

**Einfluss von Rezeptorglykosylierung und
Lipidmembranumgebung auf die Ligandbindung
muskarinischer Acetylcholinrezeptoren
unter besonderer Berücksichtigung der
allosterischen Bindungsstelle**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Nadine Barbara Linsel

aus Koblenz

Bonn 2008

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

1. Referent: Prof. Dr. med. Klaus Mohr
2. Referent: Prof. Dr. rer. nat. Heinz Bönisch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2008

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2005 bis Juli 2008 in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Institutes der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Klaus Mohr angefertigt.

Meiner Familie

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.

(Galileo Galilei)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Gegenstand der Arbeit.....	1
1.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren.....	3
1.3 Allosterische Bindungsstelle	5
1.4 Allosterische Modulatoren des muskarinischen M ₂ -Rezeptors	9
1.5 N-Glykosylierung von Rezeptorproteinen	11
1.6 Grundlagen des Sphingolipidmetabolismus'	14
1.7 Fragestellung dieser Arbeit.....	17
2 Methoden und Materialien.....	21
2.1 Molekularbiologische Arbeiten	21
2.1.1 Verwendete Plasmide.....	21
2.1.2 Zielgerichtete Mutagenese	22
2.1.2.1 Polymerase-Kettenreaktion	22
2.1.2.2 Transformation.....	25
2.1.2.3 Plasmid-DNA-Gewinnung.....	27
2.1.2.4 Sequenzierung der Plasmid-DNA.....	29
2.1.2.5 Untersuchte punktmutierte M ₂ -Rezeptoren.....	29
2.2 Zellbiologische Arbeiten.....	30
2.2.1 Charakterisierung verwendeter Zelllinien.....	30
2.2.2 Zellkultur	32
2.2.3 Transfektionen.....	33
2.2.3.1 Transiente Transfektion und Membranpräparation.....	33
2.2.3.1.1 Durchgeführte transiente Transfektionen.....	36

2.2.3.2	Stabile Transfektion (FlpIn TM -System) und Membranpräparation	37
2.3	Proteinbestimmungen	39
2.3.1	Proteinbestimmungen nach Lowry	39
2.3.2	Proteinbestimmungen nach Bradford	40
2.4	Radioligand-Bindungsstudien	41
2.4.1	Theoretische Grundlagen	41
2.4.2	Experimente im Bindungsgleichgewicht	42
2.4.2.1	Homologe Konkurrenzexperimente	42
2.4.2.1.1	Theoretische Grundlagen	43
2.4.2.1.2	Durchführung von homologen Konkurrenzexperimenten am Brandel-Cell-Harvester	45
2.4.2.1.3	Durchführung von homologen Konkurrenzexperimenten am Tomtec-Harvester	47
2.4.2.2	Heterologe Konkurrenzexperimente	49
2.4.2.3	Allosterische Interaktion	50
2.4.2.3.1	Theoretische Grundlagen	50
2.4.2.3.2	Durchführung von allosterischen Interaktionsexperimenten	52
2.4.3	Kinetische Experimente	54
2.4.3.1	Theoretische Grundlagen	54
2.4.3.1.1	Durchführung von Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten	58
2.5	Funktionelle Experimente	60
2.5.1	Theoretische Grundlagen: [³⁵ S]GTPγS-Versuch	60
2.5.2	Durchführung der [³⁵ S]GTPγS-Versuche	62
2.5.2.1	Einfluss verschiedener Testsubstanzen auf die basale [³⁵ S]GTPγS- Bindung	62
2.5.2.2	Einfluss des Partialagonisten Pilocarpin auf die [³⁵ S]GTPγS-Bindung im Vergleich zum Vollagonisten Acetylcholin	63

2.6	Statistik	65
2.7	Verwendete Substanzen.....	67
2.7.1	Radioliganden.....	67
2.7.2	Orthosterische Liganden.....	68
2.7.2.1	Agonisten.....	68
2.7.2.2	Partialagonisten.....	68
2.7.2.3	Antagonisten.....	69
2.7.3	Allosterische Modulatoren	70
2.8	Lösungen.....	73
2.9	Reagenzien	77
2.10	Verbrauchsmaterialien.....	79
2.11	Verwendete Geräte.....	81
2.12	Verwendete Computerprogramme.....	83
3	Ergebnisse	85
3.1	Abhängigkeit der Bindung typischer und atypischer allosterischer Modulatoren an humanen M ₂ -Rezeptoren vom Expressionssystem	85
3.1.1	Untersuchungen zur Bindung des typischen allosterischen Modulators WDuo3.....	88
3.1.1.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	88
3.1.1.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	90
3.1.2	Untersuchungen zur Bindung des atypischen allosterischen Modulators Duo3	93
3.1.2.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	93
3.1.2.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	94
3.1.3	Untersuchungen zur Bindung des atypischen allosterischen Modulators Tacrin	97
3.1.3.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	97

3.1.3.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	98
3.2	Abhängigkeit der Bindung typischer und atypischer allosterischer Modulatoren an humanen M ₂ -Rezeptoren von einer veränderten N-Glykosylierung	100
3.2.1	Untersuchungen zur Bindung des typischen allosterischen Modulators WDuo3	102
3.2.1.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	102
3.2.1.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	103
3.2.2	Untersuchungen zur Bindung des atypischen allosterischen Modulators Duo3	106
3.2.2.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	106
3.2.2.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	108
3.2.3	Untersuchungen zur Bindung des atypischen allosterischen Modulators Tacrin	110
3.2.3.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	110
3.2.3.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	111
3.3	Abhängigkeit der Bindung typischer und atypischer allosterischer Modulatoren an humanen M ₂ -Rezeptoren von einer veränderten Sphingolipidumgebung	113
3.3.1	Abhängigkeit der Bindung des typischen allosterischen Modulators WDuo3 von einer veränderten Sphingolipidumgebung.....	117
3.3.1.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	117
3.3.1.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	120
3.3.2	Abhängigkeit der Bindung des typischen allosterischen Modulators W84 von einer veränderten Sphingolipidumgebung	124
3.3.2.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	124
3.3.3	Abhängigkeit der Bindung des atypischen allosterischen Modulators Duo3 von einer veränderten Sphingolipidumgebung	126

3.3.3.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	126
3.3.3.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	129
3.4	Bedeutung der Aminosäure M ₂ ⁴²² Trp im Hinblick auf typisches und atypisches Bindungsverhalten strukturmodifizierter allosterischer Modulatoren.....	133
3.4.1	Untersuchungen zur Bindung des typischen allosterischen Modulators WDuo3.....	135
3.4.1.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	135
3.4.1.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	136
3.4.2	Untersuchungen zur Bindung des atypischen allosterischen Modulators Duo3	139
3.4.2.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	139
3.4.2.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	140
3.4.3	Untersuchungen zur Bindung des atypischen allosterischen Modulators Tacrin	143
3.4.3.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	143
3.4.3.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	145
3.4.4	Untersuchungen zur Bindung des allosterischen Modulators EHW437	147
3.4.4.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	147
3.4.4.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	149
3.4.5	Untersuchungen zur Bindung des allosterischen Modulators DuoWO ..	151
3.4.5.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	151
3.4.5.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	153
3.4.6	Untersuchungen zur Bindung des allosterischen Modulators Duo34.....	155
3.4.6.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	155
3.4.6.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	157

3.4.7	Untersuchungen zur Bindung des allosterischen Modulators Duo64.....	159
3.4.7.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	159
3.4.7.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	160
3.5	Einfluss der Epitope M ₂ ⁸⁹ Trp und M ₂ ⁹⁹ Trp auf die Bindung typischer und atypischer allosterischer Liganden.....	163
3.5.1	Untersuchungen zur Bindung des typischen allosterischen Modulators WDuo3.....	167
3.5.1.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	167
3.5.1.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	169
3.5.2	Untersuchungen zur Bindung des atypischen allosterischen Modulators Duo3	171
3.5.2.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	171
3.5.2.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	173
3.5.3	Untersuchungen zur Bindung des allosterischen Modulators Duo64.....	175
3.5.3.1	Bindung an [³ H]NMS-besetzte Rezeptoren.....	175
3.5.3.2	Bindung an [³ H]NMS-unbesetzte Rezeptoren.....	176
3.6	Einfluss der Epitope M ₂ ⁸⁹ Trp und M ₂ ⁹⁹ Trp auf die Bindung und G-Protein-Kopplung von Agonisten und Partialagonisten am muskarinischen M ₂ -Rezeptor.....	178
3.6.1	Heterologe Konkurrenzexperimente.....	178
3.6.1.1	Acetylcholin	178
3.6.1.2	Pilocarpin.....	180
3.6.2	Untersuchungen zum Einfluss des Epitops M ₂ ⁹⁹ Trp auf die G-Protein-Kopplung am muskarinischen M ₂ -Rezeptor.....	182
3.6.2.1	Einfluss Rezeptor-sättigender Konzentrationen verschiedener Liganden auf die basale [³⁵ S]GTPγS-Bindung Bindung an M ₂ - und M ₂ ⁹⁹ Trp→Ala-Rezeptoren	182

3.6.3	Einfluss des Epitops $M_2^{99}\text{Trp}$ auf die Acetylcholin- und Pilocarpin-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung	184
4	Diskussion	187
4.1	Erörterung der Abhängigkeit der Bindung typischer und atypischer allosterischer Modulatoren an muskarinischen M_2 -Rezeptoren von der Wahl des Expressionssystems	188
4.2	Erörterung der Abhängigkeit der Bindung typischer und atypischer allosterischer Modulatoren an muskarinischen M_2 -Rezeptoren von einer defekten N-Glykosylierung der Rezeptorproteine	191
4.3	Erörterung der Abhängigkeit der Bindung typischer und atypischer allosterischer Modulatoren an muskarinischen M_2 -Rezeptoren von einer veränderten Sphingolipidumgebung	194
4.4	Erörterung der Bedeutung der Aminosäure $M_2^{422}\text{Trp}$ im Hinblick auf typisches und atypisches Bindungsverhalten strukturmodifizierter allosterischer Modulatoren.....	199
4.4.1	Erörterung der Bindung der Modulatoren WDuo3 und Duo3 an $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren.....	200
4.4.2	Erörterung der Epitopabhängigkeit strukturmodifizierter Modulatoren gegenüber $M_2^{422}\text{Tryptophan}$	202
4.5	Erörterung der Bedeutung der Epitope $M_2^{89}\text{Trp}$ und $M_2^{99}\text{Trp}$ im Hinblick auf die Bindung allosterischer und orthosterischer Liganden sowie hinsichtlich der Rezeptor-G-Protein-Aktivierung	206
5	Zusammenfassung	213
6	Literaturverzeichnis.....	217
7	Veröffentlichungen	225

1 Einleitung

1.1 Gegenstand der Arbeit

Der muskarinische M_2 -Rezeptor gilt als ein nützliches Modellsystem zur Analyse verschiedener Aspekte der Interaktion von Liganden mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Uns interessierte zunächst die bisher unbeachtete Frage nach der Beeinflussung der allosterischen Ligandbindung durch die N-Glykosylierung des Rezeptors. Frühere Untersuchungen ergaben keinen Einfluss der N-Glykosylierung auf die Bindung orthosterischer Liganden an muskarinischen M_2 -Rezeptoren (van Koppen und Nathanson, 1990). Orthosterische Liganden binden an die Acetylcholin-Bindungsstelle des Rezeptors. Der negative Befund ist mit der Tatsache zu erklären, dass sich die orthosterische Bindungsstelle in einem „geschützten“ Areal der transmembranären Domänen im Inneren des M_2 -Rezeptorproteins befindet (vergleiche Abbildung 1.1), wohingegen die N-Glykanketten des Rezeptorproteins am N-terminalen Ende des Rezeptors und somit in der Region der extrazellulären Schleifen lokalisiert sind. In diesem Areal befindet sich die allosterische Bindungsstelle des Rezeptors, so dass eine Abhängigkeit der Bindung allosterischer Liganden von der N-Glykosylierung des Rezeptors durchaus plausibel erscheint. Die Haftpositionen allosterischer Liganden innerhalb der allosterischen Bindungsstelle sind nicht für alle Liganden gleich. Für den in Abbildung 1.1 dargestellten Liganden Duo3 ist bekannt, dass seine Rezeptorbindung nicht von subtypabhängigen Aminosäuren der allosterischen Kernregion bestimmt wird (Tränkle et al., 2005). Aus diesem Befund kann eine „periphere“ Orientierung des Moleküls innerhalb des allosterischen Areals abgeleitet werden, aus der wiederum eine Interaktion mit Glykanketten am N-Terminus resultieren könnte. Im 3-dimensionalen Modell des muskarinischen M_2 -Rezeptors lässt das „angedockte“ Duo3-Molekül das freie Volumen der allosterischen Kernregion ungenutzt (vergleiche Abbildung 1.1). In der vorliegenden Arbeit wurde demzufolge der Einfluss der N-Glykanketten auf die Bindung von Duo3 untersucht. Um die Hypothese der peripheren Lokalisation des Duo3-Bindeareals zu prüfen, wurde darüber hinaus die Abhängigkeit der Duo3-Bindung von einem weiteren Kernepitop, das Rezeptorsubtyp-unabhängige allosterische Basisaffinität vermittelt, untersucht.

Die Konformation der extrazellulären Schleifen des Rezeptors, die dessen allosterische Bindungsstelle umgeben, könnte auch vom Ladungszustand der Kopfgruppen der umgebenden Membranlipide abhängen. Demzufolge wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit weiterhin der Einfluss von veränderten Sphingolipideigenschaften der Plasmamembran hinsichtlich einer allosterischen Ligand-Rezeptor-Interaktion überprüft.

Die nachfolgenden Abschnitte dienen der Erläuterung theoretischer Grundlagen der Thematik und der ausführlichen Herleitung der Projektfelder der vorliegenden Arbeit.

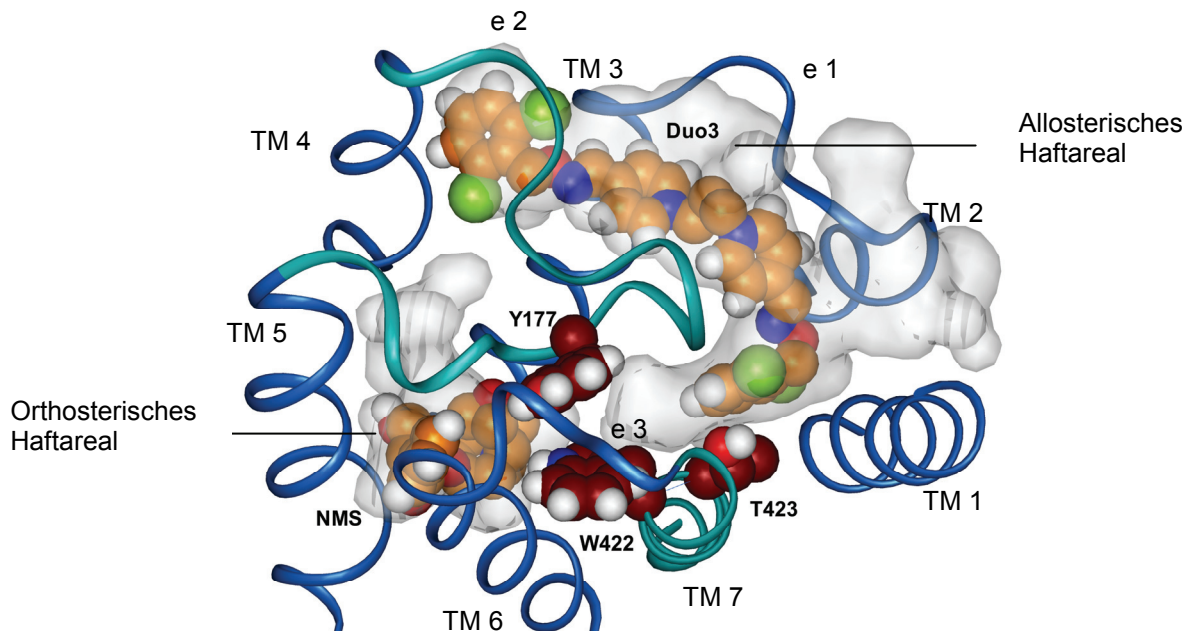


Abbildung 1.1: Modell des muskarinischen M₂-Rezeptors. Blick von oben. Farbcode: Rezeptorprotein: Helices/e1/e3: blau; e2/TM7: cyan; freie Rezeptorvolumina: grau; Liganden: Kohlenstoff: orange (NMS)/dunkelrot (Aminosäuren der Kernregion, M₂¹⁷⁷Tyr, M₂⁴²²Trp, M₂⁴²³Thr); Wasserstoff: weiß; Stickstoff: blau; Sauerstoff: rot. Das orthosterische Haftareal ist mit dem muskarinischen Antagonisten N-Methylscopolamin besetzt, im allosterischen Haftareal befindet sich der Modulator Duo3. Duo3 erreicht nicht das freie Volumen in der Tiefe der allosterischen Bindungsstelle, die von den genannten Kernpitopen umgeben ist. Die Abbildung wurde freundlicherweise überlassen von Frau J. Schrobang und Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje; Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie; Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

1.2 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Struktur, Funktion, Lokalisation: Muskarinische Acetylcholinrezeptoren gehören der Gruppe heptahelikaler G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) an, die bislang die größte bekannte Proteinsuperfamilie darstellen. Die Klassifizierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren erfolgt anhand verschiedener Untergruppen (Wess, 2005). Muskarinische Acetylcholinrezeptoren werden der „Gruppe A“ beziehungsweise den „Rhodopsin-artigen GPCR“ zugeordnet (Wess, 1996; Caulfield und Birdsall, 1998; Horn et al., 1998). In Klonierungsuntersuchungen wurden 5 Muskarinrezeptor-Subtypen (M_1 - M_5) identifiziert, ihre Verteilung sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem ist ausführlich beschrieben (Kubo et al., 1986; Bonner et al., 1987; Hulme et al., 1990; Caulfield, 1993; Caulfield und Birdsall, 1998; Eglen, 2005). In Tabelle 1.1 ist die Verteilung der Subtypen im Überblick dargestellt.

Subtyp	Verteilung	
	Peripherie	Zentrales Nervensystem
M_1	---	Cortex, Hippocampus
M_2	Herz, Glatte Muskulatur	Cortex, Hippocampus, Thalamus
M_3	Glatte Muskulatur, Exokrine Drüsen (z.B. Speicheldrüsen)	---
M_4	---	Striatum
M_5	---	Substantia nigra

Tabelle 1.1: Überblick über die Verteilung muskarinischer Acetylcholinrezeptoren im Organismus (Wess, 2004; Eglen, 2005).

Muskarinische Acetylcholinrezeptoren koppeln an unterschiedliche G-Protein- α -Untereinheiten, wobei M_1 -, M_3 - und M_5 -Rezeptoren durch eine bevorzugte Kopplung an $G_{q/11}$ -Proteine gekennzeichnet sind. M_2 - und M_4 -Rezeptoren koppeln hingegen vorwiegend an $G_{i/o}$ -Proteine (Caulfield, 1993; Wess, 1998; Hulme et al., 2003). Eine $G_{i/o}$ -Kopplung, wie sie im Falle des M_2 -Rezeptors auftritt, ist durch eine nachfolgende Hemmung der Adenylatcyclase (vermittelt durch die G_α -Untereinheit des G-Proteins) und durch eine verlängerte Öffnungszeit von Kaliumkanälen charakterisiert

($G_{\beta\gamma}$ -vermittelt) (Eglen, 2005). Mittlerweile zeigen neuere Untersuchungen, dass muskarinische M_2 -Rezeptoren überdies bei Einsatz hoher Konzentrationen eines Agonisten sowohl G_s - als auch $G_{q/11}$ -Proteine aktivieren können (Michal et al., 2007).

Eine physiologische Rolle spielt der M_2 -Subtyp, der Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit ist, besonders am Herzen, wo er die vagalen Effekte vermittelt. Zusammen mit dem muskarinischen M_4 -Rezeptor stellt er weiterhin einen inhibitorischen Auto- und Heterorezeptor dar, der antinozizeptive Wirkungen vermittelt. Zudem ist der muskarinische M_2 -Rezeptor eingebunden in die M_3 -dominierte Kontrolle von Drüsen- und glattemuskulären Funktionen (Wess et al., 2007).

1.3 Allosterische Bindungsstelle

Begriffsbestimmung und Einführung: Der Begriff Allosterie beschreibt das Vorliegen einer oder mehrerer zusätzlicher Bindungsstellen an einem Rezeptorprotein oder Enzym zusätzlich zum orthosterischen Haftareal. Bei letzterem handelt es sich um die endogene Ligandbindungsstelle (Christopoulos, 2002; Christopoulos und Kenakin, 2002; Wess, 2005). Die Bindung eines allosterischen Modulators verursacht eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins, wodurch die Bindung des Orthosters im Sinne einer allosterischen Verstärkung oder Hemmung beeinflusst werden kann (Wess, 2005). Diese Wechselwirkungen können anhand des allosterischen ternären Komplex-Modells quantifiziert werden (Ehlert, 1988). Allosterische Interaktionen wurden an GPCR erstmals für muskarinische Acetylcholinrezeptoren beschrieben, inzwischen konnten für die wichtigsten GPCR-Unterfamilien (A-C) jeweils für bestimmte Rezeptoren eine allosterische Modulation durch einige Liganden beobachtet werden (Birdsall und Lazareno, 2005).

Therapeutische Perspektiven allosterischer Modulatoren: Bezüglich therapeutischer Anwendungen weisen allosterische Modulatoren gegenüber rein orthosterischen Agonisten und Antagonisten theoretisch verschiedene Vorteile auf.

- Muskarinische allosterische Liganden besitzen eine ausgeprägte Rezeptor-Subtypselektivität, da eine weniger hohe Konservierung der Aminosäure-Sequenz des allosterischen Haftareals im Vergleich zur hoch konservierten orthosterischen Bindungsstelle vorliegt (Hulme et al., 2003). Allosterische Modulatoren erlangen eine Spezifität der Bindung über bestimmte, nicht konservierte Epitope des Rezeptorproteins (Buller et al., 2002; Voigtländer et al., 2003). Eine erhöhte Selektivität kann überdies dadurch erreicht werden, dass sich bezüglich verschiedener Subtypen unterschiedliche Kooperativitäten zwischen einem allosterischen Modulator und dem endogenen orthosterischen Liganden ergeben. Unter einer absoluten Subtypselektivität versteht man in diesem Zusammenhang, dass eine allosterische Testsubstanz ausschließlich an einem Rezeptorsubtyp in der Lage ist, die Bindung des orthosterischen endogenen Botenstoffs zu fördern oder zu hemmen.

- Ein weiterer denkbarer Vorteil allosterischer Modulatoren ist die selbstlimitierende Wirkung der Substanzen. Der Maximaleffekt eines allosterischen Modulators auf die Bindung des orthosterischen Liganden ist vom kooperativen Verhalten zwischen beiden am gegebenen Rezeptor geprägt. Bei mäßiger Kooperativität resultieren somit keine übermäßig starken Veränderungen der Orthoster-Bindung.
- Überdies ist die Wirkung eines allosterischen Modulators an die Anwesenheit eines endogenen Liganden gebunden, wenn das Alloster selbst keinen direkten Einfluss auf die Signaltransduktion des betroffenen Rezeptors nimmt. Infolgedessen ergibt sich eine ausgeprägte räumliche und zeitliche Spezifität der Alloster-Wirkung.

Ein weithin bekanntes Beispiel für den therapeutischen Einsatz allosterischer Modulatoren stellt die Arzneistoffgruppe der Benzodiazepine dar, die vor allem im Bereich der Anxiolyse, der Epilepsiebehandlung und der Anästhesie eingesetzt wird. Benzodiazepine vermitteln ihre spezifischen Effekte über eine allosterische Verstärkung der GABA-Wirkung am GABA_A-Rezeptor, einem Ligand-gesteuerten Ionenkanal. Im Vergleich dazu stellt das Calcimimetikum Cinacalcet (Mimpara[®]) einen allosterischen Modulator des calciumsensitiven Rezeptors dar, der den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zuzuordnen ist (Block et al., 2004). Durch Cinacalcet resultiert eine erhöhte Sensitivität des Rezeptors für Calcium-Ionen, so dass es in der Folge zu einer verminderten Freisetzung von Parathormon kommt. Der Arzneistoff wird bei Vorliegen eines sekundären Hyperparathyreoidismus sowie bei Hypercalcämie im Rahmen eines Nebenschilddrüsenkarzinoms angewendet.

Spezielle Aspekte der allosterischen Modulation muskarinischer M₂-Rezeptoren: Typischerweise nimmt die Wirksamkeit allosterischer Modulatoren an den verschiedenen Muskarinrezeptorsubtypen in nachstehender Reihenfolge zu: $M_5 < M_3 < M_1 < M_4 < M_2$ (Ellis et al., 1993; Jakubik et al., 1995; Ellis und Seidenberg, 2000). Dementsprechend ist der muskarinische M₂-Rezeptor besonders gut geeignet, allosterische Wechselwirkungen zu untersuchen. Abbildung 1.2 zeigt die Lokalisation des orthosterischen und des allosterischen Haftareals an diesem Rezeptorsubtyp. In diesem Fall ist der Rezeptor orthosterisch mit dem Antagonisten

(inversen Agonisten) N-Methylscopolamin (NMS) besetzt, so dass sich das Rezeptorprotein in einer inaktiven Konformation befindet.

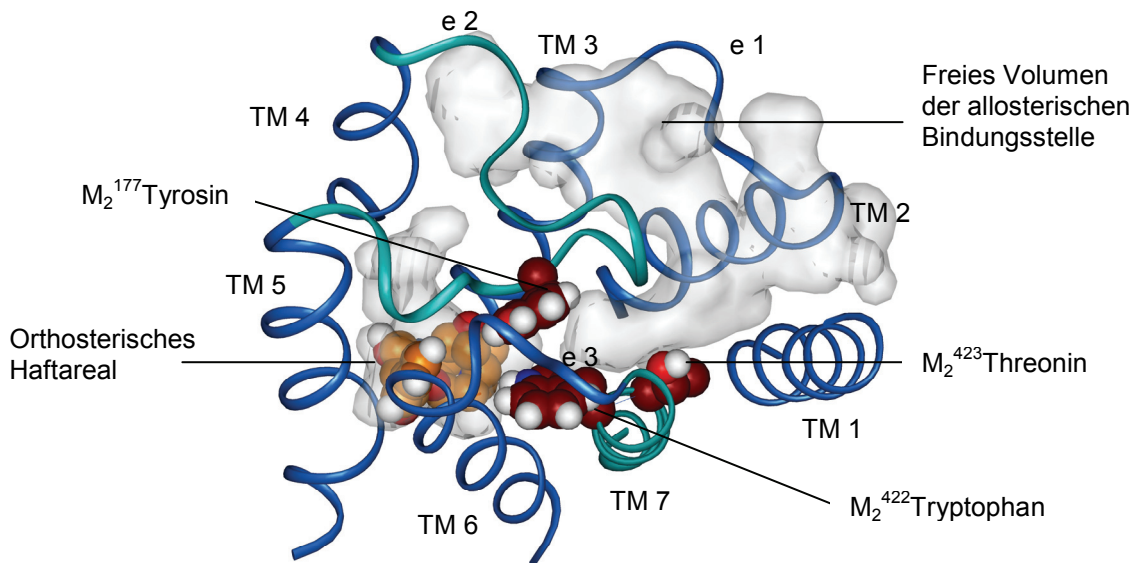


Abbildung 1.2: Modell des muskarinischen M₂-Rezeptors. Blick von oben. Farbcode: Rezeptorprotein: Helices/e1/e3: blau; e2/TM7: cyan; freie Rezeptorvolumina: grau; Liganden: Kohlenstoff: orange (NMS)/dunkelrot (Aminosäuren der Kernregion); Wasserstoff: weiß; Stickstoff: blau; Sauerstoff: rot. Die Abbildung wurde freundlicherweise überlassen von Frau J. Schrobang und Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje; Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie; Heinrich-Heine Universität Düsseldorf.

Die orthosterische Bindungstasche ist im oberen Teil des M₂-Rezeptorproteins zwischen Epitopen der transmembranären Domänen 3, 5, 6 und 7 angeordnet. Sowohl für den endogenen Liganden Acetylcholin als auch für exogene orthosterische Agonisten und Antagonisten wird angenommen, dass sie innerhalb eines so genannten „aromatischen Käfigs“ binden (Lu et al., 2002). Eine ausgesprochen wichtige Funktion hinsichtlich der Acetylcholin-Bindung kommt in diesem Zusammenhang dem konservierten Epitop M₂¹⁰³ Aspartat zu. Über Kation- π -Wechselwirkungen dieser Aminosäure und der positiv geladenen Kopfgruppe des Acetylcholin-Moleküls wird der Ligand-Rezeptor-Komplex stabilisiert (Hulme et al., 1989; Wess, 1993).

Die allosterische Bindungsstelle ist im Vergleich zum orthosterischen Haftareal weiter im extrazellulären Bereich des Rezeptors lokalisiert (Voigtländer et al., 2003; Prilla et al., 2006). Allosterische Modulatoren des muskarinischen M₂-Rezeptors weisen teils stark differierende Strukturmerkmale auf, binden aber zum Teil an das gleiche

Rezeptorareal, das dementsprechend als gemeinsame allosterische Bindungsstelle („common allosteric site“) bezeichnet wird (Ellis und Seidenberg, 1992; Tränkle und Mohr, 1997; Lanzafame et al., 1997). Für einige strukturabweichende Modulatoren wurde das Vorliegen einer zweiten allosterischen Bindungsstelle postuliert (Tucek und Proska, 1995; Tränkle und Mohr, 1997; Lazareno et al., 2000; Lazareno et al., 2002). Demgegenüber weisen neuere Untersuchungen darauf hin, dass auch strukturmodifizierte allosterische Modulatoren, wie beispielsweise Duo3 und Tacrin, an das gleiche Haftareal binden. Es werden vermutlich unterschiedliche Areale der Bindungsstelle durch die verschiedenartigen Modulatoren besetzt (Tränkle et al., 2005).

Die Affinität allosterischer Modulatoren zum muskarinischen M_2 -Rezeptor hängt von mehreren Epitopen ab, die in verschiedenen transmembranären Domänen und extrazellulären Schleifen lokalisiert sind. Zunächst wurde innerhalb der 2. extrazellulären Schleife die so genannte „EDGE-Sequenz“ entdeckt. Diese Folge von drei sauren und einer neutralen Aminosäure (M_2^{172} Glutamat, M_2^{173} Aspartat, M_2^{174} Glycin, M_2^{175} Glutamat) ist hinsichtlich der M_2 -selektiven Bindung des allosterischen Modulators Gallamin von Bedeutung (Leppik et al., 1994; Gnagey und Ellis, 1996). Daran anschließend wurden die Epitope M_2^{177} Tyrosin in der 2. extrazellulären Schleife (e2) und M_2^{423} Threonin in der 7. transmembranären Domäne (TM7) als essentiell für die M_2/M_5 -Subtypselektivität von Alkanbisammonium- und Caracurin-V-Typ ermittelt (Buller et al., 2002; Voigtländer et al., 2003; Huang et al., 2005). Schließlich wurde mit M_2^{422} Tryptophan eine Aminosäure entdeckt, die allosterische Basisaffinität vermittelt. Da M_2^{422} Tryptophan in direkter Nachbarschaft zum Epitop M_2^{177} Tyrosin liegt, kommt es zur Ausbildung einer besonderen („Sandwich-artigen“) Orientierung der allosterischen Reste (siehe Abbildung 1.2), die es allosterischen Modulatoren mit planaren Ringsystemen erlaubt, zu interkalieren und über π - π -Wechselwirkungen mit dem Rezeptor zu interagieren (Prilla et al., 2006).

1.4 Allosterische Modulatoren des muskarinischen M₂-Rezeptors

Mittlerweile steht eine Vielzahl strukturverschiedener allosterischer Liganden muskarinischer Rezeptoren zu Forschungszwecken zur Verfügung, darunter die Substanzen W84, Gallamin und Alcuronium, die zu den „Prototyp-Modulatoren“ zählen. Sowohl Gallamin (Clark und Mitchelson, 1976) als auch Alcuronium (Tucek et al., 1990) weisen allerdings primär muskelrelaxierende Eigenschaften auf. Eine Identifizierung der allosterischen Eigenschaften von W84 erfolgte bereits früh (Lüllmann et al., 1969). Ausgangspunkt war die Beobachtung einer Potenzierung der Atropin-Wirkung durch W84 in Versuchen zur Prophylaxe von Organophosphat-Intoxikationen an Mäusen (Kords et al., 1968). Die allosterischen Eigenschaften der beschriebenen Prototyp-Modulatoren fanden sich nicht an anderen G-Proteingekoppelten Rezeptoren, ein Verlust der Selektivität erfolgte erst in hohen Dosen (Pfaffendorf et al., 2000; Franken et al., 2000).

Eine bisquartäre Zwischenkette weisen neben W84 auch die Verbindungen des Bispyridinium-Typs auf, wie beispielsweise die Oximverbindungen WDuo3 und Duo3. In Untersuchungen mit W84 und Duo3 wurden trotz ähnlicher Ladungsverteilung und annähernd gleichem van der Waals-Volumen differierende Struktur-Wirkungs-Beziehungen gefunden (Kostenis et al., 1994). Weitere Versuche zeigten, dass mit Duo3 im Gegensatz zu W84 und WDuo3 steile Konzentrations-Effekt-Kurven auftraten und die allosterische Wirksamkeit von Duo3 anders als beispielsweise W84 und WDuo3 eine geringe Puffer-Abhängigkeit der Affinität aufweist. Darüber hinaus wurde in Interaktionsstudien mit Obidoxim, einem mit vielen allosterischen Modulatoren kompetitiv interagierendem allosterischen Liganden, eine nicht-kompetitive Wechselwirkung mit Duo3 festgestellt. Gleiches gilt für den atypischen allosterischen Modulator Tacrin. Charakteristisch für atypisches Bindungsverhalten ist das Auftreten von steilen Konzentrations-Effekt-Kurven (Potter et al., 1989; Tränkle und Mohr, 1997; Gharagozloo et al., 2002; Tränkle et al., 2005). Im Vergleich zu Duo3 werden allosterische Substanzen, die nicht zu steilen Kurvenverläufen führen und die zudem durch eine kompetitive Interaktion mit Obidoxim gekennzeichnet sind, als *typische allosterische Modulatoren* bezeichnet. Es wurde zunächst angenommen, dass typische und atypische allosterische Modulatoren an

unterschiedliche allosterische Haftareale binden (Voigtländer et al., 2003; Huang et al., 2005; Tränkle et al., 2005). Dieser Befund konnte in neueren Untersuchungen nicht bestätigt werden und es wird offensichtlich sowohl von WDuo3 als auch von Duo3 die gleiche Bindungsstelle besetzt (vergleiche Abbildung 1.1). Innerhalb der allosterischen Rezeptorregion kommt es jedoch zu einer unterschiedlichen Positionierung allosterischer Liganden (Tränkle et al., 2005). Einen Sonderfall hinsichtlich atypischer Interaktionen stellt offenbar Tacrin dar, es konnte anhand von Molecular-Modelling-Untersuchungen die Möglichkeit einer simultanen Bindung zweier Modulatormoleküle an ein einzelnes Rezeptorprotein gezeigt werden.

