. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (38), S. 23871–23879.
- January, B.; Seibold, A.; Allal, C.; Whaley, B. S.; Knoll, B. J.; Moore, R. H. et al. (1998): Salmeterol-induced desensitization, internalization and phosphorylation of the human beta2-adrenoceptor. In: *British journal of pharmacology* 123 (4), S. 701–711. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701658.
- Jarpe, M. B.; Knall, C.; Mitchell, F. M.; Buhl, A. M.; Duzic, E.; Johnson, G. L. (1998): D-Arg1,D-Phe5,D-Trp7,9,Leu11 Substance P acts as a biased agonist toward neuropeptide and chemokine receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (5), S. 3097–3104.

- Javitch, J. A.; Fu, D.; Chen, J.; Karlin, A. (1995): Mapping the binding-site crevice of the dopamine D2 receptor by the substituted-cysteine accessibility method. In: *Neuron* 14 (4), S. 825–831.
- Jennings, G.; Bobik, A.; Oddie, C.; Restall, R. (1984): Cardioselectivity, kinetics, hemodynamics, and metabolic effects of xamoterol. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 35 (5), S. 594–603.
- Jepsen, K.; Lullmann, H.; Mohr, K.; Pfeffer, J. (1988): Allosteric stabilization of 3H-N-methylscopolamine binding in guinea-pig myocardium by an antidote against organophosphate intoxication. In: *Pharmacology & toxicology* 63 (3), S. 163–168.
- Johnson, M. (1998): The beta-adrenoceptor. In: *American journal of respiratory and critical care medicine* 158 (5 Pt 3), S. S146-53. DOI: 10.1164/ajrccm.158.supplement\_2.13tac110.
- Jones, C. K.; Brady, A. E.; Bubser, M.; Deutch, A. Y.; Williams, L. C. (2006): TBPB is a highly selective M1 allosteric muscarinic receptor agonist in vitro and produces robust antipsychotic-like effects in vivo. In: *Neuropsychopharmacology* 31, S. 116.
- Jones, Carrie K.; Brady, Ashley E.; Davis, Albert A.; Xiang, Zixiu; Bubser, Michael; Tantawy, Mohammed Noor et al. (2008): Novel selective allosteric activator of the M1 muscarinic acetylcholine receptor regulates amyloid processing and produces antipsychotic-like activity in rats. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (41), S. 10422–10433. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1850-08.2008.
- Jones, Christopher; Hacker, David; Cormac, Irene; Meaden, Alan; Irving, Claire B. (2012): Cognitive behaviour therapy versus other psychosocial treatments for schizophrenia. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (4), S. CD008712. DOI: 10.1002/14651858.CD008712.pub2.
- Jones, S. V. (1993): Muscarinic receptor subtypes: modulation of ion channels. In: *Life sciences* 52 (5-6), S. 457–464.
- Kahsai, Alem W.; Xiao, Kunhong; Rajagopal, Sudarshan; Ahn, Seungki; Shukla, Arun K.; Sun, Jinpeng et al. (2011): Multiple ligand-specific conformations of the  $\beta_2$ -adrenergic receptor. In: *Nature chemical biology* 7 (10), S. 692–700. DOI: 10.1038/nchembio.634.
- Kang, Yanyong; Zhou, X. Edward; Gao, Xiang; He, Yuanzheng; Liu, Wei; Ishchenko, Andrii et al. (2015): Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. In: *Nature* 523 (7562), S. 561–567. DOI: 10.1038/nature14656.
- Katritch, Vsevolod; Cherezov, Vadim; Stevens, Raymond C. (2013): Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 53, S. 531–556. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-032112-135923.
- Kebig, A.; Mohr, K. (2008): Cinacalcet - ein allosterischer Verstärker am Ca<sup>2+</sup>-Rezeptor. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 133 (33), S. 1681–1683. DOI: 10.1055/s-0028-1082785.

- Kebig, Anna Elisabeth (2010): Signalwegsaktivierung an muskarinischen M2-Rezeptoren. Einfluss der allosterischen Bindungsstelle.
- Kenakin, T. P.; Morgan, P. H. (1989): Theoretical effects of single and multiple transducer receptor coupling proteins on estimates of the relative potency of agonists. In: *Molecular pharmacology* 35 (2), S. 214–222.
- Kenakin, T. (1994): On the definition of efficacy. In: *Trends in pharmacological sciences* 15 (11), S. 408–409.
- Kenakin, T. (1995): Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. In: *Trends in pharmacological sciences* 16 (7), S. 232–238.
- Kenakin, T. (1997): Differences between natural and recombinant G protein-coupled receptor systems with varying receptor/G protein stoichiometry. In: *Trends in pharmacological sciences* 18 (12), S. 456–464.
- Kenakin, Terry (2005): New concepts in drug discovery: collateral efficacy and permissive antagonism. In: *Nature reviews. Drug discovery* 4 (11), S. 919–927. DOI: 10.1038/nrd1875.
- Kenakin, Terry (2007): Allosteric agonist modulators. In: *Journal of receptor and signal transduction research* 27 (4), S. 247–259. DOI: 10.1080/10799890701509000.
- Kenakin, Terry (2011): Functional selectivity and biased receptor signaling. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 336 (2), S. 296–302. DOI: 10.1124/jpet.110.173948.
- Kenakin, Terry (2012a): The potential for selective pharmacological therapies through biased receptor signaling. In: *BMC pharmacology & toxicology* 13, S. 3. DOI: 10.1186/2050-6511-13-3.
- Kenakin, Terry (2013): New concepts in pharmacological efficacy at 7TM receptors: IUPHAR review 2. In: *British journal of pharmacology* 168 (3), S. 554–575. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02223.x.
- Kenakin, Terry (2015): The Effective Application of Biased Signaling to New Drug Discovery. In: *Molecular pharmacology* 88 (6), S. 1055–1061. DOI: 10.1124/mol.115.099770.
- Kenakin, Terry; Christopoulos, Arthur (2013a): Measurements of ligand bias and functional affinity. In: *Nature reviews. Drug discovery* 12 (6), S. 483. DOI: 10.1038/nrd3954-c2.
- Kenakin, Terry; Christopoulos, Arthur (2013b): Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. In: *Nature reviews. Drug discovery* 12 (3), S. 205–216. DOI: 10.1038/nrd3954.
- Kenakin, Terry; Miller, Laurence J. (2010): Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. In: *Pharmacological reviews* 62 (2), S. 265–304. DOI: 10.1124/pr.108.000992.

- Kenakin, Terry P. (2012b): Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery. In: *British journal of pharmacology* 165 (6), S. 1659–1669. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01749.x.
- Keov, Peter; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur (2011): Allosteric modulation of G protein-coupled receptors: a pharmacological perspective. In: *Neuropharmacology* 60 (1), S. 24–35. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2010.07.010.
- Keov, Peter; Valant, Celine; Devine, Shane M.; Lane, J. Robert; Scammells, Peter J.; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur (2013): Reverse engineering of the selective agonist TBPB unveils both orthosteric and allosteric modes of action at the M<sub>1</sub> muscarinic acetylcholine receptor. In: *Molecular pharmacology* 84 (3), S. 425–437. DOI: 10.1124/mol.113.087320.
- Keov, Peter; Lopez, Laura; Devine, Shane M.; Valant, Celine; Lane, J. Robert; Scammells, Peter J. et al. (2014): Molecular mechanisms of bitopic ligand engagement with the M<sub>1</sub> muscarinic acetylcholine receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (34), S. 23817–23837. DOI: 10.1074/jbc.M114.582874.
- Kilts, Jason D.; Connery, Hilary S.; Arrington, Elaine G.; Lewis, Mechelle M.; Lawler, Cindy P.; Oxford, Gerry S. et al. (2002): Functional selectivity of dopamine receptor agonists. II. Actions of dihydrexidine in D<sub>2</sub>L receptor-transfected MN9D cells and pituitary lactotrophs. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 301 (3), S. 1179–1189.
- Kinzer-Ursem, Tamara L.; Linderman, Jennifer J. (2007): Both ligand- and cell-specific parameters control ligand agonism in a kinetic model of g protein-coupled receptor signaling. In: *PLoS computational biology* 3 (1), S. e6. DOI: 10.1371/journal.pcbi.0030006.
- Kisselev, O. G.; Ermolaeva, M. V.; Gautam, N. (1994): A farnesylated domain in the G protein gamma subunit is a specific determinant of receptor coupling. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (34), S. 21399–21402.
- Koch-Brandt, C. (1993): *Gentransfer: Prinzipien, Experimente, Anwendung bei Säugern*. New York: Thieme Verlag Stuttgart.
- Kofuku, Yutaka; Ueda, Takumi; Okude, Junya; Shiraishi, Yutaro; Kondo, Keita; Maeda, Masahiro et al. (2012): Efficacy of the  $\alpha$ -adrenergic receptor is determined by conformational equilibrium in the transmembrane region. In: *Nature communications* 3, S. 1045. DOI: 10.1038/ncomms2046.
- Kostenis, E.; Mohr, K. (1996): Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation. In: *Trends in pharmacological sciences* 17 (8), S. 280–283.
- Krüger, Anna (2014): Signalwegaktivierung des muskarinischen M<sub>2</sub>-Rezeptors durch bispharmakophore Derivate von Iperoxo und Acetylcholin. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn, Bonn.

- Kruh, J. (1982): Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. In: *Molecular and cellular biochemistry* 42 (2), S. 65–82.
- Kruse, Andrew C.; Hu, Jianxin; Pan, Albert C.; Arlow, Daniel H.; Rosenbaum, Daniel M.; Rosemond, Erica et al. (2012): Structure and dynamics of the M3 muscarinic acetylcholine receptor. In: *Nature* 482 (7386), S. 552–556. DOI: 10.1038/nature10867.
- Kruse, Andrew C.; Li, Jianhua; Hu, Jianxin; Kobilka, Brian K.; Wess, Jürgen (2014): Novel insights into M3 muscarinic acetylcholine receptor physiology and structure. In: *Journal of molecular neuroscience* : MN 53 (3), S. 316–323. DOI: 10.1007/s12031-013-0127-0.
- Kruse, Andrew C.; Ring, Aaron M.; Manglik, Aashish; Hu, Jianxin; Hu, Kelly; Eitel, Katrin et al. (2013): Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor. In: *Nature* 504 (7478), S. 101–106. DOI: 10.1038/nature12735.
- Kubo, T.; Fukuda, K.; Mikami, A.; Maeda, A.; Takahashi, H.; Mishina, M. et al. (1986a): Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. In: *Nature* 323 (6087), S. 411–416. DOI: 10.1038/323411a0.
- Kubo, T.; Maeda, A.; Sugimoto, K.; Akiba, I.; Mikami, A.; Takahashi, H. et al. (1986b): Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. In: *FEBS letters* 209 (2), S. 367–372.
- Kudlacek, Oliver; Waldhoer, Maria; Kassack, Matthias U.; Nickel, Peter; Salmi, Jussi I.; Freissmuth, Michael; Nanoff, Christian (2002): Biased inhibition by a suramin analogue of A1-adenosine receptor/G protein coupling in fused receptor/G protein tandems: the A1-adenosine receptor is predominantly coupled to G $\alpha$  in human brain. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 365 (1), S. 8–16. DOI: 10.1007/s00210-001-0493-y.
- Labrecque, J.; Fargin, A.; Bouvier, M.; Chidiac, P.; Dennis, M. (1995): Serotonergic antagonists differentially inhibit spontaneous activity and decrease ligand binding capacity of the rat 5-hydroxytryptamine type 2C receptor in Sf9 cells. In: *Molecular pharmacology* 48 (1), S. 150–159.
- Lagerström, Malin C.; Schiöth, Helgi B. (2008): Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. In: *Nature reviews. Drug discovery* 7 (4), S. 339–357. DOI: 10.1038/nrd2518.
- Lane, J. Robert; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur (2013): Bridging the gap: bitopic ligands of G-protein-coupled receptors. In: *Trends in pharmacological sciences* 34 (1), S. 59–66. DOI: 10.1016/j.tips.2012.10.003.
- Langmead, Christopher J.; Christopoulos, Arthur (2013): Supra-physiological efficacy at GPCRs: superstition or super agonists? In: *British journal of pharmacology* 169 (2), S. 353–356. DOI: 10.1111/bph.12142.



- Langmead, Christopher J.; Fry, Victoria A. H.; Forbes, Ian T.; Branch, Clive L.; Christopoulos, Arthur; Wood, Martyn D.; Herdon, Hugh J. (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. In: *Molecular pharmacology* 69 (1), S. 236–246. DOI: 10.1124/mol.105.017814.
- Langmead, Christopher J.; Watson, Jeannette; Reavill, Charlie (2008): Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. In: *Pharmacology & therapeutics* 117 (2), S. 232–243. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2007.09.009.
- Lanzafame, A. A.; Christopoulos, A.; Mitchelson, F. (2003): Cellular signaling mechanisms for muscarinic acetylcholine receptors. In: *Receptors & channels* 9 (4), S. 241–260.
- Lawler, C. P.; Prioleau, C.; Lewis, M. M.; Mak, C.; Jiang, D.; Schetz, J. A. et al. (1999): Interactions of the novel antipsychotic aripiprazole (OPC-14597) with dopamine and serotonin receptor subtypes. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 20 (6), S. 612–627. DOI: 10.1016/S0893-133X(98)00099-2.
- Lazareno, S. (1999): Measurement of agonist-stimulated 35SGTP gamma S binding to cell membranes. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 106, S. 231–245.
- Lazareno, S.; Birdsall, N. J. (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. In: *Molecular pharmacology* 48 (2), S. 362–378.
- Lazareno, S.; Dolezal, V.; Popham, A.; Birdsall, N. J. M. (2004): Thiochrome enhances acetylcholine affinity at muscarinic M4 receptors: receptor subtype selectivity via cooperativity rather than affinity. In: *Molecular pharmacology* 65 (1), S. 257–266. DOI: 10.1124/mol.65.1.257.
- Lazareno, S.; Farries, T.; Birdsall, N. J. (1993): Pharmacological characterization of guanine nucleotide exchange reactions in membranes from CHO cells stably transfected with human muscarinic receptors m1-m4. In: *Life sciences* 52 (5-6), S. 449–456.
- Lazareno, S.; Popham, A.; Birdsall, N. J. (2000): Allosteric interactions of staurosporine and other indolocarbazoles with N-methyl-(3)Hscopolamine and acetylcholine at muscarinic receptor subtypes: identification of a second allosteric site. In: *Molecular pharmacology* 58 (1), S. 194–207.
- Lazareno, S.; Popham, A.; Birdsall, N. J. M. (2002): Analogs of WIN 62,577 define a second allosteric site on muscarinic receptors. In: *Molecular pharmacology* 62 (6), S. 1492–1505.
- Leach, Katie; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur (2007): Allosteric GPCR modulators: taking advantage of permissive receptor pharmacology. In: *Trends in pharmacological sciences* 28 (8), S. 382–389. DOI: 10.1016/j.tips.2007.06.004.

- Lean, A. de; Stadel, J. M.; Lefkowitz, R. J. (1980): A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 255 (15), S. 7108–7117.
- Lebois, Evan P.; Bridges, Thomas M.; Lewis, L. Michelle; Dawson, Eric S.; Kane, Alexander S.; Xiang, Zixiu et al. (2010): Discovery and characterization of novel subtype-selective allosteric agonists for the investigation of M(1) receptor function in the central nervous system. In: *ACS chemical neuroscience* 1 (2), S. 104–121. DOI: 10.1021/cn900003h.
- Lebon, Guillaume; Langmead, Christopher J.; Tehan, Ben G.; Hulme, Edward C. (2009): Mutagenic mapping suggests a novel binding mode for selective agonists of M1 muscarinic acetylcholine receptors. In: *Molecular pharmacology* 75 (2), S. 331–341. DOI: 10.1124/mol.108.050963.
- Lebon, Guillaume; Warne, Tony; Edwards, Patricia C.; Bennett, Kirstie; Langmead, Christopher J.; Leslie, Andrew G. W.; Tate, Christopher G. (2011): Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation. In: *Nature* 474 (7352), S. 521–525. DOI: 10.1038/nature10136.
- Lee, T. W.; Sole, M. J.; Wells, J. W. (1986): Assessment of a ternary model for the binding of agonists to neurohumoral receptors. In: *Biochemistry* 25 (22), S. 7009–7020.
- Lee, Taeweon; Schwandner, Ralf; Swaminath, Gayathri; Weiszmann, Jennifer; Cardozo, Mario; Greenberg, Joanne et al. (2008): Identification and functional characterization of allosteric agonists for the G protein-coupled receptor FFA2. In: *Molecular pharmacology* 74 (6), S. 1599–1609. DOI: 10.1124/mol.108.049536.
- Lefkowitz, R. J. (2007): Seven transmembrane receptors: something old, something new. In: *Acta physiologica (Oxford, England)* 190 (1), S. 9–19. DOI: 10.1111/j.1365-201X.2007.01693.x.
- Lefkowitz, R. J.; Cotecchia, S.; Samama, P.; Costa, T. (1993): Constitutive activity of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. In: *Trends in pharmacological sciences* 14 (8), S. 303–307. DOI: 10.1016/0165-6147(93)90048-O.
- Lefkowitz, Robert J. (2004): Historical review: a brief history and personal retrospective of seven-transmembrane receptors. In: *Trends in pharmacological sciences* 25 (8), S. 413–422. DOI: 10.1016/j.tips.2004.06.006.
- Lefkowitz, Robert J.; Shenoy, Sudha K. (2005): Transduction of receptor signals by beta-arrestins. In: *Science (New York, N.Y.)* 308 (5721), S. 512–517. DOI: 10.1126/science.1109237.
- Levey, A. I. (1993): Immunological localization of m1-m5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissues and brain. In: *Life sciences* 52 (5-6), S. 441–448.

- Levey, A. I. (1996): Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (24), S. 13541–13546.
- Levey, A. I.; Edmunds, S. M.; Koliatsos, V.; Wiley, R. G.; Heilman, C. J. (1995): Expression of m1-m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in rat hippocampus and regulation by cholinergic innervation. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15 (5 Pt 2), S. 4077–4092.
- Levey, A. I.; Kitt, C. A.; Simonds, W. F.; Price, D. L.; Brann, M. R. (1991): Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11 (10), S. 3218–3226.
- Li, Bo; Scarselli, Marco; Knudsen, Christopher D.; Kim, Soo-Kyung; Jacobson, Kenneth A.; McMillin, Sara M.; Wess, Jurgen (2007): Rapid identification of functionally critical amino acids in a G protein-coupled receptor. In: *Nature methods* 4 (2), S. 169–174. DOI: 10.1038/nmeth990.
- Liggett, Stephen B. (2011): Phosphorylation barcoding as a mechanism of directing GPCR signaling. In: *Science signaling* 4 (185), S. pe36. DOI: 10.1126/scisignal.2002331.
- Ligt, R. A. de; Kourounakis, A. P.; IJzerman, A. P. (2000): Inverse agonism at G protein-coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery. In: *British journal of pharmacology* 130 (1), S. 1–12. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703311.
- Lindberg, Jill S.; Culleton, Bruce; Wong, Gordon; Borah, Michael F.; Clark, Roderick V.; Shapiro, Warren B. et al. (2005): Cinacalcet HCl, an oral calcimimetic agent for the treatment of secondary hyperparathyroidism in hemodialysis and peritoneal dialysis: a randomized, double-blind, multicenter study. In: *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 16 (3), S. 800–807. DOI: 10.1681/ASN.2004060512.
- Litschig, S.; Gasparini, F.; Rueegg, D.; Stoehr, N.; Flor, P. J.; Vranesic, I. et al. (1999): CPCCOEt, a noncompetitive metabotropic glutamate receptor 1 antagonist, inhibits receptor signaling without affecting glutamate binding. In: *Molecular pharmacology* 55 (3), S. 453–461.
- Liu, Liwang; Zhao, Rubing; Bai, Yan; Stanish, Lee F.; Evans, James E.; Sanderson, Michael J. et al. (2006): M1 muscarinic receptors inhibit L-type Ca<sup>2+</sup> current and M-current by divergent signal transduction cascades. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26 (45), S. 11588–11598. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2102-06.2006.
- Lovell, Kimberly M.; Frankowski, Kevin J.; Stahl, Edward L.; Slauson, Stephen R.; Yoo, Euna; Prisinzano, Thomas E. et al. (2015): Structure-activity relationship studies of functionally selective kappa opioid receptor agonists that modulate ERK 1/2 phosphorylation while preserving G protein

- over arrestin2 signaling bias. In: *ACS chemical neuroscience* 6 (8), S. 1411–1419. DOI: 10.1021/acschemneuro.5b00092.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *The Journal of biological chemistry* 193 (1), S. 265–275.
- Lu, Z. L.; Saldanha, J. W.; Hulme, E. C. (2001): Transmembrane domains 4 and 7 of the M(1) muscarinic acetylcholine receptor are critical for ligand binding and the receptor activation switch. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (36), S. 34098–34104. DOI: 10.1074/jbc.M104217200.
- Ma, Lei; Seager, Matthew A.; Wittmann, Marion; Jacobson, Marlene; Bickel, Denise; Burno, Maryann et al. (2009): Selective activation of the M1 muscarinic acetylcholine receptor achieved by allosteric potentiation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (37), S. 15950–15955. DOI: 10.1073/pnas.0900903106.
- Mahan, L. C.; Koachman, A. M.; Insel, P. A. (1985): Genetic analysis of beta-adrenergic receptor internalization and down-regulation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (1), S. 129–133.
- Mailman, Richard B.; Murthy, Vishakantha (2010): Third generation antipsychotic drugs: partial agonism or receptor functional selectivity? In: *Current pharmaceutical design* 16 (5), S. 488–501.
- Maloteaux, J. M.; Hermans, E. (1994): Agonist-induced muscarinic cholinergic receptor internalization, recycling and degradation in cultured neuronal cells. Cellular mechanisms and role in desensitization. In: *Biochemical pharmacology* 47 (1), S. 77–88.
- Manglik, Aashish; Kruse, Andrew C.; Kobilka, Tong Sun; Thian, Foon Sun; Mathiesen, Jesper M.; Sunahara, Roger K. et al. (2012): Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. In: *Nature* 485 (7398), S. 321–326. DOI: 10.1038/nature10954.
- Mangmool, Supachoke; Kurose, Hitoshi (2011): G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX). In: *Toxins* 3 (7), S. 884–899. DOI: 10.3390/toxins3070884.
- Manning, David R. (2002): Measures of efficacy using G proteins as endpoints: differential engagement of G proteins through single receptors. In: *Molecular pharmacology* 62 (3), S. 451–452.
- Marinissen, M. J.; Gutkind, J. S. (2001): G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. In: *Trends in pharmacological sciences* 22 (7), S. 368–376.
- Marino, M. J.; Rouse, S. T.; Levey, A. I.; Potter, L. T.; Conn, P. J. (1998): Activation of the genetically defined m1 muscarinic receptor potentiates N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor currents in hippocampal pyramidal cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (19), S. 11465–11470.

- Marlo, Joy E.; Niswender, Colleen M.; Days, Emily L.; Bridges, Thomas M.; Xiang, Yun; Rodriguez, Alice L. et al. (2009): Discovery and characterization of novel allosteric potentiators of M1 muscarinic receptors reveals multiple modes of activity. In: *Molecular pharmacology* 75 (3), S. 577–588. DOI: 10.1124/mol.108.052886.
- Mary, Sophie; Damian, Marjorie; Louet, Maxime; Floquet, Nicolas; Fehrentz, Jean-Alain; Marie, Jacky et al. (2012): Ligands and signaling proteins govern the conformational landscape explored by a G protein-coupled receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (21), S. 8304–8309. DOI: 10.1073/pnas.1119881109.
- Marzilli, M.; Orsini, E.; Marraccini, P.; Testa, R. (2000): Beneficial effects of intracoronary adenosine as an adjunct to primary angioplasty in acute myocardial infarction. In: *Circulation* 101 (18), S. 2154–2159.
- Matsui, H.; Lazareno, S.; Birdsall, N. J. (1995): Probing of the location of the allosteric site on m1 muscarinic receptors by site-directed mutagenesis. In: *Molecular pharmacology* 47 (1), S. 88–98.
- May, Lauren T.; Avlani, Vimesh A.; Langmead, Christopher J.; Herdon, Hugh J.; Wood, Martyn D.; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur (2007a): Structure-function studies of allosteric agonism at M2 muscarinic acetylcholine receptors. In: *Molecular pharmacology* 72 (2), S. 463–476. DOI: 10.1124/mol.107.037630.
- May, Lauren T.; Leach, Katie; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur (2007b): Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 47, S. 1–51. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105159.
- Melancon, Bruce J.; Hopkins, Corey R.; Wood, Michael R.; Emmitte, Kyle A.; Niswender, Colleen M.; Christopoulos, Arthur et al. (2012): Allosteric modulation of seven transmembrane spanning receptors: theory, practice, and opportunities for central nervous system drug discovery. In: *Journal of medicinal chemistry* 55 (4), S. 1445–1464. DOI: 10.1021/jm201139r.
- Menniti, Frank S.; Lindsley, Craig W.; Conn, P. Jeffrey; Pandit, Jayvardhan; Zagouras, Panayiotis; Volkmann, Robert A. (2013): Allosteric modulators for the treatment of schizophrenia: targeting glutamatergic networks. In: *Current topics in medicinal chemistry* 13 (1), S. 26–54.
- Messerer, Regina; Kauk, Michael; Volpato, Daniela; Alonso Canizal, Maria Consuelo; Klockner, Jessika; Zabel, Ulrike et al. (2017): FRET Studies of Quinolone-Based Bitopic Ligands and Their Structural Analogues at the Muscarinic M1 Receptor. In: *ACS chemical biology* 12 (3), S. 833–843. DOI: 10.1021/acscchembio.6b00828.
- Michal, P.; El-Fakahany, E. E.; Dolezal, V. (2007): Muscarinic M2 receptors directly activate Gq/11 and Gs G-proteins. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 320 (2), S. 607–614. DOI: 10.1124/jpet.106.114314.

- Michal, P.; Lysíková, M.; Tucek, S. (2001): Dual effects of muscarinic M(2) acetylcholine receptors on the synthesis of cyclic AMP in CHO cells: dependence on time, receptor density and receptor agonists. In: *British journal of pharmacology* 132 (6), S. 1217–1228. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703931.
- Miller, L. G.; Galpern, W. R.; Greenblatt, D. J.; Lumpkin, M.; Shader, R. I. (1990): Chronic benzodiazepine administration. VI. A partial agonist produces behavioral effects without tolerance or receptor alterations. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 254 (1), S. 33–38.
- Milligan, G. (2008): A day in the life of a G protein-coupled receptor: the contribution to function of G protein-coupled receptor dimerization. In: *British journal of pharmacology* 153 Suppl 1, S. S216–29. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707490.
- Milligan, Graeme (2003): Principles: extending the utility of 35SGTP gamma S binding assays. In: *Trends in pharmacological sciences* 24 (2), S. 87–90.
- Milligan, Graeme (2004): G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology. In: *Molecular pharmacology* 66 (1), S. 1–7. DOI: 10.1124/mol.104.000497.
- Milligan, Graeme (2010): The role of dimerisation in the cellular trafficking of G-protein-coupled receptors. In: *Current opinion in pharmacology* 10 (1), S. 23–29. DOI: 10.1016/j.coph.2009.09.010.
- Milligan, Graeme (2013): The prevalence, maintenance, and relevance of G protein-coupled receptor oligomerization. In: *Molecular pharmacology* 84 (1), S. 158–169. DOI: 10.1124/mol.113.084780.
- Milligan, Graeme; Kostenis, Evi (2006): Heterotrimeric G-proteins: a short history. In: *British journal of pharmacology* 147 Suppl 1, S. S46–55. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706405.
- Milligan, Graeme; Stoddart, Leigh A.; Smith, Nicola J. (2009): Agonism and allosterism: the pharmacology of the free fatty acid receptors FFA2 and FFA3. In: *British journal of pharmacology* 158 (1), S. 146–153. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00421.x.
- Min, Anna de; Matera, Carlo; Bock, Andreas; Holze, Janine; Kloeckner, Jessica; Muth, Mathias et al. (2017): A New Molecular Mechanism To Engineer Protean Agonism at a G Protein-Coupled Receptor. In: *Molecular pharmacology* 91 (4), S. 348–356. DOI: 10.1124/mol.116.107276.
- Minamino, Tetsuo (2012): Cardioprotection from ischemia/reperfusion injury: basic and translational research. In: *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 76 (5), S. 1074–1082.
- Mistry, Rajendra; Dowling, Mark R.; Challiss, R. A. John (2005): An investigation of whether agonist-selective receptor conformations occur with respect to M2 and M4 muscarinic acetylcholine receptor signalling via Gi/o and Gs proteins. In: *British journal of pharmacology* 144 (4), S. 566–575. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706090.

- Mistry, Shailesh N.; Valant, Celine; Sexton, Patrick M.; Capuano, Ben; Christopoulos, Arthur; Scammells, Peter J. (2013): Synthesis and pharmacological profiling of analogues of benzyl quinolone carboxylic acid (BQCA) as allosteric modulators of the M1 muscarinic receptor. In: *Journal of medicinal chemistry* 56 (12), S. 5151–5172. DOI: 10.1021/jm400540b.
- Miyakawa, T.; Yamada, M.; Duttaroy, A.; Wess, J. (2001): Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (14), S. 5239–5250.
- Möhler, H.; Fritschy, J. M.; Rudolph, U. (2002): A new benzodiazepine pharmacology. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 300 (1), S. 2–8.
- Mohr, K.; Tränkle, C.; Holzgrabe, U. (2003): Structure/activity relationships of M2 muscarinic allosteric modulators. In: *Receptors & channels* 9 (4), S. 229–240.
- Mohr, Klaus; Schmitz, Jens; Schrage, Ramona; Tränkle, Christian; Holzgrabe, Ulrike (2013): Molecular alliance—from orthosteric and allosteric ligands to dualsteric/bitopic agonists at G protein coupled receptors. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 52 (2), S. 508–516. DOI: 10.1002/anie.201205315.
- Mohr, Klaus; Tränkle, Christian; Kostenis, Evi; Barocelli, Elisabetta; Amici, Marco de; Holzgrabe, Ulrike (2010): Rational design of dualsteric GPCR ligands: quests and promise. In: *British journal of pharmacology* 159 (5), S. 997–1008. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00601.x.
- Molajo, A. O.; Bennett, D. H. (1985): Effect of xamoterol (ICI 118587), a new beta1 adrenoceptor partial agonist, on resting haemodynamic variables and exercise tolerance in patients with left ventricular dysfunction. In: *British heart journal* 54 (1), S. 17–21.
- Möller, Dorothee; Kling, Ralf C.; Skultety, Marika; Leuner, Kristina; Hübner, Harald; Gmeiner, Peter (2014): Functionally selective dopamine D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> receptor partial agonists. In: *Journal of medicinal chemistry* 57 (11), S. 4861–4875. DOI: 10.1021/jm5004039.
- MONOD, J.; CHANGEUX, J. P.; JACOB, F. (1963): Allosteric proteins and cellular control systems. In: *Journal of molecular biology* 6, S. 306–329.
- MONOD, J.; WYMAN, J.; CHANGEUX, J. P. (1965): ON THE NATURE OF ALLOSTERIC TRANSITIONS: A PLAUSIBLE MODEL. In: *Journal of molecular biology* 12, S. 88–118.
- Moore, Robert H.; Millman, Ellen E.; Godines, Veronica; Hanania, Nicola A.; Tran, Tuan M.; Peng, Hui et al. (2007): Salmeterol stimulation dissociates beta2-adrenergic receptor phosphorylation and internalization. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 36 (2), S. 254–261. DOI: 10.1165/rcmb.2006-0158OC.
- Mortier, Jeremie; Rakers, Christin; Bermudez, Marcel; Murgueitio, Manuela S.; Riniker, Sereina; Wolber, Gerhard (2015): The impact of molecular dynamics on drug design: applications for the

characterization of ligand-macromolecule complexes. In: *Drug discovery today* 20 (6), S. 686–702. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.01.003.

Moss, J.; Tsai, S. C.; Bruni, P.; Adamik, R.; Kanaho, Y.; Hewlett, E. L.; Vaughan, M. (1985): Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of adenylate cyclase. Effects of guanyl nucleotides and rhodopsin. In: *Developments in biological standardization* 61, S. 43–49.

Motulsky, H. J.; Christopoulos, A. (2003): Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression. In: *A practical guide to curve fitting*.

Motulsky, Harvey J.; Mahan, Lawrence C.; Ansel, Paul A. (1985): Radioligand, agonists and membrane receptors on intact cells: data analysis in a bind. In: *Trends in pharmacological sciences* 6, S. 317–319. DOI: 10.1016/0165-6147(85)90149-X.

Munk, C.; Isberg, V.; Mordalski, S.; Harpsøe, K.; Rataj, K.; Hauser, A. S. et al. (2016): GPCRdb: the G protein-coupled receptor database - an introduction. In: *British journal of pharmacology* 173 (14), S. 2195–2207. DOI: 10.1111/bph.13509.

Muth, Mathias; Bender, Wiebke; Scharfenstein, Olaf; Holzgrabe, Ulrike; Balatkova, Edith; Tränkle, Christian; Mohr, Klaus (2003): Systematic development of high affinity bis(ammonio)alkane-type allosteric enhancers of muscarinic ligand binding. In: *Journal of medicinal chemistry* 46 (6), S. 1031–1040. DOI: 10.1021/jm021017q.

Nathanson, N. M. (1983): Binding of agonists and antagonists to muscarinic acetylcholine receptors on intact cultured heart cells. In: *Journal of neurochemistry* 41 (6), S. 1545–1549.

Nawaratne, Vindhya; Leach, Katie; Felder, Christian C.; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur (2010): Structural determinants of allosteric agonism and modulation at the M4 muscarinic acetylcholine receptor: identification of ligand-specific and global activation mechanisms. In: *The Journal of biological chemistry* 285 (25), S. 19012–19021. DOI: 10.1074/jbc.M110.125096.

Nedoma, J.; Tucek, S.; Danilov, A. F.; Shelkovnikov, S. A. (1986): Stabilization of antagonist binding to cardiac muscarinic acetylcholine receptors by gallamine and other neuromuscular blocking drugs. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 236 (1), S. 219–223.

Nesterov, Alexandre; Hong, Mei; Hertel, Carmen; Jiao, Ping; Brownell, Lidia; Cannon, Edward (2010): Screening a plant extract library for inhibitors of cholecystokinin receptor CCK1 pathways. In: *Journal of biomolecular screening* 15 (5), S. 518–527. DOI: 10.1177/1087057110369702.

Nikolaev, Viacheslav O.; Hoffmann, Carsten; Bünemann, Moritz; Lohse, Martin J.; Vilardaga, Jean-Pierre (2006): Molecular basis of partial agonism at the neurotransmitter alpha2A-adrenergic receptor and Gi-protein heterotrimer. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (34), S. 24506–24511. DOI: 10.1074/jbc.M603266200.



- Niswender, Colleen M.; Conn, P. Jeffrey (2010): Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 50, S. 295–322. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533.
- Noel, J. P.; Hamm, H. E.; Sigler, P. B. (1993): The 2.2 Å crystal structure of transducin- $\alpha$  complexed with GTP  $\gamma$  S. In: *Nature* 366 (6456), S. 654–663. DOI: 10.1038/366654a0.
- Nuttall, A.; Snow, H. M. (1982): The cardiovascular effects of ICI 118,587: A beta 1-adrenoceptor partial agonist. In: *British journal of pharmacology* 77 (2), S. 381–388.
- Nygaard, Rie; Zou, Yaozhong; Dror, Ron O.; Mildorf, Thomas J.; Arlow, Daniel H.; Manglik, Aashish et al. (2013): The dynamic process of  $\beta_2$ -adrenergic receptor activation. In: *Cell* 152 (3), S. 532–542. DOI: 10.1016/j.cell.2013.01.008.
- O'Brien, Julie A.; Lemaire, Wei; Chen, Tsing-Bau; Chang, Raymond S. L.; Jacobson, Marlene A.; Ha, Sookhee N. et al. (2003): A family of highly selective allosteric modulators of the metabotropic glutamate receptor subtype 5. In: *Molecular pharmacology* 64 (3), S. 731–740. DOI: 10.1124/mol.64.3.731.
- Offermanns, S.; Wieland, T.; Homann, D.; Sandmann, J.; Bombien, E.; Spicher, K. et al. (1994): Transfected muscarinic acetylcholine receptors selectively couple to Gi-type G proteins and Gq/11. In: *Molecular pharmacology* 45 (5), S. 890–898.
- O'Gorman, S.; Fox, D. T.; Wahl, G. M. (1991): Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 251 (4999), S. 1351–1355.
- Oki, Tomomi; Takagi, Yukiko; Inagaki, Sayuri; Taketo, Makoto M.; Manabe, Toshiya; Matsui, Minoru; Yamada, Shizuo (2005): Quantitative analysis of binding parameters of 3HN-methylscopolamine in central nervous system of muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. In: *Brain research. Molecular brain research* 133 (1), S. 6–11. DOI: 10.1016/j.molbrainres.2004.09.012.
- Orban, Tivadar; Jastrzebska, Beata; Gupta, Sayan; Wang, Benlian; Miyagi, Masaru; Chance, Mark R.; Palczewski, Krzysztof (2012): Conformational dynamics of activation for the pentameric complex of dimeric G protein-coupled receptor and heterotrimeric G protein. In: *Structure (London, England : 1993)* 20 (5), S. 826–840. DOI: 10.1016/j.str.2012.03.017.
- Overington, John P.; Al-Lazikani, Bissan; Hopkins, Andrew L. (2006): How many drug targets are there? In: *Nature reviews. Drug discovery* 5 (12), S. 993–996. DOI: 10.1038/nrd2199.
- Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A. et al. (2000): Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. In: *Science (New York, N.Y.)* 289 (5480), S. 739–745.
- Palczewski, Krzysztof (2010): Oligomeric forms of G protein-coupled receptors (GPCRs). In: *Trends in biochemical sciences* 35 (11), S. 595–600. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.05.002.