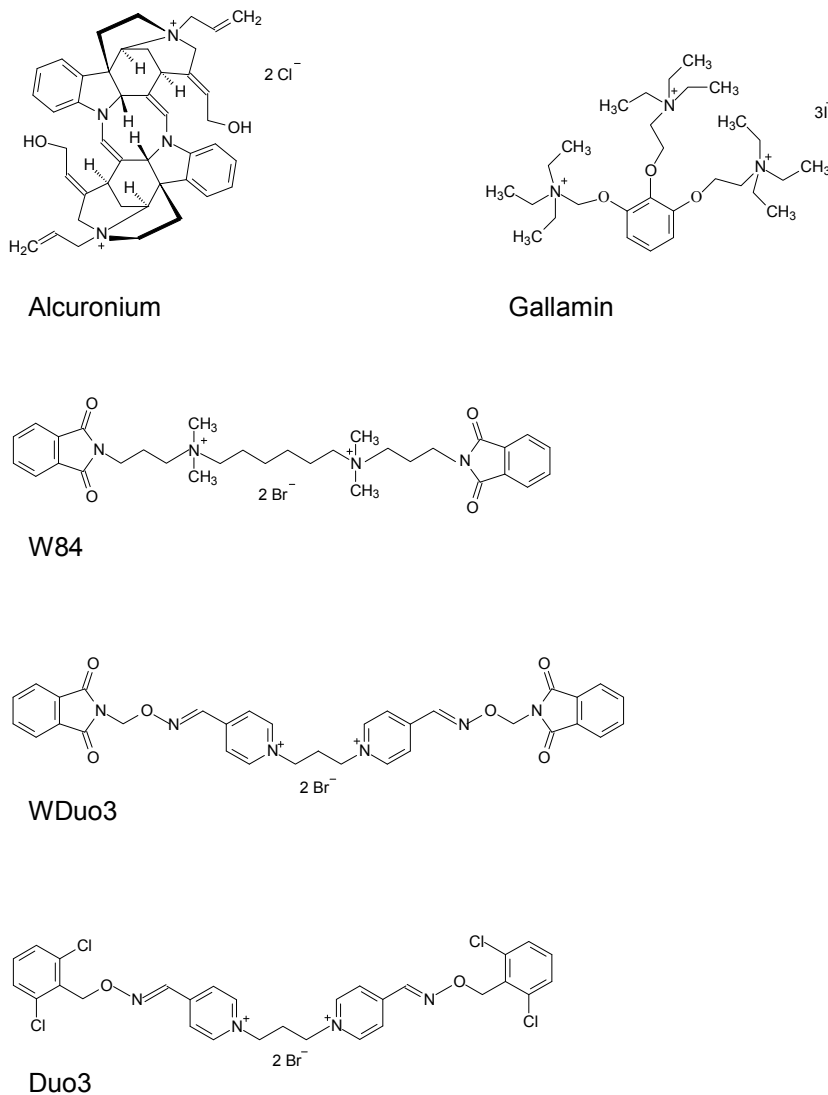


Abbildung 1.3: Strukturformeln typischer allosterischer Testsubstanzen sowie der atypischen Testsubstanz Duo3.

1.5 N-Glykosylierung von Rezeptorproteinen

Einführung: Die N-Glykosylierung spielt eine bedeutende Rolle hinsichtlich der korrekten Faltung, des Transports und der Oberflächenexpression von Membranproteinen. Diese posttranslationale Modifikation von Glykoproteinen umfasst die kovalente Bindung von Oligosaccharidketten an Asparaginreste des Rezeptorproteins. Ein Anknüpfen von Kohlenhydratresten ist möglich, wenn die Aminosäure Asparagin innerhalb einer so genannten Konsensussequenz vorliegt. Diese Sequenz ist dadurch gekennzeichnet, dass auf Asparagin zunächst eine beliebige Aminosäure folgt (mit Ausnahme von Prolin oder Aspartat) und im Anschluss daran ein Serin- oder Threoninrest vorliegt (Shakin-Eshleman et al., 1996; Helenius und Aebi, 2001).

Prozess der N-Glykosylierung: Die Synthese von N-glykosylierten Rezeptorproteinen erfolgt sowohl im Endoplasmatischen Retikulum (ER) als auch im Golgi-Apparat. Die zu Beginn ablaufenden Schritte einer N-Glykosylierung stellen einen konservierten Prozess innerhalb aller eukaryotischen Zellen dar. Als Ausgangsverbindung der Glykansynthese dient das in der Membran des ER verankerte Lipid Dolychylphosphat. Es kommt zunächst im cytosolischen Teil des ER zur Anlagerung verschiedener Kohlenhydratbausteine an das Lipid bis ein so genanntes Kern-Oligosaccharid entsteht (siehe Abbildung 1.4). Dieses gelangt auf bislang ungeklärte Weise in das Lumen des ER, wo schrittweise eine weitere Anlagerung von Glykanbausteinen erfolgt (Helenius und Aebi, 2001). Anschließend kommt es zum Transfer des Glykans auf den Asparaginrest des Proteins. Verantwortlich für diesen Schritt ist das Enzym Oligosaccharyltransferase, das in der Membran des ER lokalisiert ist. Nach korrekter Faltung des Glykoproteins unter Beteiligung eines Chaperon-Systems, dem Calnexin-Calreticulin-Komplex, gelangt das Protein in den Golgi-Apparat, wo eine Kürzung und weitere Prozessierung der Glykanketten stattfindet (Helenius und Aebi, 2001). Zunächst liegen im Golgi-Apparat Glykane vom „High-Mannose-Typ“ vor (siehe Abbildung 1.5 A). Diese Kohlenhydratketten sind durch endständige Mannosereste gekennzeichnet. Durch die Aktivität des Enzyms N-Acetylglucosaminyglykosyltransferase I (GlcNAc-TI) werden N-Acetylglucosaminreste übertragen. Infolgedessen kommt es zu einer Bildung von „Hybrid-Typ“-Glykanen die sowohl endständige Mannosereste als auch

N-Acetylglucosaminreste tragen (siehe Abbildung 1.5 B). Eine weitere Übertragung von N-Acetylglucosaminbausteinen erfolgt mittels N-Acetylglucosaminyglykosyltransferase II. Nach diesem Schritt sind alle Glykanketten endständig mit N-Acetylglucosamin substituiert und die Glykane werden als „Complex-Typ“ bezeichnet (siehe Abbildung 1.5 C) (Varki et al. 1999). Im Anschluss erfolgen weitere Prozessierungen, welche die Glykosylierung durch Anlagerung von Galactoseresten und terminalen Sialinsäuren komplettieren. Erst nach vollständiger Glykosylierung erfolgen der Membrantransport der Glykoproteine und schließlich der Einbau in die Plasmamembran.

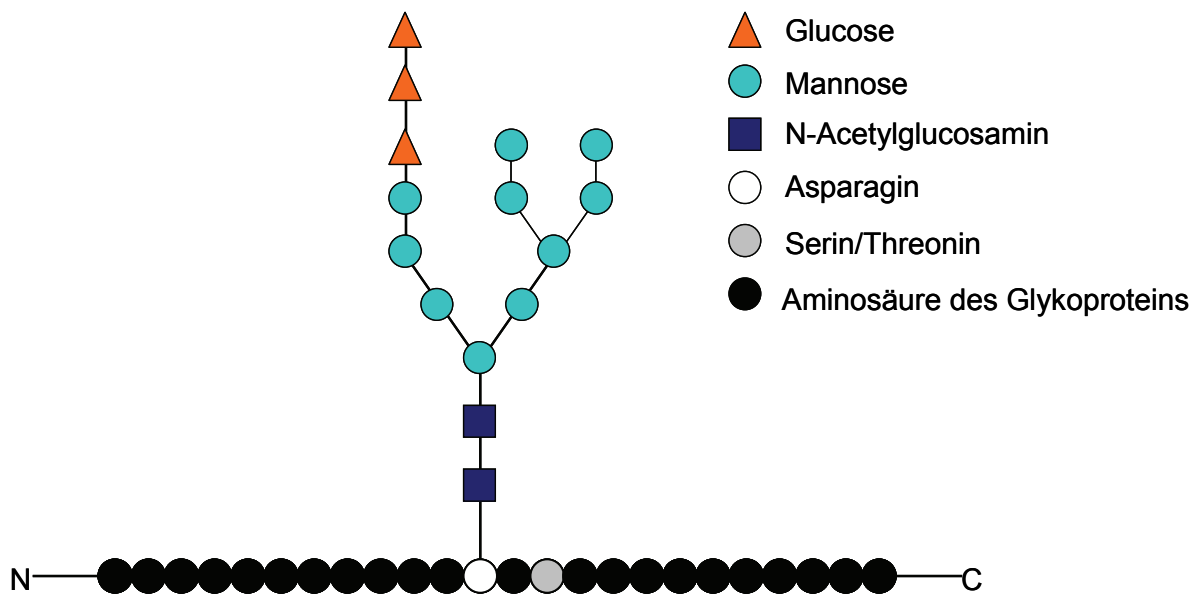


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Kern-Oligosaccharids im Endoplasmatischen Retikulum.

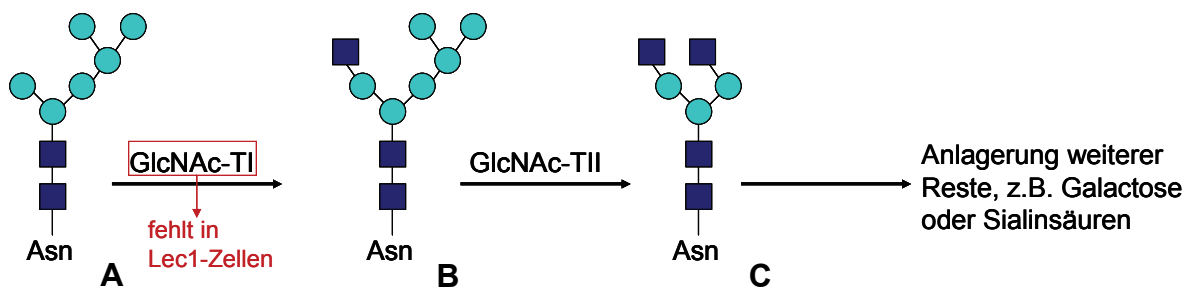


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Glykane vom A: „High-Mannose-Typ“ B: „Hybrid-Typ“ und C: „Complex-Typ“. GlcNAc-TI/II: N-Acetylglucosaminyglykosyltransferase I/II. Legende der Glykanbausteine siehe Abbildung 1.4.

Defekte der N-Glykosylierung: In eukaryotischen Zellen mit entsprechenden genetischen Veränderungen lässt sich eine defekte N-Glykosylierung mit dem Ziel hervorrufen, die Funktion der Glykanketten innerhalb eines Rezeptorproteins zu untersuchen. Lec1-Zellen stellen beispielsweise CHO-Glykosylierungsmutanten dar, die durch einen Defekt des Enzyms N-Acetylglucosaminoglykosyltransferase I gekennzeichnet sind (Stanley et al., 1975). Infolge dieses Defektes kommt es ausschließlich zur Synthese von Glykanen vom „High-Mannose-Typ“ (Varki et al. 1999). Endständige Sialinsäuren, die unter physiologischen Bedingungen negative Ladungen aufweisen, fehlen in diesem Fall vollständig.

N-Glykosylierung des muskarinischen M₂-Rezeptors: Der muskarinische M₂-Rezeptor verfügt über 4 potentielle N-Glykosylierungsstellen im extrazellulären Bereich des Rezeptorproteins am N-terminalen Rezeptorende (Asparagin², Asparagin³, Asparagin⁶, Asparagin⁹). Die Ausprägung der Kohlenhydratketten von Glykoproteinen ist im Allgemeinen stark variabel und hängt unter anderem von Spezies und Gewebe des betrachteten Organismus ab (Varki et al. 1999). Demzufolge kann für den muskarinischen M₂-Rezeptor keine genaue Aussage bezüglich der Gestaltung der N-Glykanketten in bestimmten eukaryotischen Expressionssystemen gemacht werden. Bisher konnte keine Beteiligung der N-Glykosylierung an der orthosterischen Ligandbindung oder der G-Protein-Interaktion an M₂-Rezeptoren nachgewiesen werden (van Koppen und Nathanson, 1990; Lanctot et al., 1999). Diese Befunde erscheinen plausibel, da der orthosterische Ligand tief im Inneren des Rezeptorproteins bindet, die N-Glykosylierungsstellen des M₂-Rezeptors jedoch im extrazellulären Bereich des Rezeptorproteins lokalisiert sind.

1.6 Grundlagen des Sphingolipidmetabolismus'

Einführung: Sphingolipide werden als ein über eine Amidbindung mit einer Fettsäure verbundenes Sphingosinmolekül definiert und dienen als Bausteine von Plasmamembranen eukaryotischer Zellen. Ceramide gelten als die einfachste Gruppe der Sphingolipide und weisen keine Substitution des Sphingosinrestes auf. Demgegenüber sind Glykosphingolipide durch eine Verknüpfung am Sphingosinrest mit einem Kohlenhydrat, meist Glucose oder Galactose, gekennzeichnet. Cerebroside stellen eine Untergruppe der Glykosphingolipide dar, die häufig im zentralen Nervensystem, vor allem im Myelin, zu finden ist. Abbildung 1.6 zeigt die Entstehung beispielhafter Glykosphingolipide.

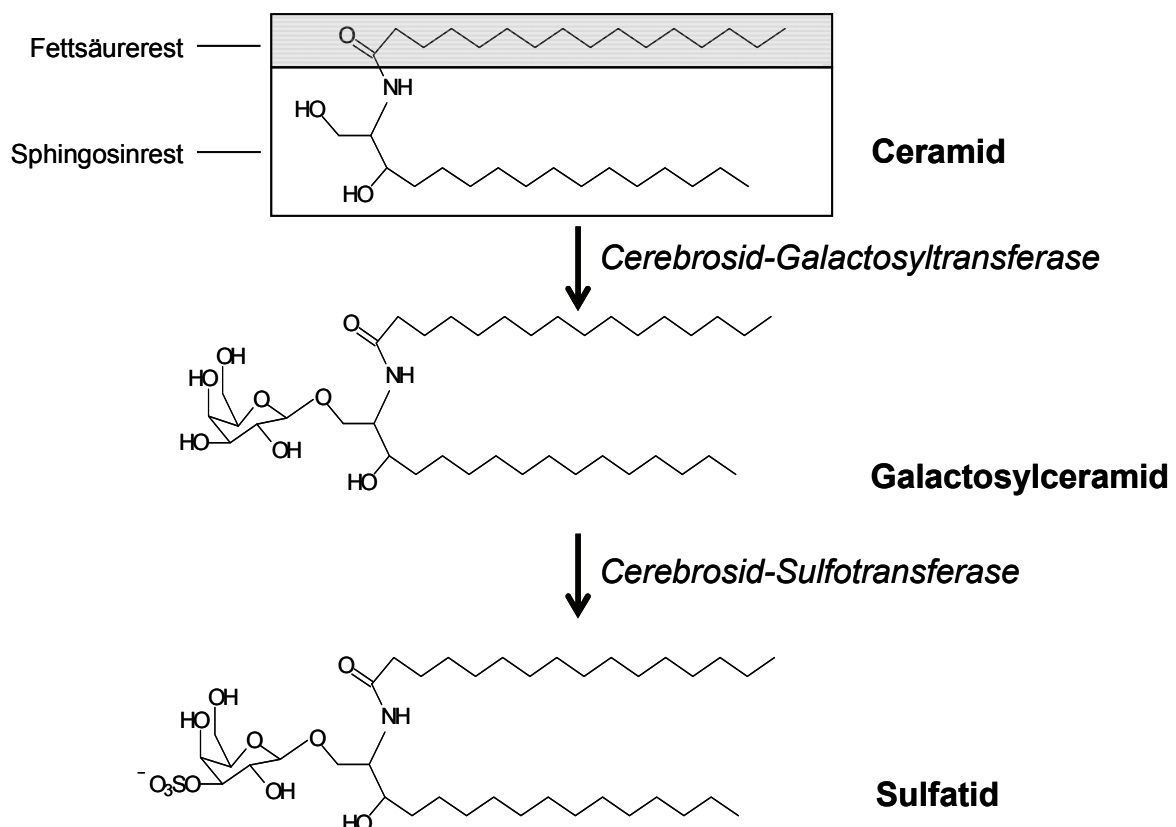


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Entstehung des Cerebrosids Galactosylceramid und des Sulfo cerebrosids Sulfatid in Myelin-produzierenden Zellen (Oligodendrozyten und Schwann'sche Zellen). In CHO-Zellen liegt nativ weder Galactosylceramid noch Sulfatid vor.

Zu Beginn wird durch das Enzym Cerebrosid-Galactosyltransferase ein Galactoserest auf das Ceramidmolekül übertragen und es entsteht das Cerebrosid Galactosylceramid. Die Anknüpfung eines Sulfatrestes durch Cerebrosid-Sulfotransferase führt zur Entstehung der Verbindung Sulfatid. Die hier dargestellten Glykosphingolipide Galactosylceramid und Sulfatid sind Lipidbestandteile des Myelins.

Glykosphingolipide sind neben ihrer Bedeutung als Membranbausteine essentiell für die Entwicklung von komplexeren Organismen und spielen darüber hinaus eine Rolle bei der Regulation von Membranproteinen (Kolter und Sandhoff, 2006). Störungen des Abbaus und nachfolgende Anreicherungen von Glykosphingolipiden in Lysosomen und Membranen führen zu charakteristischen Krankheitsbildern.

Metachromatische Leukodystrophie: Die metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist definiert als Gruppe degenerativer Erkrankungen der weißen Substanz des Gehirns und wird den lysosomalen Speichererkrankung zugeordnet. Eine MLD ist mit einer Anreicherung des Cerebrosidsulfats Sulfatid unter anderem im zentralen Nervensystem assoziiert, vor allem in den zellulären Membranen Myelinbildender Zellen (Oligodendrozyten oder in peripheren Nerven Schwann'sche Zellen). Ursache der Sulfatid-Akkumulation ist ein Defekt des Enzyms Arylsulfatase A (ASA), welches unter physiologischen Bedingungen für den Abbau des Sulfatids verantwortlich ist (Gieselmann et al., 2003). Eine Anreicherung des Cerebrosidsulfats in Myelinbildenden Zellen führt zu einer ausgeprägten Wachstumshemmung der Myelinscheide und ist mit charakteristischen und schwerwiegenden neurologischen Ausfallserscheinungen verbunden. Es zeigen sich klinisch verschiedenartige Manifestationen einer MLD, die anhand des Ausbruchzeitpunkts der Erkrankung unterschieden werden können (Gieselmann et al., 2003). Allgemein gilt, dass ein späterer Eintritt der Krankheit mit einem milderem Verlauf assoziiert ist.

Die molekulargenetischen Grundlagen einer MLD sind zum heutigen Zeitpunkt gut bekannt, überdies konnten die Symptome der Erkrankung anhand eines Tiermodells (ASA-Knockout-Maus) genauer charakterisiert werden (Gieselmann et al., 1998). Eine Untersuchung der Auswirkungen einer Sulfatid-Akkumulation auf die Funktion von in die Membran eingelagerten Rezeptorproteinen steht allerdings noch aus.

Zelllinien zur Erzeugung modifizierter Membranumgebungen: Zur Erforschung molekularer Grundlagen einer MLD dient eine spezifische Zelllinie, die eine Anreicherung des Cerebrosidsulfats Sulfatid in den zellulären Membranen simuliert. Eine stabile Transfektion der Ausgangszelllinie CHOK1 mit dem Gen des Enzyms Galactosyltransferase führt zu CHOGalT-Zellen, die durch eine Anreicherung des Cerebrosids Galactosylceramid in der Plasmamembran charakterisiert sind. Ausgehend von CHOGalT-Zellen wird eine weitere stabile Transfektion mit dem Gen des Enzyms Sulfotransferase vorgenommen. Aus diesem Schritt resultieren CHOSULF-Zellen, die durch eine Anreicherung von Sulfatid in Membranen gekennzeichnet sind und demzufolge als Zellmodell für eine metachromatische Leukodystrophie dienen.

1.7 Fragestellung dieser Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden typische und atypische allosterische Modulatoren als molekulare Sonden eingesetzt, um die Konsequenzen einer veränderten Rezeptorglykosylierung und einer veränderten Membrenumgebung auf die Bindungseigenschaften muskarinischer M_2 -Rezeptoren zu untersuchen.

- (1) Anhand Radioligand-Bindungs-Untersuchungen sollte in Voruntersuchungen die Rolle verschiedenartiger Expressionssysteme im Hinblick auf die Bindung typischer und atypischer allosterischer Modulatoren sowohl an mit dem Antagonisten [3 H]N-Methylscopolamin-besetzten als auch -unbesetzten muskarinischen M_2 -Rezeptoren vergleichend analysiert werden. Als eukaryotische Expressionssysteme des M_2 -Rezeptors standen CHO-Zellen (Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters) sowie COS7-Zellen (Nierenzellen der Grünen Meerkatze) zur Verfügung. Der typische allosterische Modulator WDuo3 sowie die atypischen Modulatoren Duo3 und Tacrin dienten als Testsubstanzen. Die Molekülstrukturen von WDuo3 und Duo3 weisen eine ausgeprägte Ähnlichkeit auf und unterscheiden sich lediglich anhand ihrer lateralen Substitution voneinander (siehe Kapitel 2.7.3). Für Duo3 wird im Vergleich zu WDuo3 ein andersartiges Bindungsverhalten am allosterischen Haftareal des muskarinischen M_2 -Rezeptors postuliert (Tränkle et al., 2005). Möglicherweise wird die bislang molekularmechanistisch unverstandene atypische Interaktion von Duo3 im Gegensatz zu WDuo3 von der Art des Expressionssystems beeinflusst. So ist es denkbar, dass die Bindung atypischer Modulatoren durch ein möglicherweise differierendes N-Glykosylierungsmuster der Rezeptorproteine aus unterschiedlichen Expressionssystemen stärker beeinflusst wird als das Bindungsverhalten von typischen Modulatoren. Tacrin zeigt hingegen im Vergleich zu Duo3 eine abweichende Art der atypischen Bindung. Diese ist der Literatur zufolge durch die simultane Bindung von zwei Tacrin-Molekülen an das allosterische Haftareal zu erklären (Tränkle et al., 2005). Eine Untersuchung von Tacrin erschien vor diesem Hintergrund ebenfalls essentiell.

- (2) Darauf aufbauend sollte überprüft werden, in welchem Ausmaß ein ausgeprägter N-Glykosylierungsdefekt der M_2 -Rezeptorproteine das Bindungsverhalten der oben beschriebenen allosterischen Modulatoren beeinflusst. Zu diesem Zweck sollten Radioligand-Bindungsstudien an M_2 -Rezeptoren durchgeführt werden, die in Lec1-Zellen exprimiert wurden. Lec1-Zellen sind CHO-Glykosylierungsmutanten und zeichnen sich durch einen Defekt des Enzyms N-Acetylglucosaminoglycosyltransferase I aus. Diese Zelllinie ist somit ausschließlich in der Lage, N-Glykane vom High-Mannose-Typ zu synthetisieren. Diese Kohlenhydratketten verfügen nicht über endständige Sialinsäuremoleküle (Stanley et al., 1999; Varki et al., 1999; Helenius und Aebi, 2001), die möglicherweise aufgrund ihrer Lokalisation eine tragende Rolle bei der Bindung atypischer allosterischer Modulatoren spielen (siehe Kapitel 1.1). Eine vollständige N-Glykosylierung ist überdies von großer Bedeutung für biochemische Vorgänge innerhalb der Zellen wie beispielsweise für die korrekte Faltung von Rezeptorproteinen (Helenius und Aebi, 2004). In der Literatur wird zudem beschrieben, dass die N-Glykosylierung verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren eine bedeutende Rolle für die Oberflächenexpression von Rezeptordimeren spielt (He et al., 2002; Michineau et al., 2006). Folglich könnte aus einer defekten N-Glykosylierung der M_2 -Rezeptoren eine verringerte Rezeptordimerisierung resultieren. Die atypische Wirkung des allosterischen Modulators Duo3 könnte auf einer Interaktion mit M_2 -Rezeptordimeren beruhen (Gharagozloo et al., 2002; Tränkle et al., 2005).
- (3) Es sollte im weiteren Verlauf die Untersuchung der Bedeutung einer veränderten Sphingolipidumgebung im Hinblick auf die Bindungseigenschaften orthosterischer und allosterischer Liganden am muskarinischen M_2 -Rezeptor erfolgen. Um dies zu ermöglichen, wurden von Dr. M. Eckhardt (Institut für Physiologische Chemie, Universität Bonn) freundlicherweise Zelllinien mit verschiedenen Lipidmodifikationen zur Verfügung gestellt. Zum einen wurde mit CHOGalT-Zellen gearbeitet, die stabil mit dem Gen für das Enzym Galactosyltransferase transfiziert waren. Dieses Enzym bewirkt eine Galactosylierung von Ceramiden und führt zu einer Anreicherung des Cerebrosids Galactosylceramid in der

Membranumgebung. Weiterhin wurden CHOSULF-Zellen verwendet, die zusätzlich stabil mit dem Gen für das Enzym Cerebrosidsulfotransferase transfiziert sind. Dieses Enzym bewirkt innerhalb der Membran eine Anreicherung von Sulfatid, einem sulfatierten Galactosylceramid. Beide Ausgangs-Zelllinien wurden für unsere Zwecke transient mit dem hM₂-Rezeptorgen transfiziert. Die Durchführung sämtlicher Bindungsexperimente sollte sowohl in einem artifiziellen 5 mM Na,K,P_i-Puffer (L 15) als auch in einem 10 mM HEPES-Puffersystem (L 23) mit annähernd physiologischer Ionenstärke erfolgen. Als allosterische Testsubstanzen sollten vor allem WDuo3 und Duo3 zum Einsatz kommen, da auch bezüglich einer modifizierten Lipidumgebung der Rezeptoren ein unterschiedliches Verhalten zwischen typischen und atypischen allosterischen Liganden denkbar ist.

(4) Erreicht der atypische Modulator Duo3 tatsächlich nicht die Kernregion der allosterischen Bindungsstelle des M₂-Rezeptors, dürfte die Rezeptorbindung von Duo3 nicht von dem allosterischen Kernepitop M₂⁴²²Tryptophan abhängen. Es stellt ein für die allosterische Basisaffinität essentielles Epitop dar (Prilla et al., 2006). Diese Befunde wurden aus Experimenten mit punktmutierten Rezeptoren (M₂⁴²²Trp→Ala) erhalten. Um zu überprüfen, ob die mit Prototyp-Allosteren (z.B. W84) gewonnenen Ergebnisse auf atypische allosterische Modulatoren oder Substanzen mit atypischen Strukturmerkmalen übertragen werden können, sollten vergleichende Bindungsuntersuchungen an M₂-Wildtyprezeptoren und an punktmutierten M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren durchgeführt werden.

(5) Abschließend sollten die Epitope M₂⁸⁹Tryptophan und M₂⁹⁹Tryptophan hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Affinität atypischer oder typischer allosterischer Testsubstanzen in Radioligand-Bindungsstudien untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Möglichkeit der Beteiligung dieser Epitope an der G-Protein-Kopplung der Rezeptoren in [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten überprüft werden. Der Ausgangspunkt dieser Untersuchungen waren Experimente von Matsui et al. (1995), in denen für die korrespondierenden Epitope des muskarinischen M₁-Rezeptors M₁⁹¹Tryptophan und M₁¹⁰¹Tryptophan eine Beteiligung an der Bindung des

Prototyp-Allosters Gallamin gefunden wurde. In neueren Untersuchungen konnte zudem belegt werden, dass Gallamin und das strukturverschiedene W84 eine große Ähnlichkeit im Hinblick auf ihre Epitopabhängigkeit und Subtypselektivität aufweisen (Huang et al., 2005). Demzufolge sollte exemplarisch der W84-artige typische allosterische Modulator WDuo3 sowie der atypische allosterische Modulator Duo3 und das Duo3-Derivat Duo64 an punktmutierten M_2 -Rezeptoren ($M_2^{89}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ und $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$) untersucht werden.

2 Methoden und Materialien

2.1 Molekularbiologische Arbeiten

2.1.1 Verwendete Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Rezeptorproteine wurden durch Expression aus verschiedenen Plasmidvektoren erhalten.

Bei allen durchgeführten Transformationen mit anschließender transienter Transfektion (siehe Kapitel 2.2.1) wurden als Expressionsvektoren pcD-Plasmide verwendet (Okayama und Berg, 1992). Diese enthielten die cDNA des jeweiligen Gens von Interesse (hier: M₂-Rezeptorsubtyp: Hm2pcD) und wiesen zusätzlich eine Ampicillin-Resistenz und den viralen SV40-Promotor (Simian virus 40) auf, wodurch das im Vektor vorhandene Gen in eukaryotischen Systemen exprimiert werden konnte. Weiterhin umfassten die verwendeten pcD-Plasmide einen bakteriellen Replikationsursprung, durch den die Vervielfältigung der Plasmide in Bakterienzellen gewährleistet wurde. Die Plasmide wurden freundlicherweise von Prof. Dr. John Ellis, (Penn State University, Hershey PA, USA) zur Verfügung gestellt.

Zur Generierung einer stabilen CHOFlpInTM Zelllinie wurde das über Invitrogen bezogene pcDNA5/FRT/TO-Plasmid verwendet. Das Gen für den humanen M₂-Rezeptorsubtyp (Hm2) wurde in das Vektorensystem kloniert. Die Besonderheit dieses Vektors liegt im Vorhandensein eines Gens, das für das Enzym Flp-Rekombinase codiert. Hiermit kann während einer stabilen Transfektion die Integration eines Gens von Interesse an einer bestimmten Stelle des Genoms von Säugetierzellen gewährleistet werden. Eine ausführliche Beschreibung der Generierung von stabilen Zelllinien mittels des pcDNA5/FRT/TO-Plasmids erfolgt in Kapitel 2.2.3.2.

2.1.2 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Erzeugung von transienten und stabilen Rezeptormutanten des muskarinischen M₂-Rezeptors wurde jeweils eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt.

2.1.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Zu Beginn jedes neuen Mutagenesezyklus' erfolgte eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit dem Ziel, eine Punktmutation im Bereich des Hm2-Rezeptorgens der verwendeten Plasmide einzubringen.

Allgemeine Informationen: Die PCR stellt ein Verfahren zur enzymatischen Vervielfältigung von DNA dar, bei dem als wichtigste Ausgangsprodukte eine DNA-Matrize („Template“), Oligonukleotidprimer, Oligonukleotide und eine geeignete DNA-Polymerase benötigt werden. Der Ablauf einer klassischen PCR kann grob in drei Abschnitte gegliedert werden. Zunächst erfolgt in einem programmierbaren Thermocycler (G 21) bei 95°C eine *Denaturierung* der vorgegebenen DNA-Matrize. Nach Abkühlen auf 55°C kommt es zum so genannten *Annealing*, d.h. der Anlagerung der Oligonukleotidprimer an die DNA-Matrize. Im weiteren Verlauf wird die Temperatur erneut auf 68°C erhöht. Dies stellt das Aktivitätsoptimum der hier verwendeten Polymerase (s.u.) dar. Es kommt zur *Elongation* des jeweiligen Primers an der Matrize, indem Nukleotide in Richtung 5' → 3' angelagert werden. Die Vorgehensweise in dieser Arbeit entsprach der im Quick-Change[®] Site-Directed Mutagenesis Kit-Handbuch (V 25) beschriebenen Methode und wird in den folgenden Abschnitten näher charakterisiert.

Charakterisierung der Primer: Um eine gezielte Mutagenese durchzuführen, wurden in dieser Arbeit Primer gewählt, die eine Basensequenz mit der gewünschten Punktmutation enthielten. Auf diese Weise wurde gewährleistet, dass die mittels PCR erhaltenen DNA-Stränge ebenfalls diese Mutation aufwiesen. Bei der Auswahl der Oligonukleotidprimer war es notwendig, verschiedene Grundsätze des „Primerdesigns“ zu berücksichtigen. Die verwendeten Primer sollten dementsprechend z.B. eine Länge von 18-30 Basen und ein Guanin-Cytosin-Verhältnis von 40-60% aufweisen. Durch letzteres wurde

sichergestellt, dass die Schmelztemperatur des Primers im Bereich von 55-80°C liegt und somit eine Annealingtemperatur von 55°C gewählt werden konnte.

Versuchsansätze und methodische Vorgehensweise: Zu Beginn der PCR wurden zwei verschiedene Ansätze vorbereitet, der eigentliche Reaktionsansatz und ein Kontrollansatz. Letzterer enthielt neben Oligonukleotid-Kontrollprimern das pWhitescript-Kontrollplasmid, welches über ein für das Enzym β -Galactosidase kodierendes lacZ Gen verfügt, das allerdings an Position 9 eine Punktmutation aufweist. Die Kontrollprimer hingegen verfügen über die korrekte Basensequenz. Dementsprechend müsste bei einer korrekt ablaufenden PCR-Reaktion ein funktionstüchtiges lacZ Gen resultieren. Nach erfolgreicher Transformation in E.coli-Zellen exprimieren diese β -Galactosidase. Mit Hilfe dieses Enzyms ist es möglich, ein entsprechendes Substrat zu einem blauen Farbstoff umzuwandeln und diese Reaktion als Indikator für eine erfolgreiche PCR zu nutzen (siehe Kapitel 2.1.2.2). Die beiden Ansätze wurden nach folgendem Schema in dünnwandige Reaktionsgefäße (V 2), die eine optimale Temperaturübertragung im Thermocycler (G 21) gewährleisten, pipettiert.

Reaktionsansatz	Kontrollansatz
5 μ l 10x Probenpuffer	5 μ l 10x Probenpuffer
2 μ l Plasmid-DNA-Template (5 ng/ μ l)	2 μ l pWhitescript Kontrollplasmid
2 μ l Oligonukleotid-Primer 1 (62,5 ng/ μ l)	1,25 μ l Oligonukleotid-Kontrollprimer 1
2 μ l Oligonukleotid-Primer 2 (62,5 ng/ μ l)	1,25 μ l Oligonukleotid-Kontrollprimer 2
1 μ l dNTP-Mix	1 μ l dNTP-Mix
38 μ l sterilfiltriertes Aqua dest.	39,5 μ l sterilfiltriertes Aqua dest.
<i>Gesamtvolumen: 50 μl</i>	<i>Gesamtvolumen: 50 μl</i>
+ 1 μ l Pfu-Turbo [®] Polymerase	+ 1 μ l Pfu-Turbo [®] Polymerase

Tabelle 2.1: Pipettierschema des Kontroll- und des Reaktionsansatzes der PCR im Rahmen der zielgerichteten Mutagenese mit Hilfe des QuickChange[®] Site-Directed Mutagenesis Kits (V 25, Stratagene).

Erst kurz vor Start der Reaktion wurde den Ansätzen die DNA-Polymerase zugesetzt, wobei den Herstellerangaben entsprechend eine Pfu-Turbo[®]-Polymerase verwendet wurde. Diese stammt aus dem Bakterium *Pyrococcus furiosus* und weist zusätzlich zu ihrer Polymerasetätigkeit eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität auf, die eine Korrekturaktivität erlaubt. Weiterhin ist die Pfu-Turbo[®]-Polymerase thermostabiler als die klassischerweise verwendete Taq-Polymerase.