- Park, Jung Hee; Scheerer, Patrick; Hofmann, Klaus Peter; Choe, Hui-Woog; Ernst, Oliver Peter (2008): Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin. In: *Nature* 454 (7201), S. 183–187. DOI: 10.1038/nature07063.
- Pediani, John D.; Ward, Richard J.; Godin, Antoine G.; Marsango, Sara; Milligan, Graeme (2016): Dynamic Regulation of Quaternary Organization of the M1 Muscarinic Receptor by Subtype-selective Antagonist Drugs. In: *The Journal of biological chemistry* 291 (25), S. 13132–13146. DOI: 10.1074/jbc.M115.712562.
- Peng, Joyce Yao-chun; Vaidehi, Nagarajan; Hall, Spencer E.; Goddard, William A. (2006): The Predicted 3D Structures of the Human M1 Muscarinic Acetylcholine Receptor with Agonist or Antagonist Bound. In: *ChemMedChem* 1 (8), S. 878–890. DOI: 10.1002/cmdc.200600047.
- Peralta, E. G.; Ashkenazi, A.; Winslow, J. W.; Smith, D. H.; Ramachandran, J.; Capon, D. J. (1987): Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. In: *The EMBO journal* 6 (13), S. 3923–3929.
- Pierce, Kristen L.; Premont, Richard T.; Lefkowitz, Robert J. (2002): Seven-transmembrane receptors. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 3 (9), S. 639–650. DOI: 10.1038/nrm908.
- Pineyro, Graciela (2014): Analysing signaling data to quantify pharmacological bias. Université de Montréal. 15th Annual G Protein-Coupled receptor (GPCR) retreat, 03.10.2014. Online verfügbar unter [www.gpcr-retreat.com/gpcr-course-pineyro-2014.pdf](http://www.gpcr-retreat.com/gpcr-course-pineyro-2014.pdf).
- Pogozheva, I. D.; Lomize, A. L.; Mosberg, H. I. (1997): The transmembrane 7-alpha-bundle of rhodopsin: distance geometry calculations with hydrogen bonding constraints. In: *Biophysical journal* 72 (5), S. 1963–1985. DOI: 10.1016/S0006-3495(97)78842-8.
- Potter, L. T.; Ferrendelli, C. A.; Hanchett, H. E.; Hollifield, M. A.; Lorenzi, M. V. (1989): Tetrahydroaminoacridine and other allosteric antagonists of hippocampal M1 muscarine receptors. In: *Molecular pharmacology* 35 (5), S. 652–660.
- Pouleur, H.; Rousseau, M. F.; Mengeot, P.; Veriter, C.; Vincent, M. F.; Brasseur, L. A. (1982): Improvement of global and regional left ventricular function in patients with previous myocardial infarction by a new beta 1 adrenoceptor partial agonist, ICI 118,587. In: *European heart journal* 3 Suppl D, S. 123–127.
- Price, Martin R.; Baillie, Gemma L.; Thomas, Adele; Stevenson, Lesley A.; Easson, Morag; Goodwin, Richard et al. (2005): Allosteric modulation of the cannabinoid CB1 receptor. In: *Molecular pharmacology* 68 (5), S. 1484–1495. DOI: 10.1124/mol.105.016162.
- Prilla, Stefanie (2007): Muskarinische Acetylcholinrezeptoren. Identifizierung einer Kernregion für allosterisch-orthosterische Rezeptorinteraktionen. 1. Aufl. München: Verl. Dr. Hut (Pharmakologie).

- Prilla, Stefanie; Schrobang, Jasmin; Ellis, John; Holtje, Hans-Dieter; Mohr, Klaus (2006): Allosteric interactions with muscarinic acetylcholine receptors: complex role of the conserved tryptophan M242Trp in a critical cluster of amino acids for baseline affinity, subtype selectivity, and cooperativity. In: *Molecular pharmacology* 70 (1), S. 181–193. DOI: 10.1124/mol.106.023481.
- Raasch, Alexandra; Scharfenstein, Olaf; Tränkle, Christian; Holzgrabe, Ulrike; Mohr, Klaus (2002): Elevation of ligand binding to muscarinic M(2) acetylcholine receptors by bis(ammonio)alkane-type allosteric modulators. In: *Journal of medicinal chemistry* 45 (17), S. 3809–3812.
- Raddatz, Rita; Schaffhauser, Hervé; Marino, Michael J. (2007): Allosteric approaches to the targeting of G-protein-coupled receptors for novel drug discovery: a critical assessment. In: *Biochemical pharmacology* 74 (3), S. 383–391. DOI: 10.1016/j.bcp.2007.05.007.
- Rahmeh, Rita; Damian, Marjorie; Cottet, Martin; Orcel, Hélène; Mendre, Christiane; Durroux, Thierry et al. (2012): Structural insights into biased G protein-coupled receptor signaling revealed by fluorescence spectroscopy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (17), S. 6733–6738. DOI: 10.1073/pnas.1201093109.
- Rajagopal, Sudarshan; Ahn, Seungkil; Rominger, David H.; Gowen-MacDonald, William; Lam, Christopher M.; Dewire, Scott M. et al. (2011): Quantifying ligand bias at seven-transmembrane receptors. In: *Molecular pharmacology* 80 (3), S. 367–377. DOI: 10.1124/mol.111.072801.
- Rajagopal, Sudarshan; Rajagopal, Keshava; Lefkowitz, Robert J. (2010): Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. In: *Nature reviews. Drug discovery* 9 (5), S. 373–386. DOI: 10.1038/nrd3024.
- Rasmussen, Søren G. F.; Choi, Hee-Jung; Fung, Juan Jose; Pardon, Els; Casarosa, Paola; Chae, Pil Seok et al. (2011a): Structure of a nanobody-stabilized active state of the  $\beta_2$  adrenoceptor. In: *Nature* 469 (7329), S. 175–180. DOI: 10.1038/nature09648.
- Rasmussen, Søren G. F.; DeVree, Brian T.; Zou, Yaozhong; Kruse, Andrew C.; Chung, Ka Young; Kobilka, Tong Sun et al. (2011b): Crystal structure of the  $\beta_2$  adrenergic receptor-Gs protein complex. In: *Nature* 477 (7366), S. 549–555. DOI: 10.1038/nature10361.
- Redka, Dar'ya S.; Pisterzi, Luca F.; Wells, James W. (2008): Binding of orthosteric ligands to the allosteric site of the M(2) muscarinic cholinergic receptor. In: *Molecular pharmacology* 74 (3), S. 834–843. DOI: 10.1124/mol.108.048074.
- Reichelt, Melissa E.; Willems, Laura; Molina, Jose G.; Sun, Chun-Xiao; Noble, Janci C.; Ashton, Kevin J. et al. (2005): Genetic Deletion of the  $\beta_1$  Adenosine Receptor Limits Myocardial Ischemic Tolerance. In: *Circ Res* 96 (3), S. 363. DOI: 10.1161/01.RES.0000156075.00127.C3.

- Reiter, Eric; Ahn, Seungkil; Shukla, Arun K.; Lefkowitz, Robert J. (2012): Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 52, S. 179–197. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.010909.105800.
- Ritter, Stefanie L.; Hall, Randy A. (2009): Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (12), S. 819–830. DOI: 10.1038/nrm2803.
- Roettger, B. F.; Ghanekar, D.; Rao, R.; Toledo, C.; Yingling, J.; Pinon, D.; Miller, L. J. (1997): Antagonist-stimulated internalization of the G protein-coupled cholecystokinin receptor. In: *Molecular pharmacology* 51 (3), S. 357–362.
- Rosenbaum, Daniel M.; Cherezov, Vadim; Hanson, Michael A.; Rasmussen, Søren G. F.; Thian, Foon Sun; Kobilka, Tong Sun et al. (2007): GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function. In: *Science (New York, N.Y.)* 318 (5854), S. 1266–1273. DOI: 10.1126/science.1150609.
- Rosenbaum, Daniel M.; Rasmussen, Soren G. F.; Kobilka, Brian K. (2009): The structure and function of G-protein-coupled receptors. In: *Nature* 459 (7245), S. 356–363. DOI: 10.1038/nature08144.
- Rouse, S. T.; Marino, M. J.; Potter, L. T.; Conn, P. J.; Levey, A. I. (1999): Muscarinic receptor subtypes involved in hippocampal circuits. In: *Life sciences* 64 (6-7), S. 501–509.
- Rousseau, M. F.; Pouleur, H.; Vincent, M. F. (1983): Effects of a cardioselective beta 1 partial agonist (corwin) on left ventricular function and myocardial metabolism in patients with previous myocardial infarction. In: *The American journal of cardiology* 51 (8), S. 1267–1274.
- Ruiz de Azua, Inigo; Gautam, Dinesh; Guettier, Jean-Marc; Wess, Jürgen (2011): Novel insights into the function of  $\alpha$ -cell M3 muscarinic acetylcholine receptors: therapeutic implications. In: *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 22 (2), S. 74–80. DOI: 10.1016/j.tem.2010.10.004.
- Salon, John A.; Lodowski, David T.; Palczewski, Krzysztof (2011): The significance of G protein-coupled receptor crystallography for drug discovery. In: *Pharmacological reviews* 63 (4), S. 901–937. DOI: 10.1124/pr.110.003350.
- Samama, P.; Cotecchia, S.; Costa, T.; Lefkowitz, R. J. (1993): A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (7), S. 4625–4636.
- Samama, P.; Pei, G.; Costa, T.; Cotecchia, S.; Lefkowitz, R. J. (1994): Negative antagonists promote an inactive conformation of the beta 2-adrenergic receptor. In: *Molecular pharmacology* 45 (3), S. 390–394.
- Scarselli, Marco; Li, Bo; Kim, Soo-Kyung; Wess, Jürgen (2007): Multiple residues in the second extracellular loop are critical for M3 muscarinic acetylcholine receptor activation. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (10), S. 7385–7396. DOI: 10.1074/jbc.M610394200.

Scheerer, Patrick; Park, Jung Hee; Hildebrand, Peter W.; Kim, Yong Ju; Krauss, Norbert; Choe, Hui-Woog et al. (2008): Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. In: *Nature* 455 (7212), S. 497–502. DOI: 10.1038/nature07330.

Schmitz, Jens; van der Mey, Dorina; Bermudez, Marcel; Klöckner, Jessica; Schrage, Ramona; Kostenis, Evi et al. (2014): Dualsteric muscarinic antagonists--orthosteric binding pose controls allosteric subtype selectivity. In: *Journal of medicinal chemistry* 57 (15), S. 6739–6750. DOI: 10.1021/jm500790x.

Scholten, D. J.; Canals, M.; Maussang, D.; Roumen, L.; Smit, M. J.; Wijtmans, M. et al. (2012): Pharmacological modulation of chemokine receptor function. In: *British journal of pharmacology* 165 (6), S. 1617–1643. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01551.x.

Schrage, R.; Min, A. de; Hochheiser, K.; Kostenis, E.; Mohr, K. (2016): Superagonism at G protein-coupled receptors and beyond. In: *British journal of pharmacology* 173 (20), S. 3018–3027. DOI: 10.1111/bph.13278.

Schrage, R.; Seemann, W. K.; Klockner, J.; Dallanoce, C.; Racke, K.; Kostenis, E. et al. (2013): Agonists with supraphysiological efficacy at the muscarinic M2 ACh receptor. In: *British journal of pharmacology* 169 (2), S. 357–370. DOI: 10.1111/bph.12003.

Schrage, Ramona; Holze, Janine; Klockner, Jessica; Balkow, Aileen; Klause, Anne S.; Schmitz, Anna-Lena et al. (2014): New insight into active muscarinic receptors with the novel radioagonist (3)Hiperoxo. In: *Biochemical pharmacology* 90 (3), S. 307–319. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.05.012.

Schrage, Ramona; Schmitz, Anna-Lena; Gaffal, Evelyn; Annala, Suvi; Kehraus, Stefan; Wenzel, Daniela et al. (2015): The experimental power of FR900359 to study Gq-regulated biological processes. In: *Nature communications* 6, S. 10156. DOI: 10.1038/ncomms10156.

Schroder, Ralf; Janssen, Nicole; Schmidt, Johannes; Kebig, Anna; Merten, Nicole; Hennen, Stephanie et al. (2010): Deconvolution of complex G protein-coupled receptor signaling in live cells using dynamic mass redistribution measurements. In: *Nature biotechnology* 28 (9), S. 943–949. DOI: 10.1038/nbt.1671.

Schröder, Ralf; Schmidt, Johannes; Blättermann, Stefanie; Peters, Lucas; Janssen, Nicole; Grundmann, Manuel et al. (2011): Applying label-free dynamic mass redistribution technology to frame signaling of G protein-coupled receptors noninvasively in living cells. In: *Nature protocols* 6 (11), S. 1748–1760. DOI: 10.1038/nprot.2011.386.

Schröter, A.; Tränkle, C.; Mohr, K. (2000): Modes of allosteric interactions with free and 3HN-methylscopolamine-occupied muscarinic M2 receptors as deduced from buffer-dependent potency shifts. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 362 (6), S. 512–519.

- Schütz, W.; Freissmuth, M. (1992): Reverse intrinsic activity of antagonists on G protein-coupled receptors. In: *Trends in pharmacological sciences* 13 (10), S. 376–380.
- Schwartz, Thue W.; Holst, Birgitte (2006): Ago-allosteric modulation and other types of allosterism in dimeric 7TM receptors. In: *Journal of receptor and signal transduction research* 26 (1-2), S. 107–128. DOI: 10.1080/10799890600567570.
- Schwartz, Thue W.; Holst, Birgitte (2007): Allosteric enhancers, allosteric agonists and ago-allosteric modulators: where do they bind and how do they act? In: *Trends in pharmacological sciences* 28 (8), S. 366–373. DOI: 10.1016/j.tips.2007.06.008.
- Schwyzler, R. (1977): ACTH: a short introductory review. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 297, S. 3–26.
- Shabetai, R. (1990): Selective beta-1-adrenoceptor partial agonist treatment for congestive heart failure. In: *Cardiology* 77 (5), S. 357–366.
- Shapiro, David A.; Renock, Sean; Arrington, Elaine; Chiodo, Louis A.; Liu, Li-Xin; Sibley, David R. et al. (2003): Aripiprazole, a novel atypical antipsychotic drug with a unique and robust pharmacology. In: *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28 (8), S. 1400–1411. DOI: 10.1038/sj.npp.1300203.
- Sheffler, Douglas J.; Sevel, Christian; Le, Uyen; Lovell, Kimberly M.; Tarr, James C.; Carrington, Sheridan J. S. et al. (2013): Further exploration of M allosteric agonists: subtle structural changes abolish M allosteric agonism and result in pan-mAChR orthosteric antagonism. In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 23 (1), S. 223–227. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.10.132.
- Shenoy, Sudha K.; Drake, Matthew T.; Nelson, Christopher D.; Houtz, Daniel A.; Xiao, Kunhong; Madabushi, Srinivasan et al. (2006): beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. In: *The Journal of biological chemistry* 281 (2), S. 1261–1273. DOI: 10.1074/jbc.M506576200.
- Shenoy, Sudha K.; Lefkowitz, Robert J. (2005): Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin. In: *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2005 (308), S. cm10. DOI: 10.1126/stke.2005/308/cm10.
- Shenoy, Sudha K.; Lefkowitz, Robert J. (2011): -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. In: *Trends in pharmacological sciences* 32 (9), S. 521–533. DOI: 10.1016/j.tips.2011.05.002.
- Shi, Lei; Javitch, Jonathan A. (2002): The binding site of aminergic G protein-coupled receptors: the transmembrane segments and second extracellular loop. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 42, S. 437–467. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.42.091101.144224.

- Shirey, Jana K.; Brady, Ashley E.; Jones, Paulianda J.; Davis, Albert A.; Bridges, Thomas M.; Kennedy, J. Phillip et al. (2009): A selective allosteric potentiator of the M1 muscarinic acetylcholine receptor increases activity of medial prefrontal cortical neurons and restores impairments in reversal learning. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29 (45), S. 14271–14286. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3930-09.2009.
- Shonberg, Jeremy; Herenbrink, Carmen Klein; López, Laura; Christopoulos, Arthur; Scammells, Peter J.; Capuano, Ben; Lane, J. Robert (2013): A structure-activity analysis of biased agonism at the dopamine D2 receptor. In: *Journal of medicinal chemistry* 56 (22), S. 9199–9221. DOI: 10.1021/jm401318w.
- Shonberg, Jeremy; Lopez, Laura; Scammells, Peter J.; Christopoulos, Arthur; Capuano, Ben; Lane, J. Robert (2014): Biased agonism at G protein-coupled receptors: the promise and the challenges--a medicinal chemistry perspective. In: *Medicinal research reviews* 34 (6), S. 1286–1330. DOI: 10.1002/med.21318.
- Shortle, David; Chan, Hue Sun; Dill, Ken A. (1992): Modeling the effects of mutations on the denatured states of proteins. In: *Protein Science* 1 (2), S. 201–215. DOI: 10.1002/pro.5560010202.
- Slater, Susan (2012): Plerixafor. In: *Journal of the advanced practitioner in oncology* 3 (1), S. 49–54.
- Smith, Nicola J.; Bennett, Kirstie A.; Milligan, Graeme (2011): When simple agonism is not enough: emerging modalities of GPCR ligands. In: *Molecular and cellular endocrinology* 331 (2), S. 241–247. DOI: 10.1016/j.mce.2010.07.009.
- Spalding, T. A.; Birdsall, N. J.; Curtis, C. A.; Hulme, E. C. (1994): Acetylcholine mustard labels the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (6), S. 4092–4097.
- Spalding, Tracy A.; Ma, Jian-Nong; Ott, Thomas R.; Friberg, Mikael; Bajpai, Abhishek; Bradley, Stefania Risso et al. (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. In: *Molecular pharmacology* 70 (6), S. 1974–1983. DOI: 10.1124/mol.106.024901.
- Spalding, Tracy A.; Trotter, Carol; Skjaerbaek, Niels; Messier, Terri L.; Currier, Erika A.; Burstein, Ethan S. et al. (2002): Discovery of an ectopic activation site on the M(1) muscarinic receptor. In: *Molecular pharmacology* 61 (6), S. 1297–1302.
- Spiegel, A. M. (1987): Signal transduction by guanine nucleotide binding proteins. In: *Molecular and cellular endocrinology* 49 (1), S. 1–16.
- Steen, Anne; Thiele, Stefanie; Guo, Dong; Hansen, Lærke S.; Frimurer, Thomas M.; Rosenkilde, Mette M. (2013): Biased and constitutive signaling in the CC-chemokine receptor CCR5 by

manipulating the interface between transmembrane helices 6 and 7. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (18), S. 12511–12521. DOI: 10.1074/jbc.M112.449587.