Nach Polymerase-Zusatz wurden die Proben im Thermocycler (G 21) platziert, welcher anhand eines vorgegebenen Inkubationsprotokolls programmiert war. Zunächst wurde auf eine Temperatur von 95°C erhitzt, um die doppelsträngige DNA-Matrize zu denaturieren. Nach einer Zeitspanne von 30 s wurde die Temperatur auf 55°C vermindert, wodurch eine Hybridisierung der Oligonukleotidprimer stattfinden konnte (*Annealing*). Darauf folgend wurde auf 68°C erhitzt. Diese Temperatur stellt das Optimum für die Aktivität der Pfu-Turbo[®]-Polymerase dar und gewährleistete eine *Elongation* der Primer, indem Oligonukleotide am 3'-Ende angelagert wurden.

Die PCR läuft typischerweise in mehreren Zyklen ab, wobei die Anzahl der Zyklen abhängig von der Anzahl ausgetauschter Basen ist. Auch die Elongationszeit innerhalb eines Zyklus ist variabel und hängt von der Syntheserate der verwendeten Polymerase ab. Die Reaktionsgeschwindigkeit der hier verwendeten Pfu-Turbo[®]-Polymerase beträgt 2 min/kb. Bei einem Plasmid von 6 kb ist daher eine Elongationszeit von 12 min pro Zyklus ausreichend. Nach 18 durchlaufenen Temperaturzyklen wird das erhaltene Produkt auf 4°C gekühlt.

Um die ursprüngliche DNA-Matrize aus dem PCR-Produkt zu entfernen, wurde nachträglich ein Verdau mit der Endonuklease Dpn1 durchgeführt. Dpn1 stammt aus einem *E.coli*-Stamm mit *dam*-Methylierungssystem und kann sowohl methylierte als auch hemimethylierte DNA-Stränge erkennen und abbauen. Durch Zugabe von 1µl Dpn1 für 1h bei 37°C erfolgte der Abbau der methylierten DNA-Matrize, die Struktur der durch PCR neu synthetisierten und unmethylierten DNA blieb jedoch unbeeinflusst. Das erhaltene PCR-Produkt wurde bei -20°C gelagert.

2.1.2.2 Transformation

Definition: Unter einer Transformation versteht man die Aufnahme freier DNA durch Bakterien.

In diesem Abschnitt wird die Aufnahme der jeweiligen Plasmide, die mutierte M₂-Rezeptorgene enthalten, in superkompetente XL-1-Blue E.coli-Zellen (Stamm: E.coliK12) beschrieben.

Herstellung von Agarplatten: Vor Durchführung der Transformationsreaktion erfolgte die Herstellung von Ampicillin-haltigen Agarplatten. Dazu wurden 18,5 g LB-Agar (R 40) in 500 ml Aqua dest. gegeben und das Gemisch in der Mikrowelle (G 23) bis zum Vorliegen einer klaren Lösung erhitzt. Die Lösung wurde autoklaviert und abgekühlt. Nach Erreichen einer Temperatur von 60°C wurden dem flüssigen Agar 200 µl Ampicillin (R 21) mit einer sterilen Pipette (V 7) zugesetzt. Hiernach wurden pro Platte 25 ml Agar möglichst blasenfrei ausgegossen und die Platten nachfolgend bei 2-8°C gelagert.

Hitzeschock-Transformation: Als Transformationsmethode wurde entsprechend den Herstellerangaben die Hitzeschock-Transformation gewählt.

Hierzu wurden zunächst die superkompetenten XL-1-Blue-Bakterienzellen vorsichtig aufgetaut und anschließend 50 µl der Zellen in ein 50 ml Rundboden-Falcongefäß (V 5) gegeben und auf Eis gelagert. Zu diesem Ansatz wurde je 1 µl der Dpn1-verdauten Plasmid-DNA mit den jeweils verschieden mutierten M₂-Muskarinrezeptorgenen zugesetzt. In zwei weiteren Rundboden-Falcongefäßen (V 5) erfolgte der Ansatz von zwei Kontrollreaktionen. Im ersten Kontrollansatz wurde zu 50 µl Bakterien-Zellen 1 µl DNA zugesetzt, die aus der PCR-Kontrollreaktion erhalten wurde. In einem zweiten zusätzlichen Ansatz wurde 1 µl des pUC18-Plasmids eingesetzt. Der erste Ansatz diente der Kontrolle einer korrekt abgelaufenen PCR, der zweite Ansatz wurde entsprechend zur Überprüfung einer fehlerfreien Transformation genutzt.

Das Starten der Transformationsreaktion erfolgte während des Hitzeschocks, bei dem die vorbereiteten Falcongefäße für eine Zeitspanne von exakt 45 s in ein auf 42°C temperiertes Wasserbad eingetaucht wurden. Anschließend wurden die

verschiedenen Ansätze für weitere 2 min auf Eis gelagert und je 0,5 ml NZY⁺-Lösung (L 26) zugesetzt, die zuvor auf 42°C temperiert wurde. Es folgte eine einstündige Inkubation der verschiedenen Ansätze bei 37°C und 225-250 rpm im Schüttelinkubator (G 26). Vor dem Ausplattieren der verschiedenen Ansätze wurden zwei der vorbereiteten Ampicillin-haltigen Agarplatten zusätzlich nacheinander mit IPTG-Lösung (L 15) und X-Gal-Lösung (L 29) beschickt. Auf eine der vorbehandelten Agarplatten wurden 250 µl der mit PCR-Kontrolle transformierten Bakterienkultur gegeben, auf die zweite der Ansatz zur Transformationskontrolle (5 µl mit pUC18-Plasmid transformierte Bakteriensuspension + 195 µl NZY⁺). Beide Lösungen wurden mit Hilfe einer sterilen Impföse ausplattiert. Je 150 µl der transformierten Ansätze mit unterschiedlich mutierter Plasmid-DNA wurden hingegen auf unbehandelten, Ampicillin-haltigen Agarplatten ausgestrichen und anschließend zusammen mit den Agarplatten der Kontrollreaktionen im Brutschrank (G 15) bei 37°C für 16-18 Stunden inkubiert.

Kontrolle des erfolgreichen PCR- und Transformations-Verlaufs: Die Überprüfung erfolgte anhand der Begutachtung der beiden Kontroll-Agarplatten. Eine Anzahl von mehr als 250 Bakterienkolonien mit mehr als 98% blau gefärbten Kolonien je Agarplatte zeigte sowohl eine erfolgreiche PCR (siehe Kapitel 2.1.2.1) als auch eine erfolgreiche Transformation an. Bei korrekt verlaufener Transformation des pUC18-Plasmids in die Bakterienzellen wird das α-Fragment des Enzyms β-Galactosidase exprimiert, für das ein im Plasmid vorliegendes lacZ-Gen codiert. IPTG (R 37) fördert hierbei die Expression des α-Fragments. Zusammen mit dem ω-Fragment der β-Galactosidase, das bereits in den Bakterienzellen vorliegt, rekonstituiert sich die Aktivität des Enzyms und das auf den Agarplatten aufgebrauchte Substrat X-Gal (R 49) kann zu einem blauen Farbstoff umgesetzt werden.

Selektieren von Klonen: Zunächst erfolgte die Auswahl von jeweils zwei Bakterienklonen pro Agarplatte mit mutierter Plasmid-DNA. Die einzelnen Klone wurden isoliert und in bereitgestellte 50 ml-Falcongefäße (V 8) mit je 12 ml sterilem, Ampicillin-haltigen LB-Medium (L 1) überführt. Bei 37°C und 200 rpm wurde 8-9 Stunden im Schüttelinkubator (G 26) inkubiert. Anschließend erfolgte der Start einer Übernachtskultur, indem das jeweils stärker getrübbte Medium zweier identischer

Klone ausgewählt wurde und zu 500 ml sterilem, ampicillinhaltigen LB-Medium (L 1) gegeben wurde. Die weitere Vorgehensweise zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus dieser Kultur wird im nachfolgenden Kapitel beschrieben.

2.1.2.3 Plasmid-DNA-Gewinnung

Die Durchführung der Plasmid-DNA-Gewinnung erfolgte mit Hilfe des Qiagen® Plasmid Maxi Kits.

Dieses Kapitel dient ausschließlich der Erläuterung des theoretischen Hintergrunds einer Plasmid-DNA-Gewinnung, das genaue Protokoll des praktischen Ablaufs ist im jeweiligen Handbuch der Firma Qiagen® zu finden.

Zunächst erfolgte eine Amplifikation von Bakterienklonen mit entsprechender Plasmid-DNA aus „Glycerolstocks“, die ein Gemisch aus Bakterienklonen mit 60% Glycerol darstellen und aus früheren Transformationen stammten. Dazu wurden 500 ml eines sterilen, Ampicillin-haltigen LB-Mediums (L 1) mit einer kleinen Menge gefrorener oder frischer Bakterienkultur versetzt. Die Ansätze wurden 16-18h bei 37°C und 200 rpm in einem Schüttelinkubator (G 26) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung von jeweils 500 ml der angewachsenen Bakterienkulturen in geeignete Zentrifugengläser (V 3) und die Zentrifugation bei 7000 rpm für die Dauer von 30 min (G 1; Rotor: JLA 10.5; Temperatur: 4°C).

In der Zwischenzeit wurde ein kleiner Teil der restlichen Bakterienkultur entnommen, um neue Glycerolstocks herzustellen. Hierzu wurden in einem „Kryovial“ (V 11) 300 µl steriles Glycerol 60% (L 7) vorgelegt und 900 µl Bakterienkultur zugegeben. Die Komponenten wurden kurz gemischt und zügig bei -80°C (G 25) eingefroren.

Die nach Zentrifugation erhaltenen „Pellets“ wurden mit 10 ml RNAase A-haltigem Tris/EDTA-Puffer (Qiagen® Plasmid Maxi Kit, V 22) resuspendiert. Anschließend erfolgte die alkalische Lyse der Bakterienzellen mittels NaOH-Natriumdodecylsulfat-Puffer (Qiagen® Plasmid Maxi Kit, V 22). Die bei diesem Prozess freigesetzte RNA wurde durch die anfänglich zugesetzte RNAase A abgebaut, um eine Störung der Aufreinigung der Plasmid-DNA zu vermeiden. Bei der alkalischen Lyse werden typischerweise Zellbestandteile freigesetzt und es kommt weiterhin zur alkalischen Denaturierung von Proteinen, chromosomaler DNA und Plasmid-DNA. Ein Abbruch der Reaktion erfolgte nach genau fünf Minuten, indem

zur Neutralisation 10 ml gekühlter Kaliumacetatpuffer (pH 5,5; Qiagen[®] Plasmid Maxi Kit, V 22) zugesetzt wurde. Die Einhaltung der Lysezeit ist von großer experimenteller Bedeutung, da bei Überschreitung der Zeitspanne von 5 min eine irreversible Denaturierung der Plasmid-DNA zu erwarten ist. Durch diese Neutralisationsreaktion kommt es zur Ausfällung von denaturierten Protein- und Zellresten in Salz-Detergens-Komplexen. Dagegen bleibt die kleinere, ringförmig geschlossene Plasmid-DNA in Lösung und renaturiert. Das Präzipitat wurde 30 min zentrifugiert (G 1; Rotor JA 25,5; 12000 rpm; Temperatur: 4°C) und der Überstand anschließend vorsichtig dekantiert. Es wurde erneut für 15 min und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nachfolgend wurde der die intakte Plasmid-DNA enthaltende klare Überstand möglichst rückstandsfrei auf eine bereits äquilibrierte Anionenaustauscherharz-Säule (Qiagen[®] Plasmid Maxi Kit, V 22) gegeben. Das Harz verfügt über positive Ladungen und ist daher in der Lage, negativ geladen vorliegende Plasmid-DNA zu binden. Sowohl Salzgehalt als auch pH-Wert des Lysats gewährleisten, dass ausschließlich Plasmid-DNA durch die Anionenaustauschersäule zurückgehalten wird. Weitere Bestandteile des Lysats wie abgebaute RNA oder Zellproteine können die Säule ungehindert passieren. Um diese Verunreinigungen möglichst vollständig zu entfernen, wurde mehrmals mit einem Puffer mittlerer Salzkonzentration gewaschen. Durch Zusatz eines Puffers mit hoher Salzkonzentration wurde die an das Anionenaustauscherharz gebundene Plasmid-DNA vollständig eluiert. Das Eluat wurde in einem Falcon-Gefäß (V 5) aufgefangen und die Plasmid-DNA im Anschluß durch Zugabe von 100%igem, hochreinen Isopropanol (R 19) ausgefällt. Auf diese Weise werden die Salze des Elutionspuffers entfernt und die gewonnene Plasmid-DNA aufkonzentriert. Das nach Zentrifugation (G 1; Rotor JS 4,3; 4300 rpm; Temperatur: 4°C) erhaltene Pellet wurde durch Zusatz von 70%igem Ethanol gewaschen, um letzte Salzreste zu entfernen und an der Luft getrocknet. Die „Pellets“ wurden in 600 µl sterilem TE-Puffer (L 29) resuspendiert, in „Kryovials“ überführt und bei -20°C aufbewahrt.

Die Gehaltsbestimmung der Plasmid-DNA (µg/µl) erfolgte photometrisch (G 3). Hierzu wurden 8 µl in TE-Puffer (L 29) gelöste Plasmid-DNA mit 392 µl Aqua dest. verdünnt (Verhältnis 1:50) und die Absorption sowohl bei $\lambda = 260$ nm (A_{260}) als auch bei $\lambda = 280$ nm (A_{280}) vermessen. Die Reinheit wurde durch den Quotienten der Absorptionswerte bei $\lambda = 260$ nm (A_{260}) und $\lambda = 280$ nm (A_{280}) bestimmt.

Der Gehalt der Plasmid-DNA wurde mittels untenstehender Gleichung berechnet:

$$\text{Plasmid-DNA-Gehalt } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = A_{260} \times 0,05 \times 50$$

2.1.2.4 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Die Überprüfung der Basensequenz der erhaltenen Plasmid-DNA erfolgte unter Anwendung der Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977) und wurde von der Firma Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Verfahren: Standard Hot Start) durchgeführt.

2.1.2.5 Untersuchte punktmutierte M₂-Rezeptoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene punktmutierte M₂-Rezeptoren verwendet. Zunächst kam die von Frau Dr. S. Prilla hergestellte Rezeptormutante M₂⁴²²Trp→Ala zum Einsatz. M₂⁴²²Trp stellt ein konserviertes Epitop der siebten transmembranären Domäne des M₂-Rezeptors dar und spielt eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung allosterischer Basisaffinität (Prilla et al., 2006).

Im weiteren Verlauf wurden überdies die punktmutierten Rezeptoren M₂⁸⁹Trp→Ala und M₂⁹⁹Trp→Ala verwendet. Das Epitop M₂⁸⁹Trp befindet sich in der ersten extrazellulären Schleife des M₂-Rezeptorproteins, M₂⁹⁹Trp ist in der dritten transmembranären Domäne lokalisiert.

2.2 Zellbiologische Arbeiten

2.2.1 Charakterisierung verwendeter Zelllinien

Innerhalb dieser Arbeit wurde mit verschiedenen Zelllinien gearbeitet, die nachfolgend in einer Übersicht (siehe Tabelle 2.2) dargestellt und genauer charakterisiert werden.

Zelllinie	Nährmedium	Charakterisierung
COS7 <i>Art der Transfektion</i> Transient	Dulbecco's Modified Eagles Medium (L 6)	Nierenzellen der Grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>). <i>COS7-Zellen sind mit einer Mutante des Affenvirus SV40 (Simian virus 40) stabil transfiziert. Diese Mutante exprimiert das SV40-T-Antigen, welches normalerweise an den SV40-Replikationsursprung bindet und zur Vermehrung viraler DNA führt. Werden nun fremde Plasmide mit diesem Replikationsursprung in die Zellen eingebracht, kann eine effektive Vermehrung der Plasmid-DNA in den Zellen erfolgen.</i>
CHOK1* <i>Art der Transfektion</i> Transient	Dulbecco's Modified Eagles Medium (L 6)	Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters (<i>Cricetulus griseus</i>). <i>CHOK1-Zellen stellen einen Subklon einer parenteralen CHO-Zelllinie dar.</i>
CHOLec1* <i>Art der Transfektion</i> Transient	Dulbecco's Modified Eagles Medium (L 6)	Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters (<i>Cricetulus griseus</i>). <i>CHOLec1-Zellen sind Glykosylierungsmutanten von parenteralen CHO-Zellen. Durch einen Defekt des Enzyms N-Acetylglucosaminoglycosyltransferase I werden ausschließlich Glykane vom High-Mannose-Typs gebildet.</i>

CHOGaIT* <i>Transient</i>	Dulbecco's Modified Eagles Medium (L 6)	Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters (Cricetulus griseus). <i>CHOGaIT-Zellen sind stabil mit dem Enzym Galactosyltransferase transfiziert. Daraus ergibt sich ein erhöhter Gehalt an Galactosylceramid in der Membranumgebung.</i>
CHOSULF* <i>Transient</i>	Dulbecco's Modified Eagles Medium (L 6)	Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters (Cricetulus griseus). <i>CHOSULF-Zellen sind sowohl stabil mit Galactosyltransferase als auch mit dem Enzym Cerebrosidsulfotransferase transfiziert. Es resultiert ein erhöhter Gehalt an Sulfatid in der Membranumgebung.</i>
CHO M₂[#] <i>Stabil</i>	Nutrient Mixture F12 Ham (L 24)	Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters (Cricetulus griseus), stabil transfiziert mit dem Hm2-Gen.
CHO FlpInTM M₂^{##} <i>Stabil</i>	Nutrient Mixture F12 Ham (L 24) mit 2 ml Glutamin und ohne Zusatz von G418	Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters (Cricetulus griseus), stabil transfiziert mit dem Hm2-Gen.
CHO FlpInTM M₂⁹⁹Trp→Ala^{##} <i>Stabil</i>	Nutrient Mixture F12 Ham (L 24) mit 2 ml Glutamin und ohne Zusatz von G418	Ovarialzellen des chinesischen Seidenhamsters (Cricetulus griseus), stabil transfiziert mit dem entsprechend mutierten Hm2-Gen.

Tabelle 2.2: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien. *Die Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. M. Eckhardt (Institut für Physiologische Chemie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. †Die Zellen wurden freundlicherweise von Frau PD Dr. V. Otto (Abteilung Chemie und angewandte Biowissenschaften, ETH Zürich, Schweiz) zur Verfügung gestellt. #Die Zellen wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. G. Lambrecht (Abteilung Pharmakologie, Biozentrum Niederursel, Universität Frankfurt/Main) zur Verfügung gestellt. ##Die untransfizierte CHO FlpInTM Zelllinie wurde freundlicherweise Frau Prof. Dr. E. Kostenis (Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Zellkultur

Alle durchgeführten zellbiologischen Arbeiten erfolgten unter aseptischen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Luftstrom (G 10).

Die Zellen wurden in sterilen Gewebekulturschalen (V 9, V 10) im Brutschrank (G 15) bei 37°C, 5%igem CO₂-Gehalt und 96%iger Luftfeuchte kultiviert. Die für die unterschiedlichen Zelllinien jeweils verwendeten Nährmedien sind in Tabelle 2.2 aufgelistet.

Auftauen und Kultivieren von Zellen: Zu Beginn wurde 1 ml DMSO-haltige Zellsuspension zügig bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend zu 9 ml des entsprechenden Nährmediums in ein Falcongefäß (V 8) gegeben. Die verdünnte Zellsuspension wurde zentrifugiert (G 1; Rotor: JS 4.3; 900 rpm; Temperatur: 4°C) und der verbleibende Überstand vorsichtig abgesaugt. Das entstandene Pellet wurde in 10 ml Nährmedium resuspendiert und in eine Gewebekulturschale (V 9) überführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte unter den oben angegebenen Bedingungen.

Vermehrung der Zellen: Ein Passagieren der Zellen wurde bei ausreichender Konfluenz regelmäßig alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:4 durchgeführt. Hierzu wurde zunächst das Nährmedium von den Gewebekulturschalen (V 10) sorgfältig abgesaugt und die adhärennten Zellen im Anschluß mit 10 ml vortemperiertem PBS-Puffer (L 3) gewaschen. Anschließend erfolgte das Ablösen der Zellen vom Schalenboden. Hierzu wurden 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (R 48) auf die Schalen gegeben und diese 3-5 min bei 37°C im Brutschrank (G 15) inkubiert. Waren die Zellen nach dieser Zeit noch nicht vollständig vom Schalenboden abgelöst, wurde zusätzlich vorsichtig gegen die Schalen geklopft. Anschließend wurde die Trypsin-EDTA-Lösung (R 48) mit mindestens 3-5 ml Nährmedium neutralisiert und in ein Falcongefäß (V 8) gegeben, in dem eine ausreichende Menge zusätzliches Nährmedium vorgelegt war. Die Zellsuspension wurde gemischt und anschließend auf neue, mit je 20 ml Nährmedium beschickte Gewebekulturschalen (V 10) verteilt. Die weitere Inkubation erfolgte unter den oben angegebenen Bedingungen.

Einfrieren und Lagerung der Zellen: Nach erfolgreicher Vermehrung und ausreichender Konfluenz der Zellen, wurden zunächst das Nährmedium von den

Gewebekulturschalen (V 10) abgesaugt und vorsichtig mit 10 ml vortemperiertem PBS-Puffer (L 3) gewaschen. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und auf jede Schale wurden 3-5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (R 48) gegeben. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei 37°C. Nach dieser Zeit wurde vorsichtig gegen die Schalen geklopft, falls die Zellen noch nicht vollständig vom Boden abgelöst waren. Anschließend wurde die Trypsin-EDTA-Lösung (R 48) mit mindestens 3-5 ml Nährmedium neutralisiert, die Zellsuspension in ein Falcongefäß (V 8) überführt und zentrifugiert (G 1; Rotor: JS 4.3; 900 rpm; Temperatur: 4°C). Der Überstand wurde abgesaugt und das verbleibende „Pellet“ in einer ausreichenden Menge Nährmedium aufgenommen und resuspendiert. Je 900 µl Zellsuspension wurden in „Kryovials“ (V 11) pipettiert, in denen bereits je 100 µl DMSO (R 25) vorgelegt waren. Die Mischung wurde kurz umgeschüttelt und zügig bei -80°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in einen Tank mit Flüssigstickstoff überführt.

2.2.3 Transfektionen

Der folgende Abschnitt beschreibt die in dieser Arbeit verwendeten Transfektionsarten und die Präparation der zellulären Membranen.

2.2.3.1 Transiente Transfektion und Membranpräparation

Allgemeines: Um eine heterologe Expression des humanen muskarinischen M₂-Rezeptors und verschiedener Rezeptormutanten zu erreichen, wurde in einigen Zelllinien (siehe Tabelle 2.2) eine transiente Transfektion durchgeführt. Darunter versteht man das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische zelluläre Systeme. Die Lebensdauer der transient aufgenommenen Plasmid-DNA ist jedoch nur kurz, da es bereits nach einigen Tagen zu einem vollständigen Abbau des Fremdgens in den Zellen kommt. Im Gegensatz zu einer stabilen Transfektion wird das Gen in diesem Fall nicht in das Genom der Zelle integriert, sondern liegt frei als Plasmid vor.

In dieser Arbeit wurde das Transfektionsreagenz Polyfect[®] (R 18) verwendet. Es besteht aus so genannten Dendrimeren, die kugelförmig verzweigte Polymere darstellen und über endständige, positiv geladene Aminosäuren verfügen, durch die eine Komplexbildung mit negativ geladenen Phosphatgruppen der Plasmid-DNA ermöglicht wird. Der Komplex verfügt insgesamt über eine positive Ladungsstruktur

und kann so in die Zelle aufgenommen werden. Dendrimere puffern zusätzlich die Umgebung in den Endosomen, so dass die DNA vor einem Angriff durch lysosomale DNAsen geschützt wird (Tang et al., 1996). Im Zytoplasma erfolgt eine Freisetzung der Plasmid-DNA aus den Komplexen.

Ausplattieren der Zellen: 24 Stunden vor Beginn der Transfektion wurden die kultivierten Zellen aufgeteilt, so dass sich am Ende auf jeder Gewebekulturschale (V 9) $1,6 \times 10^6$ Zellen befanden. Hierzu wurden zunächst neue Schalen mit je 7 ml Dulbecco's Modified Eagles Medium (L 6) beschickt. Die in Kultur gehaltenen Zellen wurden mit vortemperiertem PBS-Puffer (L 4) gewaschen und trypsinisiert (siehe Kapitel 2.2.2). Anschließend wurde die erhaltene Zellsuspension zentrifugiert (G 1; Rotor: JS 4.3; 900 rpm; Temperatur: 4°C), der Überstand abgesaugt und das erhaltene Pellet je nach Größe mit 20-30 ml Nährmedium resuspendiert. Es wurden nachfolgend zügig je 10 µl der Suspension auf jede Seite einer Neubauer Zählkammer (G 32) pipettiert und die Zellzahl in je zwei 4x4-Quadraten der Kammer bestimmt. Der Mittelwert der ermittelten Zellzahlen diente der Berechnung des Volumens an Zellsuspension, das jeweils auf eine vorbereitete Schale gegeben werden musste, um eine Zellzahl von $1,6 \times 10^6$ zu gewährleisten. Die Zellen wurden anschließend im Brutschrank inkubiert.

Transfektion: Nach 24 Stunden hatten die Zellen eine Konfluenz von 40-80% erreicht und die Transfektion wurde begonnen. Die an dieser Stelle verwendete DNA des humanen muskarinischen M_2 -Rezeptors und verschiedener Rezeptormutanten wurde aus Plasmid-DNA-Gewinnungen (siehe Kapitel 2.1.2.3) erhalten. Zu Beginn jeder Transfektion wurde ein bestimmtes Volumen der jeweiligen Plasmid-DNA, das einer Menge von 6 µg DNA entspricht, mit Nährmedium ohne Serum- und Antibiotikazusatz in einem Eppendorfgefäß (V 12) auf 300 µl aufgefüllt. Die Lösung wurde intensiv gemischt, zentrifugiert (G 7) und es wurden anschließend 30 µl Transfektionsreagenz (R 18) zugesetzt. Es folgte eine Inkubationszeit von 10-15 min, in der sich Dendrimer-Plasmid-DNA-Komplexe bildeten. Während dieser Zeit wurde das Nährmedium der seit dem Vortag inkubierten Zellen gewechselt. Anschließend wurde zu jedem Ansatz, der DNA und Transfektionsreagenz enthielt, je 1 ml Nährmedium mit Serum- und Antibiotikazusatz gegeben. Die Lösung wurde mehrfach gründlich gemischt und der Inhalt eines Eppendorfgefäßes (V 12) auf eine

vorbereitete Schale mit Zellen gegeben. Innerhalb der nächsten 48 Stunden wurden die gewünschten Rezeptorproteine in den Zellen heterolog exprimiert.

Membranpräparation: Zwei Tage nach erfolgter Transfektion wurde die Präparation der Membranen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 2 ml PBS-Puffer (L 4) gewaschen. Anschließend wurden 4 ml des jeweiligen Inkubationspuffers (L 15 oder L 23) auf jede Gewebekulturschale (V 9) gegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers (V 23) mechanisch vom Schalenboden abgelöst. Die erhaltenen Zellsuspensionen von 5 Schalen wurden quantitativ in ein auf Eis gelagertes Zentrifugenröhrchen (V 15) überführt und die Zellen mittels eines Polytron-Homogenisators (G 16, 3x10 s, Stufe 6) zerstört. Nachfolgend wurde zentrifugiert (G 1; Rotor JA 25.50; 30 min; 18000 rpm; Temperatur: 4°C), der Überstand vorsichtig abgegossen und das entstandene Pellet in 2 ml Inkubationspuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Suspensionen aus zwei Zentrifugenröhrchen in einem Potter-Glasgefäß (G 12) vereinigt, es wurde je zweimal mit 2 ml Inkubationspuffer gewaschen, so dass im Glasgefäß 12 ml Suspension vorlagen. Diese Menge wurde erneut per Hand homogenisiert, das Potter-Glasgefäß anschließend mit zweimal 4,5 ml Inkubationspuffer gespült und die Suspension in ein Falcongefäß (V 8) gegeben. Es wurde intensiv gemischt und die abschließend erhaltene Suspension auf Eppendorfgefäße (V 12) aufgeteilt. Eine Lagerung der erhaltenen Membranpräparation erfolgte bei -80°C (G 25).

2.2.3.1.1 Durchgeführte transiente Transfektionen

Transfizierte Zelllinie	Verwendete Plasmid-DNA	Datum	Inkubationspuffer
COS7	M ₂	30.06.2005	5 mM Na,K,P _i (L 23)
COS7	M ₂	25.01.2007	5 mM Na,K,P _i (L 23)
COS7	M ₂	26.07.2007	5 mM Na,K,P _i (L 23)
COS7	M ₂ ⁴²² Trp→Ala	15.11.2006	5 mM Na,K,P _i (L 23)
COS7	M ₂ ⁴²² Trp→Ala	25.01.2007	5 mM Na,K,P _i (L 23)
COS7	M ₂ ⁸⁹ Trp→Ala	04.10.2007	5 mM Na,K,P _i (L 23)
COS7	M ₂ ⁹⁹ Trp→Ala	04.10.2007	5 mM Na,K,P _i (L 23)
CHOK1	M ₂	11.05.2006	5 mM Na,K,P _i (L 23)
CHOK1	M ₂	27.07.2006	5 mM Na,K,P _i (L 23)
CHOK1	M ₂	24.05.2007	10 mM HEPES (L 15)
CHOLec1	M ₂	21.10.2005	5 mM Na,K,P _i (L 23)
CHOLec1	M ₂	02.03.2006	5 mM Na,K,P _i (L 23)
CHOLec1	M ₂	24.03.2006	5 mM Na,K,P _i (L 23)
CHOLec1	M ₂	06.04.2006	5 mM Na,K,P _i (L 23)
CHOGaIT	M ₂	14.12.2006	5 mM Na,K,P _i (L 23)
CHOGaIT	M ₂	24.05.2007	10 mM HEPES (L 15)
CHOSULF	M ₂	27.07.2006	5 mM Na,K,P _i (L 23)
CHOSULF	M ₂	26.04.2007	5 mM Na,K,P _i (L 23)
CHOSULF	M ₂	24.05.2007	10 mM HEPES (L 15)

Tabelle 2.3: Auflistung der durchgeführten transienten Transfektionen und Membranpräparationen.

2.2.3.2 Stabile Transfektion (FlpIn™-System) und Membranpräparation

In diesem Abschnitt wird die Durchführung einer stabilen Transfektion mit Hilfe des FlpIn™-Systems (V 13) beschrieben. Das Ziel war die Etablierung einer Zelllinie, die den muskarinischen $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptor (Rezeptormutante) stabil exprimiert. Die Besonderheit des FlpIn™-Systems besteht darin, dass die Integration des Gens von Interesse (*gene of interest = GOI*) in das Genom von eukaryotischen Zellen an einer spezifischen, genomischen Stelle erfolgt. Dies entspricht einer ortsspezifischen Rekombination.

Transfektion: In der hier verwendeten Ausgangszelllinie (CHOFlpIn™), die freundlicherweise von Prof. Dr. E. Kostenis (Pharmazeutische Biologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt wurde, ist eine Erkennungssequenz für das Enzym Flp-Rekombinase stabil in das Genom integriert. Diese Sequenz liegt innerhalb der codierenden Sequenzen für ein Fusionsprotein aus β -Galactosidase und einem Protein, das für eine Zeocin-Resistenz verantwortlich ist. Nach dem Auftauen der Zellen werden die Wirtszellen daher auf Zeocin (R 10) (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) selektioniert.

Dem FlpIn™-System-Handbuch (Invitrogen®) entsprechend wurde in einen zweiten Expressionsvektor gleichzeitig das Gen für den humanen muskarinischen M_2 -Rezeptor kloniert. Diese Klonierungsarbeiten und die Etablierung einer stabilen CHOFlpIn- M_2 -Zelllinie, die nachfolgend in dieser Arbeit verwendet wird, wurden von Frau A. Kebig und Frau Dr. M. Mohr-Andrä durchgeführt. Der oben (siehe Kapitel 2.1.1) angeführte Expressionsvektor wurde daraufhin zielgerichtet mutiert (siehe Kapitel 2.1.2), so dass für das weitere Vorgehen der Expressionsvektor mit dem ligierten Gen für den muskarinischen $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptor vorlag. Dieser Vektor wurde zusammen mit dem pOG44-Plasmid (R 9), das konstitutiv das Enzym Flp-Rekombinase exprimiert, in die CHOFlpIn™-Ausgangszelllinie transfiziert (Methode siehe Kapitel 2.2.3.1). Nach dieser Kotransfektion vermittelt die aus pOG44-stammende Flp-Rekombinase eine Rekombination der beiden FRT-Regionen. Hierbei wird das pcDNA5/FRT/TO-Plasmid mit dem Gen von Interesse an den Ort der FRT-Sequenz integriert. Die für eine Hygromycin-Resistenz codierende Sequenz liegt nun stromabwärts des SV40-Promotors und kann abgelesen werden. Gleichzeitig findet eine Inaktivierung des lacZ-Zeocin-Fusionsgens statt, sodass die

Expressionszelllinie zwar resistent gegenüber Hygromycin (R 8), aber nunmehr sensibel auf Zeocin (R 10) reagiert. Daher wurden die Zellen zu Beginn in Hygromycin-haltigem (800 µg/ml) Nutrient Mixture F12-Ham (L 24) mit 2 ml Glutamin und ohne Zusatz von G418 auf Hygromycin (R 8) selektioniert. In späteren Passagen wurde dagegen eine Hygromycinkonzentration von 400 µg/ml verwendet.

Membranpräparation: Die Herstellung der Membransuspensionen von allen stabil transfizierten Zellen (siehe Tabelle 2.2) erfolgte wie nachfolgend beschrieben. Bei ausreichender Konfluenz der Zellen wurde 18 bis 24 Stunden vor der geplanten Präparation das verwendete Nährmedium durch 5 mM butyrathaltiges Nährmedium ersetzt, um den Expressionsgrad der Rezeptoren zu erhöhen (Kruh, 1982). Nach dieser Zeitspanne wurde zunächst das Nährmedium von den Schalen (V 10) abgenommen und jeweils 2,4 ml eisgekühlter Homogenisationspuffer (L 13) zugesetzt. Danach erfolgte das mechanische Ablösen des Zellrasens vom Schalenboden mit Hilfe eines Zellschabers (V 23). Die Schale wurde mit 1,5 ml Puffer gespült und die erhaltene Suspension anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurden immer fünf Schalen auf einmal bearbeitet und dementsprechend die Suspensionen von fünf Schalen in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt. Nach diesem Schritt erfolgte die Zerstörung der Zellen mit Hilfe eines Polytron Homogenisators (G 16; 2x10 s; Stufe 6). Anschließend wurde zentrifugiert (G 1; Rotor: JA 25.50; 40000 rpm; 10 min; Temperatur 2°C), der Überstand nachfolgend vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 10 ml Zentrifugationspuffer (L 14) aufgenommen. Es wurde erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde noch einmal wiederholt und das letztlich entstandene Pellet in einer entsprechenden Menge des jeweiligen Inkubationspuffers aufgenommen, aliquotiert und zügig bei -80°C (G 25) eingefroren. Art und Menge des Puffers richteten sich in diesem Fall nach den mit der jeweiligen Membransuspension durchgeführten Versuchen.