Steinfeld, Tod; Hughes, Adam D.; Klein, Uwe; Smith, Jacqueline A. M.; Mammen, Mathai (2011): THRX-198321 is a bifunctional muscarinic receptor antagonist and beta2-adrenoceptor agonist (MABA) that binds in a bimodal and multivalent manner. In: *Molecular pharmacology* 79 (3), S. 389–399. DOI: 10.1124/mol.110.069120.

Steinfeld, Tod; Mammen, Mathai; Smith, Jacqueline A. M.; Wilson, Richard D.; Jasper, Jeffrey R. (2007): A novel multivalent ligand that bridges the allosteric and orthosteric binding sites of the M2 muscarinic receptor. In: *Molecular pharmacology* 72 (2), S. 291–302. DOI: 10.1124/mol.106.033746.

STEPHENSON, R. P. (1956): A modification of receptor theory. In: *British journal of pharmacology and chemotherapy* 11 (4), S. 379–393.

Stevens, Raymond C.; Cherezov, Vadim; Katritch, Vsevolod; Abagyan, Ruben; Kuhn, Peter; Rosen, Hugh; Wüthrich, Kurt (2013): The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. In: *Nature reviews. Drug discovery* 12 (1), S. 25–34. DOI: 10.1038/nrd3859.

Stockton, J. M.; Birdsall, N. J.; Burgen, A. S.; Hulme, E. C. (1983): Modification of the binding properties of muscarinic receptors by gallamine. In: *Molecular pharmacology* 23 (3), S. 551–557.

Swaminath, Gayathri; Deupi, Xavier; Lee, Tae Weon; Zhu, Wen; Thian, Foon Sun; Kobilka, Tong Sun; Kobilka, Brian (2005): Probing the beta2 adrenoceptor binding site with catechol reveals differences in binding and activation by agonists and partial agonists. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (23), S. 22165–22171. DOI: 10.1074/jbc.M502352200.

Sykes, David A.; Dowling, Mark R.; Charlton, Steven J. (2009): Exploring the mechanism of agonist efficacy: a relationship between efficacy and agonist dissociation rate at the muscarinic M3 receptor. In: *Molecular pharmacology* 76 (3), S. 543–551. DOI: 10.1124/mol.108.054452.

Szabo, Monika; Klein Herenbrink, Carmen; Christopoulos, Arthur; Lane, J. Robert; Capuano, Ben (2014): Structure-activity relationships of privileged structures lead to the discovery of novel biased ligands at the dopamine D<sub>2</sub> receptor. In: *Journal of medicinal chemistry* 57 (11), S. 4924–4939. DOI: 10.1021/jm500457x.

Tahtaoui, Chouaib; Parrot, Isabelle; Klotz, Philippe; Guillier, Fabrice; Galzi, Jean-Luc; Hibert, Marcel; Ilien, Brigitte (2004): Fluorescent pirenzepine derivatives as potential bitopic ligands of the human M1 muscarinic receptor. In: *Journal of medicinal chemistry* 47 (17), S. 4300–4315. DOI: 10.1021/jm040800a.

Teng, Min; Johnson, Michael D.; Thomas, Christine; Kiel, Dan; Lakis, James N.; Kercher, Tim et al. (2007): Small molecule ago-allosteric modulators of the human glucagon-like peptide-1 (hGLP-1)



receptor. In: *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17 (19), S. 5472–5478. DOI: 10.1016/j.bmcl.2007.06.086.

Thal, David M.; Sun, Bingfa; Feng, Dan; Nawaratne, Vindhya; Leach, Katie; Felder, Christian C. et al. (2016): Crystal structures of the M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptors. In: *Nature* 531 (7594), S. 335–340. DOI: 10.1038/nature17188.

Thal, L. J.; Forrest, M.; Loft, H.; Mengel, H. (2000): Lu 25-109, a muscarinic agonist, fails to improve cognition in Alzheimer's disease. Lu25-109 Study Group. In: *Neurology* 54 (2), S. 421–426.

Thomas, Rachel L.; Langmead, Christopher J.; Wood, Martyn D.; Challiss, R. A. John (2009): Contrasting effects of allosteric and orthosteric agonists on m1 muscarinic acetylcholine receptor internalization and down-regulation. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 331 (3), S. 1086–1095. DOI: 10.1124/jpet.109.160242.

Thomas, Rachel L.; Mistry, Rajendra; Langmead, Christopher J.; Wood, Martyn D.; Challiss, R. A. John (2008): G protein coupling and signaling pathway activation by m1 muscarinic acetylcholine receptor orthosteric and allosteric agonists. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 327 (2), S. 365–374. DOI: 10.1124/jpet.108.141788.

Thompson, Georgina L.; Lane, J. Robert; Coudrat, Thomas; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur; Canals, Meritxell (2016): Systematic analysis of factors influencing observations of biased agonism at the mu-opioid receptor. In: *Biochemical pharmacology* 113, S. 70–87. DOI: 10.1016/j.bcp.2016.05.014.

Trankle, C.; Kostenis, E.; Burgmer, U.; Mohr, K. (1996): Search for lead structures to develop new allosteric modulators of muscarinic receptors. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 279 (2), S. 926–933.

Trankle, Christian; Weyand, Oliver; Voigtlander, Uta; Mynett, Anita; Lazareno, Sebastian; Birdsall, Nigel J. M.; Mohr, Klaus (2003): Interactions of orthosteric and allosteric ligands with 3Hdimethyl-W84 at the common allosteric site of muscarinic M2 receptors. In: *Molecular pharmacology* 64 (1), S. 180–190. DOI: 10.1124/mol.64.1.180.

Tränkle, C.; Andresen, I.; Lambrecht, G.; Mohr, K. (1998): M2 receptor binding of the selective antagonist AF-DX 384: possible involvement of the common allosteric site. In: *Molecular pharmacology* 53 (2), S. 304–312.

Tränkle, C.; Mohr, K. (1997): Divergent modes of action among cationic allosteric modulators of muscarinic M2 receptors. In: *Molecular pharmacology* 51 (4), S. 674–682.

Tränkle, Christian; Dittmann, Andreas; Schulz, Uwe; Weyand, Oliver; Buller, Stefan; Jöhren, Kirstin et al. (2005): Atypical muscarinic allosteric modulation: cooperativity between modulators and their

- atypical binding topology in muscarinic M2 and M2/M5 chimeric receptors. In: *Molecular pharmacology* 68 (6), S. 1597–1610. DOI: 10.1124/mol.105.017707.
- Trumpp-Kallmeyer, S.; Hoflack, J.; Bruinvels, A.; Hibert, M. (1992): Modeling of G-protein-coupled receptors: application to dopamine, adrenaline, serotonin, acetylcholine, and mammalian opsin receptors. In: *Journal of medicinal chemistry* 35 (19), S. 3448–3462.
- Trzaskowski, B.; Latek, D.; Yuan, S.; Ghoshdastider, U.; Debinski, A.; Filipek, S. (2012): Action of molecular switches in GPCRs--theoretical and experimental studies. In: *Current medicinal chemistry* 19 (8), S. 1090–1109.
- Tyndall, Joel D. A.; Sandilya, Radhika (2005): GPCR agonists and antagonists in the clinic. In: *Medicinal chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))* 1 (4), S. 405–421.
- Vaidehi, Nagarajan; Kenakin, Terry (2010): The role of conformational ensembles of seven transmembrane receptors in functional selectivity. In: *Current opinion in pharmacology* 10 (6), S. 775–781. DOI: 10.1016/j.coph.2010.09.004.
- Valant, Celine; Felder, Christian C.; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur (2012a): Probe dependence in the allosteric modulation of a G protein-coupled receptor: implications for detection and validation of allosteric ligand effects. In: *Molecular pharmacology* 81 (1), S. 41–52. DOI: 10.1124/mol.111.074872.
- Valant, Celine; Gregory, Karen J.; Hall, Nathan E.; Scammells, Peter J.; Lew, Michael J.; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur (2008): A novel mechanism of G protein-coupled receptor functional selectivity. Muscarinic partial agonist McN-A-343 as a bitopic orthosteric/allosteric ligand. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (43), S. 29312–29321. DOI: 10.1074/jbc.M803801200.
- Valant, Celine; May, Lauren T.; Aurelio, Luigi; Chuo, Chung Hui; White, Paul J.; Baltos, Jo-Anne et al. (2014): Separation of on-target efficacy from adverse effects through rational design of a bitopic adenosine receptor agonist. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (12), S. 4614–4619. DOI: 10.1073/pnas.1320962111.
- Valant, Celine; Robert Lane, J.; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur (2012b): The best of both worlds? Bitopic orthosteric/allosteric ligands of g protein-coupled receptors. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 52, S. 153–178. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134514.
- van der Westhuizen, Emma T; Breton, Billy; Christopoulos, Arthur; Bouvier, Michel (2014): Quantification of ligand bias for clinically relevant  $\beta_2$ -adrenergic receptor ligands: implications for drug taxonomy. In: *Molecular pharmacology* 85 (3), S. 492–509. DOI: 10.1124/mol.113.088880.
- van Koppen, C. J.; Nathanson, N. M. (1990): Site-directed mutagenesis of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (34), S. 20887–20892.

- Venkatakrishnan, A. J.; Deupi, Xavier; Lebon, Guillaume; Tate, Christopher G.; Schertler, Gebhard F.; Babu, M. Madan (2013): Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. In: *Nature* 494 (7436), S. 185–194. DOI: 10.1038/nature11896.
- Violin, Jonathan D.; Lefkowitz, Robert J. (2007): Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. In: *Trends in pharmacological sciences* 28 (8), S. 416–422. DOI: 10.1016/j.tips.2007.06.006.
- Vogel, S. S.; Chin, G. J.; Mumby, S. M.; Schonberg, M.; Schwartz, J. H. (1989): G proteins in *Aplysia*: biochemical characterization and regional and subcellular distribution. In: *Brain research* 478 (2), S. 281–292.
- Vogel Lena (2015): Muskarinische M3-Rezeptoren; Einfluss des orthosterischen / allosterischen Epitops Trp 7.35 auf Ligandbindung, Rezeptoraktivierung und Signalweiterleitung. Dissertationsschrift. Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn, Bonn.
- Vögler, Oliver; Barceló, Juana M.; Ribas, Catalina; Escribá, Pablo V. (2008): Membrane interactions of G proteins and other related proteins. In: *Biochimica et biophysica acta* 1778 (7-8), S. 1640–1652. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.03.008.
- Voigtlander, Uta; Jöhren, Kirstin; Mohr, Marion; Raasch, Alexandra; Trankle, Christian; Buller, Stefan et al. (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. In: *Molecular pharmacology* 64 (1), S. 21–31. DOI: 10.1124/mol.64.1.21.
- Waelbroeck, M.; Renzetti, A. R.; Tastenoy, M.; Barlow, R. B.; Christophe, J. (1992): Inactivation of brain cortex muscarinic receptors by 4-diphenylacetoxy-1-(2-chloroethyl) piperidine mustard. In: *Biochemical pharmacology* 44 (2), S. 285–290.
- Waelbroeck, Magali (2003): Allosteric drugs acting at muscarinic acetylcholine receptors. In: *Neurochemical research* 28 (3-4), S. 419–422.
- Ward, S. D.; Curtis, C. A.; Hulme, E. C. (1999): Alanine-scanning mutagenesis of transmembrane domain 6 of the M(1) muscarinic acetylcholine receptor suggests that Tyr381 plays key roles in receptor function. In: *Molecular pharmacology* 56 (5), S. 1031–1041.
- Warne, Tony; Moukhametzianov, Rouslan; Baker, Jillian G.; Nehmé, Rony; Edwards, Patricia C.; Leslie, Andrew G. W. et al. (2011): The structural basis for agonist and partial agonist action on a (1)-adrenergic receptor. In: *Nature* 469 (7329), S. 241–244. DOI: 10.1038/nature09746.
- Wei, Huijun; Ahn, Seungkirl; Shenoy, Sudha K.; Karnik, Sadashiva S.; Hunyady, László; Luttrell, Louis M.; Lefkowitz, Robert J. (2003): Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. In: *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (19), S. 10782–10787. DOI: 10.1073/pnas.1834556100.
- Wess, J. (1993): Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. In: *Trends in pharmacological sciences* 14 (8), S. 308–313.
- Wess, J. (1996): Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. In: *Critical reviews in neurobiology* 10 (1), S. 69–99.
- Wess, Jürgen; Eglén, Richard M.; Gautam, Dinesh (2007): Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. In: *Nature reviews. Drug discovery* 6 (9), S. 721–733. DOI: 10.1038/nrd2379.
- Wess, Jürgen (2004): Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 44, S. 423–450. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121622.
- Wess, Jürgen (2005): Allosteric binding sites on muscarinic acetylcholine receptors. In: *Molecular pharmacology* 68 (6), S. 1506–1509. DOI: 10.1124/mol.105.019141.
- West, Graham M.; Chien, Ellen Y. T.; Katritch, Vsevolod; Gatchalian, Jovylyn; Chalmers, Michael J.; Stevens, Raymond C.; Griffin, Patrick R. (2011): Ligand-dependent perturbation of the conformational ensemble for the GPCR  $\beta_2$  adrenergic receptor revealed by HDX. In: *Structure (London, England : 1993)* 19 (10), S. 1424–1432. DOI: 10.1016/j.str.2011.08.001.
- Whistler, J. L.; Zastrow, M. von (1999): Dissociation of functional roles of dynamin in receptor-mediated endocytosis and mitogenic signal transduction. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (35), S. 24575–24578.
- Woo, Anthony Yiu-Ho; Jozwiak, Krzysztof; Toll, Lawrence; Tanga, Mary J.; Kozocas, Joseph A.; Jimenez, Lucita et al. (2014): Tyrosine 308 is necessary for ligand-directed Gs protein-biased signaling of  $\beta_2$ -adrenoceptor. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (28), S. 19351–19363. DOI: 10.1074/jbc.M114.558882.
- Wood, Michael R.; Hopkins, Corey R.; Brogan, John T.; Conn, P. Jeffrey; Lindsley, Craig W. (2011): "Molecular switches" on mGluR allosteric ligands that modulate modes of pharmacology. In: *Biochemistry* 50 (13), S. 2403–2410. DOI: 10.1021/bi200129s.
- Wootten, Denise; Christopoulos, Arthur; Sexton, Patrick M. (2013): Emerging paradigms in GPCR allostery: implications for drug discovery. In: *Nature reviews. Drug discovery* 12 (8), S. 630–644. DOI: 10.1038/nrd4052.
- Xu, Fei; Wu, Huixian; Katritch, Vsevolod; Han, Gye Won; Jacobson, Kenneth A.; Gao, Zhan-Guo et al. (2011): Structure of an agonist-bound human A2A adenosine receptor. In: *Science (New York, N.Y.)* 332 (6027), S. 322–327. DOI: 10.1126/science.1202793.

- Yan, Feng; Mosier, Philip D.; Westkaemper, Richard B.; Roth, Bryan L. (2008): Galpha-subunits differentially alter the conformation and agonist affinity of kappa-opioid receptors. In: *Biochemistry* 47 (6), S. 1567–1578. DOI: 10.1021/bi701476b.
- Yang, Q.; Lanier, S. M. (1999): Influence of G protein type on agonist efficacy. In: *Molecular pharmacology* 56 (3), S. 651–656.
- Yang, Zequan; Cerniway, Rachael J.; Byford, Anne M.; Berr, Stuart S.; French, Brent A.; Matherne, G. Paul (2002): Cardiac overexpression of A1-adenosine receptor protects intact mice against myocardial infarction. In: *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 282 (3), S. H949-55. DOI: 10.1152/ajpheart.00741.2001.
- Yao, Xiaojie; Parnot, Charles; Deupi, Xavier; Ratnala, Venkata R. P.; Swaminath, Gayathri; Farrens, David; Kobilka, Brian (2006): Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta2-adrenoceptor. In: *Nature chemical biology* 2 (8), S. 417–422. DOI: 10.1038/nchembio801.
- Yeatman, Holly R.; Lane, J. Robert; Choy, Kwok Ho Christopher; Lambert, Nevin A.; Sexton, Patrick M.; Christopoulos, Arthur; Canals, Meritxell (2014): Allosteric modulation of M1 muscarinic acetylcholine receptor internalization and subcellular trafficking. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (22), S. 15856–15866. DOI: 10.1074/jbc.M113.536672.
- Zahn, Katrin; Eckstein, Niels; Trankle, Christian; Sadee, Wolfgang; Mohr, Klaus (2002): Allosteric modulation of muscarinic receptor signaling: alcuronium-induced conversion of pilocarpine from an agonist into an antagonist. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 301 (2), S. 720–728.
- Zhang, J.; Ferguson, S. S.; Law, P. Y.; Barak, L. S.; Caron, M. G. (1999): Agonist-specific regulation of delta-opioid receptor trafficking by G protein-coupled receptor kinase and beta-arrestin. In: *Journal of receptor and signal transduction research* 19 (1-4), S. 301–313. DOI: 10.3109/10799899909036653.
- Zhang, Jin; Zhang, Kaihua; Gao, Zhan-Guo; Paoletta, Silvia; Zhang, Dandan; Han, Gye Won et al. (2014a): Agonist-bound structure of the human P2Y12 receptor. In: *Nature* 509 (7498), S. 119–122. DOI: 10.1038/nature13288.
- Zhang, Kaihua; Zhang, Jin; Gao, Zhan-Guo; Zhang, Dandan; Zhu, Lan; Han, Gye Won et al. (2014b): Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug. In: *Nature* 509 (7498), S. 115–118. DOI: 10.1038/nature13083.
- Zhang, Yongqin; Rodriguez, Alice L.; Conn, P. Jeffrey (2005): Allosteric potentiators of metabotropic glutamate receptor subtype 5 have differential effects on different signaling pathways in cortical astrocytes. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 315 (3), S. 1212–1219. DOI: 10.1124/jpet.105.090308.

Zimmermann Cornelia (2012): Suche nach orthosterisch/allosterischen Hybridagonisten an muskarinischen M1-Rezeptoren durch Analyse von Signalwegaktivierungen. Masterarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn, Bonn.

Zürn, A.; Zabel, U.; Vilardaga, J-P; Schindelin, H.; Lohse, M. J.; Hoffmann, C. (2009): Fluorescence resonance energy transfer analysis of alpha 2a-adrenergic receptor activation reveals distinct agonist-specific conformational changes. In: *Molecular pharmacology* 75 (3), S. 534–541. DOI: 10.1124/mol.108.052399.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

[ <sup>35</sup> S]GTP S	Guanosin-5'- <sup>3</sup> -thiotriphosphat, radioaktiv markiert
Å	Angström
A <sub>2</sub> A-Rezeptor	Adenosin A <sub>2</sub> -Rezeptor
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylzyklase
ACh	Acetylcholin
Ala	Alanin
ANOVA	<i>one-way Analysis of Variance</i>
Aqua dest.	Aqua detillata, destilliertes Wasser
ATG	Startcodon
AUC	<i>Area under the curve</i> (Fläche unter der Kurve)
α <sub>1</sub> , α <sub>2</sub> -Rezeptor	α <sub>1</sub> -Adrenozeptor, α <sub>2</sub> -Adrenozeptor
BRET	Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer
Ca <sup>2+</sup>	zweiwertiges Kalziumion
Ca <sub>v</sub> 1.2	<i>Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CaSR	calciumsensitiver Rezeptor
CHO-Zellen	<i>Chinese hamster ovary cells</i> (Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters) CHO-K <sub>1</sub>
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CCR	Chemokin Rezeptor
Cdc42	<i>Cell division control protein 42 homolog</i>
Ci	Curie (Einheit)
CMV	Cytomegalievirus
cpm	<i>counts per minute</i> (Zerfälle (1/min))
CXCL	Zytokin aus der Familie der CXC-Chemokine
CXCR	Chemokin Rezeptor

DAG	Diacylglycerol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMR	<i>Dynamic mass redistribution</i> (Dynamische Massenumverteilung)
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered-saline</i> , (phosphatgepufferte Salzlösung)
dpm	<i>disintegrations per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
DTT	DL-Dithiothreitol
ECL	<i>extracellular loop</i> (extrazelluläre Schleife)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
FCS/FKS	<i>fetal calf serum</i> , (fetales Kälberserum)
Flp	Rekombinase Flippase
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
FRT	<i>Flp Recombination Target</i>
G Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
G <sub>i</sub> Protein	inhibitorisches G Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GIPs	<i>G protein coupled receptorinteracting proteins</i>
GIRK-Kanal	<i>G protein activated inwardly-rectifying K<sup>+</sup> channel</i> (G Protein-aktivierender einwärts-gleichrichtender K <sup>+</sup> Kanal)
GLPR	<i>glucagon-like peptide 1 receptor</i>
G <sub>s</sub> Protein	stimulatorisches G Protein
Glu	Glutaminsäure
GPCR	<i>G protein coupled receptor</i> (G Protein gekoppelter Rezeptor)
GRAFS	Klassifikationssystem für GPCR: <i>Glutamate, Rhodopsin, Adhesion, Frizzled/Taste2, Secretin</i>
GRK	G protein-coupled receptor kinases (G Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase)
GTP	Guanosintriphosphat
GTP S	Guanosin-5'-O-[ $\gamma$ -thio]-triphosphat



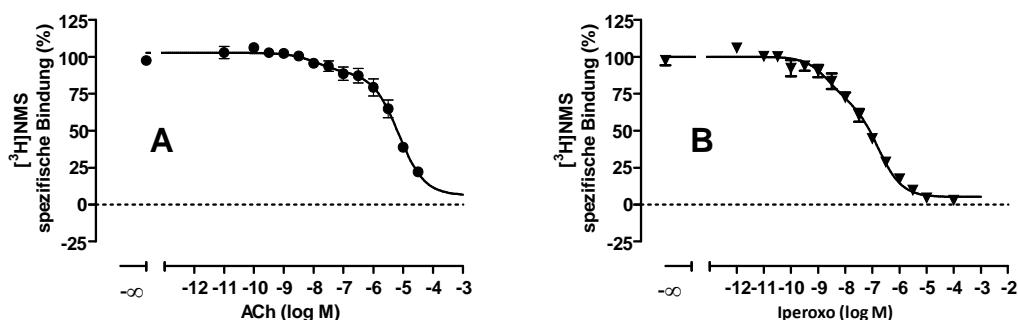
$^3\text{H}$	Tritium ( Radionuklid des Wasserstoffs)
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i> , Pufferlösung
HDAC	Histon-Deacetylasen
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazinyl-1-ethansulfonsäure
HI-Virus	<i>human immunodeficiency virus</i> (humanes Immundefizienz-Virus)
hM <sub>1</sub> -CHO	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, welche stabil mit dem humanen M1-Rezeptor transfiziert sind
hM <sub>3</sub> -CHO	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, welche stabil mit dem humanen M3-Rezeptor transfiziert sind
HSA	Humanes Serumalbumin
HTRF	<i>Homogenous Time Resolved Fluorescence</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ICL	<i>intracellular loop</i> (intrazelluläre Schleife)
IP1,IP3	Inositolmonophosphat, Inositoltriphosphat
JK	Jessica Klöckner
KCNQ	<i>Potassium voltage-gated channel</i>
KEK	Konzentrations-Effekt-Kurve
Lsg.	Lösung
M-Rezeptor	Muskarinrezeptor
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
MAP	<i>mitogen-activated protein</i> ( Mitogen-aktivierendes Protein)
MD-Simulation	Molekular-dynamische (MD)-Simulationen
mGlu	metabotrope Glutamatrezeptor
n	Versuchsumfang, Anzahl der unabhängigen Einzelversuche
n.d.	nicht definiert
n.s.	nicht signifikant
nAChR	nikotinische Acetylcholinrezeptor
NC-IUPHAR	<i>International Committee of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Classification</i>
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>

NMS	N-Methylscopolamin
OPMOD	“ <i>Operational Model of Agonism</i> ”, nach Black und Leff, 1983
P <sub>2</sub> Y <sub>12</sub>	Adenosindiphosphat-Rezeptor
PAM	positiver allosterischer Modulator ( <i>positive allosteric modulator</i> )
PDE	Phosphodiesterase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxonium-Ionen-Konzentration
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphates
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
pm	picometer
POPOP	1,4-Bis(5-phenyloxazol-2-yl)benzen
PPO	2,5-Diphenyloxazol
PTX	Pertussistoxin
Rac (GTPase)	Unterfamilie der Rho GTPase
RGS	<i>Regulators of G protein signaling</i>
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RWG	<i>resonant waveguide grating</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)
SV40	Simian Virus 40
Tb	Terbium
TCM	ternäres Komplexmodell ( <i>ternary complex model</i> )
TM	transmembranäre Domäne
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin

Var	Varianz
wt	Wildtyp
x g	Das Vielfache der mittleren Erdschwerebeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## 9 Anhang

### 9.1 Bindungseigenschaften der orthosterischen Vollagonisten Acetylcholin und Iperoxo an intakten CHO-*hM<sub>1</sub>*-wt-Zellen

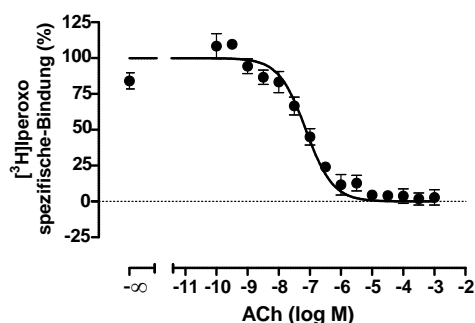


**Abbildung 9. 1:** Einfluss des endogenen Agonisten Acetylcholin (ACh) sowie des orthosterischen Vollagonisten Iperoxo auf die [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindung an lebenden CHO-*hM<sub>1</sub>*-wt-Zellen. Ordinate: [<sup>3</sup>H]NMS-spezifische Bindung in %. 0% entspricht der unspezifischen Bindung (in Anwesenheit von Atropin 10 μM), 100% entspricht der Konzentration des Radioliganden in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Konzentration des Radioliganden betrug 0,2 nM, die Zellzahl betrug 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28°C. Kurvenanpassung: Bei monophasischem Kurvenverlauf unter Verwendung von Gleichung 12, bei biphasischem Kurvenverlauf mit Gleichung 14 (vgl. 3.2.4.2) und nachfolgender Korrektur der resultierenden IC<sub>50</sub> Werte zu K<sub>I</sub> nach Cheng & Prusoff (1973). Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus vier bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	Kurvenanpassung	n	logK <sub>I,1</sub>	logK <sub>I,2</sub>	logK <sub>I</sub>
ACh	biphasisch	2	-8,62 ± 0,15	-5,23 ± 0,18	
	monophasisch	2			-5,71 ± 0,33
Iperoxo	biphasisch	3	-8,68 ± 0,05	-6,84 ± 0,09	
	monophasisch	2			-7,51 ± 0,08

**Tabelle 9. 1:** Kenngrößen der in Abbildung 9.1 dargestellten Gleichgewichtsbindungskurven. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. logK<sub>I,1</sub>: Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante für die niedrig affine Rezeptorpopulation. logK<sub>I,2</sub>: Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante für die hoch affine Rezeptorpopulation. logK<sub>I</sub>: Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante für die Gesamtpopulation. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung der Kurven erfolgte monophasisch mit Gleichung 12 oder biphasisch mit Gleichung 14 und nachfolgender Umrechnung der IC<sub>50</sub> Werte mit Gleichung 8 (vgl. 3.2.4.1).

## 9.2 Bindungseigenschaften des orthosterischen Vollagonisten Acetylcholin an Membranhomogenaten aus CHO-*hM<sub>1</sub>*-wt-Zellen



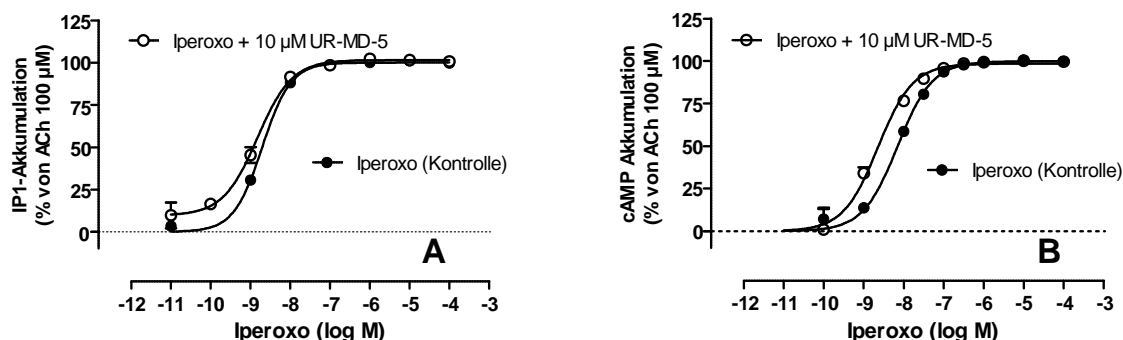
**Abbildung 9. 2: Heterologe Konkurrenz zwischen [<sup>3</sup>H]Iperoxo und ACh an Membranhomogenaten aus CHO-*hM<sub>1</sub>*-wt-Zellen.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]Iperoxo in Prozent der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen [<sup>3</sup>H]Iperoxo-Bindung in Anwesenheit von 10  $\mu$ M Carbachol, 100% entspricht der [<sup>3</sup>H]Iperoxo Gleichgewichtsbindung in Abwesenheit ACh. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des eingesetzten unmarkierten Kompetitors ACh. Die Radioligandkonzentration betrug 0,2 nM, die Inkubationszeit 3h in HEPES (12,5mM)-Puffer (L9), pH 7,4, bei 30°C. Die verwendete Proteinmenge der Membransuspensionen betrug 30-40  $\mu$ g Protein pro Vertiefung. Die nichtlineare Kurvenanpassung erfolgte auf Basis eines kompetitiven Einbindungsstellenmodells, die signifikant besser war, als diejenige für ein kompetitives Zweibindungsstellenmodell nach Gleichung 14 (vgl. 3.2.4.2) mit F=variabel versus F=1=konstant (F-Test,  $p > 0.05$ ). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	$E_{\min} \%$	$E_{\max} \%$	$\log K_I$	n
ACh	= 0	= 100	$-7,25 \pm 0,12$	3

**Tabelle 9. 2: Kenngrößen der in Abbildung 9.2 dargestellten Gleichgewichtsbindungskurven aus heterologen Konkurrenzexperimenten mit dem Radioagonisten [<sup>3</sup>H]Iperoxo an Membranhomogenaten aus CHO-*hM<sub>1</sub>*-wt-Zellen.**  $\log K_I$ : dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsinhibitionskonstante  $K_I$  der Testsubstanz, (vgl. 3.2.4.1, Gl. 8). n: Anzahl der durchgeführten Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von Gleichung 14, mit F=1=konstant, (vgl. 3.2.4.2).

### 9.3 Weiterführende Experimente zur Charakterisierung des allosterischen Fragmentes UR-MD-5 (BQCA<sub>d</sub>)

#### 9.3.1 Das allosterische Fragment UR-MD-5 liefert in Pilotexperimenten Hinweise auf PAM-Eigenschaften hinsichtlich der Iperoxo-induzierten G<sub>s</sub>-Signalwegaktivierung

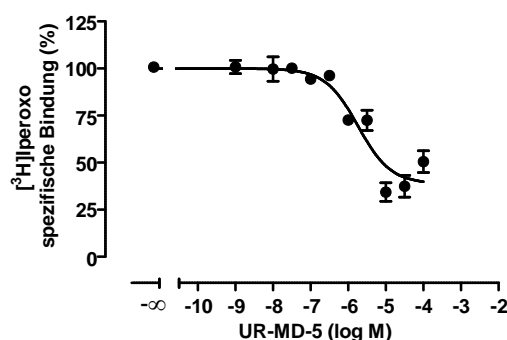


**Abbildung 9. 3: Das allosterische Fragment UR-MD-5 zeigt PAM-Eigenschaften hinsichtlich der Iperoxo-induzierten G<sub>s</sub>-Signalwegaktivierung am muskarinischen hM<sub>1</sub>-Rezeptor.** (A) Repräsentatives Ergebnis eines von zwei IP1-Akkumulationsexperimenten hinsichtlich der Beeinflussung der durch Iperoxo induzierten G<sub>q</sub> Protein-vermittelten Signalwegaktivierung. Ordinate: IP1-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (induziert durch 100 µM Acetylcholin). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration von Iperoxo. Die Zellzahl betrug 100.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler eines Experimentes, das in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt und ein weiteres Mal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt wurde. (B) Repräsentatives Ergebnis eines Experimentes zur Akkumulation von cAMP hinsichtlich der Beeinflussung der durch Iperoxo induzierten G<sub>s</sub> Protein-vermittelten Signalwegaktivierung. Ordinate: cAMP-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale cAMP-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau (bestimmt in Gegenwart von 100 µM Acetylcholin). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration von Iperoxo. Die Zellzahl betrug 50.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler eines Experimentes, das in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt und ein weiteres Mal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt wurde.

	Substanz	E <sub>min</sub> (%)	E <sub>max</sub> (%)	n <sub>H</sub>	log EC <sub>50</sub>
<b>G<sub>q</sub>-Signalweg</b>	Iperoxo (Kontrolle)	= 0	100 ± 1	= 1,00	-8,71 ± 0,02
	Iperoxo + 10 µM UR-MD-5	10 ± 1	102 ± 3	= 1,00	-8,83 ± 0,06
<b>G<sub>s</sub>-Signalweg</b>	Iperoxo (Kontrolle)	= 0	100 ± 1	= 1,00	-8,15 ± 0,04
	Iperoxo + 10 µM UR-MD-5	= 0	99 ± 2	= 1,00	-8,64 ± 0,07* <sup>c</sup>

**Tabelle 9. 3: Kenngrößen der in Abbildung 9. 3 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven.** E<sub>min</sub> %: unteres Plateau der Kurve. E<sub>max</sub>: Maximale IP1-/cAMP-Akkumulation (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve). n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. logEC<sub>50</sub>: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus jeweils eines Experimentes, das in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt und ein weiteres Mal mit dem gleichen Ergebnis wiederholt wurde. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12). \*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße der Kontrollkurve (t- Test, \* p<0,05)

### 9.3.2 Bindungseigenschaften des allosterischen Fragmentes UR-MD-5 an Membranhomogenaten aus CHO-hM<sub>2</sub>-wt-Zellen in Pilotexperimenten



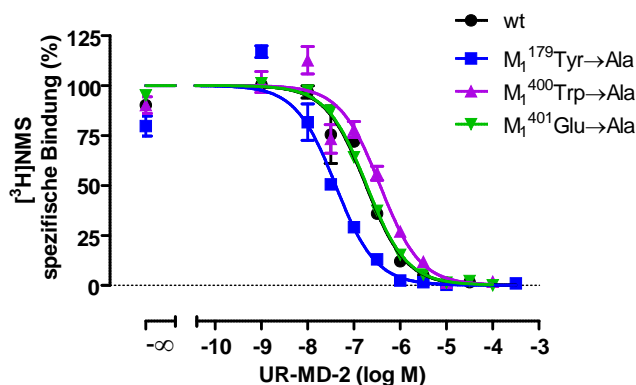
**Abbildung 9. 4: Pilotexperimente bezüglich des modulatorischen Effektes von UR-MD-5 auf die [<sup>3</sup>H]Iperoxo-Gleichgewichtsbindung an Membranhomogenaten aus CHO-hM<sub>2</sub>-wt-Zellen.** (A) Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]Iperoxo (1 nM) in Prozent des Wertes in Abwesenheit einer Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen [<sup>3</sup>H]Iperoxo Bindung (in Anwesenheit von 10 μM Carbachol), 100% entspricht der [<sup>3</sup>H]Iperoxo Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus des jeweils eingesetzten allosterischen Fragmentes (UR-MD-5). Für weitere Details vgl. Kapitel 5.6.2 des Diskussionsteiles dieser Arbeit.

Substanz	Logistische Gleichung (Gl.12)			Ehlerl Modell (Gl.15)		
	E <sub>min</sub> (%)	E <sub>max</sub> (%)	n <sub>H</sub>	log K <sub>A</sub>	log 'c	n
UR-MD-5	39 ± 4	= 100	-1,00	-5,98 ± 0,14	-0,66 ± 0,06	2

**Tabelle 9. 4: Kenngrößen der in Abbildung 9.4 dargestellten Bindungskurve.** E<sub>min</sub>%: unteres Plateau der Kurve. E<sub>max</sub>%: oberes Plateau der Kurve. n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. logK<sub>A</sub>: Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung der Testsubstanz. log 'c: Dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors 'c, mit log 'c < 0, log 'c = 0, log 'c > 0 für negative, neutrale und positive Kooperativität. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die in Form einer Dreifachbestimmungen durchgeführt wurden. Das untere Plateau sowie der Hill-Koeffizient wurden mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12) analysiert. Die erweiterte Analyse der Daten der Modulatoren erfolgte mit Hilfe des ternären Modells allosterischer Modulation unter Anwendung von Gleichung 15. Für weitere Details vgl. Kapitel 5.6.2 des Diskussionsteiles dieser Arbeit.