2.3 Proteinbestimmungen

In diesem Kapitel wird die Bestimmung des Proteingehaltes der hergestellten Membranhomogenate beschrieben. Der Proteingehalt aller Membranen aus CHO-Zellen wurde nach der Methode von Lowry (Lowry et al., 1951) bestimmt, für Membranproteine aus COS7-Zellen wurde die Methode nach Bradford angewendet (Bradford, 1976).

2.3.1 Proteinbestimmungen nach Lowry

Reaktionsprinzip: Die Proteinbestimmung nach Lowry beruht auf zwei aufeinander folgenden Reaktionen. Zunächst kommt es zur Bildung eines blauvioletten, quadratisch-planaren Komplexes zwischen Peptidbindungen und Kupfer-II-Ionen in alkalischer Lösung (Biuretreaktion). In einem zweiten Schritt reduziert dieser Komplex das gelb gefärbte Folin-Ciocalteus-Reagenz, das aus Molybdän- und Wolfram-Heteropolysäuren besteht. Es resultiert eine zum Proteingehalt proportionale, intensive Blaufärbung. Die Auswertung erfolgt entsprechend photometrisch (G 3) bei einer Wellenlänge von 500 nm.

Methodisches Vorgehen: Zunächst wird aus 100 ml 2%iger Natriumcarbonatlösung (L 20), 1 ml Kaliumnatriumtartratlösung (L 3) und 1 ml Kupfersulfatlösung (L 4) eine Lösung hergestellt, die nachfolgend als „Arbeitslösung“ bezeichnet wird. Anschließend wurde eine Lösung des Vergleichsproteins Albumin (R 36) hergestellt und sechs verschiedene Konzentrationen (0,25 mg/ml bis 2,0 mg/ml) zur Erstellung einer Kalibriergeraden vorbereitet. In einem nächsten Schritt wurden zu 200 µl jeder Kalibrierkonzentration und jeder zu vermessenden Proteinprobe 2,0 ml der Arbeitslösung gegeben. Es folgte eine Inkubation der Proben unter Lichtausschluss für 10 min. In einem zweiten Schritt wurde jede Probe mit 200 µl Folin-Ciocalteus-Reagenz (L 7) versetzt und für 30 min unter Lichtausschluss inkubiert. Im Anschluss daran erfolgten die photometrische Vermessung (G 3) der verschiedenen Kalibrierkonzentrationen bzw. der Proben und eine Berechnung des Proteingehaltes.

2.3.2 Proteinbestimmungen nach Bradford

Reaktionsprinzip: Das Bradford-Reagenz beinhaltet den Farbstoff Coomassie-Brillant Blau G-250, der in saurer Lösung blau gefärbte Komplexe mit den Seitenketten der Proteine bildet. Eine photometrische Auswertung (G 3) erfolgt daher im üblichen Frequenzbereich für blaues Licht bei 595 nm.

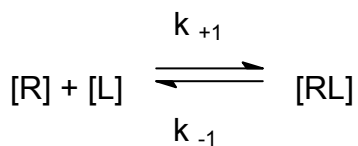
Methodisches Vorgehen: Bei der Proteinbestimmung nach Bradford wurde wiederum zunächst eine Stammlösung des Vergleichsproteins Albumin (R 36) angefertigt. Aus dieser Stammlösung erfolgte anschließend die Herstellung von sechs verschiedenen Konzentrationen (0,25 mg/ml bis 2,0 mg/ml) zur Erstellung einer Kalibriergeraden. Es wurden nachfolgend je 100 µl der unverdünnt eingesetzten Proteinproben bzw. Kalibrierkonzentrationen mit je 3,0 ml Bradford-Reagenz (R 23) versetzt, intensiv gemischt und 5-45 min unter Lichtausschluss inkubiert. Es erfolgte eine zeitnahe photometrische Vermessung (G 3) aller Proben und abschließend die Berechnung des Proteingehaltes.

2.4 Radioligand-Bindungsstudien

In dieser Arbeit wurden Radioligand-Bindungsexperimente mit dem Liganden [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS) durchgeführt. Nachfolgend werden die theoretischen Grundlagen und die experimentellen Vorgehensweisen beschrieben.

2.4.1 Theoretische Grundlagen

Die Beschreibung und Analyse von Radioligand-Bindungsexperimenten stützt sich prinzipiell auf die Theorie des Massenwirkungsgesetzes. Somit wird die reversible Interaktion eines Liganden mit einem Rezeptor durch folgende Reaktion beschrieben (Bennet und Yamamura, 1985):



Gleichung 2. 1

- [R]: Konzentration der freien Rezeptoren
- [L]: Konzentration des freien Liganden
- [RL]: Konzentration der Ligand-Rezeptor-Komplexe
- k_{+1} : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation
- k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation

Hieraus können die Geschwindigkeiten sowohl für die Assoziationsreaktion als auch für die Dissoziationsreaktion berechnet werden.

Für die Assoziationsreaktion gilt:

$$v_{\text{hin}} = k_{+1} \cdot [R] \cdot [L]$$

Gleichung 2.2

Analog wird die Geschwindigkeit der Dissoziationsreaktion bestimmt:

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

Gleichung 2.3

In einem dynamischen Gleichgewichtszustand laufen Assoziationsreaktion und Dissoziationsreaktion mit gleicher Geschwindigkeit ab.

$$k_{+1} \cdot [R] \cdot [L] = k_{-1} \cdot [RL] \quad \text{Gleichung 2.4}$$

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D ergibt sich aus dem Quotienten der Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation (k_{-1}) und der Assoziation (k_{+1}). Aus dem Kehrwert von K_D ergibt sich die Assoziationskonstante K_A .

$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} = \frac{1}{K_A} \quad \text{Gleichung 2.5}$$

K_D : Gleichgewichtsdissoziationskonstante
 K_A : Gleichgewichtsassoziationskonstante

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D entspricht der Konzentration eines Liganden, bei der im Gleichgewicht die Hälfte aller Rezeptoren besetzt wird. K_D ist daher ein Maß für die Affinität des Liganden am Rezeptor und wird in der Einheit mol/l angegeben. Häufig erfolgt eine Angabe von K_D in Form des negativen dekadischen Logarithmus'. Ein hoher pK_D -Wert zeigt dementsprechend eine hohe Affinität des Liganden zum Rezeptor an.

2.4.2 Experimente im Bindungsgleichgewicht

Alle unter diesem Kapitel aufgeführten Experimente wurden unter Gleichgewichtsbedingungen ausgeführt. Dies bedeutet, dass die Inkubationszeit der jeweiligen Versuchsansätze, bestehend aus Rezeptor, Radioligand und einem weiteren orthosterischen oder allosterischen Liganden, so gewählt war, dass das Bindungsgleichgewicht erreicht wurde.

2.4.2.1 Homologe Konkurrenzexperimente

Homologe Konkurrenzexperimente dienten in dieser Arbeit zur Charakterisierung der hergestellten rezeptorhaltigen Membransuspensionen. Die Beschreibung der

Rezeptoreigenschaften erfolgte anhand von zwei Parametern, K_D und B_{max} . K_D kennzeichnet hierbei die Affinität des verwendeten Radioliganden [3H]N-Methylscopolamin zum Rezeptor, B_{max} stellt ein Maß für die Anzahl an Bindungsstellen in der Membransuspension dar. Beide Kenngrößen werden nachfolgend genauer erläutert.

2.4.2.1.1 Theoretische Grundlagen

Ein homologes Wettbewerbsexperiment stellt eine spezielle Form eines Inhibitionsexperiments dar, bei dem der Radioligand und der eingesetzte Inhibitor die gleiche chemische Struktur aufweisen. Die beiden Substanzen unterscheiden sich daher nur in der An- bzw. Abwesenheit der radioaktiven Markierung. Im Falle eines mit Tritium markierten Radioliganden (z.B. [3H]N-Methylscopolamin) sind daher keine Unterschiede im chemischen Verhalten der beiden Liganden zu erwarten.

Bei einer homologen Wettbewerbsexperiment wird nur eine einzige Radioligandkonzentration verwendet. Im Vergleich zu Sättigungsexperimenten, die ebenfalls zur Bestimmung von K_D und B_{max} eingesetzt werden können und bei denen ansteigende Konzentrationen des Radioliganden verwendet werden, ist die Methode der homologen Wettbewerbsexperiment als kostengünstiger zu bewerten.

Im Experiment werden zu der festgesetzten Radioligandkonzentration stufenweise ansteigende Konzentrationen des strukturgleichen Inhibitors gegeben. Der Radioligand wird somit sukzessive durch den unmarkierten Wettbewerber vom Rezeptor „verdrängt“.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit des Inhibitors ermittelt, eine Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgt in Anwesenheit eines in hohem Überschuss vorliegenden, strukturverschiedenen Liganden, der eine Affinität zur gleichen Bindungsstelle aufweist. So kommt es zu einer vollständigen Dissoziation des Radioliganden vom Rezeptor und dieser bindet nur noch an unspezifische Bindungsstellen.

Die Auswertung erfolgt anhand computergestützter, nichtlinearer Regressionsanalyse (GraphPad Prism[®]). In diesem Rahmen wird die gemessene spezifische Bindung des Radioliganden gegen steigende logarithmische

Konzentrationen des Inhibitors aufgetragen und die Kurve entsprechend der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ angepasst (Barlow und Blake, 1989).

$$B_{\text{ges}} = \text{Min} + \frac{\text{Max} - \text{Min}}{1 + (\text{IC}_{50} / 10^{[X]})^{n_H}} \quad \text{Gleichung 2.6}$$

- B_{ges} : Gesamtbindung des Radioliganden
 Min : Unteres Kurvenplateau (Gesamtbindung des Radioliganden in Anwesenheit hoher Konzentrationen des unmarkierten Liganden)
 Max : Oberes Kurvenplateau (Gesamtbindung des Radioliganden in Abwesenheit des unmarkierten Liganden)
 IC_{50} : Konzentration des unmarkierten Liganden, bei der die spezifische Bindung des Radioliganden um 50% reduziert wurde (Wendepunkt der sigmoiden Kurve)
 $[X]$: Konzentration des unmarkierten Liganden
 n_H : Hill-Koeffizient (Maß für die Kurvensteilheit)

Eine Beschreibung der Steilheit der resultierenden sigmoiden Kurve erfolgt durch den Parameter n_H , der dem Hill-Koeffizienten aus der Hill-Gleichung (Hill, 1910) entspricht. Weicht n_H nicht signifikant von -1 ab, so ist davon auszugehen, dass die betrachtete Ligand-Rezeptor-Interaktion im Verhältnis 1:1 verlaufen ist und die Population der Rezeptoren als homogen angesehen werden kann. Weiterhin gibt der IC_{50} -Wert die Konzentration des Kompetitors an, bei der die Hälfte der spezifischen Bindung des Radioliganden verdrängt wird. Ausgehend von diesem Wert kann durch die Gleichung von Cheng und Prusoff die Affinität des Inhibitors zum Rezeptor bestimmt werden (Cheng und Prusoff, 1973). Voraussetzung ist hierbei die Kenntnis der eingesetzten Konzentration des Radioliganden $[L]$ sowie die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D des markierten Liganden.

$$K_i = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + \frac{[L]}{K_D}} \quad \text{Gleichung 2.7}$$

- K_i : Affinität des Inhibitors zum Rezeptor
 $[L]$: Konzentration des Radioliganden
 K_D : Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Radioliganden

Da sich bei einer homologen Kompetition Radioligand und Inhibitor aufgrund ihrer Strukturidentität chemisch nicht voneinander unterscheiden, kann in diesem Fall die

Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D mit K_i gleichgesetzt werden und Gleichung 2.7 folgendermaßen vereinfacht werden.

$$K_D = K_i = IC_{50} \cdot [L] \quad \text{Gleichung 2.8}$$

Unter Anwendung dieses Zusammenhangs und durch Einbeziehung der spezifischen Radioligandbindung B_0 kann schließlich die maximale Anzahl der Bindungsstellen B_{max} in der Membransuspension bestimmt werden (DeBlasi et al. 1989).

$$B_{max} = \frac{B_0 \cdot IC_{50}}{[L]} \quad \text{Gleichung 2.9}$$

B_{max} : Maximale Anzahl der Bindungsstellen in der Membransuspension
 B_0 : Spezifische Bindung des Radioliganden (in Abwesenheit des Inhibitors)

2.4.2.1.2 Durchführung von homologen Konkurrenzexperimenten am Brandel-Cell-Harvester

Wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben, diente die Durchführung von homologen Konkurrenzexperimenten der Charakterisierung von hergestellten Membranhomogenaten bezüglich der Parameter K_D und B_{max} . In den meisten Fällen wurden die Versuche in einem 5 mM Na,K,P_i-Puffer (L 23) bei einer Temperatur von 23°C durchgeführt, in Einzelfällen wurde zur Inkubation ein 10 mM HEPES-Puffer (L 15) und eine Temperatur von 30°C gewählt.

In allen in dieser Arbeit durchgeführten homologen Konkurrenzexperimenten kam der Radioligand [³H]N-Methylscopolamin in einer Konzentration von 0,2 nM zum Einsatz. Die verschiedenen Versuchsansätze wurden nach folgendem Schema in Borosilikat-Reagenzgläser (V 4) pipettiert. Anschließend wurden die Ansätze mit Hilfe eines Kleinschüttlers (G 11) intensiv gemischt und bei der jeweiligen Temperatur im Wasserbad (G 13) für eine Zeitspanne von 120 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben mittels eines Brandel-Cell-Harvesters (G 4) über einen Glasfaserfilter (V 24) vakuumfiltriert und zweimal mit eisgekühltem 40 mM Na,K,P_i-Puffer (L 22) oder Aqua destillata (R 16) von definiertem Volumen

gespült. Zur Reduktion der unspezifischen Bindung war der Filter im Voraus für 15 min in PEI-Lösung (L 27) eingelegt worden. Die durch den Filtrationsvorgang einzeln ausgestanzten Filter enthielten die membrangebundene Aktivität des Radioliganden. Zur Bestimmung der jeweiligen Aktivitäten wurden die Filter einzeln in Szintillationsgefäße (V 6) überführt, mit je 5 ml Szintillationscocktail (R 3) versetzt und nach einer Wartezeit von mindestens zwei Stunden mit Hilfe eines Flüssigkeit-Szintillationszählers (G 2) vermessen. Die computergestützte Auswertung erfolgte entsprechend der Beschreibung in Kapitel 2.4.2.1.1.

Eingesetzte Lösung	Volumen	Versuchsansatz	Endkonzentration im Ansatz
[³ H]N-Methylscopolamin	100 µl	Alle	0,2 nM
Aqua pro analysi (R 17)	50 µl	Gesamtbindung	
Atropin in Aqua pro analysi	50 µl	<i>oder:</i> Unspezifische Bindung	3 µM
N-Methylscopolamin in Aqua pro analysi	50 µl	<i>oder:</i> Kompetitive Bindung	1 x 10 ^{-x} / 3 x 10 ^{-x} (aufsteigende Konzentrationen)
Inkubationspuffer (L 23 oder L 15)	1100 µl	Alle	4 mM Na ₂ HPO ₄ + 1 mM KH ₂ PO ₄ ; 23°C; pH 7,4 <i>oder:</i> 10 mM HEPES + 10 mM MgCl ₂ + 100 mM NaCl; 30°C; pH7,4
Membransuspension in Inkubationspuffer	250 µl	Alle	q. s.
Gesamtvolumen	1500 µl		

Tabelle 2.4: Pipettierschema zur Durchführung eines homologen Konkurrenzexperimentes (Filtrationsgerät: Brandel-Cell-Harvester). Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

2.4.2.1.3 Durchführung von homologen Konkurrenzexperimenten am Tomtec-Harvester

Homologe Konkurrenzexperimente am Tomtec-Harvester (G 30) wurden ausschließlich zur Charakterisierung von Membransuspensionen aus CHOFlpInTMM₂- und CHOFlpInTMM₂⁹⁹Trp→Ala-Zellen durchgeführt. Diese Rezeptoren wurden nachfolgend in funktionellen [³⁵S]GTPγS-Experimenten benutzt, in denen zur Filtration ebenfalls ein Tomtec-Harvester (G 31) eingesetzt wurde (vgl. Kapitel 1.1). Aus diesem Grund erfolgten die homologen Konkurrenzexperimente mit den beiden angegebenen Membransuspensionen an einem gleichartigen Filtrationsgerät (G 30).

Zu Beginn wurden die verschiedenen Lösungen in eine „96-well“ Mikrotiterplatte (V 1) einpipettiert. Das Pipettierschema (siehe Tabelle 2.5) unterschied sich prinzipiell im eingesetzten Gesamtvolumen vom Versuchsansatz am Brandel-Cell-Harvester. Weiterhin wurde jeder Ansatz mit zusätzlich 50 µl GDP versetzt, so dass eine vergleichbare Inkubationsumgebung bezogen auf das [³⁵S]GTPγS-Experiment (siehe Kapitel 2.5.2) geschaffen wurde. Als Inkubationspuffer wurde entsprechend der im [³⁵S]GTPγS-Experiment verwendete HEPES-Puffer (L 15) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei einer Temperatur von 30°C im Schüttelwasserbad (G 13) über eine Zeitspanne von 120 min. Nach der angegebenen Inkubationszeit erfolgte Vakuumfiltration durch einen Tomtec-Harvester (G 30) über eine passende Glasfaserfiltermatte (V 20). Es wurde zweimal mit einem definierten Volumen Aqua destillata (R 16) gespült und die Filtermatte, die 15 min vor der Filtration in PEI-Lösung eingelegt worden war, anschließend für 3 min in der Mikrowelle (G 23) getrocknet. Nachfolgend wurde ein Szintillationswachs (V 18) mit Hilfe eines Heizblocks (G 24) aufgeschmolzen. Nachdem das Wachs getrocknet war, wurde die Filtermatte in eine beschriftete Klarsichthülle und anschließend in eine Zählkassette überführt. Die sich auf der Filtermatte befindende membrangebundene Aktivität wurde mittels eines Feststoff-Szintillationsmeßgerätes (G 33) bestimmt. Eine computergestützte Auswertung der Versuche wurde analog zu Kapitel 2.4.2.1.1 durchgeführt.

Eingesetzte Lösung	Volumen	Versuchsansatz	Endkonzentration im Ansatz
[³ H]N-Methylscopolamin	50 µl	Alle	0,2 nM
Aqua pro analysi (R 17)	100 µl	Gesamtbindung	
Atropin in Aqua pro analysi +	50 µl +	<i>oder:</i> Unspezifische Bindung	3 µM
Aqua pro analysi (R 17)	50 µl		
N-Methylscopolamin in Aqua pro analysi +	50 µl +	<i>oder:</i> Kompetitive Bindung	1 x 10 ^{-x} / 3 x 10 ^{-x} (aufsteigende Konzentrationen)
Aqua pro analysi (R 17)	50 µl		
GDP (L 8)	50 µl	Alle	10 µM
Inkubationspuffer (L 15)	250 µl	Alle	10 mM HEPES + 10 mM MgCl ₂ + 100 mM NaCl; 30°C; pH7,4
Membransuspension in Inkubationspuffer	50 µl	Alle	q. s.
Gesamtvolumen	500 µl		

Tabelle 2.5: Pipettierschema zur Durchführung eines homologen Konkurrenzexperiments (Filtrationsgerät: Tomtec-Harvester). Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.4.2.2 Heterologe Konkurrenzexperimente

Unter heterologen Konkurrenzexperimenten versteht man Radioligand-Bindungsexperimente, die durch Interaktion eines strukturverschiedenen Inhibitors mit einem Radioliganden charakterisiert sind. Wie bei der homologen Konkurrenz konkurrieren hier Kompetitor und Radioligand um die gleiche (orthosterische) Bindungsstelle. Die Versuche sind dementsprechend durch Zugabe von steigenden Konzentrationen Inhibitor zu einer einzigen festgelegten Radioligandkonzentration (0,2 nM) gekennzeichnet. Die Abtrennung der Membransuspensionen erfolgte mit Hilfe des Brandel-Cell-Harvesters (G 4) in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C.

Eingesetzte Lösung	Volumen	Versuchsansatz	Endkonzentration im Ansatz
[³ H]N-Methylscopolamin	100 µl	Alle	0,2 nM
Aqua pro analysi (R 17)	50 µl	<i>oder:</i> Gesamtbindung	
Atropin in Aqua pro analysi	50 µl	<i>oder:</i> Unspezifische Bindung	3 µM
Inhibitor in Aqua pro analysi	50 µl	<i>oder:</i> Kompetitive Bindung	1 x 10 ^{-x} / 3 x 10 ^{-x} (aufsteigende Konzentrationen)
Inkubationspuffer (L 23)	1100 µl	Alle	4 mM Na ₂ HPO ₄ + 1 mM KH ₂ PO ₄ ; 23°C; pH 7,4
Membransuspension in Inkubationspuffer	250 µl	Alle	q. s.
Gesamtvolumen	1500 µl		

Tabelle 2.6: Pipettierschema zur Durchführung eines heterologen Konkurrenzexperimentes (Filtrationsgerät: Brandel-Cell-Harvester). Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Nach zweistündiger Inkubation wurden die Versuchsansätze entsprechend der Beschreibung in Kapitel 2.4.2.1.2 vakuumfiltriert und die jeweiligen Aktivitäten vermessen. Die Bestimmung von K_i erfolgte nach Gleichung 2.7.

2.4.2.3 Allosterische Interaktion

2.4.2.3.1 Theoretische Grundlagen

Das Prinzip der Allosterie ist durch das Vorhandensein von zwei verschiedenen Bindungsstellen am Rezeptor gekennzeichnet. Neben der orthosterischen Bindungsstelle existiert noch eine weitere, so genannte allosterische Bindungsstelle. Im Rahmen einer allosterischen Interaktion beeinflussen sich diese beiden Bindungsstellen gegenseitig und die Wechselwirkung kann theoretisch anhand des ternären Komplex-Modells beschrieben werden (Ehlert, 1988).

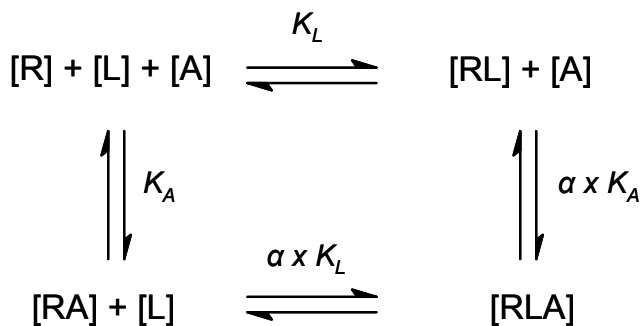


Abbildung 2.1

[R]:	Konzentration des freien Rezeptors
[L]:	Konzentration des orthosterischen Liganden
[A]:	Konzentration des allosterischen Liganden
[RA], [RL], [RLA]:	Konzentration der verschiedenen Ligand-Rezeptor-Komplexe
K_L :	Gleichgewichtsdissoziationskonstante des orthosterischen Liganden
K_A :	Gleichgewichtsdissoziationskonstante des allosterischen Liganden
α :	Kooperativitätsfaktor

Hierbei stellen die beiden Gleichgewichtsdissoziationskonstanten die Affinität des orthosterischen oder des allosterischen Liganden zum freien Rezeptor bzw. zur jeweiligen Bindungsstelle dar. Bindet an einem mit dem orthosterischen oder allosterischen Liganden besetzten Rezeptor zusätzlich der jeweils andere Ligand, so können die Affinitäten gegenseitig beeinflusst werden. Diese Interaktion wird durch den Kooperativitätsfaktor α beschrieben. Im Fall einer Bindungshemmung zwischen den Liganden nimmt der negative dekadische Logarithmus von α einen negativen Wert an ($p\alpha < 0$). Wird die Bindung der Liganden gegenseitig gefördert, ist $p\alpha$ entsprechend positiv ($p\alpha > 0$). Kommt es zu keiner gegenseitigen Bindungsbeeinflussung, so hat $p\alpha$ den Wert 0 ($p\alpha = 0$). Diese verschiedenen

Wechselwirkungsbeziehungen werden auch mit den Begriffen negative, positive und neutrale Kooperativität bezeichnet. Auf Basis des ternären Komplex-Modells kann eine nichtlineare Regressionsanalyse durchgeführt werden, mit der die Parameter K_A und α bestimmt werden können (Ehlert, 1988):

$$B_A = B_0 \cdot \frac{[L] + K_L}{[L] + K_L \cdot \frac{K_A + \alpha}{K_A + [A]/\alpha}} \quad \text{Gleichung 2.10}$$

B_A : Spezifische Bindung des Radioliganden L in Anwesenheit des allosterischen Liganden A
 B_0 : Spezifische Bindung des Radioliganden L in Abwesenheit des allosterischen Liganden A

Die in diesem Modell verwendete Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Radioligandbindung K_L entspricht dem in homologen Kompetitionsexperimenten bestimmten K_D -Wert. Aus dem Produkt der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Allosterbindung K_A und dem Kooperativitätsfaktor α ergibt sich die Affinität des allosterischen Liganden zum Radioligand-besetzten Rezeptor (Ellis, 1997). Tritt bei einem Experiment eine neutrale Kooperativität zwischen den beiden Liganden auf, ist es nicht möglich, eine nichtlineare Regressionsanalyse auf Basis von Gleichung 2.10 durchzuführen. In diesem Fall wurde eine modifizierte Gleichung angewendet, in der die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A durch den Quotienten $EC_{0,5diss}/\alpha$ ersetzt ist (Raasch et al., 2002; Daiss et al., 2002). Hierbei zeigt der $EC_{0,5diss}$ -Wert, der in Radioligand-Dissoziationsexperimenten (siehe Kapitel 2.4.3) bestimmt werden kann, die Affinität des allosterischen Liganden am Radioligand-besetzten Rezeptor an.

Um zu gewährleisten, dass die Reaktion zum Zeitpunkt der Messung im Gleichgewicht war, wurde die notwendige Inkubationszeit anhand der folgenden Gleichung berechnet (Lazareno und Birdsall, 1995):

$$t_{1/2obs} = t_{1/2off} \cdot \left(1 + \frac{[A]}{EC_{0,5diss}} \right) \quad \text{Gleichung 2.11}$$

$t_{1/2obs}$: Halbwertszeit der Gleichgewichtseinstellung
 $t_{1/2off}$: Halbwertszeit der Dissoziation des Radioliganden in Abwesenheit des allosterischen Liganden (Kontrollbedingungen)
 $[A]$: Konzentration des allosterischen Liganden
 $EC_{0,5diss}$: Konzentration des allosterischen Modulators, die zur halbmaximalen Dissoziationsverzögerung des Radioliganden am Rezeptor führt

Bei der Wahl der Inkubationszeit wurde davon ausgegangen, dass sich die Reaktion nach dem Fünffachen der Halbwertszeit $t_{1/2\text{obs}}$ im Gleichgewicht befand.

2.4.2.3.2 Durchführung von allosterischen Interaktionsexperimenten

Allosterische Interaktionsexperimente dienen der Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A der Bindung des allosterischen Liganden und des Kooperativitätsfaktors α . K_A gibt in diesem Fall die Affinität des allosterischen Modulators zum freien, nicht mit [^3H]N-Methylscopolamin-besetzten Rezeptor an. Alle Versuchsansätze wurden nach unten stehendem Pipettierschema in Borosilikat-Reagenzgläser (V 4) pipettiert.

Eingesetzte Lösung	Volumen	Versuchsansatz	Endkonzentration im Ansatz
[^3H]N-Methylscopolamin	100 μl	Alle	0,2 nM
Aqua pro analysi (R 17)	50 μl	<i>oder:</i> Gesamtbindung	
Atropin in Aqua pro analysi	50 μl	<i>oder:</i> Unspezifische Bindung	3 μM
Allosterischer Modulator in Aqua pro analysi	50 μl	<i>oder:</i> Allosterische Bindung	$1 \times 10^{-x} / 3 \times 10^{-x}$ (aufsteigende Konzentrationen)
Inkubationspuffer (L 15 oder L 23)	1100 μl	Alle	4 mM Na_2HPO_4 + 1 mM KH_2PO_4 ; 23°C; pH 7,4 <i>oder:</i> 10 mM HEPES + 10 mM MgCl_2 + 100 mM NaCl; 30°C; pH7,4
Membransuspension in Inkubationspuffer	250 μl	Alle	q. s.
Gesamtvolumen	1500 μl		

Tabelle 2.7: Pipettierschema zur Durchführung eines allosterischen Interaktionsexperiments (Filtrationsgerät: Brandel-Cell-Harvester). Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Versuche wurden entweder in 5 mM Na,K,P_i-Puffer (L 23) bei 23°C oder in 10 mM-HEPES-Puffer (L 15) bei 30°C durchgeführt und mit Hilfe eines Brandel-Cell-Harvester (G 4) analog zu Kapitel 2.4.2.1.2 filtriert. Die Inkubationszeit wurde anhand von Gleichung 2.11 berechnet. Als radioaktiv markierter orthosterischer Ligand wurde [³H]N-Methylscopolamin in einer Konzentration von 0,2 nM oder 0,05 nM eingesetzt. Die Auswertung von allosterischen Interaktionsexperimenten erfolgte anhand von Gleichung 2.10 mit Hilfe einer computergestützten, nichtlinearen Regressionsanalyse (GraphPad Prism[®]).

2.4.3 Kinetische Experimente

2.4.3.1 Theoretische Grundlagen

Kinetische Experimente, die unter Ungleichgewichtsbedingungen erfolgten, dienten in dieser Arbeit dazu, allosterische Interaktionen genauer zu charakterisieren und insbesondere das Bindungsverhalten von allosterischen Liganden zu beschreiben.

Grundsätzlich können allosterische Liganden sowohl die Geschwindigkeit des Zerfalls als auch die Geschwindigkeit der Bildung eines orthosterischen Ligand-Rezeptor-Komplexes beeinflussen. Im Falle von muskarinischen Rezeptoren kommt es meistens zu einer allosterischen Verzögerung von Assoziation und Dissoziation des orthosterischen Liganden. Eine Assoziationshemmung tritt auch bei einem kompetitiven Antagonismus auf, die Hemmung der Dissoziation kann hingegen nur auf eine Interaktion mit einem Liganden zurückgeführt werden, der nicht an der orthosterischen, sondern an einer anderen Bindungsstelle haftet. Aus diesem Grund kennzeichnet eine Verzögerung der Dissoziation eine allosterische Interaktion (Kostenis und Mohr, 1996). In Einzelfällen konnte an muskarinischen Rezeptoren auch eine Beschleunigung der Dissoziation eines orthosterischen Liganden durch einen allosterischen Modulator gefunden werden (Ellis und Seidenberg, 1989).

In den Versuchen wird die Bindung des Radioorthosters [³H]N-Methylscopolamin als Funktion der Zeit betrachtet. Da die dissoziationsverzögernde Wirkung von allosterischen Modulatoren Rückschlüsse auf die Besetzung der allosterischen Bindungsstelle zulässt, kann in kinetischen Experimenten die Affinität der Modulatoren zu ihrer Bindungsstelle am Orthoster-besetzten Rezeptor bestimmt werden. Der $EC_{0,5diss}$ -Wert entspricht der Alloster-Konzentration für eine halbmaximale, dissoziationsverzögernde Wirkung und ist ein Maß für die Affinität des Allosters.

Wie bereits beschrieben, ändert sich die Konzentration von Radioligand-Rezeptor-Komplexen [RL] in Abhängigkeit von parallel ablaufenden Assoziations- und Dissoziationsprozessen. Dieser Zusammenhang kann durch nachfolgende Gleichung dargestellt werden:

$$\frac{d[\text{RL}]}{dt} = k_{+1} \cdot [\text{R}] \cdot [\text{L}] - k_{-1} \cdot [\text{RL}] \quad \text{Gleichung 2.12}$$

In Dissoziationsexperimenten erfolgt nach Einstellung des Bindungs-Gleichgewichts des Radioliganden die Zugabe eines nicht-markierten kompetitiven Antagonisten im Überschuß. Infolgedessen wird die Assoziation des Radioliganden selektiv verhindert. Eine Bestimmung der Radioligand-Dissoziation ist somit möglich und es gilt:

$$k_{+1} \cdot [\text{R}] \cdot [\text{L}] \ll -k_{-1} \cdot [\text{RL}] \quad \text{Gleichung 2.13}$$

Daraus ergibt sich die Differentialgleichung der zugehörigen Reaktionskinetik 1. Ordnung:

$$\frac{d[\text{RL}]}{dt} = -k_{-1} \cdot [\text{RL}] \quad \text{Gleichung 2.14}$$

Aus einer Integration dieses Zusammenhangs resultiert:

$$[\text{RL}]_t = [\text{RL}]_0 \cdot e^{-k_{-1}t} + u \quad \text{Gleichung 2.15}$$

$[\text{RL}]_t$: Radioligand-Bindung zum Zeitpunkt t

$[\text{RL}]_0$: Radioligand-Bindung zum Zeitpunkt 0, d.h. vor Beginn der Messung der Dissoziation

u : Unspezifische Radioligand-Bindung

Die Dissoziations-Halbwertszeit $t_{1/2}$ kann mit Hilfe der Geschwindigkeits-Dissoziationskonstanten k_{-1} berechnet werden:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{-1}} \quad \text{Gleichung 2.16}$$

Sie beschreibt den Zeitraum, in dem die Anzahl der Radioligand-Rezeptor-Komplexe auf die Hälfte der ursprünglich vorhandenen Komplexe gesunken ist. Dieser Ausgangswert wird vor dem Start der Reaktion, d.h. vor der Zugabe eines kompetitiven Antagonisten bestimmt. Der Einfluss eines allosterischen Modulators auf die Dissoziationshalbwertszeit beziehungsweise die apparente Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation k_{-1} ist konzentrationsabhängig.

Zur Auswertung wurden die verschiedenen Werte für k_{-1} , die zuvor auf den Kontrollwert in Abwesenheit der allosterischen Testsubstanz normiert worden waren, halblogarithmisch gegen aufsteigende Konzentrationen des allosterischen Modulators aufgetragen. Eine Kurvenanpassung erfolgte nach computergestützter nichtlinearer Regressionsanalyse anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Der Wendepunkt der resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurve entspricht dem $EC_{0,5diss}$ -Wert (siehe oben). War das untere Plateau der Kurve signifikant verschieden von 0, so zeigte dies, dass der allosterische Modulator selbst in hohen Konzentrationen die Dissoziation des Radioliganden nicht vollständig unterbinden kann. Ein von -1 signifikant abweichendes Steilheitsmaß der Kurve deutete auf ein komplexeres Bindungsverhalten des allosterischen Modulators hin, wie es beispielsweise bei atypischen allosterischen Liganden (Duo3 oder Tacrin; siehe Kapitel 2.7.3) gefunden wird.

Zweipunkt-Dissoziationsexperimente: Alle in dieser Arbeit durchgeführten Dissoziationsexperimente erfolgten nach der Methode der „Zweipunkt-Kinetik“. Hierbei erfolgt zunächst die Bestimmung der spezifischen Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt $t = 0$. Ein zweiter Messzeitpunkt innerhalb des Dissoziationsverlaufs wurde im Voraus festgelegt. Da die Dissoziation monoexponentiell verläuft, sind zwei Messpunkte zur Charakterisierung des Dissoziationsverlaufs ausreichend. Vorteilhaft ist hierbei vor allem der geringere experimentelle Aufwand, die Methode ist weiterhin durch einen niedrigeren Material- und Radioligandverbrauch gekennzeichnet. Eine ausführliche Beschreibung der Methode ist bei Kostenis und Mohr (1996) zu finden.

Die Berechnung von k_{-1} erfolgt nach dieser Gleichung:

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

Gleichung 2.17

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

$B_{0,\text{spez}}$: Spezifische Bindung des Radioliganden zum Zeitpunkt 0, d.h. vor Beginn der Messung der Dissoziation

Wie zuvor beschrieben, wurde aus den ermittelten k_{-1} -Werten die zugehörige Konzentrations-Effektkurve ermittelt. Zu diesem Zweck wurden alle k_{-1} -Werte zusammengefasst und den gesammelten Daten ein Kurvenverlauf angepasst. In einigen in dieser Arbeit durchgeführten Dissoziationsverzögerungsexperimenten konnten komplette Kurvenverläufe erhalten werden. In diesen Fällen wurde eine individuelle Anpassung der einzelnen Kurven vorgenommen, an die sich eine Mittelung der Parametereinzelnwerte anschloß. Im Folgenden wird im Rahmen der Betrachtung von Versuchsergebnissen angeführt, wenn die Möglichkeit dieser Auswertungsmethode bestand. Weiterhin wird darauf hingewiesen, wenn sich aus der individuellen Anpassung und Auswertung qualitativ andersartige Resultate ergaben.

2.4.3.1.1 Durchführung von Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten

Die Abtrennung von Radioligand-Rezeptor-Komplexen erfolgte bei allen durchgeführten Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit Hilfe des Brandel Cell Harvesters (G 4). Alle Versuchsansätze wurden in Borosilikat Reagenzgläser (V 4) pipettiert. Als Inkubationsumgebung wurden entweder ein 5 mM Na,K,P_i-Puffer (L 23) und 23°C oder ein 10 mM HEPES-Puffer (L 15) und 30°C ausgewählt. Folgendes Pipettierschema diente in Dissoziationsexperimenten als Basisansatz:

Eingesetzte Lösung	Volumen	Versuchsansatz	Endkonzentration im Ansatz
[³ H]N-Methylscopolamin	10 µl	Alle	1 nM
Aqua pro analysi (R 17)	10 µl	Alle außer der unspezifischen Bindung	
Atropin in Aqua pro analysi	10 µl	<i>oder:</i> Unspezifische Bindung	3 µM
Inkubationspuffer (L 15 oder L 23)	480 µl	Alle	4 mM Na ₂ HPO ₄ + 1 mM KH ₂ PO ₄ ; 23°C; pH 7,4 <i>oder:</i> 10 mM HEPES + 10 mM MgCl ₂ + 100 mM NaCl; 30°C; pH7,4
Gesamtvolumen	500 µl		

Tabelle 2.8: Pipettierschema zur Durchführung von Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten (Filtrationsgerät: Brandel-Cell-Harvester; Basisansatz).

Nach Pipettieren dieses Basisansatzes (siehe Tabelle 2.8) wird zu allen Proben, mit Ausnahme der Ansätze für Gesamtbindung und unspezifische Bindung, je 500 µl mit Inkubationspuffer (L 15 oder L 23) verdünnte Membransuspension zugesetzt. Der Zeitpunkt der Homogenatzugabe entsprach dem Startpunkt der 30 minütigen Vorinkubationsphase, in der es zu einer Einstellung des Bindungsgleichgewichts mit Ausbildung von Radioligand-Rezeptor-Komplexen kam. Nach diesem Zeitintervall

wurde die Dissoziationsmessung durch Zugabe von je 1 ml „Startlösung“ (siehe Tabelle 2.9) begonnen.

Eingesetzte Lösung	Volumen	Versuchsansatz	Endkonzentration im Ansatz
Aqua pro analysi (R 17)	1100 μ l	Kontrollansatz	
Allosterischer Modulator	1100 μ l	oder: Testansatz	$1 \times 10^{-x} / 3 \times 10^{-x}$ (aufsteigende Konzentrationen)
Atropin in Aqua pro analysi	1100 μ l	Alle	3 μ M
Gesamtvolumen	2200 μl		

Tabelle 2.9: Pipettierschema zur Durchführung von Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten (Filtrationsgerät: Brandel-Cell-Harvester; „Startlösung“). Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Nach einer festgelegten Zeit t , die anhand der Kontroll-Dissoziationshalbwertszeit festgelegt worden war, wurden die Ansätze mit Hilfe des Brandel Cell Harvesters (G 4) filtriert (siehe Kapitel 2.4.2.1.2). Genau 30 min vor der Filtration wurden weiterhin je 500 μ l Homogenat zu den Ansätzen zur Messung der Gesamtbindung und der unspezifischen Radioligand-Bindung gegeben. Die weitere experimentelle Vorgehensweise und die Messung der Aktivität der verschiedenen Proben entsprach der in Kapitel 2.4.2.1.2 beschriebenen Methode. Eine Auswertung der kinetischen Experimente erfolgte computergestützt mittels nichtlinearer Regressionsanalyse (GraphPad Prism[®]) (siehe Kapitel 2.4.3.1). Aus dem resultierenden Kurvenverlauf wurden der $EC_{0,5\text{diss}}$ -Wert als Maß für die Affinität des allosterischen Modulators und das Steilheitsmaß der Kurve n_H bestimmt.

2.5 Funktionelle Experimente

2.5.1 Theoretische Grundlagen: [³⁵S]GTPγS-Versuch

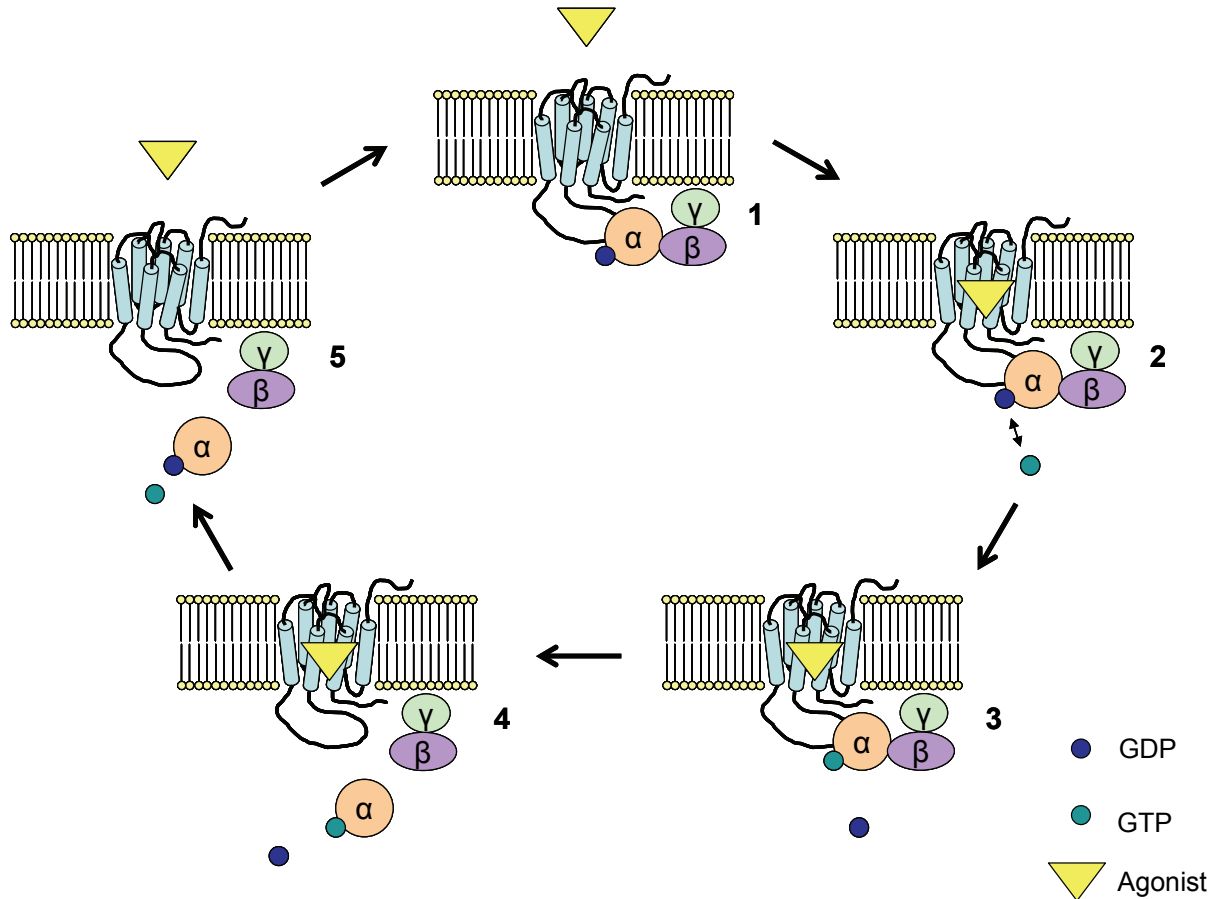


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten-Rezeptors. Zur Erläuterung der Abbildung wird auf den nachfolgenden Text verwiesen.

Mit Hilfe von [³⁵S]GTPγS-Bindungsexperimenten wurde die erste Stufe der funktionellen Ebene der Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren untersucht. Diese Experimente beruhen auf folgendem Prinzip: Die Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors der Klasse A wird meist durch die Bindung eines Agonisten an ein spezifisches Haftareal innerhalb der transmembranären Domänen des Rezeptorproteins hervorgerufen und ist ein mehrstufiger Prozess. Zu Beginn kommt es durch Bindung eines Agonisten zu einer Änderung der Konformation des Rezeptorproteins (siehe Abbildung 2.2/2). Der Rezeptor fungiert in der Folge als so genannter GTP-Austauschfaktor (Milligan und Kostenis, 2006). An der α-Untereinheit des zugehörigen, heterotrimeren G-Proteins kommt es zum Austausch von GDP

durch GTP (siehe Abbildung 2.2/2 und Abbildung 2.2/3). Mit diesem Nukleotidaustausch geht eine Konformationsänderung des G-Proteins einher und die α -Untereinheit des G-Proteins dissoziiert von der $\beta\gamma$ -Untereinheit (siehe Abbildung 2.2/4). Nachfolgend können beide beschriebenen Untereinheiten mit verschiedenen Effektorsystemen interagieren und sind somit für die Signaltransduktion verantwortlich. Aufgrund der intrinsischen GTPase-Aktivität der α -Untereinheit kommt es in einem nächsten Schritt zum erneuten Austausch der Nukleotide, so dass wiederum GDP an das G-Protein bindet (siehe Abbildung 4/4). Dadurch kommt es zu einer Reassoziierung des G-Proteins an den Rezeptor und zur Wiederherstellung des inaktiven Ausgangszustandes (siehe Abbildung 2.2/5 und Abbildung 2.2/1).

Im [^{35}S]GTP γ S-Versuch wird das radioaktiv markierte Nukleotid-Analogon [^{35}S]GTP γ S eingesetzt und dessen Agonist-induzierte Bindung an das G-Protein gemessen. Das [^{35}S]GTP γ S-Molekül ist durch einen Austausch des Sauerstoffs am γ -ständigen Phosphatrest der Ribose gegen [^{35}S] gekennzeichnet. Dies führt zu einer Stabilität des radioaktiv markierten Nukleotid-Analogons gegenüber der intrinsischen GTPase-Aktivität der α -Untereinheit des G-Proteins (Milligan, 2003). [^{35}S]GTP γ S bindet daher irreversibel an die α -Untereinheit. Die Reassoziierung von beiden G-Protein-Untereinheiten (α und $\beta\gamma$) wird verhindert und es kommt zu einer Daueraktivierung des G-Proteins und zu einer Akkumulation von [^{35}S]GTP γ S in der Membran. Durch Messung der Radioaktivität (siehe Kapitel 2.5.2) wird die Menge des gebundenen [^{35}S]GTP γ S bestimmt. Unter geeigneten Messbedingungen spiegelt das Ausmaß der [^{35}S]GTP γ S-Bindung die Agonist-Rezeptor-Interaktion wider.

Ein Zusatz von GDP, Magnesium- und Natriumionen trägt im Versuchssystem dazu bei, ein bestmögliches Verhältnis zwischen basaler und Agonist-induzierter [^{35}S]GTP γ S-Bindung zu gewährleisten. Durch GDP erfolgt eine Auffüllung von leeren Nukleotidbindungsstellen an der α -Untereinheit, da GDP eine höhere Affinität als [^{35}S]GTP γ S an inaktiven G-Proteinen aufweist. Dadurch kommt es zu einer Senkung der basalen [^{35}S]GTP γ S-Bindung. Magnesiumionen erhöhen hingegen sowohl die basale als auch die Agonist-induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung, allerdings ist der Effekt auf die Agonist-induzierte Bindung stärker (Harrison und Traynor, 2003). Eine Senkung der basalen Bindung von [^{35}S]GTP γ S kann hingegen durch Natriumionen erreicht werden. Diese scheinen an einen konservierten Aspartatrest in der zweiten

transmembranären Domäne zu binden, wodurch es zu einer Entkopplung der G-Proteine von den Rezeptoren und somit zu einer Reduktion der basalen Bindung kommt (Harrison und Traynor, 2003). Die hier gewählte Pufferzusammensetzung (L 15) gewährleistet ein ausreichend großes Messfenster mit einer möglichst geringen basalen und einer hohen Agonist-induzierten [³⁵S]GTPγS-Bindung.

2.5.2 Durchführung der [³⁵S]GTPγS-Versuche

Die Experimente erfolgten in dieser Arbeit aufgrund der höheren Rezeptorexpression ausschließlich an Membranhomogenaten aus stabil transfizierten CHOFlpInTM-Zellen.

Alle Versuche wurden in einem HEPES-Puffersystem (L 15) bei 30°C durchgeführt, so dass im Versuchsansatz Konzentrationen von 10 mM HEPES, 10 mM Magnesiumchlorid und 100 mM Natriumchlorid resultierten. Die Inkubationszeit wurde auf 60 min festgelegt, da frühere Untersuchungen (Klemt, 2005) für diesen Zeitraum ein optimales Verhältnis von basaler und Agonist-induzierter [³⁵S]GTPγS-Bindung ergeben hatten. Der Proteingehalt der Membransuspensionen wurde jeweils auf 40 µg/ml im Versuchsansatz festgesetzt. Alle Komponenten des Ansatzes wurden entsprechend der Pipettierschemata (siehe unten) in 96-well Mikrotiterplatten (V 1) pipettiert. Nachfolgend werden die in dieser Arbeit untersuchten Einflussfaktoren auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung erläutert.

2.5.2.1 Einfluss verschiedener Testsubstanzen auf die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung

Diese Versuche dienten neben den Parametern B_{max} und K_D der Bindung von [³H]NMS (siehe Kapitel 2.4.2.1.1) der weiteren Charakterisierung der Membranhomogenate. Es wurde der Einfluss von Rezeptor-sättigenden Konzentrationen verschiedener Testsubstanzen auf die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung gemessen. Eingesetzt wurden hierbei die Agonisten Acetylcholin (100 mM) und Oxotremorin M (100 mM), der Partialagonist Pilocarpin (1 mM), der inverse Agonist Atropin (1 µM) und Alcuronium (100 µM), ein inverser allosterischer Agonist. Die verschiedenen Ansätze wurden in „96-well“ Mikrotiterplatten pipettiert (siehe Kapitel 2.5.2). Nach der Inkubationszeit wurden die Ansätze mit Hilfe eines Tomtec-

Harvesters (G 31) vakuumfiltriert. Die Filtrationsmethode entsprach der bereits in Kapitel 2.4.2.1.3 vorgestellten. Jedoch wurden in diesem Fall die Filtermatten 5 min in Aqua dest. (R 16) eingelegt. Auch die Trocknung der Filter und die Vermessung der Proben erfolgte nach der in Kapitel 2.4.2.1.3 beschriebenen Methode. Die ermittelten Messwerte wurden anschließend normiert. Hierbei wurde das Niveau der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung auf 100% gesetzt.

2.5.2.2 Einfluss des Partialagonisten Pilocarpin auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung im Vergleich zum Vollagonisten Acetylcholin

Innerhalb dieser Versuche wurden der Effekt des Partialagonisten Pilocarpin und des Vollagonisten Acetylcholin auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung miteinander verglichen. Hierzu wurde das Ausmaß der Steigerung der [³⁵S]GTPγS-Bindung bestimmt. Die Versuchsansätze wurden gemäß Tabelle 2.10 zusammengestellt.

In diesem Fall entsprachen Inkubationszeit, Filtrationsvorgang und Vermessung der Proben der in Kapitel 2.4.2.1.3 beschriebenen Methode. Die Auswertung erfolgte computergestützt anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Durch das nichtlineare Regressionsverfahren wurde der Kurvenverlauf den erhaltenen Messwerten angepasst. Eine Normierung erfolgte, indem das obere Plateau der Acetylcholin-Kurve auf 100% und das untere Plateau, das der basalen [³⁵S]GTPγS-Bindung entsprach, auf 0% festgelegt wurde.

Aus den resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven ergaben sich die für die Auswertung relevanten Parameter E_{max} und EC_{50} . E_{max} beschreibt den Maximaleffekt der Testsubstanz und ist ein Maß für die intrinsische Aktivität des Agonisten (*efficacy*). Der EC_{50} -Wert kennzeichnet die Konzentration der Testsubstanz, die zu einem halbmaximalen Effekt führt (*potency*). Weiterhin wurde mittels eines F-Tests geprüft, ob die Kurvensteilheit einem Wert n_H von -1 entsprach.

Eingesetzte Lösung	Volumen	Versuchsansatz	Endkonzentration im Ansatz
Aqua pro analysi (R 17)	100 µl	Basale [³⁵ S]GTPγS-Bindung	
Aqua pro analysi (R 17)	50 µl	<i>oder:</i> Agonist-induzierte bzw. Partialagonist-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	Aufsteigende Konzentrationen
Testsubstanz	50 µl	Agonist-induzierte bzw. Partialagonist-induzierte [³⁵ S]GTPγS-Bindung	<i>oder:</i> ausgewählte Rezeptor-sättigende Konzentrationen
GDP (L 8)	50 µl	Alle	10 µM
Inkubationspuffer (L 15)	250 µl	Alle	10 mM HEPES + 10 mM MgCl ₂ + 100 mM NaCl; 30°C; pH7,4
Membranhomogenat in Inkubationspuffer (L 15)	50 µl	Alle	Proteingehalt: 40 µg/ml
[³⁵ S]GTPγS	50 µl	Alle	70 pM
Gesamtvolumen	500 µl		

Tabelle 2.10: Pipettierschema zur Durchführung des [³⁵S]GTPγS-Assays (Effekt des Partialagonisten Pilocarpin auf die [³⁵S]GTPγS-Bindung im Vergleich zum Vollagonisten Acetylcholin und Einfluss von verschiedenen Testsubstanzen auf die basale [³⁵S]GTPγS-Bindung). Es wurde jeweils eine vierfache Bestimmung der Messwerte durchgeführt.

2.6 Statistik

Alle in dieser Arbeit angeführten Mittelwerte werden in Form des arithmetischen Mittels (\bar{x}) angegeben. Voraussetzung für die Berechnung dieses Lageparameters ist eine Normalverteilung der analysierten Daten.

Arithmetisches Mittel:

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

Gleichung 2.18

Aus dem arithmetischen Mittel leitet sich die Standardabweichung (SD) ab. Dieser Streuungsparameter errechnet sich aus der Quadratwurzel der Varianz (s^2).

Standardabweichung:

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

Gleichung 2.19

Im Rahmen dieser Arbeit wird als Maß für die Streuung der Standardfehler (SEM) angegeben, der sich aus der Standardabweichung ergibt.

Standardfehler:

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

Gleichung 2.20

Die Kurvenanpassung an die Messwerte erfolgte mittels nichtlinearer Regressionsanalyse (GraphPad Prism[®]) auf der Basis entsprechender Modelle und Gleichungen. Über die Güte der Anpassung beziehungsweise die Eignung des Modells entscheidet im Falle einer gleichen Anzahl von Variablen die Summe der Fehlerquadrate, wobei eine niedrige Summe Modelle mit besserer Kurvenanpassung an die experimentell ermittelten Daten repräsentiert. Weisen die Modelle eine unterschiedliche Variablenzahl auf, wird ein F-Test durchgeführt, um zu bestimmen, welches Modell den Verlauf der ermittelten Datenpunkte am besten beschreibt

(Motulsky, 1996). Hierbei werden die Summen der Fehlerquadrate und die Anzahl der Freiheitsgrade des einfacheren Modells zu denen des komplexeren Modells ins Verhältnis gesetzt.

$$F = \frac{(SS_1 - SS_2) / (DF_1 - DF_2)}{SS_2 / DF_2} \quad \text{Gleichung 2.21}$$

SS₁: Summe der Abstandsquadrate des einfacheren Modells
 SS₂: Summe der Abstandsquadrate des komplexeren Modells
 DF₁: Anzahl der Freiheitsgrade des einfacheren Modells
 DF₂: Anzahl der Freiheitsgrade des komplexeren Modells

Liegt der berechnete Wert oberhalb eines bestimmten Tabellenwertes, so zeigt dies eine signifikant bessere Anpassung der Kurve durch das komplexere Modell an. Die Grenze der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

Mittelwerte, die aus unterschiedlichen Datensätzen stammten, wurden mit Hilfe eines zweiseitigen, ungepaarten t-Tests miteinander verglichen (GraphPad InStat®). Der t-Wert wird aus dem Quotienten der Differenz der Mittelwerte und dem Standardfehler der Mittelwertsdifferenz (SE) berechnet (Motulsky, 1996).

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{SE} \quad \text{Gleichung 2.22}$$

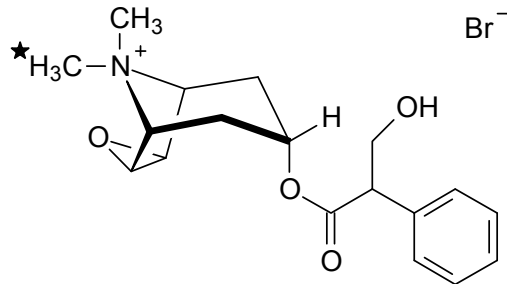
Aus dem t-Wert wird weiterhin ein p-Wert berechnet (Grenze der Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$). Ist $p > 0,05$, so kann angenommen werden, dass die zu vergleichenden Werte derselben Grundgesamtheit entstammen. Ein p-Wert $< 0,05$ zeigt dagegen einen statistisch signifikanten Unterschied der beiden Werte an. Voraussetzung für eine Anwendung des t-Tests sind nicht signifikant voneinander abweichende Standardabweichungen der zu vergleichenden Mittelwerte. Außerdem müssen die Daten einer Gaußschen Normalverteilung unterliegen. Im Falle von signifikant unterschiedlichen Standardabweichungen wurde eine Welch-Korrektur durchgeführt.

2.7 Verwendete Substanzen

Dieser Abschnitt dient der Beschreibung der verwendeten Testsubstanzen.

2.7.1 Radioliganden

$[^3\text{H}]$ N-Methylscopolamin ($[^3\text{H}]$ NMS)



M_r : 353,8 g/mol

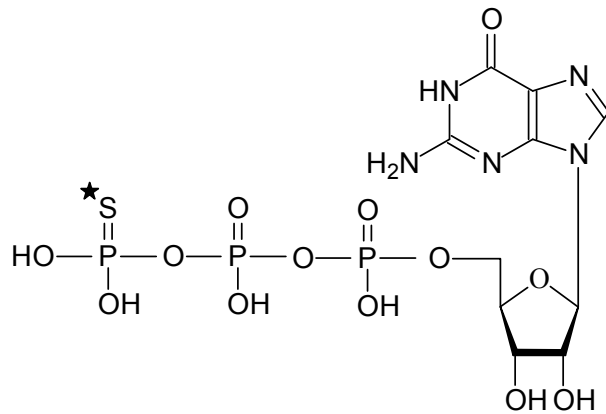
Spezifische Aktivität: 72-82 Ci/mmol (chargenabhängige Unterschiede)

Lieferant: Perkin Elmer

Produktnummer: NET636001MC

Abbildung 2.3: Strukturformel und Angaben bezüglich $[^3\text{H}]$ N-Methylscopolamin; ★: Position der radioaktiven Markierung.

$[^{35}\text{S}]$ GTP γ S



M_r : 539,2 g/mol

Spezifische Aktivität: 1250 Ci/mmol

Lieferant: Perkin Elmer

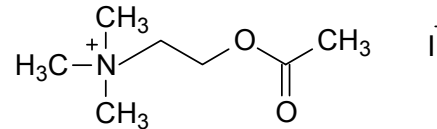
Produktnummer: NEG030H250UC

Abbildung 2.4: Strukturformel und Angaben bezüglich $[^{35}\text{S}]$ GTP γ S; ★: Position der radioaktiven Markierung.

2.7.2 Orthosterische Liganden

2.7.2.1 Agonisten

Acetylcholin



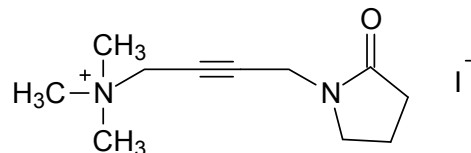
M_r: 273,1 g/mol

Lieferant/Produktnummer: Sigma-Aldrich Chemie GmbH/ A-7000

Eigenschaften: Acetylcholin ist einer der wichtigsten Neurotransmitter des Menschen. Die Substanz ist u.a. zuständig für die neuronale Übertragung an der motorischen Endplatte und stellt ferner einen Agonisten an muskarinischen und nicotinischen Acetylcholinrezeptoren dar.

Abbildung 2.5: Strukturformel und Angaben bezüglich Acetylcholin.

Oxotremorin M



M_r: 322,2 g/mol

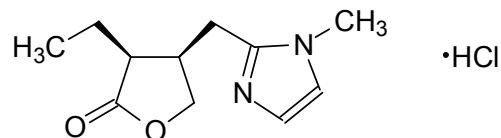
Lieferant/Produktnummer: Sigma-Aldrich Chemie GmbH/ O-100

Eigenschaften: Oxotremorin M ist ein nicht selektiver Agonist an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren.

Abbildung 2.6: Strukturformel und Angaben bezüglich Oxotremorin M.

2.7.2.2 Partialagonisten

Pilocarpin



M_r: 244,7 g/mol

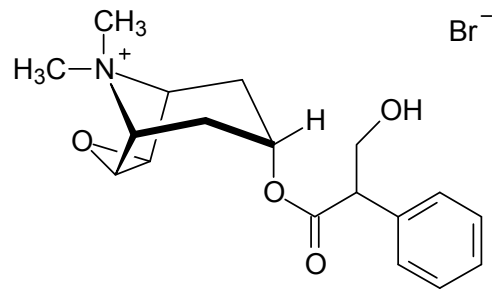
Lieferant/Produktnummer: Fluka Chemie AG/80475

Eigenschaften: Das Alkaloid Pilocarpin stammt aus den Blättern von *Pilocarpus jaborandi* (Rutaceae) und ist ein Partialagonist an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren. Therapeutisch wird es zur Behandlung des Glaukoms in Form von Augentropfen (z.B. Pilopos[®]) angewendet.

Abbildung 2.7: Strukturformel und Angaben bezüglich Pilocarpin.

2.7.2.3 Antagonisten

N-Methylscopolamin



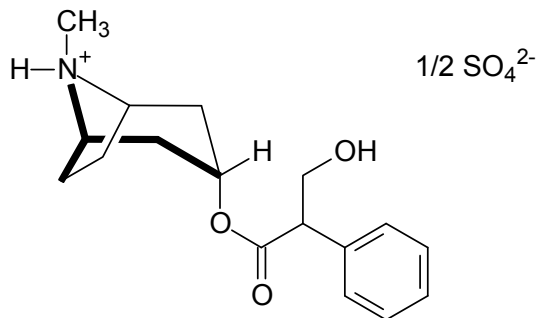
M_r: 398,3 g/mol

Lieferant/ Produktnummer: Sigma-Aldrich Chemie GmbH/S-8502

Eigenschaften: N-Methylscopolamin wirkt als Parasympatholytikum antagonistisch an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren.

Abbildung 2.8: Strukturformel und Angaben bezüglich N-Methylscopolamin.

Atropin



M_r: 676,8 g/mol

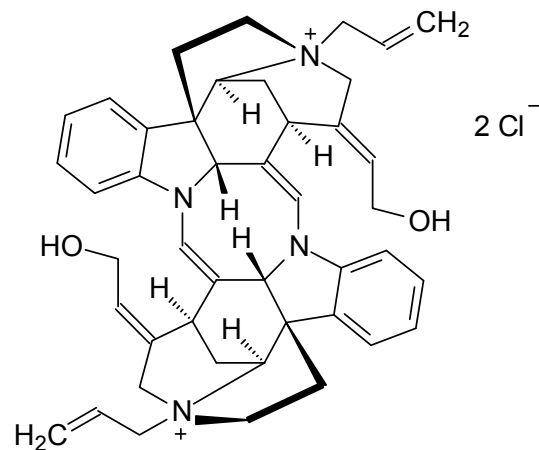
Lieferant/ Produktnummer: Sigma-Aldrich Chemie GmbH/A-0257

Eigenschaften: Atropin stellt ein Racemat aus S- und R-Hyoscyamin dar und kommt nativ in Solanaceen-Arten (z.B. *Atropa belladonna*, *Datura stramonium*) vor. Therapeutische Anwendung findet die Substanz hauptsächlich als Antidot bei Vergiftungen mit Organophosphaten, als Ophthalmikum (z.B. Atropin-POS®) zur Ausschaltung der Akkommodation für diagnostische Zwecke und als Mittel gegen Spasmen im Magen-Darm-Bereich sowie zur Vorbereitung von operativen Eingriffen (z.B. Atropinsulfat B. Braun®).

Abbildung 2.9: Strukturformel und Angaben bezüglich Atropin.

2.7.3 Allosterische Modulatoren

Alcuronium



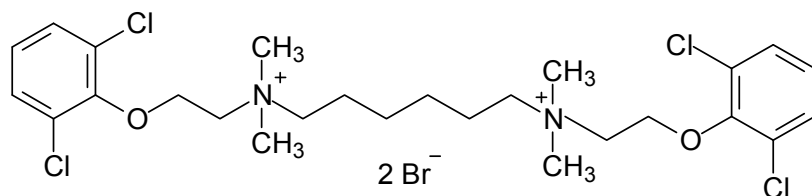
M_r: 737,8 g/mol

Lieferant/ Produktnummer: Hoffmann La Roche AG (Grenzach Wyhlen, Deutschland); Die Substanz wurde freundlicherweise vom Hersteller zur Verfügung gestellt.

Eigenschaften: Alcuronium ist ein stabilisierendes Muskelrelaxans und zeigt gegenüber dem Antagonisten N-Methylscopolamin positiv kooperatives Verhalten.

Abbildung 2.10: Strukturformel und Angaben bezüglich Alcuronium.

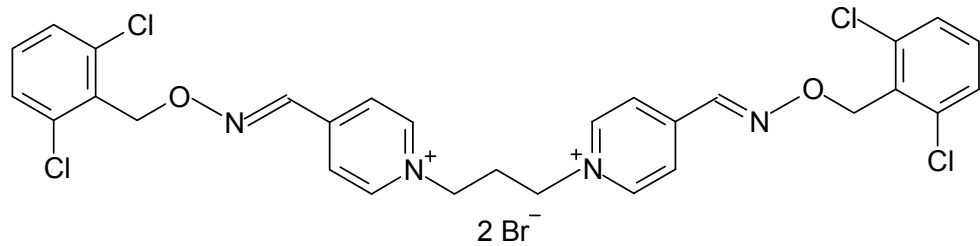
DuoWO



M_r: 712,3 g/mol

Herkunft: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

Abbildung 2.11: Strukturformel und Angaben bezüglich DuoWO.

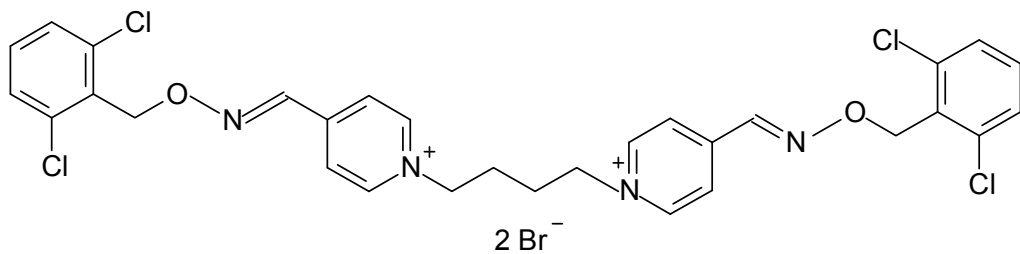
Duo3

M_r: 764,2 g/mol

Herkunft: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

Eigenschaften: Duo3 ist ein atypischer allosterischer Modulator. Bei Vergiftungen mit Organophosphaten ist die Substanz in der Lage die Acetylcholinesterase zu reaktivieren.

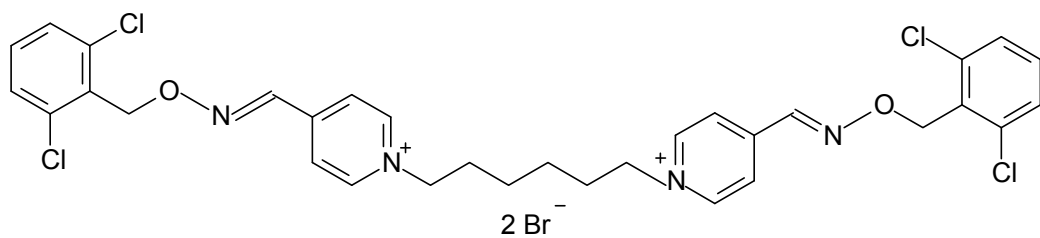
Abbildung 2.12: Strukturformel und Angaben bezüglich Duo3.

Duo34

M_r: 776,0 g/mol

Herkunft: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

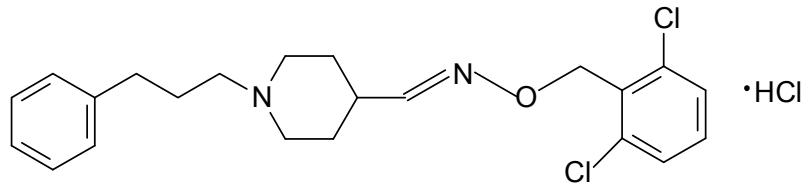
Abbildung 2.13: Strukturformel und Angaben bezüglich Duo34.

Duo64

M_r: 806,3 g/mol

Herkunft: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

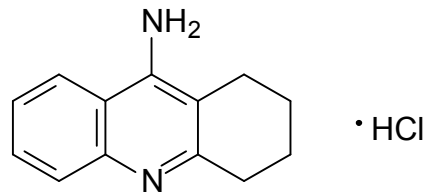
Abbildung 2.14: Strukturformel und Angaben bezüglich Duo64.

EHW 437

M_r: 451,8 g/mol

Herkunft: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

Abbildung 2.15: Strukturformel und Angaben bezüglich EHW 437.