## 9.4 Weiterführende Experimente zur Charakterisierung des allosterischen Fragmentes UR-MD-2 (TBPBd)

### 9.4.1 Einfluss putativer allosterischer Punktmutationen auf die Bindung von UR-MD-2 an orthosterisch unbesetzte muskarinische $hM_1$ -Rezeptoren



**Abbildung 9. 5: Bedeutung unterschiedlicher Rezeptorpunktmutationen des  $hM_1$ -Rezeptors auf die Gleichgewichtsbindung des allosterischen Fragmentes UR-MD-2.** Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden  $[^3H]NMS$  in Prozent des Wertes in Abwesenheit von Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen  $[^3H]NMS$  Bindung in Anwesenheit von 10  $\mu M$  Atropin, 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug 0,2 nM, die Zellzahl 75.000 Zellen pro Vertiefung in HBSS + HEPES (20 mM) Puffer (L14), pH 7,4, 28 °C. Die Auswertung der Kurven erfolgte mit Hilfe von Gleichung 15, vgl. 3.2.4.2. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Substanz	Rezeptor	$\log K_B$	$\hat{\nu}$	n
UR-MD-2 (AF)	$M_1$ -wt	$-6,68 \pm 0,09$	$<0,0001$	3
	$M_1^{179}Tyr$ Ala	$-6,74 \pm 0,07$	$<0,0001$	3
	$M_1^{400}Trp$ Ala	$-7,40 \pm 0,08^{**}$	$<0,0001$	4
	$M_1^{401}Glu$ Ala	$-6,73 \pm 0,02$	$0,01 \pm 0,008$	4

**Tabelle 9. 5: Kenngrößen der in Abbildung 9.5 dargestellten Bindungskurven.**  $n_H$ : Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit.  $\log K_B$ : Dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Bindung des allosterischen Fragmentes zum orthosterisch unbesetzten Rezeptor.  $\hat{\nu}$ : Kooperativitätsfaktor  $\hat{\nu}$ . n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung der Kurven erfolgte mit Gleichung 15. \*\*: Wert signifikant verschieden von der entsprechenden Kenngröße des  $hM_1$ -wt-Rezeptors (t- Test,  $**p < 0,01$ ).



### 9.4.2 Bindungseigenschaften des allosterischen Fragmentes UR-MD-2 (TBPBd) an Membranhomogenaten aus CHO-*hM*<sub>1</sub>-*hM*<sub>5</sub>-wt-Zellen in Pilotexperimenten

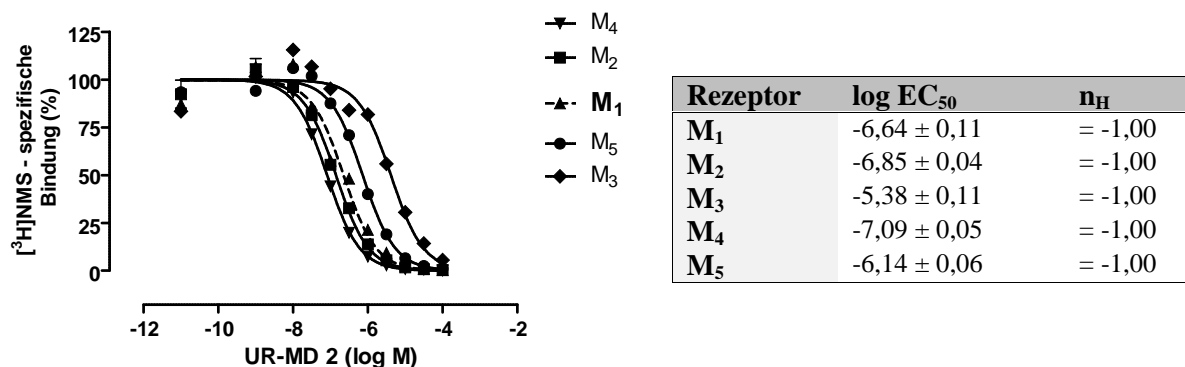
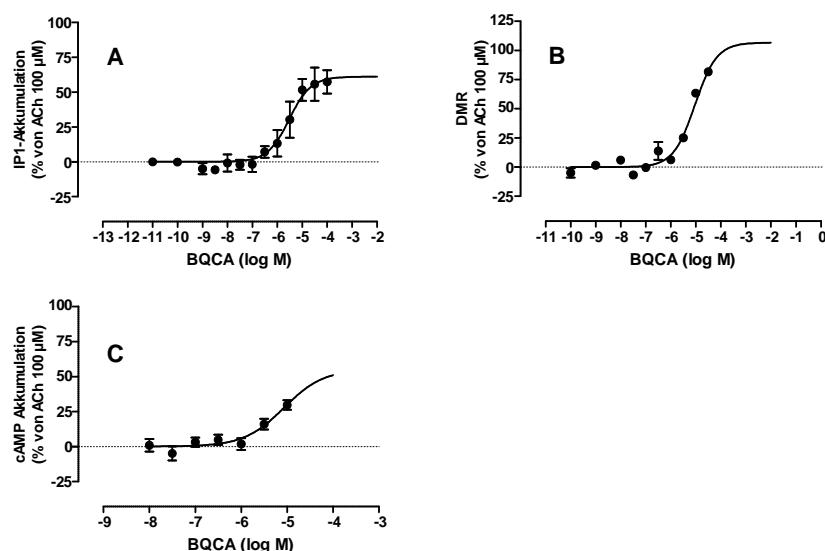


Abbildung 9. 6: Pilotexperimente zur Interaktion von [<sup>3</sup>H]NMS mit UR-MD-2 an Rezeptoren in Membransuspensionen aus CHO-*hM*<sub>1</sub>, *hM*<sub>2</sub>, *hM*<sub>3</sub>, *hM*<sub>4</sub> und *hM*<sub>5</sub>-Zellen mit Kennzahlen. Ordinate: spezifische Bindung des Radioliganden [<sup>3</sup>H]NMS in Prozent des Wertes in Abwesenheit von Testsubstanz. 0% entspricht der unspezifischen [<sup>3</sup>H]NMS-Bindung in Anwesenheit von Atropin 10 μM, 100% entspricht der Bindung in Abwesenheit einer Testsubstanz. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der eingesetzten Testsubstanz. Die Radioligandkonzentration betrug 0,2 nM. Die Proteinmenge betrug 20-40 μg pro Vertiefung in HEPES (12,5 mM) Puffer (L9), pH 7,4, 30 °C. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus jeweils einem Pilotexperiment, das in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. logEC<sub>50</sub>: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit.

## 9.5 Kontrolleexperimente zur Wirkung des positiv allosterischen Modulators BQCA am muskarinischen $hM_1$ -Rezeptor

### 9.5.1 Untersuchung des allosterisch agonistischen Effektes von BQCA in IP1- und cAMP-Akkumulations- sowie DMR-Experimenten



**Abbildung 9. 7: Durch BQCA induzierte IP1- und cAMP-Akkumulation sowie dynamische Massenumverteilung (DMR) in CHO- $hM_1$ -wt-Zellen.** (A) Ordinate: IP1-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale IP1-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau in Gegenwart von Acetylcholin 100  $\mu$ M. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration von BQCA. Die Zellzahl betrug 100.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden. (B) Konzentrations-Wirkungskurve für den Effekt der Zellantwort (DMR) von BQCA im Epic-System<sup>R</sup>. Ordinate: Um den Puffereffekt korrigierte Zellantwort in Prozent. 0% = Puffereffekt, 100% = DMR-Effekt in Gegenwart von 100  $\mu$ M ACh unter Kontrollbedingungen. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testverbindung. Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier voneinander unabhängigen Experimenten, die als Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). (C) Ordinate: cAMP-Akkumulation in %. 0% entspricht dem unteren Plateau (basale cAMP-Akkumulation in Abwesenheit einer Testsubstanz) und 100% dem oberen Plateau in Gegenwart von 100  $\mu$ M Acetylcholin. Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration von BQCA. Die Zellzahl betrug 50.000 Zellen pro Vertiefung. Kurvenanpassung: „Vier-Parameter-logistische-Gleichung“ (Gleichung 12). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung ausgeführt wurden.

Substanz	Versuch	log EC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)	n <sub>H</sub>	n
BQCA	IP1-Akkumulation	-5,52 $\pm$ 0,17	61 $\pm$ 6	= 1,00	5
BQCA	DMR	-5,03 $\pm$ 0,14	107 $\pm$ 13	= 1,00	4
BQCA	cAMP-Akkumulation	-5,07 $\pm$ 0,37	55 $\pm$ 26	= 1,00	3

**Tabelle 9. 6: Kenngrößen der in Abbildung 9.7 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven des Agonisten BQCA.** logEC<sub>50</sub>: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des Agonisten, die einen halbmaximalen Effekt hervorruft. E<sub>max</sub>: Maximale IP1-/cAMP-Akkumulation, bzw. maximaler DMR (oberes Plateau der Konzentrations-Wirkungs-Kurve). n<sub>H</sub>: Hill-Koeffizient, Maßzahl für die Kurvensteilheit. n: Anzahl unabhängiger Experimente. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten, die jeweils in Form einer Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der „Vier-Parameter-logistischen-Gleichung“ (Gleichung 12).

## 9.6 Quantifizierung eines „Ligand-Bias“ auf der Grundlage von DMR-Daten

DMR (alle Signalwege)				
Substanz	Substitution	Referenzagonist ACh	Referenzagonist Iperoxo	n
		$\log(\tau/K_A)$	$\log(\tau/K_A)$	
ACh	-	<b>6,41 ± 0,04</b>	6,38 ± 0,09 <sup>***</sup>	4
Iperoxo	-	8,65 ± 0,04 <sup>***</sup>	<b>8,82 ± 0,05</b>	13
Pilocarpin	-	5,95 ± 0,12 <sup>*</sup>	5,32 ± 0,11 <sup>***</sup>	4
JK 384	F	6,78 ± 0,10 <sup>*</sup>	6,54 ± 0,15 <sup>***</sup>	3
JK 550	F	6,98 ± 0,11 <sup>**</sup>	7,15 ± 0,33 <sup>***</sup>	3
JK 549	Br	6,80 ± 0,12 <sup>*</sup>	6,44 ± 0,15 <sup>***</sup>	3
JK 596	F,Cl	6,72 ± 0,12 <sup>*</sup>	6,36 ± 0,18 <sup>***</sup>	3
JK 491	Br	7,65 ± 0,08 <sup>***</sup>	7,62 ± 0,11 <sup>***</sup>	3
JK 537	F	6,47 ± 0,11	6,21 ± 0,11 <sup>***</sup>	4
JK 559	F,Cl	6,26 ± 0,11	5,82 ± 0,18 <sup>***</sup>	3

Tabelle 9. 7: Transduktionskoeffizienten ermittelt nach Shonberg et al. 2014 von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Iperoxo/BQCAD-Hybridsubstanzen (Substanzserie 1) auf der Basis von DMR-Daten am  $hM_1$ -wt-Rezeptor unter Verwendung des Referenzagonisten ACh (links) oder Iperoxo (rechts). F/Cl/Br: Fluor-, Chlor-, Brom-Substitution.  $\log(\tau/K_A)$ : Transduktionskoeffizienten nach Kenakin et al. 2012 ermittelt aus „gepoolten“ Datensätzen. n: Anzahl der Einzelerperimente. Die Transduktionskoeffizienten wurden durch globale Regressionsanalyse mit Hilfe von Gleichung 37 ermittelt. Dabei wurden die Parameter „bottom“ = konstant = 0 % und der Maximaleffekt  $E_{\max}$ , definiert durch 100  $\mu$ M Acetylcholin, als  $E_{\max} = 100$  % = konstant behandelt. Die  $\log(\tau/K_A)$ -Werte der als Referenz verwendeten Agonisten wurden jeweils hervorgehoben. \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant unterschiedlich zum Transduktionskoeffizienten ( $\log(\tau/K_A)$ ) des jeweiligen Referenzagonisten (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

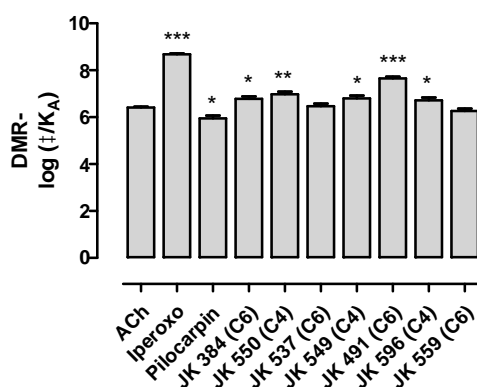
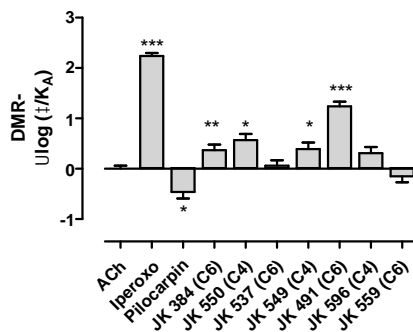


Abbildung 9. 8: Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Hybridsubstanzen (Substanzserie 1) ermittelt auf der Basis von DMR-Daten.  $\log(\tau/K_A)$ : Transduktionskoeffizienten nach Kenakin et al. 2012, ermittelt aus „gepoolt“ ausgewerteten Versuchstagen. Die Transduktionskoeffizienten wurden durch globale Regressionsanalyse mit Hilfe von Gleichungen 37 ermittelt. Dabei wurden die Parameter „bottom“ = konstant = 0 % und der Maximaleffekt  $E_{\max}$ , definiert durch 100  $\mu$ M Acetylcholin, als  $E_{\max} = 100$  % = konstant behandelt. Dargestellt sind die in Tabelle 9.4 aufgeführten Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant unterschiedlich zum Transduktionskoeffizienten  $\log(\tau/K_A)$  des Referenzagonisten (ACh) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

DMR (alle Signalwege)			
	Referenzagonist ACh	Referenzagonist Iperoxo	
Substanz	$\log(1/K_A)$	$\log(1/K_A)$	n
ACh	<b>0,00 ± 0,06</b>	-2,44 ± 0,10 <sup>***</sup>	4
Iperoxo	-2,24 ± 0,06 <sup>***</sup>	<b>0,00 ± 0,07</b>	13
Pilocarpin	-0,46 ± 0,13 <sup>*</sup>	-3,50 ± 0,13 <sup>***</sup>	4
JK 384	-0,37 ± 0,11 <sup>**</sup>	-2,28 ± 0,16 <sup>***</sup>	3
JK 550	-0,57 ± 0,12 <sup>*</sup>	-1,67 ± 0,33 <sup>***</sup>	3
JK 549	-0,39 ± 0,13 <sup>*</sup>	-2,38 ± 0,15 <sup>***</sup>	3
JK 596	-0,31 ± 0,12	-2,46 ± 0,19 <sup>***</sup>	3
JK 491	-1,24 ± 0,09 <sup>***</sup>	-1,20 ± 0,12 <sup>***</sup>	3
JK 537	-0,06 ± 0,11	-2,31 ± 0,12 <sup>***</sup>	4
JK 559	-0,15 ± 0,12	-3,00 ± 0,19 <sup>***</sup>	3

**Tabelle 9. 8: Normalisierte Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Hybridsubstanzen (Substanzserie 1) auf Basis von DMR-Daten am  $hM_1$ -wt-Rezeptor.**  $\log(1/K_A)$ : Transduktionskoeffizienten, normalisiert nach Kenakin et al. 2012, ermittelt aus „gepoolten“ Daten aller Versuchstage. n: Anzahl der Einzelexperimente; die Werte wurden mit Hilfe von Gleichung 38 ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 errechnet. Die  $\log(1/K_A)$ -Werte der jeweils als Referenz verwendeten Agonisten wurden hervorgehoben. \*, \*\*, \*\*\*: Wert signifikant unterschiedlich zum Transduktionskoeffizienten  $\log(1/K_A)$  des jeweiligen Referenzagonisten (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).



**Abbildung 9. 9: Normalisierte Transduktionskoeffizienten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben dualsterischen Hybridsubstanzen (Substanzserie 1) ermittelt auf der Basis von DMR-Daten.**  $\log(1/K_A)$ : Transduktionskoeffizienten  $\log(1/K_A)$  der zu untersuchenden Substanzen, normalisiert nach Kenakin et al. 2012, die Werte wurden mit Hilfe von Gleichung 38 ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 40 errechnet. \*, \*\*, \*\*\*: signifikant unterschiedlich zum Transduktionskoeffizienten ( $\log(1/K_A)$ ) des Referenzagonisten (ACh) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

<b>IP1-Akkumulation (G<sub>i</sub>-Signalweg) – DMR (alle Signalwege)</b>			
<b>Referenzagonist ACh</b>		<b>Referenzagonist Iperoxo</b>	
<b>Substanz</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>
<b>ACh</b>	<b>0,00 ± 0,09</b>	0,43 ± 0,12**	7
<b>Iperoxo</b>	-0,18 ± 0,08	<b>0,00 ± 0,08</b>	16
<b>Pilocarpin</b>	-0,62 ± 0,14**	0,40 ± 0,15*	7
<b>JK 384</b>	-0,70 ± 0,13***	-0,14 ± 0,18	6
<b>JK 550</b>	-0,86 ± 0,15***	-0,60 ± 0,35*	7
<b>JK 549</b>	-1,04 ± 0,16***	-0,35 ± 0,19	7
<b>JK 596</b>	-0,31 ± 0,14	0,48 ± 0,17**	6
<b>JK 491</b>	-1,34 ± 0,11***	-0,96 ± 0,13***	6
<b>JK 537</b>	-0,70 ± 0,13***	-0,48 ± 0,13**	8
<b>JK 559</b>	-0,18 ± 0,15	0,58 ± 0,21**	6

**Tabelle 9. 9:** log( /K<sub>A</sub>)-Werte ermittelt durch Differenzbildung zwischen normalisierten Transduktionskoeffizienten log( /K<sub>A</sub>) der IP1-Akkumulations- und der DMR-Daten von ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben Hybridsubstanzen (Substanzserie 1). log( /K<sub>A</sub>): Differenz der normalisierte Transduktionskoeffizienten, berechnet nach Kenakin et al. 2012 und ermittelt aus „gepoolten“ Daten aller Versuchstage beider Signalwege. n: Anzahl der Einzelerperimente; die Werte wurden mit Hilfe von Gleichung 39 ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehler wurden unter Beachtung der Fehlerfortpflanzung mit Gleichung 41 errechnet. Die log( /K<sub>A</sub>)-Werte der jeweils als Referenz verwendeten Agonisten wurden hervorgehoben. \*, \*\*, \*\*\*: log( /K<sub>A</sub>)-Wert signifikant unterschiedlich vom log( /K<sub>A</sub>)-Wert des jeweiligen Referenzagonisten (t-Test, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001).