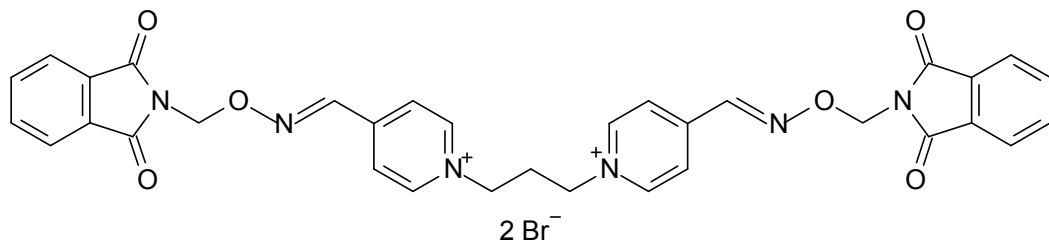
Tacrin

M_r: 234,7 g/mol

Lieferant/ Produktnummer: Sigma-Aldrich Chemie GmbH/A-3773

Eigenschaften: Tacrin gilt als atypischer allosterischer Modulator. Therapeutisch wurde der Acetylcholinesterase-Hemmstoff in der Therapie des Morbus alzheimer eingesetzt, ist aufgrund seiner ausgeprägten Hepatotoxizität jedoch heute obsolet.

Abbildung 2.16: Strukturformel und Angaben bezüglich Tacrin.

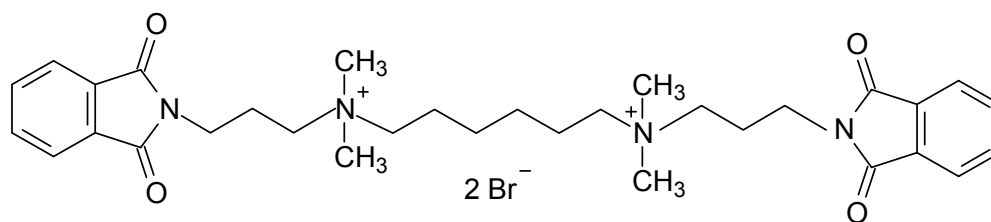
WDuo3

M_r: 764,4 g/mol

Herkunft: Arbeitskreis Prof. Dr. U. Holzgrabe (Pharmazeutische Chemie, Universität Würzburg)

Eigenschaften: WDuo3 ist analog zu Duo3 in der Lage, bei Vergiftungen mit Organophosphaten die Acetylcholinesterase zu reaktivieren.

Abbildung 2.17: Strukturformel und Angaben bezüglich WDuo3.

W84

M_r: 708,5 g/mol

Herkunft: Dr. Pfeffer (Pharmakologisches Institut, Universität Kiel)

Eigenschaften: W84 stellt ein experimentelles Antidot bei Vergiftungen mit Organophosphaten dar.

Abbildung 2.18: Strukturformel und Angaben bezüglich W84.

2.8 Lösungen

In der nachfolgend aufgeführten Liste sind die verwendeten Lösungen und Puffer sowie deren jeweilige Zusammensetzung angegeben.

L 1 Ampicillin-Lösung (50 mg/ml)

750 mg Ampicillin-Natrium (R 21) wurden in 15 ml Aqua destillata (R 16) gelöst, steril filtriert und aliquotiert (zu je 550 µl in sterile Eppendorf-Caps (V 12)). Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

L 2 Butyrat-Stammlösung (100 mM)

5,55 g Natriumbutyrat (R 1) wurden in 500 ml Aqua destillata (R 16) gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

L 3 KNaC₄H₄O₆-Lösung 2%

2 g Kalium-Natriumtartrat-Tetrahydrat (R 24) wurden in 100 ml Aqua destillata (R 16) gelöst. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

L 4 Cu₂SO₄-Lösung 1%

1 g Kupfersulfat-Pentahydrat (R 13) wurde in 100 ml Aqua destillata (R 16) gelöst. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

L 5 *Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)*

Es wurde unter Rühren eine Packung PBS-Fertigpulver (R 28) in 1000 ml Aqua destillata (R 16) gelöst. Mit Hilfe eines SFCA Bottle-Top-Filters (V 16) wurde die Lösung unter aseptischen Bedingungen in autoklavierte Glasflaschen steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

L 6 *Dubecco's Modified Eagles Medium (Nährmedium)*

Zu 500 ml DMEM-Lösung (R 27) wurden unter aseptischen Bedingungen 50 ml fetales Kälberserum und 5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

L 7 *Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz zur Proteinbestimmung*

Ein Teil Ciocalteus-Phenolreagenz (R 12) wurde mit drei Teilen Aqua destillata (R 16) vermischt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

L 8 *GDP-Stammlösung*

4,7 mg GDP (R 33) wurden in 1,0 ml Aqua destillata (R 16) gelöst und in Aliquota zu je 50 µl aufgeteilt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

L 9 *Glucose-Lösung 20%*

4 g Glucose (R 11) wurden in 20 ml Aqua destillata (R 16) gelöst und steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

L 10 *Glycerol-Lösung 60%*

30,3 ml Glycerol (R 31) und 19,7 ml Aqua destillata (R 16) wurden gemischt, steril filtriert und in je 10 ml-Aliquota aufgeteilt. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

L 11 *G 418-Stammlösung (100 mg/ml)*

Die Wirkstärke (angegeben in: µg/mg) des Antibiotikums G 418 ist chargenabhängig. Die Einwaage zur Herstellung einer Stammlösung wurde daher bei jeder Charge neu berechnet. Es wurde jeweils die gesamte Liefermenge (5 g) G 418 (R 31) genau eingewogen und mit einem entsprechenden Volumen an Aqua destillata (R 16) versetzt, so dass eine Lösung mit der Wirkstärke 100 mg/ml resultierte. Die Lösung wurde steril filtriert und aliquotiert (zu je 1,0 ml). Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

L 12 HEPES-Stammlösung (200 mM) pH 7,4

8,68 g HEPES-Natrium (R 34) und 15,89 g HEPES-Säure (R 35) wurden in 500 ml Aqua destillata (R 16) gelöst. Der pH-Wert wurde überprüft und ggf. mit 1N NaOH (R 20) eingestellt.

L 13 HEPES-Homogenisationspuffer (20 mM HEPES; 10 mM Na₂EDTA) pH 7,4

50 ml HEPES-Stammlösung (200 mM) (L 1) und 50 ml Na₂EDTA-Maßlösung (100 mM) (R 5) wurden mit Aqua destillata (R 16) ad 500 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde überprüft und ggf. mit 1N NaOH (R 20) eingestellt.

L 14 HEPES-Zentrifugationspuffer (20 mM HEPES; 0,1 mM Na₂EDTA) pH 7,4

50 ml HEPES-Stammlösung (200 mM) (L 1) und 0,5 ml Na₂EDTA-Maßlösung (100 mM) (R 5) wurden mit Aqua destillata (R 16) ad 500 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wurde überprüft und ggf. mit 1N NaOH (R 20) eingestellt.

L 15 HEPES-Inkubationspuffer I (12,5 mM HEPES; 12,5 mM MgCl₂; 125 mM NaCl) pH 7,4

9,9 g HEPES-Säure (R 35), 5,4 g HEPES-Natrium (R 34), 12,7g MgCl₂ x 6 H₂O (R 42) und 36,5 g NaCl (R 2) wurden in 5,0 l Aqua destillata (R 16) gelöst und der pH 1N NaOH (R 20) eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

L 16 HEPES-Inkubationspuffer II (10 mM HEPES; 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl) pH 7,4

1,6 g HEPES-Säure (R 35), 4,3 g HEPES-Natrium (R 34), 10,2 g MgCl₂ x 6 H₂O (R 42) und 29,2 g NaCl (R 2) wurden in 1,0 l Aqua destillata (R 16) gelöst und der pH 1N NaOH (R 20) eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

L 17 IPTG-Lösung 10 mM

24 mg IPTG (R 37) wurden in 10 ml Aqua destillata (R 16) gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

L 18 KH₂PO₄-Stammlösung (0,5 M)

68 g Kaliumdihydrogenphosphat (R 38) wurden in 1 Liter Aqua destillata (R 16) gelöst. Die Lagerung erfolgte unter Lichtausschluss bei 2-8°C.

L 19 *Luria-Bertani-Medium (ampicillinhaltig)*

12,5 g LB-Medium (R 41) wurden in 500 ml Aqua destillata (R 16) gelöst und autoklaviert. Nach Abkühlen wurden 500 µl Ampicillin-Lösung (L 1) zugefügt.

L 20 *Na₂CO₃-Lösung 2%*

2 g Natriumcarbonat (R 14) wurden in 100 ml Aqua destillata (R 16) gelöst. Die Herstellung der Lösung erfolgte frisch bei jeder Proteinbestimmung.

L 21 *Na₂HPO₄-Stammlösung (0,5 M)*

178 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (R 26) wurden mit Aqua destillata (R 16) auf ein Volumen von ca. 1,5 Liter gebracht, bis zur vollständigen Lösung erhitzt und anschließend auf ein Gesamtvolumen von 2 Liter aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

L 22 *Na,K,PO₄-Puffer (40 mM) pH 7,4*

Die Herstellung erfolgte aus 200 ml Na₂HPO₄-Stammlösung (L 20) und 60 ml KH₂PO₄-Stammlösung (L 18), die mit Aqua destillata (R 16) auf ein Volumen von 3 Litern aufgefüllt wurden. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

L 23 *Na,K,PO₄-Puffer (5 mM) pH 7,4*

Die Herstellung erfolgte aus 62,5 ml Na,K,PO₄-Puffer (40 mM, L 22), die mit Aqua destillata (R 16) ad 500 ml aufgefüllt wurden. Der pH-Wert wurde überprüft und ggf. mit 1 N Phosphorsäure (L 28) eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

L 24 *Nutrient Mixture F12-Ham (Nährmedium)*

Zu 500 ml Nährmedium wurden 50 ml fetales Kälberserum (R 30), 5 ml Penicillin Streptomycin-Lösung (R 45), 4 ml L-Glutamin-Lösung (R 39) und 1 ml G418-Lösung (L 11) gegeben. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

L 25 *NZY-Lösung pH 7,5*

4,2 g NZY-Broth (R 7) werden in 200 ml Aqua destillata (R 16) gelöst. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit 1N NaOH (R 20). Die Lösung wurde autoklaviert, die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

L 26 *NZY⁺-Lösung*

Zu 10 ml NZY-Lösung (L 25) wurden 200 µl 20%ige Glucoselösung zugegeben. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

L 27 Polyethylenimin (PEI)-Lösung 0,1 %

1,0 g PEI-Lösung 50% (R 46) wurden mit Aqua destillata (R 16) ad 500 ml aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

L 28 Phosphorsäure (1 N)

2,04 ml Phosphorsäure (R 50) wurden mit Aqua destillata (R 16) ad 100,0 ml aufgefüllt.

L 29 Tris-EDTA-Puffer (TE) 10 mM, steril

Ethylendiamintetraessigsäure (R 5) wurde unter Zugabe von 1N NaOH (R 20) in 70 ml Aqua dest. gelöst. Es wurde Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (R 15) hinzugefügt und der pH Wert mit 1N HCl (R 6) auf 8,0 eingestellt. Anschließend wurde mit Aqua destillata (R 16) auf 100 ml aufgefüllt und die Lösung steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

L 30 X-Gal-Lösung 10%ig

20 mg X-Gal (R 49) wurden in 1 ml Dimethylformamid (R 4) gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 2-8°C.

2.9 Reagenzien

In der nachfolgend aufgeführten Liste der Reagenzien wird in der rechten Spalte die Produktnummer des jeweiligen Herstellers angegeben.

Acros Organics (Geel, Belgien)

R 1	Natriumbutyrat (M_r 110,1g/mol)	26319
R 2	Natriumchlorid (NaCl) (M_r 58,4 g/mol)	207790010

Beckmann Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)

R 3	Ready Protein ^{TM+} Szintillations-Cocktail	586604
-----	--	--------

Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz)

R 4	Dimethylformamid	40248
-----	------------------	-------

Grüssing GmbH (Filsum, Deutschland)

R 5	Ethylendiamintetraessigsäure (Na ₂ EDTA-Maßlösung 0,1 mol/l)	20271
R 6	Salzsäure (HCl-Maßlösung 1 mol/l)	23204

Gibco BRL (Eggenstein, Deutschland)

R 7 NZY-Broth 13635-024

Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA)

R 8 Hygromycin B (M_r 527,5 g/mol) 10687-010

R 9 pOG44-Plasmid V6005-20

R 10 ZeocinTM (M_r 1137,41) R250-01

Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

R 11 D(+)-Glucose-Monohydrat 8346

R 12 Folin-Ciocalteus Phenolreagenz 1.09001.
0500

R 13 Kupfersulfat-Pentahydrat ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$) (M_r 249,7g/mol) 1.02790.
0250

R 14 Natriumcarbonat (Na_2CO_3) (M_r 106,0 g/mol) 1.06392.
0500

R 15 Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (M_r 121,14 g/mol) 108382

Millipore GmbH (Schwalbach, Deutschland)

R 16 Aqua destillata (Herstellung mittels Elix[®]-Wasseraufbereitungsanlage)

R 17 Aqua pro analysi (Herstellung mittels Milli Q[®]-Reinstwassersystem)

Qiagene GmbH (Hilden, Deutschland)

R 18 Polyfect[®] Transfektionsreagenz 301107

R 19 2-Propanol 99,5% (HPLC) 34863

Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland)

R 20 Natronlauge (NaOH -Maßlösung 1 mol/l) 35256

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland)

R 21 Ampicillin-Natrium (M_r 371,4g/mol) A-9518

R 22 Atropinsulfat (M_r 676,8 g/mol) A-0257

R 23 Bradford-Reagent B-6916

R 24 Kalium-Natriumtartrat-Tetrahydrat ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$)
(M_r 282,22 g/mol) 379832

R 25 Dimethylsulfoxid (M_r 78,1 g/mol) D-5879

R 26 Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$)
(M_r 177,99 g/mol) S-0876

R 27	Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM-Lösung)	D-5796
R 28	Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	D-5652
R 29	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	E-9884
R 30	Fetales Kälber Serum	F-7524
R 31	G418-Sulfat (M_r 692,7 g/mol)	A-1720
R 32	Glycerol 99% (M_r 92,09 g/mol)	G-5516
R 33	Guanosin-5'-diphosphat, Natriumsalz (M_r 443,2 g/mol)	G-7127
R 34	HEPES, Natriumsalz (M_r 260,3 g/mol)	H-7006
R 35	HEPES, freie Säure (M_r 238,3 g/mol)	H-3375
R 36	Humanes Serumalbumin (Fraktion V)	A-1653
R 37	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	I-6758
R 38	Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) (M_r 136,09 g/mol)	P-5379
R 39	L-Glutamin-Lösung 200mM	G-7513
R 40	Luria-Bertani-Agar	L-3072
R 41	Luria-Bertani-Medium	L-3522
R 42	Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($MgCl_2 \times 6H_2O$) (M_r 302,3 g/mol)	M-2670
R 43	N-Methylscopolaminbromid (NMS) (M_r 398,3 g/mol)	S-8502
R 44	Nutrient Mixture F-12 Ham	N-4888
R 45	Penicillin-Streptomycin-Lösung	P-0781
R 46	Polyethylenimin-Lösung (PEI 50% (g/ml), wässrige Lösung)	P-3143
R 47	2-Propanol, 99,5%, HPLC-Qualität	270490
R 48	Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l Na_4EDTA)	T-3924
R 49	X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galakto-pyranosid)	B-4252

Zentrale Chemikalienversorgung Endenich (ZVE), Universität Bonn, Abt. 4.6 (Bonn, Deutschland)

R 50	Phosphorsäure (H_3PO_4) 85%	124715
------	---------------------------------	--------

2.10 Verbrauchsmaterialien

In der nachfolgend aufgeführten Liste der Verbrauchsmaterialien wird in der rechten Spalte die Produktnummer des jeweiligen Herstellers angegeben.

Abgene House (Epsom, Uk)

V 1	96-well Mikrotiterplatte, PP	AB-0564
-----	------------------------------	---------

Applied Biosystems (Applera GmbH, Darmstadt, Deutschland)

V 2 MicroAmp[®] Reaktionsgefäße 0,2 ml N8010540

Beckman Instruments (Palo Alto, USA)

V 3 Zentrifugenbehältnis, PP, 500 ml 361691

Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)

V 4 Borosilikat Reagenzgläser 16x100 mm FB-51330

V 5 Falcongefäße 2059 9401352

V 6 Szintillationsgefäß (PE) 21 ml mit Schraubdeckel 619301

Greiner Bio-One GmbH (Soligen-Wald, Deutschland)

V 7 Cellstar[®] Einmalpipette 10 ml/25 ml 607160/
760160

V 8 Falcon tubes, steril, 15 ml/50 ml 227261

V 9 Gewebekulturschale, steril 100/20 mm 664160

V 10 Gewebekulturschale, steril 145/20 mm 639160

V 11 Kryovial CryoFlex 1,5 ml 123263

V 12 Polypropylen-PP- Reaktionsgefäße, 1,5 ml 616201

Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA)

V 13 FlpIn[™] System K6010-01

Merck Labor und Chemie Vertrieb GmbH (Bruchsal, Deutschland)

V 14 Spritzenvorsatzfilter (0,22 µM CM-Membran; steril) 5122110

Nalgene Nunc International (Rochester, USA)

V 15 Polycarbonat-PC-Zentrifugenröhrchen mit Verschluss, 50 ml 3138-0050

V 16 SFCA Bottle-Top-Filter, steril, 150 ml 290-4520

Pechiney Plastic Packaging (Menasha, USA)

V 17 Parafilm[®] M laboratory film PM-996

Perkin Elmer Life Sciences GmbH (Rodgau-Jügesheim, Deutschland)

V 18 MeltiLex[™] A Szintillationswachs 1450-441

V 19 Plate Cassette 1450-105

V 20 Printed Filtermat A 1450-441

V 21 Sample Bag 1450-432

Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)

V 22 Plasmid Maxi Kit 12162

Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)

V 23 Zellschaber, steril, 25 cm 83.1830

Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)V 24 Glass-Microfibre Sheets, GMF 2, 125x379 mm FT-2-1102
1253796**Stratagene Europe (Amsterdam, Niederlande)**

V 25 QuikChange™ site-directed mutagenesis kit 200519

2.11 Verwendete Geräte

In dieser Liste sind die verwendeten Gerätschaften aufgeführt.

Beckman Coulter Inc. (Unterschleißheim, Deutschland)

G 1 Avanti J-20XP Ultrazentrifuge

G 2 Beckman Coulter LS-6500 SC

Biochrome, Inc. (Cambridge, UK)

G 3 Ultrospec 3300 pro, UV/Vis-Spektrometer

Biomedical Research and Development Laboratories (Gaithersburg, USA)

G 4 Brandel Harvester, M-24

Brand GmbH & Co KG (Wertheim, Deutschland)

G 5 AccuJet®

Carl Zeiss Jena GmbH (Jena, Deutschland)

G 6 Axiovert 25, Mikroskop

Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)

G 7 Eppendorf Zentrifuge 5417C

Gesellschaft für Labortechnik, mbH (Burgwedel, Deutschland)

G 8 GFL 1083, Schüttelwasserbad

Hellma GmbH & Co. KG (Müllheim, Deutschland)

G 9 Präzisionsküvette 100-QS

Heraeus (Hilden, Deutschland)

G 10 Herasafe-Werkbank HS 15, Klasse II

Ika® Works Inc. (Wilmington, USA)

G 11 MS 1 Minishaker

Janke & Kunkel, IKA® Labortechnik (Staufen, Deutschland)

G 12 Potter Elvehjem Glashomogenisator

Julabo Labortechnik GmbH (Seelbach, Deutschland)

G 13 Julabo® TW12 Wasserbad

G 14 Julabo® F30-C Cryo-Compact-Thermostat

Kendro Laboratory Products GmbH (Langenselbold, Deutschland)

G 15 Heraeus Brutschrank, B6060

Kinematica AG (Littau-Luzern, Schweiz)

G 16 Polytron Homogenisator

Mettler Toledo AG (Greifensee, Schweiz)

G 17 Analysenwaage AG204

G 18 Präzisionswaage PB403-S

Millipore GmbH (Schwalbach, Deutschland)

G 19 Elix® Wasseraufbereitungssystem (Herstellung von Aqua destillata)

G 20 Milli-Q® Reinstwassersystem (Herstellung von Aqua pro analysi)

PerkinElmer Life Sciences GmbH (Rodgau-Jügesheim, Deutschland)

G 21 GeneAmp PCR-System 2400

Scotsman Ice Systems (Bettolino di Pogliano, Mailand, Italien)

G 22 Eismaschine AF-100, AS-E 230/50/1

Sharp Electronics Europe GmbH (Hamburg, Deutschland)

G 23 Mikrowelle Sharp P611

Techne (Duxford, Cambridge, UK)

G 24 Dri-Block® DB2A

ThermoForma Scientific (Marietta, Ohio, USA)

G 25 Gefrierschrank -86°C ULT

G 26 Orbital Shaker 420

G 27 Water Jacketed CO2 Incubator

Thermo Labsystems Oy (Helsinki, Finland)

G 28 Finnpipette Digital (diverse Größen)

G 29 Finnpipette Stepper

Tomtec Inc. (Hamden, USA)

G 30 Harvester 96® Mach III M (Produktnummer: 963-589)

G 31 Harvester 96® Mach III M (Produktnummer: 990607010)

VWR International (Langenfeld, Deutschland)

G 32 Neubauer Zählkammer

Wallac (Turku, Finland)

G 33 1450-Microbeta Trilux Liquid Scintillation & Luminescence Counter

2.12 Verwendete Computerprogramme

ChemWindow® (Version 6.0, BioRad, Philadelphia, USA)**GraphPad Prism®** (Version 4.0, GraphPad Software, San Diego, USA)**GraphPad Instat®** (Version 3.05, GraphPad Software, San Diego, USA)**Microsoft Excel® 2002** (Microsoft Corporation, Redmont, USA)**Microsoft PowerPoint® 2002** (Microsoft Corporation, Redmont, USA)**Microsoft Word® 2002** (Microsoft Corporation, Redmont, USA)

3 Ergebnisse

3.1 Abhängigkeit der Bindung typischer und atypischer allosterischer Modulatoren an humanen M_2 -Rezeptoren vom Expressionssystem

Befunde einer früheren Arbeit zeigten ein andersartiges Bindungsverhalten von atypischen allosterischen Modulatoren im Vergleich zu typischen Testsubstanzen an humanen M_2 -Rezeptoren in verschiedenen Expressionssystemen (Dittmann, 2003). Dieses differierende Verhalten wurde auf mögliche unterschiedliche N-Glykosylierungsmuster der verwendeten Expressionssysteme zurückgeführt, da das allosterische Haftareal des muskarinischen M_2 -Rezeptors im extrazellulären Bereich nahe der N-Glykosylierungsstellen lokalisiert ist. Die von Dittmann beschriebenen Versuche wurden hauptsächlich an M_2 -Rezeptoren aus COS7-Zellen und CHO-Zellen durchgeführt. COS7-Zellen sind Nierenzellen der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), wohingegen CHO-Zellen aus dem Ovar des chinesischen Seidenhamsters (*Cricetulus griseus*) stammen.

Um die Reproduzierbarkeit dieser Befunde zu prüfen, wurden die beiden Expressionssysteme hinsichtlich ihres Einflusses auf das Bindungsverhalten von allosterischen Modulatoren erneut untersucht. Als Testsubstanzen dienten exemplarisch der typische allosterische Modulator WDuo3 sowie die atypischen allosterischen Modulatoren Duo3 und Tacrin (siehe Kapitel 2.7.3). Da die verwendeten CHO-Zellen stabil, die COS7-Zellen hingegen transient mit dem hM_2 -Rezeptorgen transfiziert waren, wurde zur besseren Vergleichbarkeit ein weiteres Expressionssystem herangezogen. Die verwendete CHOK1-Zelllinie war in Analogie zu den COS7-Zellen transient mit der cDNA des hM_2 -Rezeptorgens transfiziert (siehe Kapitel 2.2.3.1).

Voruntersuchungen: Abhängigkeit der Bindung des orthosterischen Radioliganden [³H]NMS vom Expressionssystem

Zunächst wird in diesem Abschnitt die Abhängigkeit der Bindung des Orthosters [³H]NMS von der Wahl des Expressionssystems untersucht. Eine Charakterisierung der Radioligand-Bindungseigenschaften aller in dieser Arbeit hergestellten Membransuspensionen erfolgte mit Hilfe homologer Konkurrenzexperimente (siehe Kapitel 2.4.2.1). Es wurden die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_D als Maß der Affinität des verwendeten Radioliganden [³H]N-Methylscopolamin ([³H]NMS) zum Rezeptor und der Parameter B_{max} als Maß der Anzahl der Bindungsstellen im System ermittelt. Überdies wurden die Homogenate hinsichtlich der Dissoziationshalbwertszeit von [³H]NMS ($t_{1/2off}$) untersucht. Die Bestimmung von $t_{1/2off}$ erfolgte in Dissoziationsbindungsexperimenten (siehe Kapitel 2.4.3). Abbildung 3.1 zeigt die im Rahmen dieses Teilprojekts resultierenden Konzentrations-Wirkungskurven der homologen Konkurrenzexperimente.

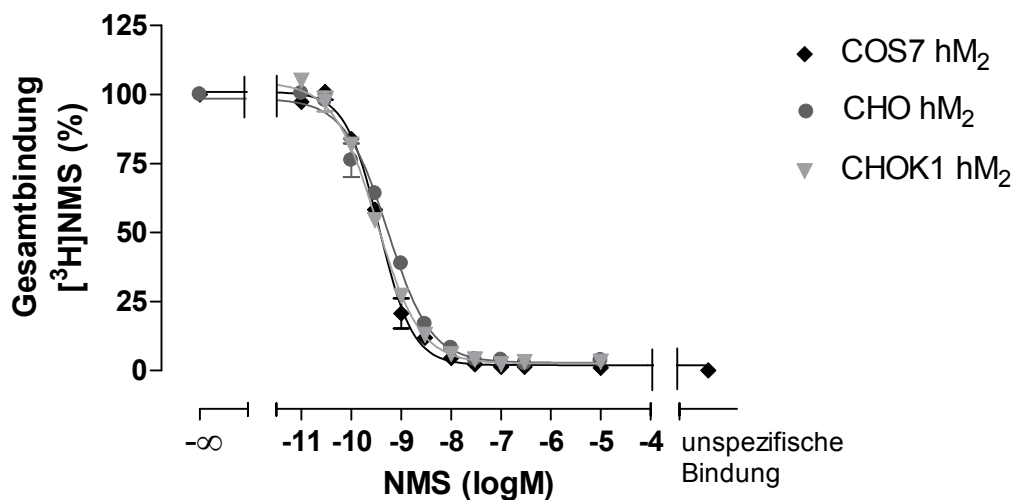


Abbildung 3.1: Homologes Konkurrenzexperiment mit steigenden Konzentrationen NMS in Anwesenheit des Radioliganden [³H]NMS (0,2 nM) an M₂-Rezeptoren aus verschiedenen Expressionssystemen. Ordinate: Gesamtbindung des Radioliganden [³H]NMS (in % bezogen auf den Kontrollwert). Abszisse: Steigende Konzentrationen NMS (log M). Die Durchführung erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 3 µM Atropin bestimmt. Es wurden jeweils zwei Versuche in Doppelbestimmung durchgeführt. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler. Der Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ an die Werte angepasst (nichtlineare Regressionsanalyse; Gleichung 2.6 (siehe Kapitel 2.4.2.1.1)).

In Tabelle 3.1 werden die zugehörigen Kenngrößen aufgelistet.

Expressionssystem	Rezeptor	pK_D	B_{max} [fmol/mg]	k_{-1} [min ⁻¹]	$t_{1/2diss}$ [min]
COS7 (transient)	hM ₂	9,75 (9,75; 9,75)	3635 (3944; 3326)	0,103 ± 0,004 n = 32	6,99
CHO (stabil)	hM ₂	9,58 (9,58; 9,58)	912 (1030; 793)	0,078 ^s ± 0,003 n = 9	8,39
CHOK1 (transient)	hM ₂	9,86 (9,84; 9,88)	712 (723; 700)	0,082 ^s ± 0,003 n = 20	8,76

Tabelle 3.1: Auflistung der aus homologen Konkurrenzexperimenten erhaltenen Parameterwerte der NMS-Bindung an M₂-Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen. pK_D : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante. B_{max} : Dichte der Bindungsstellen. k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation. $t_{1/2}$: Dissoziationshalbwertszeit. Angeführt sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler und die Anzahl der Experimente (n). Bei der Durchführung je zweier Versuche in Doppelbestimmung werden sowohl die beiden Einzelwerte der Versuche als auch der resultierende Mittelwert genannt. ^s k_{-1} unterscheidet sich signifikant von k_{-1} an COS7 hM₂ (t-Test; $p < 0,05$).

Die ermittelten Affinitäten (pK_D) des orthosterischen Liganden [³H]NMS an M₂-Rezeptoren aus verschiedenen Expressionssystemen wichen nicht wesentlich voneinander ab. Hinsichtlich der Geschwindigkeitskonstante k_{-1} der Dissoziation von [³H]NMS bestanden hingegen Unterschiede. Diese wies sowohl an transient als auch an stabil transfizierten CHO-M₂-Rezeptoren einen signifikant erniedrigten Wert gegenüber M₂-Rezeptoren aus COS7-Zellen auf. Möglicherweise kommt es durch unterschiedliche Rezeptordichten der Membranhomogenate zu Effekten, die Einfluss auf die Dissoziationsgeschwindigkeit des Radioliganden [³H]NMS nehmen.

3.1.1 Untersuchungen zur Bindung des typischen allosterischen Modulators WDuo3

3.1.1.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Zu Beginn dieser Versuchsreihe wurden Zweipunkt-Dissoziationsexperimente (siehe Kapitel 2.4.3) durchgeführt, um die Affinität des typischen allosterischen Modulators WDuo3 zum [³H]NMS-besetzten muskarinischen M₂-Rezeptor in den herangezogenen Expressionssystemen zu bestimmen und zu vergleichen.

Abbildung 3.2 zeigt die aus Dissoziationsexperimenten mit WDuo3 erhaltenen Kurvenverläufe an den zu untersuchenden M₂-Rezeptoren aus differierenden Expressionssystemen.

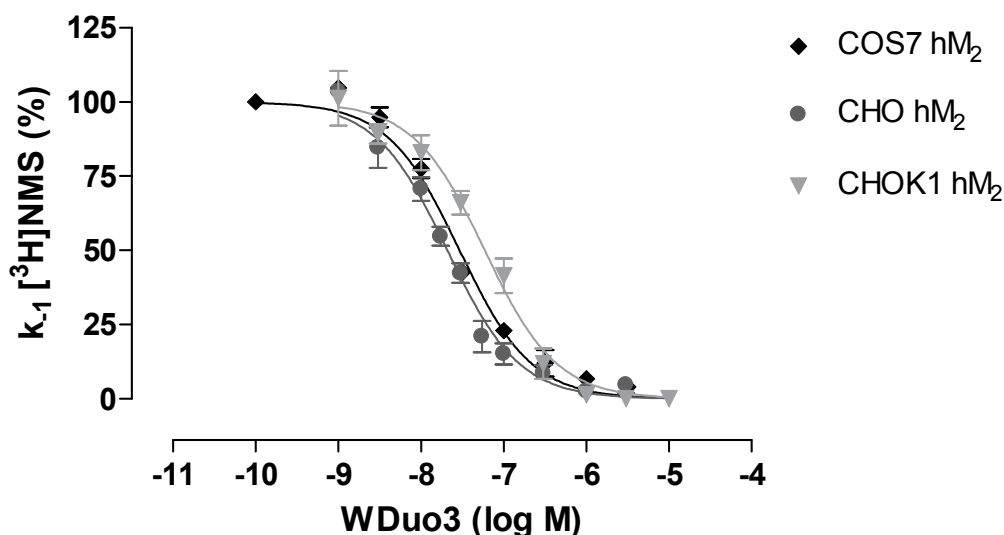


Abbildung 3.2: Interaktion von WDuo3 mit hM₂-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k_{-1} (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 6-9 unabhängigen Experimenten.

In Tabelle 3.2 sind nachfolgend die ermittelten Kenngrößen tabellarisch zusammengestellt.

Expressionssystem	Rezeptor	pEC _{0,5diss}	n _H	Unteres Plateau [%]	n
COS7 (transient)	hM ₂	7,53 ± 0,04	-1,07 ^{ns} ± 0,08	6 ^{ns} ± 2	6
CHO (stabil)	hM ₂	7,68 ^s ± 0,03	-1,08 ^{ns} ± 0,09	3 ^{ns} ± 2	9
CHOK1 (transient)	hM ₂	7,23 ^s ± 0,04	-1,01 ^{ns} ± 0,10	-3 ^{ns} ± 3	6

Tabelle 3.2: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten (siehe Abbildung 3.2) mit WDuo3 erhaltenen Kenngrößen. pEC_{0,5diss}: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation führt. n_H: Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 6-9 unabhängigen Experimenten. ^s Der pEC_{0,5diss}-Wert unterscheidet sich signifikant vom pEC_{0,5diss}-Wert an COS7 hM₂ (t-Test; p < 0,05). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von -1 (n_H) bzw. 0 (unteres Plateau) (F-Test; p < 0,05).

Die Betrachtung der pEC_{0,5diss}-Werte ergab sowohl für M₂-Rezeptoren aus stabil transfizierten CHO-Zellen als auch für Rezeptoren aus transient transfizierten CHOK1-Zellen einen signifikanten Unterschied gegenüber Rezeptoren aus transient transfizierten COS7-Zellen (siehe Tabelle 3.2). Die Affinität des typischen allosterischen Modulators WDuo3 war an M₂-Rezeptoren aus stabil transfizierten CHO-Zellen geringfügig um 0,2 Dekaden erhöht. An Rezeptoren aus transient transfizierten CHOK1-Zellen zeigte sich hingegen ein Wirksamkeitsverlust von 0,3 Dekaden gegenüber M₂-Rezeptoren aus COS7-Zellen. Das Steilheitsmaß n_H wich bei keiner der drei betrachteten Konzentrations-Effekt-Kurven signifikant von -1 ab. Erwartungsgemäß wiesen die Kurvenverläufe des typischen allosterischen Modulators WDuo3 somit normale Steilheiten auf. Eine individuelle Anpassung der einzelnen Kurvenverläufe der Testsubstanz war an M₂-Rezeptoren aus COS7-Zellen nicht möglich (siehe Kapitel 2.4.3). Für die mit WDuo3 an M₂-Rezeptoren aus transient und stabil transfizierten CHO-Zellen ermittelten Kurvenverläufe konnte eine solche Anpassung hingegen vorgenommen werden. Es zeigte sich bezüglich der Affinität von WDuo3 an stabil transfizierten CHO-Zellen ein differierender Wert (pEC_{0,5diss} = 7,57 ± 0,03), so dass gegenüber M₂-Rezeptoren aus COS7-Zellen kein signifikanter Unterschied mehr bestand. Der Affinitätswert des Modulators WDuo3 an M₂-Rezeptoren aus transient transfizierten CHOK1-Zellen unterlag hingegen keiner

Veränderung ($pEC_{0,5diss} = 7,23 \pm 0,08$). Damit blieb die signifikante Affinitätsabnahme von WDuo3 an diesen Rezeptoren unabhängig von der Methode der Auswertung bestehen, die biologische Relevanz dieses Befundes ist hingegen fraglich.