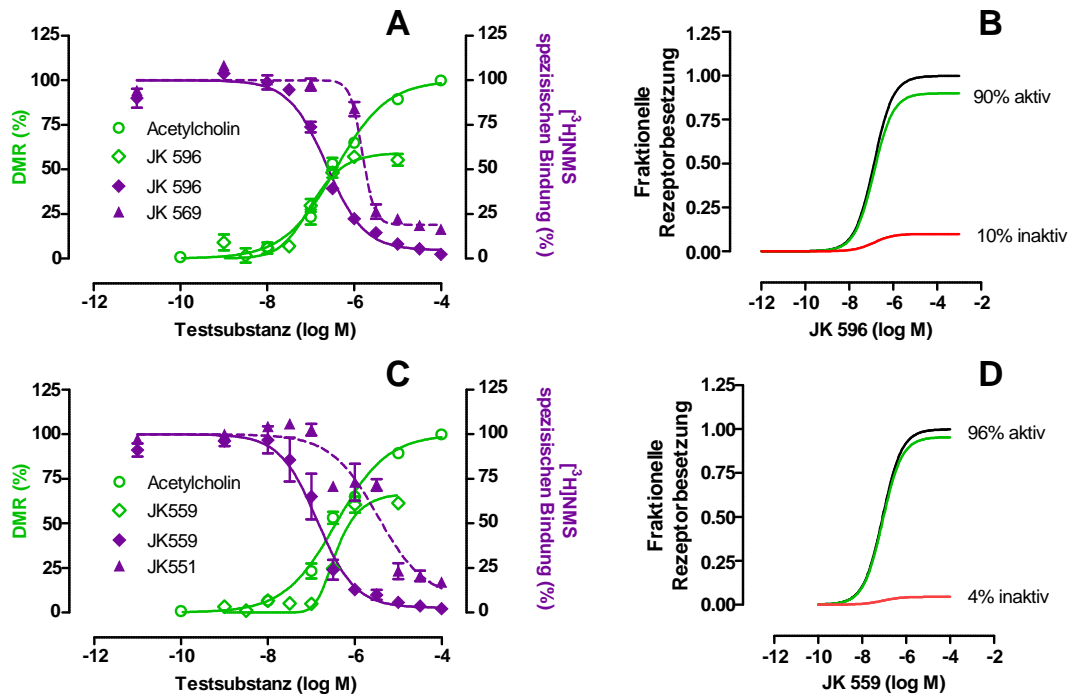
<b>DMR (alle Signalwege) – [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindung (G<sub>i</sub>-Signalwegsaktivierung)</b>			
<b>Referenzagonist ACh</b>		<b>Referenzagonist Iperoxo</b>	
<b>Substanz</b>	<b>G log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>G log( /K<sub>A</sub>)</b>	<b>n</b>
<b>ACh</b>	<b>0,00 ± 0,12</b>	-0,11 ± 0,22	9
<b>Iperoxo</b>	-0,14 ± 0,13	<b>0,00 ± 0,14</b>	18
<b>JK 384</b>	-0,49 ± 0,37	-0,20 ± 0,45	7
<b>JK 550</b>	n.d.	n.d.	6
<b>JK 549</b>	-1,65 ± 0,41**	-1,89 ± 0,42***	8
<b>JK 596</b>	-2,89 ± 0,57***	-3,31 ± 0,62***	8
<b>JK 491</b>	-0,36 ± 0,24	-0,32 ± 0,30	6
<b>JK 537</b>	-1,41 ± 0,37**	-1,11 ± 0,49**	7
<b>JK 559</b>	-2,23 ± 0,37***	-3,09 ± 0,33***	8

**Tabelle 9. 10:** log( /K<sub>A</sub>)-Werte, ermittelt durch Differenzbildung zwischen normalisierten Transduktionskoeffizienten log( /K<sub>A</sub>) der DMR-Daten und der [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsdaten für ACh, Iperoxo sowie der sieben Hybridsubstanzen (Substanzserie 1). log( /K<sub>A</sub>): Differenz der Transduktionskoeffizienten, normalisiert nach Kenakin et al. 2012 und ermittelt aus „gepoolten“ Daten aller Versuchstage der DMR- und der [<sup>35</sup>S]GTP S-Bindungsdaten. n: Anzahl der Einzelerperimente; die Werte wurden mit Hilfe von Gleichung 39 ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 41 errechnet. Die log( /K<sub>A</sub>)-Werte der jeweils als Referenz verwendeten Agonisten wurden hervorgehoben. \*, \*\*, \*\*\*: log( /K<sub>A</sub>)-Wert signifikant unterschiedlich vom log( /K<sub>A</sub>)-Wert des jeweiligen Referenzagonisten (t-Test, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001) .n.d.: nicht definiert.

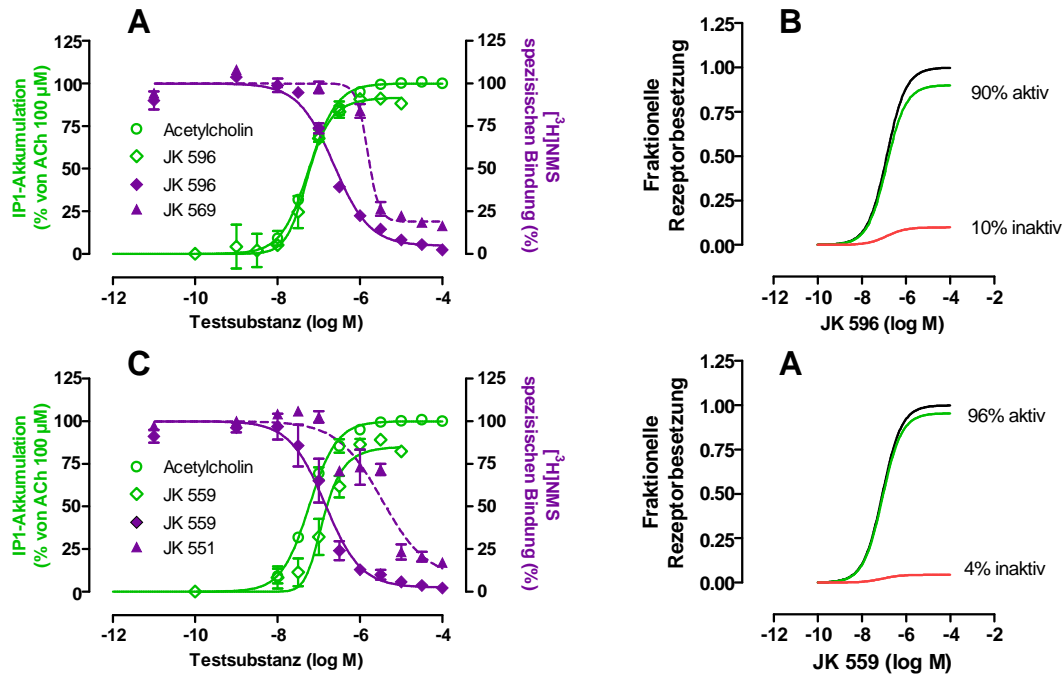
<b>DMR (alle Signalwege) – cAMP-Akkumulation (G<sub>s</sub>-Signalweg)</b>				
	<b>Referenzagonist ACh</b>		<b>Referenzagonist Iperoxo</b>	
<b>Substanz</b>	<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>		<b>log( /K<sub>A</sub>)</b>	
				<b>n</b>
<b>ACh</b>	<b>0,00 ± 0,26</b>		-0,02 ± 0,35	7
<b>Iperoxo</b>	-0,19 ± 0,20		<b>0,00 ± 0,42</b>	<b>16</b>
<b>Pilocarpin</b>	-0,32 ± 0,20		-0,30 ± 0,44	7
<b>JK 384</b>	-0,28 ± 0,25		-0,62 ± 0,42	6
<b>JK 550</b>	-0,67 ± 0,32		-0,71 ± 0,52	6
<b>JK 549</b>	-0,54 ± 0,28		-0,04 ± 0,41	6
<b>JK 596</b>	-0,54 ± 0,30		-0,91 ± 0,36	8
<b>JK 491</b>	-0,96 ± 0,23*		-0,85 ± 0,34	6
<b>JK 537</b>	-0,48 ± 0,24		-0,44 ± 0,36	7
<b>JK 559</b>	-0,50 ± 0,28		-1,07 ± 0,42	6

**Tabelle 9. 11:** log( /K<sub>A</sub>)-Werte ermittelt durch Differenzbildung zwischen normalisierten Transduktionskoeffizienten log( /K<sub>A</sub>) der DMR-Daten und der cAMP-Akkumulationsdaten für ACh, Iperoxo und Pilocarpin sowie der sieben Hybridsubstanzen (Substanzserie 1). log( /K<sub>A</sub>): Differenz der Transduktionskoeffizienten, normalisiert nach Kenakin et al. 2012 und ermittelt aus „gepoolten“ Daten aller Versuchstage der DMR-Daten und der cAMP-Akkumulations-daten. n: Anzahl der Einzelexperimente; die Werte wurden mit Hilfe von Gleichung 39 ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes aus n unabhängigen Experimenten. Die Fehlerfortpflanzung wurde unter Verwendung von Gleichung 41 errechnet. Die log( /K<sub>A</sub>)-Werte der jeweils als Referenz verwendeten Agonisten wurden hervorgehoben\*: log( /K<sub>A</sub>)-Wert signifikant unterschiedlich vom log( /K<sub>A</sub>)-Wert des jeweiligen Referenzagonisten (t-Test, \*p<0,05).

### 9.7 Globale Analyse der [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungs- sowie der Funktionsdaten der dualsterischen Iperoxo/BQCA-d-Hybridliganden JK 596, JK 559 sowie JK 549 und JK 491

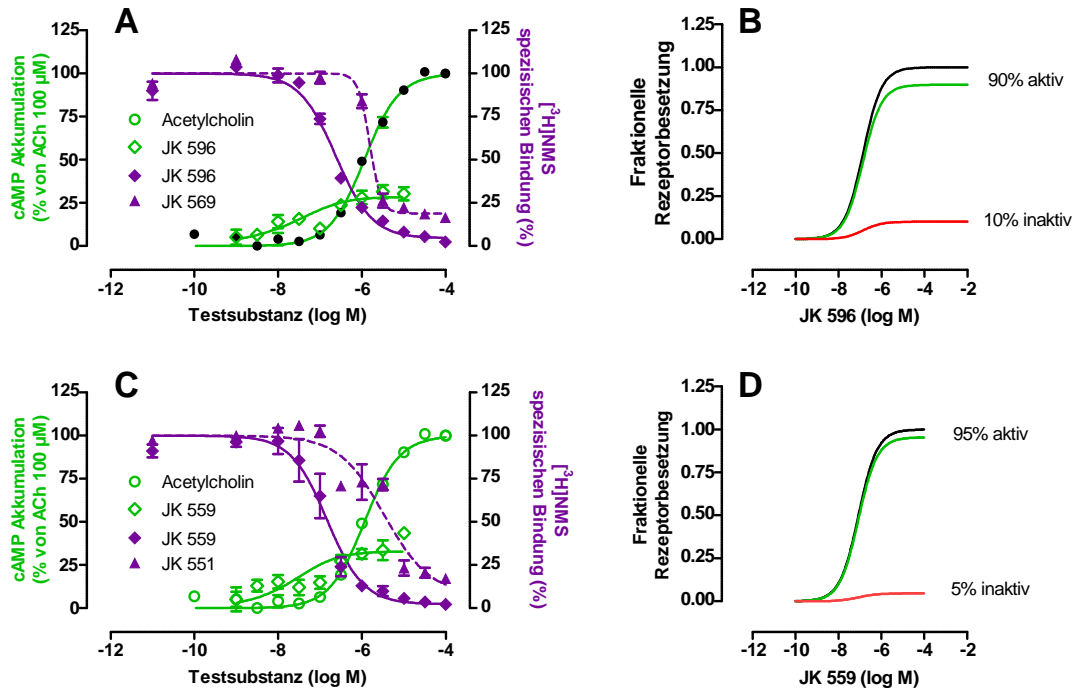


**Abbildung 9. 10:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von DMR- und [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 596 (C<sub>4</sub>), JK 559 (C<sub>6</sub>) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 569 (C<sub>4</sub>) und JK 551 (C<sub>6</sub>) an CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen. (A, C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven (DMR: Referenzagonist ACh, dualsterisches Hybrid; Bindungsdaten: dualsterisches Hybrid und allosterisches Fragment), Ordinate: ACh und Hybrid-induzierter Effekt der dynamischen Massenumverteilung (DMR) in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindung in Gegenwart des dualsterischen Hybrides und seines allosterischen Bausteins in Prozent der Bindung in Abwesenheit von Tests substanz an intakten CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung der Gleichungen 20, 17 (mit 21) und 22 für Details vgl. 3.2.4.2. (B, D) Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch das Hybrid in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichungen 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.

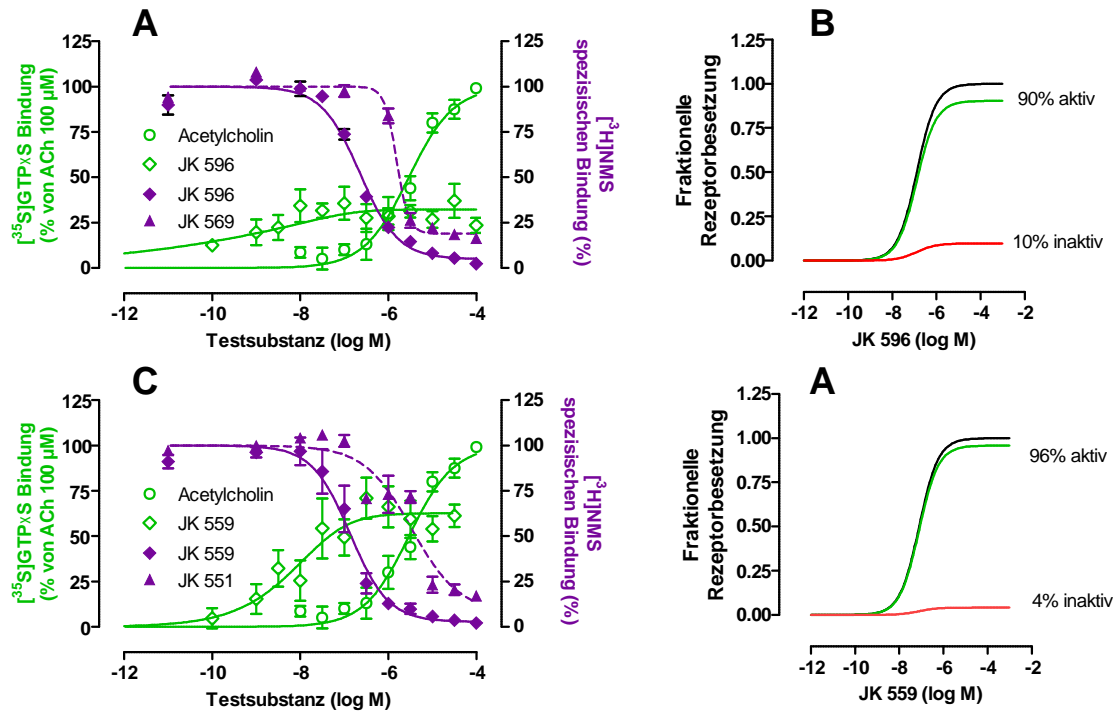


**Abbildung 9. 11:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1-Akkumulations- und  $[\text{}^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 596 ( $\text{C}_4$ ), JK 559 ( $\text{C}_6$ ) sowie ihre allosterischen Fragmente JK 569 ( $\text{C}_4$ ) und JK 551 ( $\text{C}_6$ ) an CHO- $h\text{M}_1$ -wt-Zellen. (A, C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven (IP1-Akkumulation: Referenzagonist ACh, dualsterisches Hybrid; Bindungsdaten: dualsterisches Hybrid und allosterisches Fragment), Ordinate: ACh und Hybrid induzierte-IP1-Akkumulation in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[\text{}^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung in Gegenwart des dualsterischen Hybrides und seines allosterischen Bausteins in Prozent der Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz an intakten CHO-Flp- $h\text{M}_1$ -wt Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven Sets unter Verwendung der Gleichungen 20, 17 (mit 21) und 22 für Details vgl. 3.2.4.2. (B, D) Konzentrationsabhängige, maximale fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch das Hybrid in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichungen 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurde.

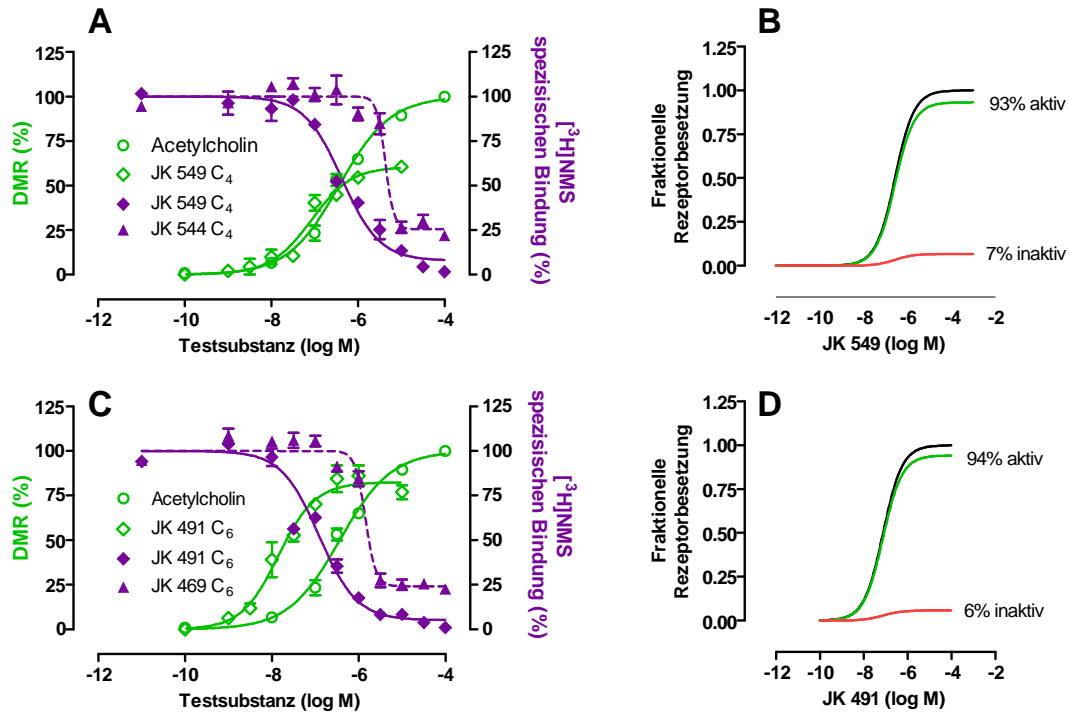




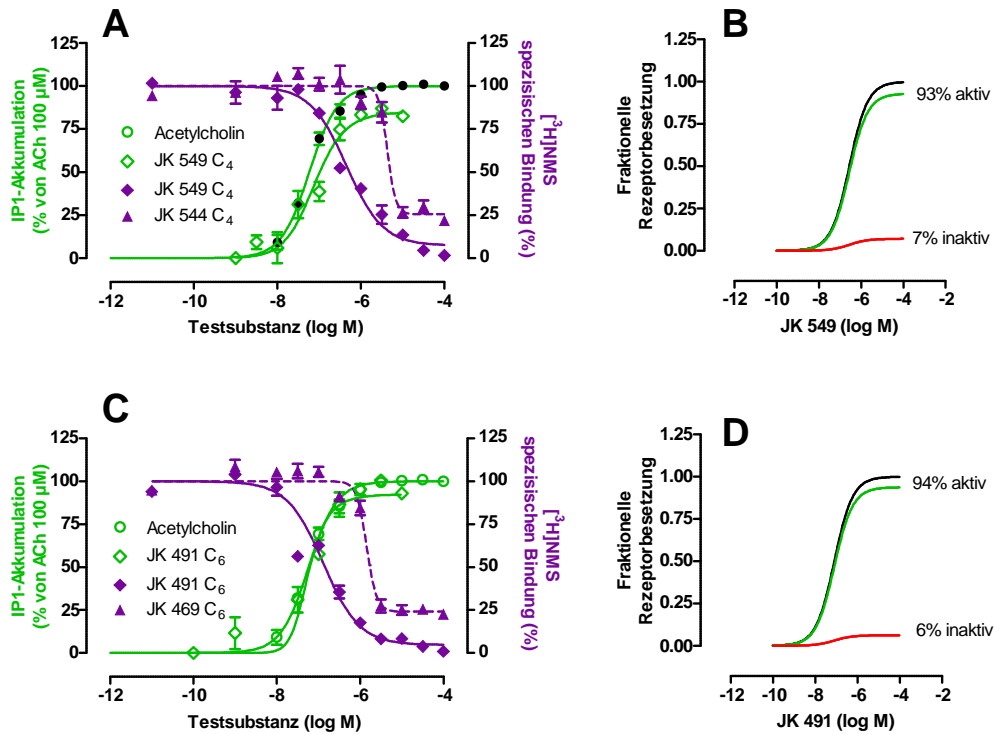
**Abbildung 9.12:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von cAMP-Akkumulations- und  $[^3\text{H}]$ NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 596 (C<sub>4</sub>), JK 559 (C<sub>6</sub>) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 569 (C<sub>4</sub>) und JK 551 (C<sub>6</sub>) an CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven (cAMP-Akkumulation: Referenzagonist ACh, dualsterisches Hybrid; Bindungsdaten: dualsterisches Hybrid und allosterisches Fragment), Ordinate: ACh und Hybrid-induzierte-cAMP-Akkumulation in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3\text{H}]$ NMS-Gleichgewichtsbindung in Gegenwart des dualsterischen Hybrides und seines allosterischen Bausteines in Prozent der Bindung in Abwesenheit von Tests substanz an intakten CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung der Gleichungen 20, 17 (mit 21) und 22, für Details vgl. 3.2.4.2. (B, D) Konzentrationsabhängige fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch das Hybrid in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichungen 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.



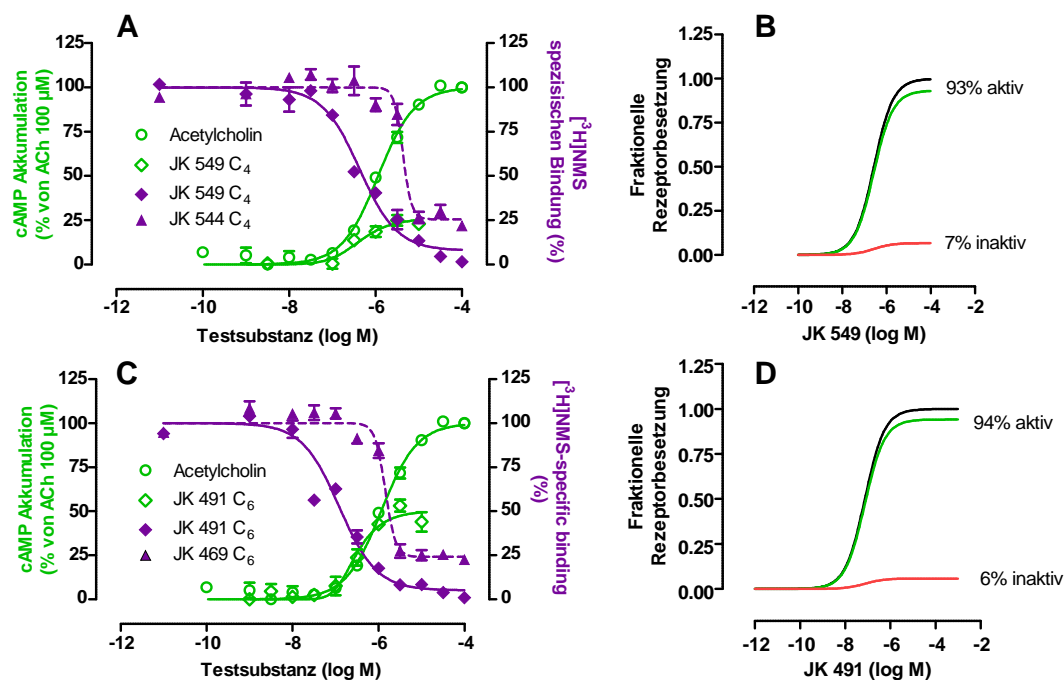
**Abbildung 9.13:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ - und  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 596 ( $\text{C}_4$ ), JK 559 ( $\text{C}_6$ ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 569 ( $\text{C}_4$ ) und JK 551 ( $\text{C}_6$ ) an lebenden intakten sowie Membranen aus CHO- $h\text{M}_1$ -wt-Zellen. (A, C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven ( $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindung: Referenzagonist ACh, dualsterisches Hybrid; Bindungsdaten: dualsterisches Hybrid und allosterisches Fragment), Ordinate: Durch ACh und das jeweilige Hybrid induzierte-Förderung der  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindung in Prozent der Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung in Gegenwart des dualsterischen Hybrides und seines allosterischen Bausteines in Prozent an intakten CHO- $h\text{M}_1$ -wt-Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung der Gleichungen 20, 17 (mit 21) und 22, für Details vgl. 3.2.4.2. (B, D) Konzentrationsabhängige fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch das Hybrid in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichungen 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.



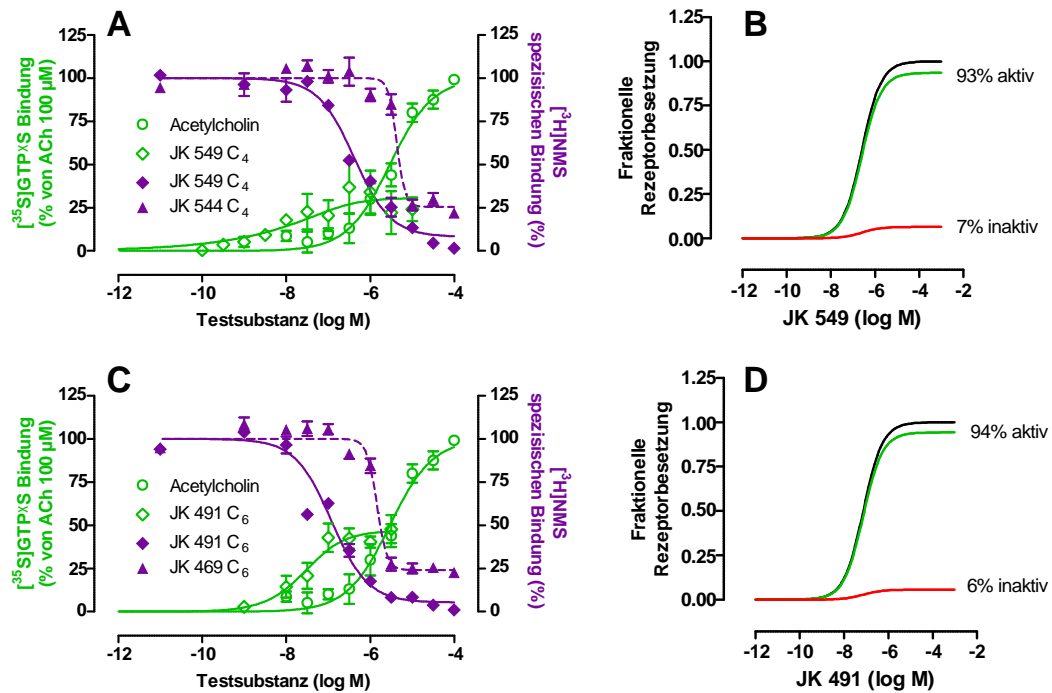
**Abbildung 9.14:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von DMR- und  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 549 (C<sub>4</sub>), JK 491 (C<sub>6</sub>) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 544 (C<sub>4</sub>) und JK 469 (C<sub>6</sub>) an intakten lebenden CHO $hM_1$ -wt-Zellen. (A, C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven (DMR: Referenzagonist ACh, dualsterisches Hybrid; Bindungsdaten: dualsterisches Hybrid und allosterisches Fragment), Ordinate: ACh und Hybrid-induzierter Effekt der dynamischen Massenverteilung (DMR) in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung in Gegenwart des dualsterischen Hybrides und seines allosterischen Bausteins in Prozent der Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz an intakten CHO- $hM_1$ -wt-Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung von Gleichungen 20, 17 (mit 21) und 22 für Details vgl. 3.2.4.2. (B, D) Konzentrationsabhängige fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch das Hybrid in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichungen 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Drei- oder Vierfachbestimmung durchgeführt wurden.



**Abbildung 9. 15:** Ergebnisse der der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von IP1-Akkumulations- und [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 549 (C<sub>4</sub>), JK 491 (C<sub>6</sub>) sowie ihre allosterischen Fragmente JK 544 (C<sub>4</sub>) und JK 469 (C<sub>6</sub>) an intakten CHO-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven (IP1-Akkumulation: Referenzagonist ACh, dualsterisches Hybrid; Bindungsdaten: dualsterisches Hybrid und allosterisches Fragment), Ordinate: ACh und Hybrid-induzierte IP1-Akkumulation in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische [<sup>3</sup>H]NMS-Gleichgewichtsbindung in Gegenwart des dualsterischen Hybrides und seines allosterischen Bausteins in Prozent der Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz an intakten CHO-Flp-*hM*<sub>1</sub>-wt-Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven Sets unter Verwendung der Gleichungen 20, 17 (mit 21) und 22, für Details vgl. 3.2.4.2. (B, D) Konzentrationsabhängige fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch das Hybrid in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichungen 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte ± Standardfehler aus drei bis vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.



**Abbildung 9. 16:** Ergebnisse der der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von cAMP-Akkumulation- und  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 549 ( $\text{C}_4$ ), JK 491 ( $\text{C}_6$ ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 544 ( $\text{C}_4$ ) und JK 469 ( $\text{C}_6$ ) an  $\text{CHO-hM}_1\text{-wt}$ -Zellen. (A, C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven (cAMP-Akkumulation: Referenzagonist ACh, dualsterisches Hybrid; Bindungsdaten: dualsterisches Hybrid und allosterisches Fragment), Ordinate: ACh und Hybrid-induzierte-cAMP-Akkumulation in Prozent (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung in Gegenwart des dualsterischen Hybrides und seines allosterischen Bausteines in Prozent der Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz an intakten  $\text{CHO-hM}_1\text{-wt}$ -Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung der Gleichungen 20, 17 (mit 21) und 22, für Details vgl. 3.2.4.2. (B, D) Konzentrationsabhängige fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch das Hybrid in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichungen 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.



**Abbildung 9.17:** Ergebnisse der globalen Analyse basierend auf dem „Operational Model of Agonism for Dynamic Ligands“, ermittelt mit Hilfe von  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ - und  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindungsdaten der dualsterischen Hybride JK 549 ( $\text{C}_4$ ), JK 491 ( $\text{C}_6$ ) sowie ihrer allosterischen Fragmente JK 544 ( $\text{C}_4$ ) und JK 469 ( $\text{C}_6$ ) an lebenden intakten sowie Membranen aus CHO- $h\text{M}_1$ -wt-Zellen. (A,C) Kurvensets der simultanen, globalen Analyse bestehend aus vier Kurven ( $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindung: Referenzagonist ACh, dualsterisches Hybrid; Bindungsdaten: dualsterisches Hybrid und allosterisches Fragment), Ordinate: ACh und Hybrid-induzierte-Förderung der  $[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$ -Bindung in Prozent der Bindung in Abwesenheit von Testsubstanz (linke Ordinate) sowie die spezifische  $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung in Gegenwart des dualsterischen Hybrides und seines allosterischen Bausteines in Prozent an intakten CHO- $h\text{M}_1$ -wt-Zellen (rechte Ordinate). Globale Kurvenanalyse von Sets aus vier Kurven unter Verwendung der Gleichungen 20, 17 (mit 21) und 22, für Details vgl. 3.2.4.2. (B, D) Konzentrationsabhängige fraktionelle Rezeptorbesetzung des Rezeptors durch das Hybrid in der aktiven und der inaktiven Bindungspose, ermittelt mit Hilfe der Gleichungen 26 und 27 (vgl. 3.2.4.2). Datenpunkte: Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler aus drei bis fünf unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, die jeweils in Form einer Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

## 10 Veröffentlichungen

### Publikationen

Engelhardt, Benjamin; **Holze, Janine**; Elliott, Christina; Baillie, George S.; Kschischo, Maik; Fröhlich, Holger (2017): Modelling and mathematical analysis of the M2 receptor-dependent joint signalling and secondary messenger network in CHO cells. In: *Mathematical medicine and biology : a journal of the IMA*. DOI: 10.1093/imammb/dqx003.

Min, Anna de; Matera, Carlo; Bock, Andreas; **Holze, Janine**; Kloeckner, Jessica; Muth, Mathias et al. (2017): A New Molecular Mechanism To Engineer Protean Agonism at a G Protein-Coupled Receptor. In: *Molecular pharmacology* 91 (4), S. 348–356. DOI: 10.1124/mol.116.107276.

Chen, Xinyu; Klockner, Jessika; **Holze, Janine**; Zimmermann, Cornelia; Seemann, Wiebke K.; Schrage, Ramona et al. (2015): Rational design of partial agonists for the muscarinic m1 acetylcholine receptor. In: *Journal of medicinal chemistry* 58 (2), S. 560–576. DOI: 10.1021/jm500860w.

Schrage, Ramona; **Holze, Janine**; Klockner, Jessica; Balkow, Aileen; Klause, Anne S.; Schmitz, Anna-Lena et al. (2014): New insight into active muscarinic receptors with the novel radioagonist (3)Hiperoxo. In: *Biochemical pharmacology* 90 (3), S. 307–319. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.05.012.(Minetal.É

### Abstrakta /Kongressbeiträge

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), München: **Holze J**; Klöckner J; Holzgrabe U; Decker M; Mohr K; Traenkle C (2016). Differential modulation by allosteric receptor epitopes of dualsteric ligand binding and signaling at human muscarinic M<sub>1</sub> acetylcholine receptors.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Kiel: **Holze J**; Schrage R; Klöckner J; Chen W; Holzgrabe U; Decker M; Bock A; Mohr K; Tränkle C (2015). Dynamic ligand binding allows a rational design of partial agonists for muscarinic M<sub>1</sub> acetylcholine receptors.

## 11 Danksagung

Herrn PD Dr. Christian Tränkle danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas. Weiterhin danke ich ihm für seine ständige Bereitschaft zu anregenden Gesprächen, seine wissenschaftlichen Ratschläge und das fortwährende Interesse an der Entwicklung meiner Arbeit, das bis in die Endphase hinein für das Gelingen von sehr großer Bedeutung war.

Ebenfalls möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. K. Mohr für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis meine Dissertation anfertigen zu können sowie für die Übernahme des Korerefrats bedanken.

Bei Herrn Professor Dr. U. Jaehde und Frau Prof. Dr. D. Bartels möchte ich mich sehr herzlich für die Mitwirkung in der Prüfungskommission bedanken.

Frau Prof. U. Holzgrabe, Herrn Prof. M. Decker sowie Frau Dr. Jessica Klöckner und Herr Dr. X. Chen danke ich für die Synthese und Bereitstellung der von mir im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Substanzen. Frau Prof. Dr. Evi Kostenis danke ich sehr für die Möglichkeit, die Versuche am EPIC<sup>®</sup> Biosensor sowie am Mithras in ihrem Arbeitskreis durchführen zu können.

Allen aktuellen und ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe Mohr möchte ich für die wirklich tolle Zeit danken, die mir stets in guter Erinnerung bleiben wird. Theresa Bödefeld danke ich für die unterhaltsame Zeit im gemeinsamen Büro. Den Technischen Assistenten Iris Jusen und Mechthild Kepe danke ich für die stete Unterstützung bei allen Fragen des täglichen Laboralltags.

Alfred Büssgen danke ich für sein unermüdliches Korrekturlesen, das mir sehr geholfen hat. Allen Freunden und Bekannten danke ich für die Geduld und den Rückhalt, den sie mir während der ganzen Arbeit immer gegeben haben.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, denen ich diese Arbeit widme. Danke für eure bedingungslose Unterstützung, euren stetig liebevollen Zuspruch und die Möglichkeit, dass ich diesen Schritt gehen durfte. Ebenfalls danke ich meiner restlichen Familie, vor allem aber Michael, Christine und Pauline die mich immer unterstützt und motiviert haben.

Mein letzter Dank gilt einer ganz besonderen Freundin, die mir von Anfang an Mut machte diesen Schritt zu gehen. Liebe Andrea, auch wenn du das Ergebnis dieser Arbeit nicht mehr erleben durftest, danke ich dir für jede Minute die ich dich kennen durfte und mich von deiner positiven Energie anstecken lassen konnte.