3.1.1.2 Bindung an [³H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Zur Ermittlung der Affinität einer allosterischen Testsubstanz zu freien M₂-Rezeptoren wurden allosterische Interaktionsexperimente durchgeführt (siehe Kapitel 2.4.2.3). Den aus diesen Versuchen erhaltenen Daten wurde mit Hilfe einer computergestützten, nichtlinearen Regressionsanalyse ein Kurvenverlauf anhand Gleichung 2.10 angepasst. Die herangezogene Analyse beruhte auf dem ternären Komplexmodell der allosterischen Interaktion (Ehlert, 1988). Ergab sich aus einem Experiment eine neutral kooperative Interaktion des allosterischen Modulators mit dem orthosterischen Radioliganden [³H]NMS (d.h. eine unveränderte [³H]NMS-Bindung trotz Interaktion mit dem Rezeptor), so konnte keine Auswertung anhand Gleichung 2.10 vorgenommen werden. In diesem Fall wurden die Daten mittels einer modifizierten Gleichung analysiert (siehe Kapitel 2.4.2.3), bei der die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A durch den Quotienten $EC_{0,5diss}/\alpha$ ersetzt wurde (Raasch et al., 2002; Daiss et al., 2002). Diese Berechnung beruht auf dem Zusammenhang $p(\alpha \times K_A) = pEC_{0,5diss}$. Die Ermittlung des $EC_{0,5diss}$ -Wertes erfolgte im Vorfeld in Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten. Mit Hilfe der angeführten Gleichung lässt sich aus den in allosterischen Interaktionsexperimenten ermittelten Parametern ein Schätzwert für $pEC_{0,5diss}$ bestimmen. Der erhaltene Wert wird dann mit dem aus Dissoziationsbindungsexperimenten stammenden Parameter verglichen, um die zu erwartende Übereinstimmung der Werte zu überprüfen (Ehlert, 1988). Die individuelle Inkubationszeit jeder Versuchsreihe wurde mit Hilfe von Gleichung 2.11 berechnet (Lazareno und Birdsall, 1995).

Abbildung 3.3 zeigt den Einfluss von WDuo3 auf die [³H]NMS-Gleichgewichtsbindung an muskarinischen M₂-Rezeptoren aus verschiedenen Expressionssystemen. Im Folgenden wird das Maß für die Affinität des allosterischen Modulators zum [³H]NMS-unbesetzten M₂-Rezeptorprotein (pK_A) und der Kooperativitätsfaktor $p\alpha$ vergleichend betrachtet. Aus den ermittelten Kurvenverläufen ergaben sich die in Tabelle 3.3 aufgelisteten Kenngrößen. Ein Vergleich der Affinitätswerte des

typischen Modulators WDuo3 an unbesetzten M_2 -Rezeptorproteinen (pK_A) zeigte an Rezeptoren aus stabil transfizierten CHO-Zellen eine geringfügige, aber signifikante Steigerung der Affinität der Testsubstanz verglichen mit Rezeptoren aus COS7-Zellen an. Für muskarinische M_2 -Rezeptoren aus transient transfizierten CHO-Zellen konnte hingegen eine statistisch signifikante Reduktion der Affinität der Testsubstanz WDuo3 gegenüber COS7- hM_2 festgestellt werden. An den Rezeptoren der drei Expressionssysteme zeigte sich eine Tendenz zur Steigerung der [3H]NMS-Bindung durch WDuo3, also eine geringfügig ausgeprägte positive Kooperativität mit [3H]NMS ($p\alpha > 0$). Eine geringe Förderung der [3H]NMS-Gleichgewichtsbindung durch WDuo3 konnte bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen werden (Schröter et al., 2000; Dittmann, 2003). Es fiel auf, dass die positive Kooperativität an M_2 -Rezeptoren aus transient transfizierten CHOK1-Zellen am deutlichsten ausgeprägt war. Die Abweichung gegenüber Rezeptoren aus stabil transfizierten CHO-Zellen beruht jedoch ausschließlich auf einem einzelnen Konzentrationswert, der im Falle von transient transfizierten CHOK1-Zellen erhoben werden konnte. Da dies bei Rezeptoren aus stabil transfizierten CHO-Zellen aus experimentellen Gründen nicht möglich war, kann eine Abweichung des Kooperativitätswertes angezweifelt werden. Weiterhin kommt aufgrund der rechnerischen Bestimmung der pK_A -Werte mit Hilfe der modifizierten Ehlert-Gleichung den $pEC_{0,5diss}$ -Werten eine entscheidende Bedeutung zu. Eine Affinitätsabnahme von WDuo3 an CHOK1- M_2 -Rezeptoren ist demnach durch den ebenfalls erniedrigten $pEC_{0,5diss}$ -Wert bedingt (siehe Kapitel 3.1.1.1). Aufgrund dessen und einer unsicheren Kurvenanpassung mit Hilfe der modifizierten Ehlert-Gleichung (Raasch et al., 2002), ist die biologische Relevanz des erhaltenen Befundes fraglich. Tabelle 3.3 zeigt überdies, dass unter Ausschluss der Einzelkonzentration 3×10^{-7} der signifikante Unterschied bezüglich des Kooperativitätsfaktors $p\alpha$ zwischen M_2 -Rezeptoren aus transient transfizierten CHOK1-Zellen und Rezeptoren aus COS7-Zellen nicht mehr besteht. Zusammenfassend betrachtet konnte keine ausgeprägte Abhängigkeit vom Expressionssystem für die Interaktion von WDuo3 mit [3H]NMS-besetzten und -unbesetzten muskarinischen M_2 -Rezeptoren festgestellt werden.

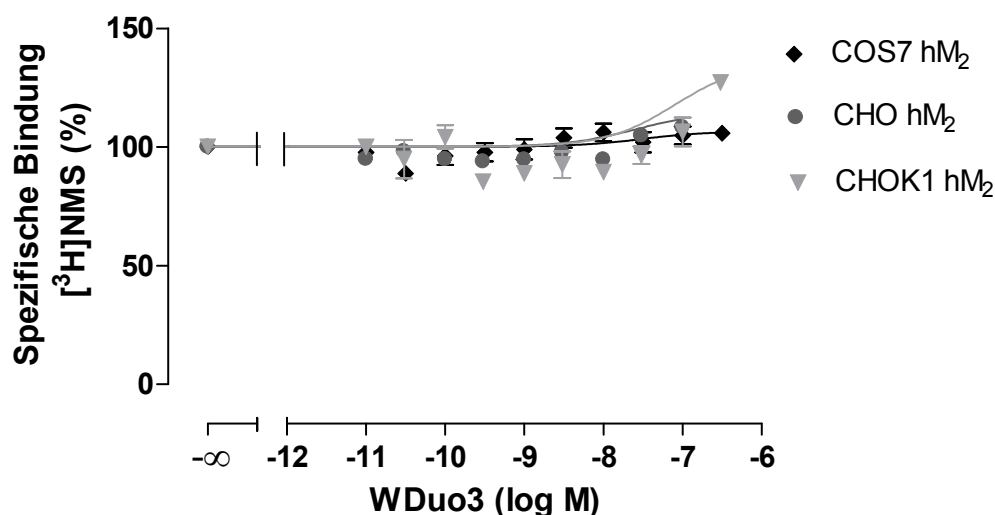


Abbildung 3.3: Einfluss des typischen allosterischen Modulators WDuo3 auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (0,2 nM) an hM_2 -Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen. Ordinate: Spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K, P_i -Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der modifizierten Ehlert-Gleichung mit $K_A = \text{EC}_{0,5\text{diss}}/\alpha$ (siehe Kapitel 2.4.2.3.1). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Expressions-system	Rezeptor	pK_A	$\text{p}\alpha$	$\text{p}\alpha + \text{pK}_A$	$\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$	n
COS7 (transient)	hM_2	$7,47^* \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,02$	-	7,53	4
CHO (stabil)	hM_2	$7,57^{\text{s}} \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,03$	-	7,68	4
CHOK1 (transient)	hM_2	$6,77^{\text{s}} \pm 0,04$	$0,46^{\#} \pm 0,04$	-	7,23	4
CHOK1 (transient) (unter Ausschluss der Konzentration 3×10^{-7})	hM_2	$7,09^{\text{s}} \pm 0,04$	$0,14 \pm 0,08$	-	7,23	4

Tabelle 3.3: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit WDuo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.3). pK_A : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. $\text{p}\alpha$: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α . n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. * Auswertung nach der modifizierten Ehlert-Gleichung mit $K_A = \text{EC}_{0,5\text{diss}}/\alpha$ (siehe Kapitel 2.4.2.3.1). ^s Der pK_A -Wert unterscheidet sich signifikant vom pK_A -Wert an COS7 hM_2 (t-Test; $p < 0,05$). [#] $\text{p}\alpha$ unterscheidet sich signifikant von $\text{p}\alpha$ an COS7 hM_2 .

3.1.2 Untersuchungen zur Bindung des atypischen allosterischen Modulators Duo3

3.1.2.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Die Interaktion von Duo3 mit [³H]NMS-besetzten muskarinischen M₂-Rezeptoren aus den verschiedenen Expressionssystemen ist in Abbildung 3.4 veranschaulicht. Tabelle 3.4 zeigt die ermittelten Kenndaten.

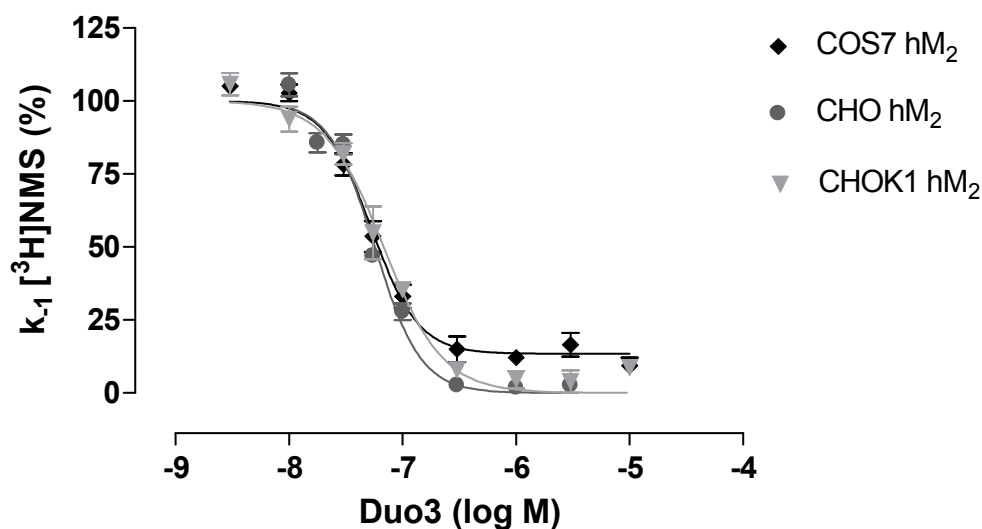


Abbildung 3.4: Interaktion von Duo3 mit hM₂-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k₋₁ (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4-7 unabhängigen Experimenten.

Ein statistischer Vergleich der Affinitäten von Duo3 an den [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren der verschiedenen Expressionssysteme zeigte eine signifikant höhere Affinität an Rezeptoren stabil transfizierter CHO-Zellen im Vergleich zu solchen aus COS7-Zellen (Tabelle 3.4). Der ermittelte Affinitätswert von Duo3 an [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren aus transient transfizierten CHO-Zellen war überdies identisch mit demjenigen an Rezeptoren aus COS7-Zellen. Alle Konzentrations-Effekt-Kurven dieser Versuchsreihe wiesen ein Steilheitsmaß n_H < -1 auf. Dies kennzeichnete das für den atypischen Modulator Duo3 charakteristische

Vorliegen „steiler“ Kurvenverläufe. Erwartungsgemäß konnte somit in allen Fällen ein komplexes Bindungsverhalten beobachtet werden, dass sich zwischen den betrachteten Expressionssystemen jedoch nicht maßgeblich unterschied. Eine individuelle Anpassung der Kurvenverläufe war innerhalb dieser Versuchsreihe in jedem Fall möglich (siehe Kapitel 2.4.3). Durch diese alternative Auswertung ergaben sich Änderungen der Affinitäten von Duo3 an den M₂-Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen (pEC_{0,5diss}-Werte: COS7 hM₂: 7,26 ± 0,05; CHO stabil hM₂: 7,28 ± 0,03; CHOK1 hM₂: 7,19 ± 0,03). Es zeigten sich unter Anwendung dieser Auswertungsmethode keinerlei signifikante Unterschiede der Wirksamkeit von Duo3 an Rezeptoren der eingesetzten Expressionssysteme.

Expressionssystem	Rezeptor	pEC _{0,5diss}	n _H	Unteres Plateau [%]	n
COS7 (transient)	hM ₂	7,17 ± 0,03	-1,50 ^s ± 0,17	13 ± 2	4
CHO (stabil)	hM ₂	7,24 [*] ± 0,02	-2,14 ^s ± 0,20	1 ^{ns} ± 2	7
CHOK1 (transient)	hM ₂	7,17 ± 0,03	-1,67 ^s ± 0,18	4 ^{ns} ± 3	4

Tabelle 3.4: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten (siehe Abbildung 3.4) mit Duo3 erhaltenen Kenngrößen. pEC_{0,5diss}: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation führt. n_H: Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4-7 unabhängigen Experimenten. ^{*}pEC_{0,5diss}-Wert unterscheidet sich signifikant vom pEC_{0,5diss}-Wert an COS7 hM₂ (t-Test; p < 0,05). ^sn_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von 0 (unteres Plateau) (F-Test; p < 0,05).

3.1.2.2 Bindung an [³H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Das folgende Kapitel beinhaltet die Ermittlung der Affinitäten von Duo3 zu freien M₂-Rezeptorproteinen aus verschiedenen Expressionssystemen. Abbildung 3.5 veranschaulicht die erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven. Die ermittelten Kenngrößen sind in Tabelle 3.5 vergleichend dargestellt.

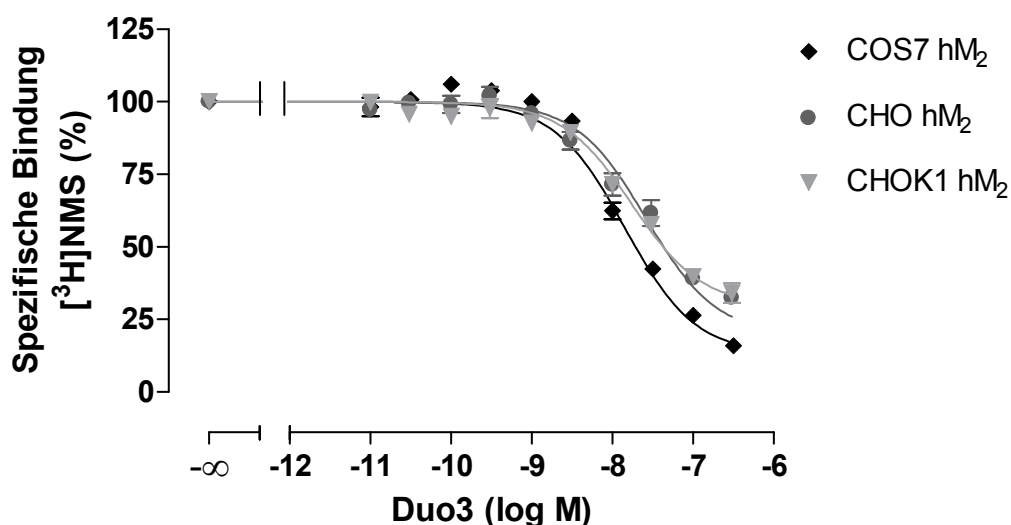


Abbildung 3.5: Einfluss des atypischen allosterischen Modulators Duo3 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS (0,2 nM) an hM₂-Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen. Ordinate: Spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Kooperativitätsmodells (siehe Gleichung 2.10). Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Steilheitsmaße der abgebildeten Kurven n_H betragen: -1,16^{ns} ± 0,11 (COS7 hM₂), 0,85^{ns} ± 0,13 (CHO hM₂), -0,93 ± 0,11 (CHOK1 hM₂). ^{ns} n_H nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05).

Der Vergleich der Affinitätswerte an unbesetzten M₂-Rezeptoren ergab einen signifikanten Affinitätsverlust (0,3 Dekaden) von Duo3 an M₂-Rezeptoren aus stabil transfizierten CHO-Zellen im Vergleich zu Rezeptoren aus COS7-Zellen (siehe Tabelle 3.5). Im Hinblick auf die Kooperativität ergab sich, dass Duo3 insgesamt zu freien M₂-Rezeptorproteinen eine höhere Affinität aufwies als zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren. Demzufolge zeigte sich in Bezug auf alle untersuchten Rezeptoren eine negative Kooperativität mit dem Orthoster [³H]NMS. Hinsichtlich der untersuchten Expressionssysteme konnten bezüglich p_α nur geringfügige, aber dennoch signifikante Unterschiede beobachtet werden. Die Produkte p(α × K_A) aus den Gleichgewichtsbindungsexperimenten stimmten mit den in Dissoziationsbindungsexperimenten erhobenen pEC_{0,5diss}-Werten gut überein. Dies zeigte die Konsistenz der Befunde. Zusammenfassend betrachtet verdeutlichen diese Resultate, dass das Bindungsverhalten des atypischen Modulators Duo3 im Hinblick auf besetzte und freie muskarinische M₂-Rezeptoren durch die Wahl des Expressionssystems nicht maßgeblich beeinflusst wird.

Expressions- system	Rezeptor	pK_A	$p\alpha$	$p\alpha + pK_A$	$pEC_{0,5diss}$	n
COS7 (transient)	hM ₂	8,12 ± 0,03	-1,17 ± 0,03	6,95	7,17	4
CHO (stabil)	hM ₂	7,78 ^s ± 0,01	-0,91 [#] ± 0,07	6,87	7,24	4
CHOK1 (transient)	hM ₂	8,07 ± 0,04	-0,84 [#] ± 0,06	7,23	7,17	4

Tabelle 3.5: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit Duo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.5). pK_A : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. $p\alpha$: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α . n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. ^s Der pK_A -Wert unterscheidet sich signifikant vom pK_A -Wert an COS7 hM₂ (t-Test; $p < 0,05$). [#] $p\alpha$ unterscheidet sich signifikant von $p\alpha$ an COS7 hM₂.

3.1.3 Untersuchungen zur Bindung des atypischen allosterischen Modulators Tacrin

3.1.3.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Zunächst wurde die Affinität der Substanz Tacrin zu [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren charakterisiert (siehe Abbildung 3.6).

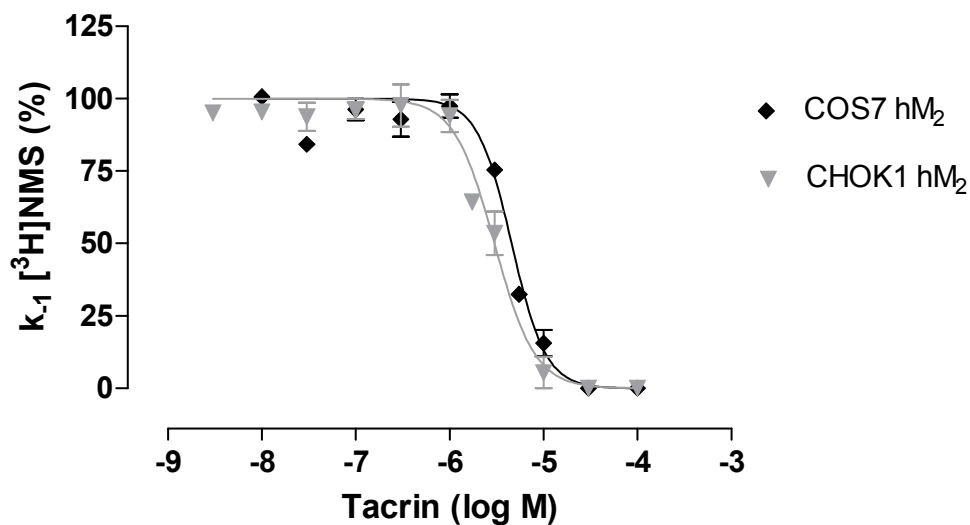


Abbildung 3.6: Interaktion von Tacrin mit hM₂-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k_{-1} (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Aus den resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven ergab sich neben den Affinitäten das jeweilige Maß der Kurvensteilheit n_H (siehe Tabelle 3.6). Ein Vergleich der ermittelten Affinitätswerte zeigt, dass Tacrin an M₂-Rezeptoren aus transient transfizierten CHO-Zellen eine geringfügig gesteigerte Affinität von nahezu 0,2 Dekaden verglichen mit M₂-Rezeptoren aus COS7-Zellen aufwies (siehe Tabelle 3.6). Obwohl der Unterschied nach Durchführung eines t-Tests signifikant war ($p < 0,05$), ist aufgrund der sehr ähnlichen Kurvenverläufe die biologische Relevanz der gefundenen Differenz fraglich. Vor dem Hintergrund der dargestellten Ergebnisse ist demzufolge von einem gleichartigen Bindungsverhalten in Bezug auf

die beiden Expressionssysteme auszugehen. Mit einem Steilheitsmaß von $n_H < -1$ zeigten beide Konzentrations-Effekt-Kurven des atypischen Modulators erwartungsgemäß hohe Kurvensteilheiten.

Expressionssystem	Rezeptor	$pEC_{0,5diss}$	n_H	Unteres Plateau [%]	n
COS7 (transient)	hM_2	$5,34 \pm 0,04$	$-2,39^s \pm 0,40$	$1^{ns} \pm 4$	4
CHOK1 (transient)	hM_2	$5,52^* \pm 0,04$	$-2,03^s \pm 0,33$	$-1^{ns} \pm 5$	4

Tabelle 3.6: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten (siehe Abbildung 3.6) mit Tacrin erhaltenen Kenngrößen. $pEC_{0,5diss}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [3H]NMS-Dissoziation führt. n_H : Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. * $pEC_{0,5diss}$ -Wert unterscheidet sich signifikant vom $pEC_{0,5diss}$ -Wert an COS7 hM_2 (t-Test; $p < 0,05$). ^s n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; $p < 0,05$). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von 0 (unteres Plateau) (F-Test; $p < 0,05$).

3.1.3.2 Bindung an [3H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Eine Untersuchung von Tacrin unter Berücksichtigung variierender Expressionssysteme wurde auch an [3H]NMS-unbesetzten M_2 -Rezeptoren durchgeführt. Die gefundenen Resultate werden in Abbildung 3.7 und Tabelle 3.7 dargestellt. Die zusammengestellten pK_A -Werte zeigten für Tacrin keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der herangezogenen Expressionssysteme. Die Affinität an freien M_2 -Rezeptoren aus CHO-Zellen entsprach derjenigen an M_2 -Rezeptoren aus COS7-Zellen. Es zeigte sich eine höhere Affinität von Tacrin an [3H]NMS-unbesetzten M_2 -Rezeptoren im Vergleich zu [3H]NMS-besetzten Rezeptoren (siehe Tabelle 3.6). Die ermittelten Kooperativitätsfaktoren wiesen auf eine stark ausgeprägte negative Kooperativität der Testsubstanz mit dem Radioliganden [3H]NMS hin. $p\alpha$ -Werte < -2 sind mit Hilfe der angewendeten Analysemethoden nicht hinreichend genau bestimmbar. Ein Vergleich von $p(\alpha \times K_A)$ mit $pEC_{0,5diss}$ konnte somit nicht vorgenommen werden. Diesen ermittelten Befunden zufolge konnte auf ein pseudokompetitives oder kompetitives Verhalten geschlossen werden, da das Radioorthoster durch den atypischen Modulator Tacrin vollständig aus seiner Gleichgewichtsbindung verdrängt wurde. Zusammengefasst kam es

hinsichtlich der Rezeptoren aus verschiedenen Expressionssystemen weder an besetzten noch an freien muskarinischen M_2 -Rezeptoren zu einer bedeutenden Änderung im Bindungsverhalten von Tacrin.

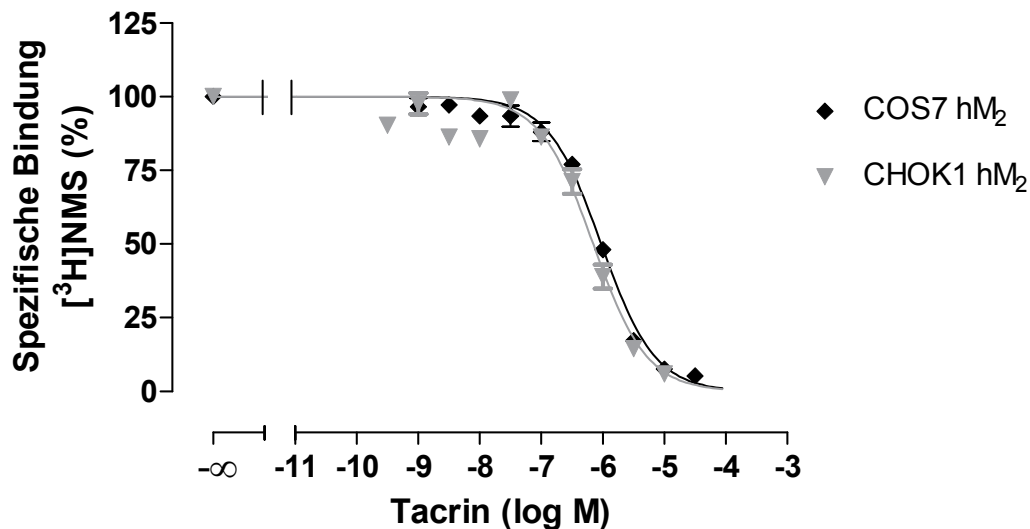


Abbildung 3.7: Einfluss des atypischen allosterischen Modulators Tacrin auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (0,2 nM) an hM_2 -Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen. Die Durchführung der Gleichgewichtsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Ordinate: Spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Kooperativitätsmodells (siehe Gleichung 2.10). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Steilheitsmaße der abgebildeten Kurven n_H betragen: $-1,24 \pm 0,10$ (COS7 hM_2), $-1,34^{\text{ns}} \pm 0,19$ (CHOK1 hM_2). ^{ns} n_H nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test; $p < 0,05$).

Expressions-system	Rezeptor	pK_A	$\text{p}\alpha$	$\text{p}\alpha + \text{pK}_A$	$\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$	n
COS7 (transient)	hM_2	$6,36 \pm 0,02$	$< -2^*$	-	5,34	4
CHO (transient)	hM_2	$6,45 \pm 0,04$	$< -2^\#$	-	5,52	4

Tabelle 3.7: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit Tacrin erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.7). pK_A : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. $\text{p}\alpha$: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α . n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. * Konkreter Wert: $-12,23 \pm 12,36$. [#] Konkreter Wert: $-21,23 \pm 21,24$.

3.2 Abhängigkeit der Bindung typischer und atypischer allosterischer Modulatoren an humanen M₂-Rezeptoren von einer veränderten N-Glykosylierung

Im Rahmen dieses Kapitels wurde überprüft, ob ein verändertes N-Glykosylierungsmuster des muskarinischen M₂-Rezeptors einen Einfluss auf das Bindungsverhalten der in Kapitel 3.1 untersuchten allosterischen Modulatoren ausübt. Verschiedene allosterische Testsubstanzen wurden bezüglich ihres Bindungsverhaltens an muskarinischen M₂-Rezeptoren mit verkürzten N-Glykanketten untersucht (Lec1-M₂-Rezeptoren). Als Vergleich dienten sowohl M₂-Rezeptoren aus stabil transfizierten CHO-Zellen als auch aus transient transfizierten CHO-Zellen, deren Struktur ein natives N-Glykosylierungsmuster aufwies.

Voruntersuchungen: Abhängigkeit der Bindung des orthosterischen Radioliganden [³H]NMS von einer veränderten N-Glykosylierung

Abbildung 3.8 zeigt die aus homologen [³H]NMS/NMS Konkurrenzexperimenten erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven. In Tabelle 3.1 sind die zugehörigen Kenngrößen aufgelistet. Aus der Betrachtung der Kurvenverläufe (siehe Abbildung 3.8) ergab sich kein wesentlicher Unterschied. Die Affinität von [³H]NMS an Lec1-M₂-Rezeptoren (pK_D) war gegenüber Rezeptoren aus CHO-Zellen nur leicht erhöht. Weiterhin konnten hinsichtlich der Geschwindigkeitsdissoziationskonstanten und folglich auch der Dissoziationshalbwertszeit keine signifikanten Unterschiede gefunden werden. Das Vorliegen von N-Glykanen vom High-Mannose-Typ an M₂-Rezeptoren aus Lec1-Zellen hatte demzufolge keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Radioliganden [³H]NMS (siehe Tabelle 3.8).

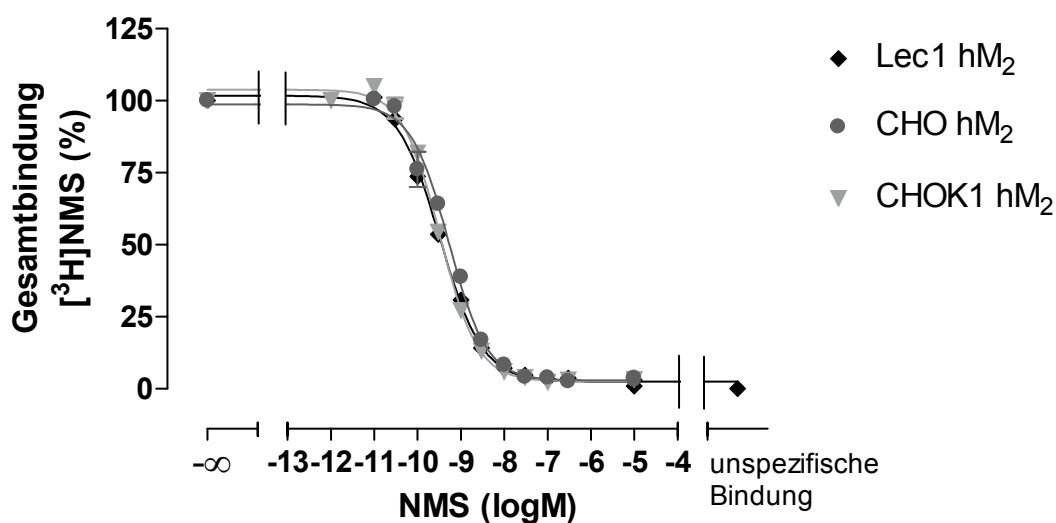


Abbildung 3.8: Homologes Konkurrenzexperiment mit steigenden Konzentrationen NMS in Anwesenheit des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (0,2 nM) an M_2 -Rezeptoren aus verschiedenen Expressionssystemen. Ordinate: Gesamtbindung des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (in % bezogen auf den Kontrollwert). Abszisse: Steigende Konzentrationen NMS (log M). Die Durchführung erfolgte in 5 mM Na,K, P_i -Puffer bei 23°C. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 3 μM Atropin bestimmt. Es wurden jeweils zwei Versuche in Doppelbestimmung durchgeführt. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler. Der Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ an die Werte angepasst (nichtlineare Regressionsanalyse; Gleichung 2.6 (siehe Kapitel 2.4.2.1.1)). Die für CHOK1 hM_2 und CHO hM_2 abgebildeten Kurvenverläufe entsprechen denjenigen aus Abbildung 3.1.

Expressionssystem	Rezeptor	pK_D	B_{max} [fmol/mg]	k_{-1} [min^{-1}]	$t_{1/2\text{diss}}$ [min]
Lec1 (transient)	hM_2	10,18 (10,14; 10,22)	129 (125; 133)	$0,086 \pm 0,003$ n = 8	8,32
CHO (stabil)	hM_2	9,58 (9,58; 9,58)	912 (1030; 793)	$0,078 \pm 0,003$ n = 9	8,39
CHOK1 (transient)	hM_2	9,86 (9,84; 9,88)	712 (723; 700)	$0,082 \pm 0,003$ n = 20	8,76

Tabelle 3.8: Auflistung der aus homologen Konkurrenzexperimenten erhaltenen Parameterwerte der NMS-Bindung an M_2 -Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen. pK_D : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante. B_{max} : Dichte der Bindungsstellen. k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation. $t_{1/2}$: Dissoziationshalbwertszeit. Angeführt sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler und die Anzahl der Experimente (n). Bei der Durchführung je zweier Versuche in Doppelbestimmung werden sowohl die beiden Einzelwerte der Versuche als auch der resultierende Mittelwert genannt.

3.2.1 Untersuchungen zur Bindung des typischen allosterischen Modulators WDuo3

3.2.1.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Die Durchführung von Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten diene zunächst der Ermittlung der Affinitäten der Testsubstanzen zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren. Die erhaltenen Kurvenverläufe sind in Abbildung 3.9 aufgeführt. Tabelle 3.9 stellt die aus den Kurvenverläufen ermittelten Kenngrößen zusammenfassend dar.

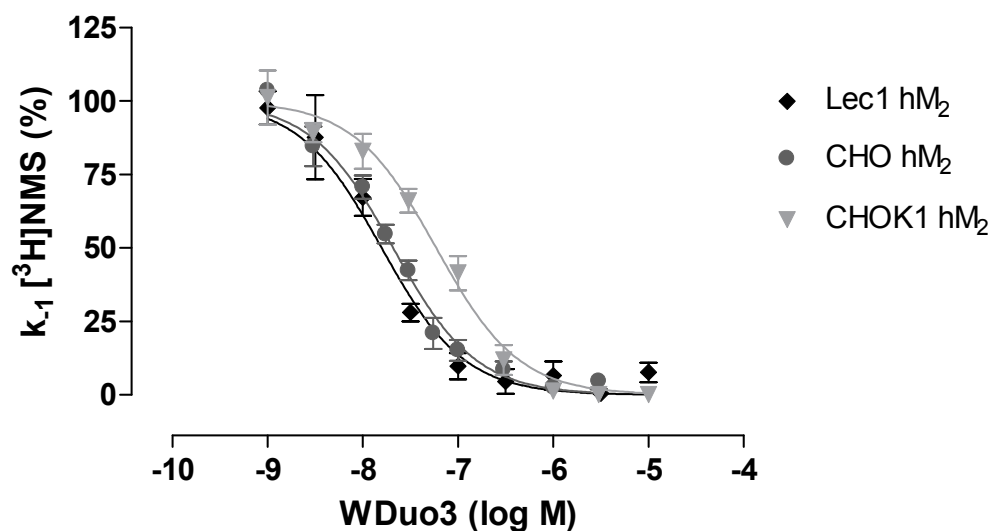


Abbildung 3.9: Interaktion von WDuo3 mit hM₂-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k₋₁ (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4-9 unabhängigen Experimenten.

Die Betrachtung der pEC_{0,5diss}-Werte zeigte keine signifikanten Unterschiede der Wirksamkeit von WDuo3 an M₂-Rezeptoren aus Lec1-Zellen und an Rezeptoren aus stabil transfizierten CHO-Zellen. Demgegenüber unterschied sich der Affinitätswert der Testsubstanz an M₂-Rezeptoren aus transient transfizierten CHO-Zellen signifikant von demjenigen der M₂-Glykosylierungsmutante (0,4 Dekaden). Bei Durchführung einer individuellen Kurvenanpassung ergaben sich Unterschiede bezüglich der Wirksamkeiten von WDuo3 an M₂-Rezeptoren aus Lec1-Zellen

($pEC_{0,5diss} = 7,93 \pm 0,09$) und stabil transfizierten CHO-Zellen ($pEC_{0,5diss} = 7,57 \pm 0,03$). Die Testsubstanz zeigte somit an Lec1-M₂-Rezeptoren eine signifikant erhöhte Wirksamkeit gegenüber Rezeptoren aus stabil und transient transfizierten CHO-Zellen. Das Steilheitsmaß n_H der Kurven konnte in allen drei Fällen unabhängig von der Auswertungsmethode auf den Wert -1 festgelegt werden (F-Test; $p < 0,05$), die ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven wurden daher als „normal steil“ angesehen. Zusammengefasst ergab sich keine eindeutige Änderung der WDuo3-Interaktion mit [³H]NMS-besetzten Rezeptoren in Abhängigkeit einer veränderten Rezeptorglykosylierung.

Expressionssystem	Rezeptor	$pEC_{0,5diss}$	n_H	Unteres Plateau [%]	n
Lec1 (transient)	hM ₂	$7,80 \pm 0,06$	$-1,27^{ns} \pm 0,18$	$4^{ns} \pm 3$	4
CHO (stabil)	hM ₂	$7,68 \pm 0,03$	$-1,08^{ns} \pm 0,09$	$3^{ns} \pm 2$	9
CHOK1 (transient)	hM ₂	$7,23^s \pm 0,04$	$-1,01^{ns} \pm 0,10$	$-3^{ns} \pm 3$	5

Tabelle 3.9: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten (siehe Abbildung 3.9) mit WDuo3 erhaltenen Kenngrößen. $pEC_{0,5diss}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation führt. n_H : Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4-9 unabhängigen Experimenten. ^s Der $pEC_{0,5diss}$ -Wert unterscheidet sich signifikant vom $pEC_{0,5diss}$ -Wert an Lec1 hM₂ (t-Test; $p < 0,05$). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von -1 (n_H) bzw. 0 (unteres Plateau) (F-Test; $p < 0,05$).

3.2.1.2 Bindung an [³H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Das folgende Kapitel beschreibt die Bindungseigenschaften der Testsubstanz WDuo3 an [³H]NMS-unbesetzten Rezeptoren. Abbildung 3.10 zeigt vergleichend die erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Auswertung der erhaltenen Daten musste mittels der modifizierten Ehlert-Gleichung durchgeführt werden, so dass eine Ermittlung des pK_A -Wertes rechnerisch aus dem Quotienten $EC_{0,5diss}/\alpha$ erfolgte. In diesem Zusammenhang war eine Betrachtung der Kooperativitäten unerlässlich. WDuo3 zeigte sowohl an M₂-Rezeptoren aus Lec1- als auch aus stabil transfizierten CHO-Zellen ein annähernd neutral kooperatives Verhalten mit dem Radioorthoster

[³H]NMS ($p\alpha = 0$). Aus Tabelle 3.10 ist ersichtlich, dass sich der Affinitätswert von WDuo3 an Lec1-M₂-Rezeptoren verglichen mit beiden Wildtyprezeptoren signifikant unterschied. Die Differenz betrug an Rezeptoren aus stabil transfizierten CHO-Zellen 0,2 Dekaden, an Rezeptorproteinen mit transient transfizierten Rezeptoren 1 Dekade. Es konnten nahezu identische Affinitätswerte an freien und besetzten Rezeptorproteinen festgestellt werden. An M₂-Rezeptoren aus transient transfizierten CHO-Zellen (CHOK1-M₂) zeigte die Testsubstanz hingegen eine höhere Affinität zu freien im Vergleich zu besetzten Rezeptorproteinen. Dies spiegelt eine positive Kooperativität wider, die jedoch ausschließlich auf einen Einzelkonzentrationswert zurückzuführen ist (vergleiche Kapitel 3.1.1.2). Vor dem Hintergrund der erläuterten Ergebnisse kann somit an freien und besetzten Rezeptorproteinen mit veränderter N-Glykosylierung kein relevant abweichendes Bindungsverhalten der untersuchten typischen Testsubstanz WDuo3 festgestellt werden.

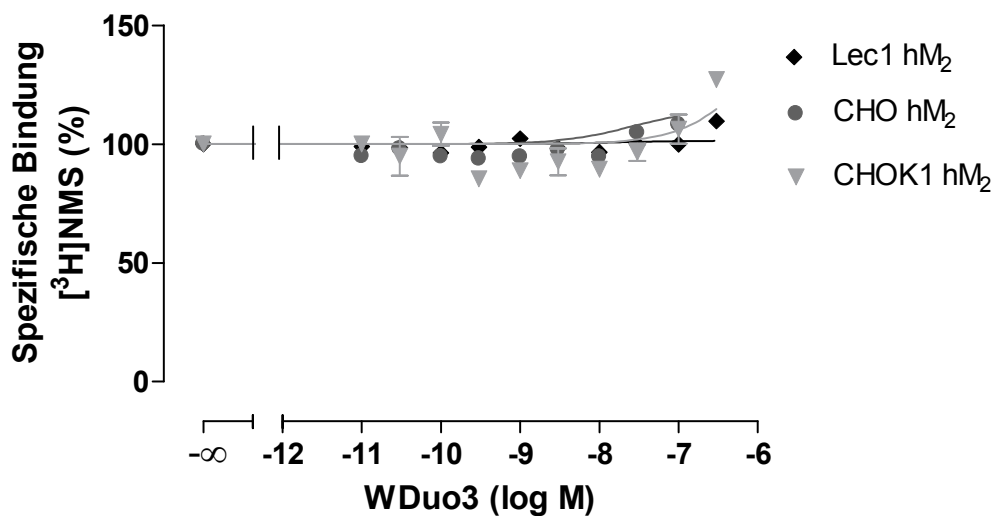


Abbildung 3.10: Einfluss des typischen allosterischen Modulators WDuo3 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS (0,2 nM) an hM₂-Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen. Ordinate: Spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der modifizierten Ehlert-Gleichung mit $K_A = EC_{0,5diss}/\alpha$ (siehe Kapitel 2.4.2.3.1). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Expressions- system	Rezeptor	pK_A	$p\alpha$	$p\alpha + pK_A$	$pEC_{0,5diss}$	n
Lec1 (transient)	hM ₂	$7,78^* \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,03$	-	7,80	4
CHO (stabil)	hM ₂	$7,57^{*s} \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,03$	-	7,68	4
CHOK1 (transient)	hM ₂	$6,77^{*s} \pm 0,04$	$0,46^{\#} \pm 0,04$	-	7,23	4

Tabelle 3.10: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit WDuo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.10). pK_A : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. $p\alpha$: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α . n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. * Auswertung nach der modifizierten Ehlert-Gleichung mit $K_A = EC_{0,5diss}/\alpha$ (siehe Kapitel 2.4.2.3.1). ^s Der pK_A -Wert unterscheidet sich signifikant vom pK_A -Wert an Lec1 hM₂. [#] $p\alpha$ unterscheidet sich signifikant von $p\alpha$ an Lec1 hM₂.

3.2.2 Untersuchungen zur Bindung des atypischen allosterischen Modulators Duo3

3.2.2.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Mit Duo3 erfolgte zunächst die Durchführung von Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit dem Ziel, sowohl die Affinität der allosterischen Testsubstanz zum [³H]NMS-besetzten glykosylierungsdefekten Rezeptor ($pEC_{0,5diss}$) als auch das Maß für die Kurvensteilheit (n_H) zu ermitteln. Abbildung 3.11 veranschaulicht die im Rahmen dieser Versuchsreihe ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven.

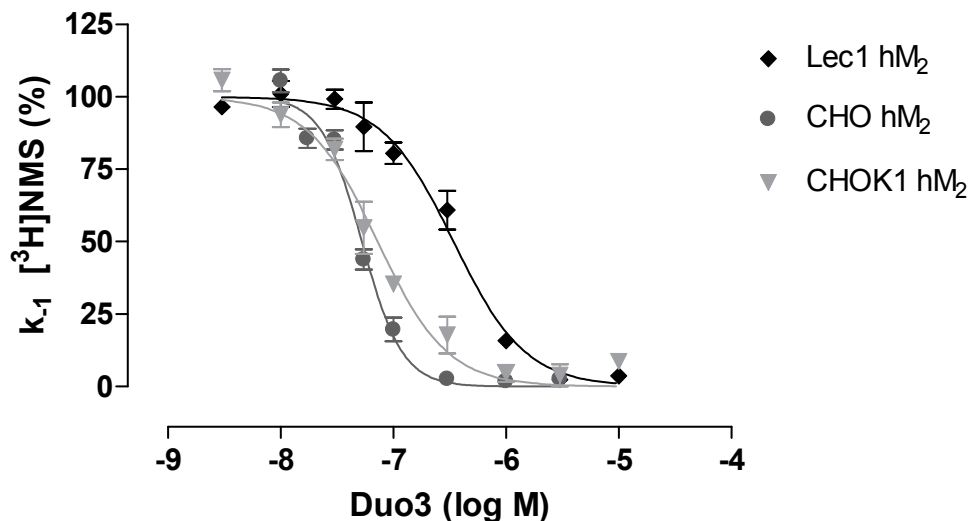


Abbildung 3.11: Interaktion von Duo3 mit hM₂-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k_{-1} (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4-7 unabhängigen Experimenten.

Die aus den Kurvenverläufen resultierenden Kenndaten werden in Tabelle 3.11 vergleichend dargestellt:

Expressionssystem	Rezeptor	pEC _{0,5diss}	n _H	Unteres Plateau [%]	n
Lec1 (transient)	hM ₂	6,46 ± 0,04	-1,37 ^s ± 0,12	-3 ^{ns} ± 6	4
CHO (stabil)	hM ₂	7,24* ± 0,02	-2,14 ^s ± 0,20	2 ^{ns} ± 2	7
CHOK1 (transient)	hM ₂	7,17* ± 0,03	-1,67 ^s ± 0,18	6 ^{ns} ± 4	4

Tabelle 3.11: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten (siehe Abbildung 3.11) mit Duo3 erhaltenen Kenngrößen. pEC_{0,5diss}: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation führt. n_H: Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4-7 unabhängigen Experimenten. * pEC_{0,5diss}-Wert unterscheidet sich signifikant vom pEC_{0,5diss}-Wert an Lec1 hM₂ (t-Test; p < 0,05). ^s n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von 0 (unteres Plateau) (F-Test; p < 0,05).

Die Konzentrations-Effekt-Kurve von Duo3 an Lec1-M₂-Rezeptoren zeigt eine deutliche Rechtsverschiebung verglichen mit den an M₂-Wildtyprezeptoren erhaltenen Kurvenverläufen (siehe Abbildung 3.11). Folglich wird eine signifikante Reduktion der Wirksamkeit von Duo3 an Lec1-M₂-Rezeptoren im Gegensatz zu M₂-Wildtyp-Rezeptoren sowohl aus stabil (0,8 Dekaden) als auch aus transient transfizierten CHO-Zellen (0,7 Dekaden) erkennbar (siehe Tabelle 3.11). Eine nähere Analyse der ermittelten Kurvensteilheiten ergab einen Wert von < -1 für das Steilheitsmaß n_H an jedem der untersuchten Rezeptortypen. Allerdings wies die Kurve an M₂-Rezeptoren aus Lec1-Zellen die am geringsten ausgeprägte Steilheit auf. Gegenüber der an stabil transfizierten CHO-M₂-Rezeptoren ermittelten Kurvensteilheit zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Eine individuelle Anpassung aller Kurvenverläufe ergab keine abweichenden Ergebnisse (pEC_{0,5diss}-Werte: Lec1 hM₂: 6,45 ± 0,03; CHO stabil hM₂: 7,28 ± 0,03; CHOK1 hM₂: 7,19 ± 0,03). Auch bezüglich der Kurvensteilheiten zeigten sich keine differierenden Endresultate.

3.2.2.2 Bindung an [³H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Im weiteren Verlauf wurden die Affinitäten des atypischen Modulators Duo3 zu [³H]NMS-unbesetzten Rezeptoren mit korrekter und verkürzter N-Glykosylierung miteinander verglichen. Zu diesem Zweck erfolgte die Durchführung heterologer Interaktionsexperimente, die eine Bestimmung der Affinität der Testsubstanz zu freien M₂-Rezeptoren und des Kooperativitätsfaktors α erlaubten. Abbildung 3.12 zeigt vergleichend die mit Hilfe der Ehlert-Gleichung (siehe Gleichung 2.10) ermittelten Kurvenverläufe. Tabelle 3.12 listet die zugehörigen Kenndaten auf.

Duo3 bewirkte an freien M₂-Rezeptoren aus Lec1-Zellen sowohl gegenüber stabil als auch transient transfizierten M₂-Wildtyprezeptoren eine signifikante Affinitätsabnahme von 0,3 bzw. 0,4 Dekaden. An allen Rezeptortypen wurde eine negative Kooperativität gefunden, die eine im Vergleich zu freien Rezeptoren erhöhte Affinität zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren widerspiegelt ($p\alpha < 0$). Dieses beobachtete negativ kooperative Verhalten war an M₂-Rezeptoren mit unvollständiger Glykosylierung (Lec1) am deutlichsten ausgeprägt. Eine vergleichende Betrachtung der Parameterwerte für $p(\alpha \times K_A)$ und $pEC_{0,5diss}$ ergab in keinem Fall bedeutenden Abweichungen. Abschließend betrachtet lassen die experimentell ermittelten Befunde den Schluss zu, dass an unvollständig glykosylierten besetzten und freien M₂-Rezeptoren ein relevant verändertes Bindungsverhalten des atypischen allosterischen Modulators Duo3 vorhanden ist.

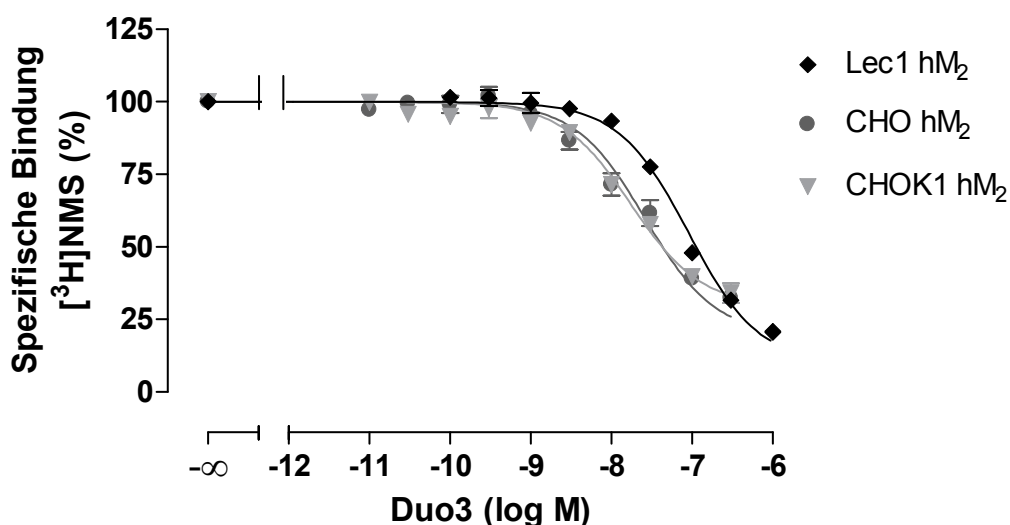


Abbildung 3.12: Einfluss des atypischen allosterischen Modulators Duo3 auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (0,2 nM) an hM_2 -Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen. Ordinate: Spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K, P_i -Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Kooperativitätsmodells (siehe Gleichung 2.10). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Steilheitsmaße der abgebildeten Kurven n_H betragen: $-0,96^{\text{ns}} \pm 0,07$ (Lec1 hM_2), $-0,85^{\text{ns}} \pm 0,13$ (CHO hM_2), $-1,34^{\text{ns}} \pm 0,19$ (CHOK1 hM_2). ^{ns} n_H nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test; $p < 0,05$).

Expressions-system	Rezeptor	pK_A	$\text{p}\alpha$	$\text{p}\alpha + \text{pK}_A$	$\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$	n
Lec1 (transient)	hM_2	$7,46 \pm 0,05$	$-1,43 \pm 0,05$	6,03	6,46	4
CHO (stabil)	hM_2	$7,78^{\text{s}} \pm 0,01$	$-0,91^{\#} \pm 0,07$	6,87	7,24	4
CHOK1 (transient)	hM_2	$8,07^{\text{s}} \pm 0,04$	$-0,84^{\#} \pm 0,06$	7,23	7,17	4

Tabelle 3.12: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit Duo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.12). pK_A : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. $\text{p}\alpha$: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α . n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. ^s Der pK_A -Wert unterscheidet sich signifikant vom pK_A -Wert an Lec1 hM_2 (t-Test; $p < 0,05$). [#] $\text{p}\alpha$ unterscheidet sich signifikant von $\text{p}\alpha$ an Lec1 hM_2 .

3.2.3 Untersuchungen zur Bindung des atypischen allosterischen Modulators Tacrin

3.2.3.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Zunächst wurde das Bindungsverhalten von Tacrin exemplarisch an [³H]NMS-besetzten muskarinischen M₂-Rezeptoren aus transient transfizierten Lec1- und transient transfizierten CHO-Zellen untersucht (siehe Abbildung 3.13). Die aus den Kurvenverläufen resultierenden Kenngrößen zeigt Tabelle 3.13. Die Betrachtung der Affinitätswerte von Tacrin ergab keinen signifikanten Unterschied an verschiedenen glykosylierten [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren. Im Rahmen der Analyse der Kurvensteilheiten wurde ein Steilheitsmaß gefunden, dass in beiden Fällen signifikant verschieden von -1 war. Im Hinblick auf Lec1-M₂-Rezeptoren war die Steilheit ausgeprägter, aber nicht signifikant erhöht.

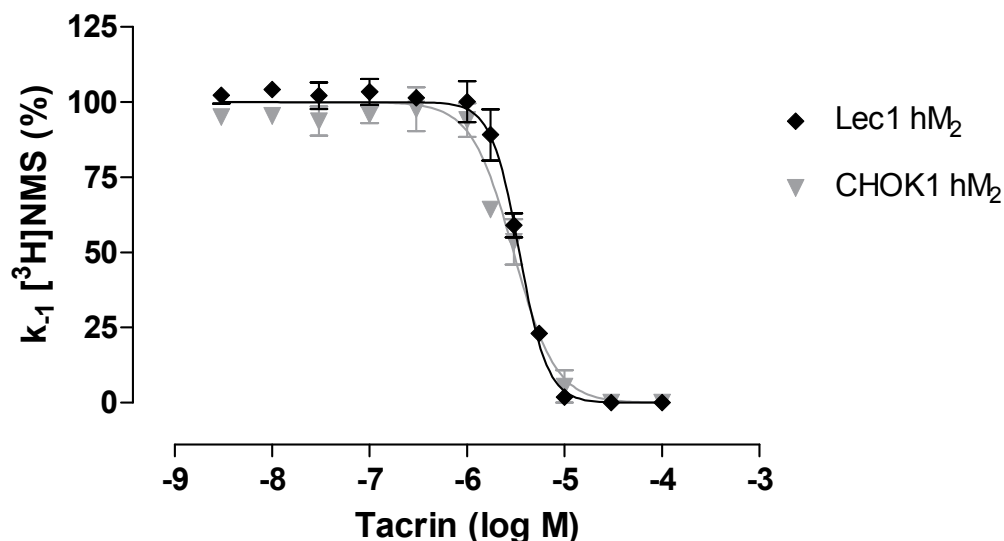


Abbildung 3.13: Interaktion von Tacrin mit hM₂-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k₋₁ (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Expressionssystem	Rezeptor	$pEC_{0,5diss}$	n_H	Unteres Plateau [%]	n
Lec1 (transient)	hM ₂	5,46 ± 0,02	-3,02 ^s ± 0,37	-1 ± 3	4
CHOK1 (transient)	hM ₂	5,52 ± 0,04	-2,03 ^s ± 0,33	-1 ± 5	4

Tabelle 3.13: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten (siehe Abbildung 3.13) mit Tacrin erhaltenen Kenngrößen. $pEC_{0,5diss}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation führt. n_H : Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. ^s n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; $p < 0,05$). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von 0 (unteres Plateau) (F-Test; $p < 0,05$).

3.2.3.2 Bindung an [³H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Aus der vergleichenden Analyse der Kurvenverläufe von Tacrin an [³H]NMS-unbesetzten Rezeptoren mit unveränderten oder verkürzten Glykanketten resultierten die im Folgenden näher erläuterten Befunde. Tabelle 3.14 veranschaulicht die aus den Kurvenverläufen erhaltenen Kenngrößen. Die in Abbildung 3.14 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven deuten auf ein identisches Bindungsverhalten von Tacrin zu freien glykosylierungsdefekten M₂-Rezeptoren und nativen Rezeptorproteinen hin. Ein Vergleich der pK_A -Werte ergab demzufolge keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 3.14). Auch im Hinblick auf den Kooperativitätsfaktor α konnten keine signifikanten Abweichungen gefunden werden. Analog zu Kapitel 3.1.3.2 wurden an beiden Rezeptortypen ausgeprägt negative Kooperativitätswerte ($p\alpha < -2$) mit dem Radioorthoster erhalten. Dieser Befund zeigt ein pseudokompetitives oder kompetitives Verhalten von Tacrin mit dem Radioliganden [³H]NMS an. [³H]NMS wurde dementsprechend sowohl am M₂-Wildtyprezeptor als auch an der N-Glykosylierungsmutante (Lec1) durch die allosterische Testsubstanz Tacrin vollständig aus seiner Gleichgewichtsbindung verdrängt. Auf der Grundlage der in diesem Kapitel experimentell ermittelten Daten lässt die Testsubstanz Tacrin weder an besetzten noch an freien M₂-Rezeptoren ein abweichendes Bindungsverhalten infolge einer veränderten Rezeptorglykosylierung erkennen.

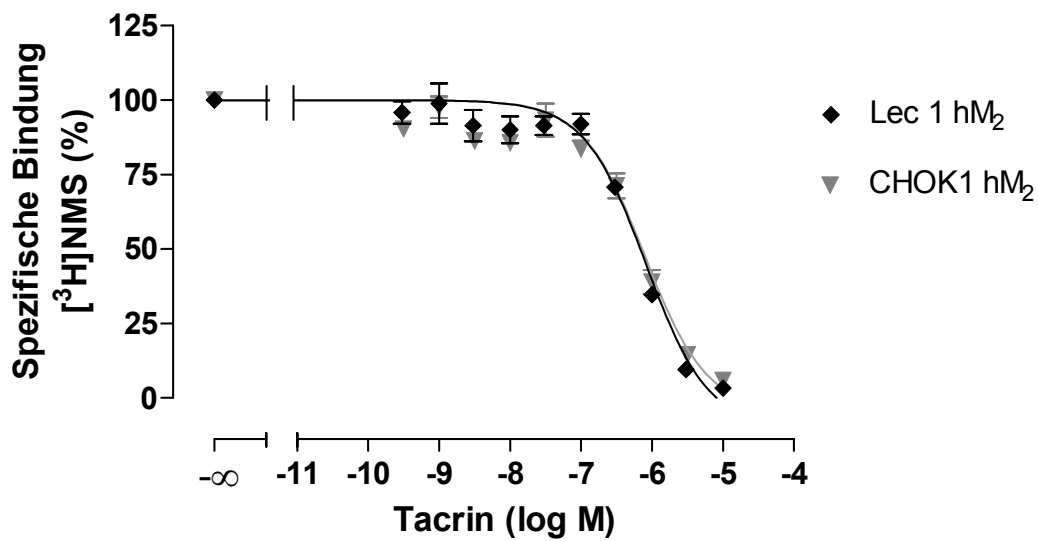


Abbildung 3.14: Einfluss des atypischen allosterischen Modulators Tacrin auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ ($0,2\text{nM}$) an hM_2 -Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen. Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,Pi -Puffer bei 23°C . Ordinate: Spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators ($\log \text{M}$). Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Kooperativitätsmodells (siehe Gleichung 2.10). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Steilheitsmaße der abgebildeten Kurven n_H betragen: $-1,45 \pm 0,19$ (Lec1 hM_2), $-1,26^{\text{ns}} \pm 0,18$ (CHOK1 hM_2). $^{\text{ns}}$ n_H nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test; $p < 0,05$).

Expressions-system	Rezeptor	pK_A	$\text{p}\alpha$	$\text{p}\alpha + \text{pK}_A$	$\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$	n
Lec1 (transient)	hM_2	$6,47 \pm 0,02$	$< -2^*$	-	5,46	4
CHOK1 (transient)	hM_2	$6,45 \pm 0,04$	$< -2^\#$	-	5,52	4

Tabelle 3.14: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit Tacrin erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.13). pK_A : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. $\text{p}\alpha$: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α . n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. * Konkreter Wert: $-15,85 \pm 15,44$. $^\#$ Konkreter Wert: $-21,23 \pm 21,24$.

3.3 Abhängigkeit der Bindung typischer und atypischer allosterischer Modulatoren an humanen M₂-Rezeptoren von einer veränderten Sphingolipidumgebung

Das nachfolgende Kapitel beschreibt die Untersuchung der Bedeutung einer durch Galactosylceramid (CHOGalT-M₂-Rezeptoren) oder Sulfatid (CHOSULF-M₂-Rezeptoren) veränderten Rezeptor-Lipidumgebung im Hinblick auf die Bindungseigenschaften orthosterischer und allosterischer Liganden am muskarinischen M₂-Rezeptor.

Voruntersuchungen: Abhängigkeit der Bindung des orthosterischen Radioliganden [³H]NMS von einer veränderten Lipidumgebung

Dieses Kapitel erläutert zunächst die Bedeutung einer Anreicherung von Galactosylceramid oder Sulfatid in der Lipidmembran bezüglich des Bindungsverhaltens des orthosterischen Antagonisten N-Methylscopolamin (NMS). Anhand homologer Competitionsexperimente wurde die Affinität von NMS zum orthosterischen Haftareal bestimmt (siehe Kapitel 2.4.2.1).

5 mM Na,K,P_i-Puffer (23°C): Zunächst erfolgte die Durchführung homologer Competitionsexperimente in einem artifiziellen 5 mM Na,K,P_i-Puffer (L 15). Die an M₂-Rezeptoren aus Zelllinien mit unterschiedlicher Lipidumgebung erhaltenen Kurvenverläufe sind in Abbildung 3.15 vergleichend dargestellt. In Analogie zu Kapitel 3.2 wurden muskarinische M₂-Wildtyprezeptoren aus transient transfizierten CHO-Zellen (CHOK1-M₂) als Kontrolle eingesetzt, da die verwendeten CHOGalT- und CHOSULF-Zellen ebenfalls transient mit dem hM₂-Rezeptoren transfiziert wurden. Tabelle 3.15 führt die an den verschiedenen Rezeptoren gefundenen Parameter bezüglich ihrer Bindungseigenschaften auf.

Eine vergleichende Analyse der pK_D-Werte ergab keine bedeutsamen Unterschiede im Hinblick auf M₂-Rezeptoren mit veränderter Lipidumgebung. Bezüglich der Geschwindigkeitsdissoziationskonstanten von [³H]NMS konnte zudem kein signifikanter Unterschied verzeichnet werden. Dies erlaubt den Schluss, dass die

Bindungseigenschaften des orthosterischen Liganden NMS durch eine modifizierte Membranlipidumgebung nicht beeinflusst werden.

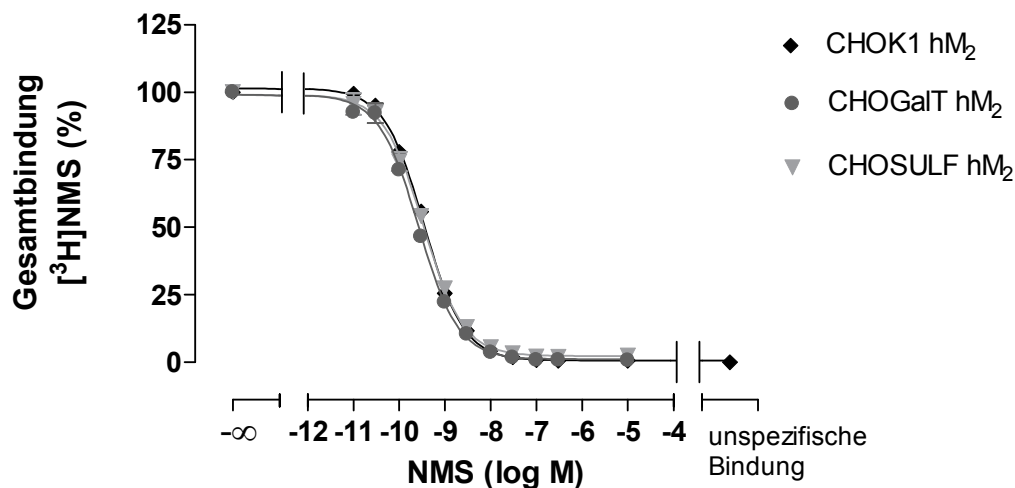


Abbildung 3.15: Homologes Konkurrenzexperiment mit steigenden Konzentrationen NMS in Anwesenheit des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (0,2 nM) an hM_2 -Rezeptoren aus verschiedenen Expressionssystemen. Ordinate: Gesamtbindung des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (in % bezogen auf den Kontrollwert). Abszisse: Steigende Konzentrationen NMS (log M). Die Durchführung erfolgte in 5 mM Na,K, P_i -Puffer bei 23°C. Die ungesättigte Bindung wurde in Anwesenheit von 3 μM Atropin bestimmt. Es wurden jeweils zwei Versuche in Doppelbestimmung durchgeführt. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler. Der Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ an die Werte angepasst (nichtlineare Regressionsanalyse; Gleichung 2.6 (siehe Kapitel 2.4.2.1.1)).

Expressionssystem	Rezeptor	pK_D	B_{max} [fmol/mg]	k_{-1} [min^{-1}]	$t_{1/2\text{diss}}$ [min]
CHOK1	hM_2	9,99 (9,92; 10,07)	712 (723; 700)	$0,082 \pm 0,003$ n = 20	8,76
CHOGaIT	hM_2	10,19 (10,12; 10,26)	758 (734; 781)	$0,071 \pm 0,005$ n = 8	10,14
CHOSULF	hM_2	$9,91 \pm 0,10$ n = 4	369 ± 26	$0,077 \pm 0,004$ n = 9	9,47

Tabelle 3.15: Auflistung der aus homologen Konkurrenzexperimenten erhaltenen Parameterwerte der NMS-Bindung an hM_2 -Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen. pK_D : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante. B_{max} : Dichte der Bindungsstellen. k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation. $t_{1/2}$: Dissoziationshalbwertszeit. Angeführt sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler und die Anzahl der Experimente (n). Bei der Durchführung je zweier Versuche in Doppelbestimmung werden sowohl die beiden Einzelwerte der Versuche als auch der resultierende Mittelwert genannt.

10 mM HEPES-Puffer (30°C): Zur Validierung der im vorangegangenen Abschnitt gefundenen Ergebnisse wurde ein weiteres Puffersystem zur Durchführung [^3H]NMS/NMS-Kompetitionsexperimente herangezogen. Der verwendete 10 mM HEPES-Puffer (L 23) ist durch eine höhere, annähernd physiologische Ionenstärke gekennzeichnet. Die aus der Versuchsreihe resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven zeigt Abbildung 3.16. Tabelle 3.16 stellt die aus den Kurvenverläufen erhaltenen Parameter zusammenfassend dar.

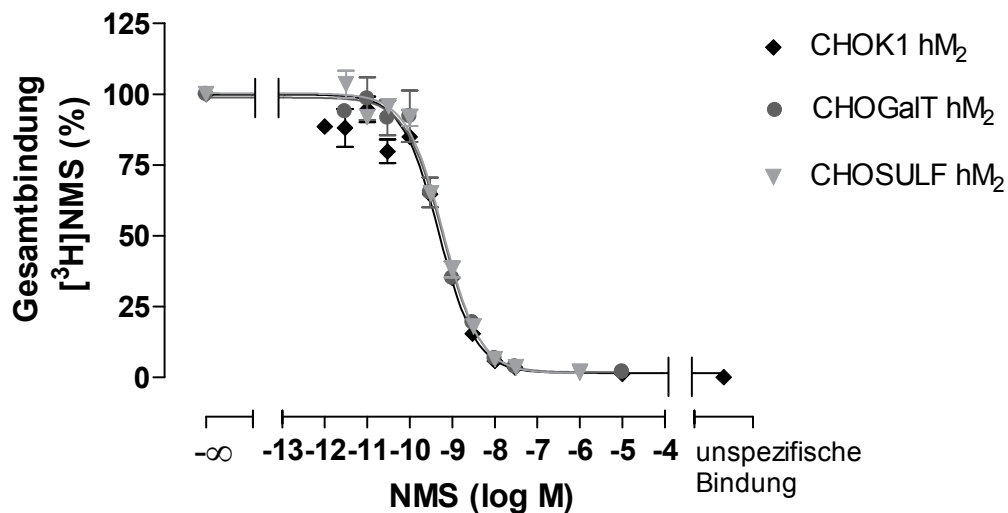


Abbildung 3.16: Homologes Konkurrenzexperiment mit steigenden Konzentrationen NMS in Anwesenheit des Radioliganden [^3H]NMS (0,2 nM) an hM_2 -Rezeptoren aus verschiedenen Expressionssystemen. Ordinate: Gesamtbindung des Radioliganden [^3H]NMS (in % bezogen auf dem Kontrollwert). Abszisse: Steigende Konzentrationen NMS (log M). Die Durchführung erfolgte in 10 mM HEPES-Puffer bei 30°C. Die ungesättigte Bindung wurde in Anwesenheit von 3 μM Atropin bestimmt. Es wurden jeweils zwei Versuche in Doppelbestimmung durchgeführt. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler. Der Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ an die Werte angepasst (nichtlineare Regressionsanalyse; Gleichung 2.6 (siehe Kapitel 2.4.2.1.1)).

Bedingt durch die gewählte HEPES-Pufferumgebung ergab sich eine signifikant niedrigere Affinität von NMS an den M_2 -Rezeptoren gegenüber Affinitätswerten, die im Na,K, P_i -Puffer gefunden wurden (siehe oben). Dieser Effekt wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben und wird auf die Anwesenheit von Magnesiumionen zurückgeführt (Pedder et al., 1991; Strassmann, 2007). Überdies war die Dissoziationshalbwertszeit des Liganden in diesem Puffersystem gegenüber dem Na,K, P_i -Puffer stark vermindert. Eine vergleichende Betrachtung der pK_D -Werte unter Verwendung des HEPES-Puffersystems ließ keine signifikanten Abweichungen

erkennen. Dementsprechend konnte auch im Hinblick auf dieses „physiologischere“ Puffersystem keine Abhängigkeit der Bindung des orthosterischen Liganden NMS von einer veränderten Lipidumgebung der Rezeptoren gefunden werden. Die experimentell ermittelten Daten zeigen somit für beide Puffersysteme, dass weder durch Anreicherung von Galactosylceramid noch von Sulfatid in der Membran ein Einfluss auf die Bindung von NMS festgestellt werden kann.

Expressionssystem	Rezeptor	pK_D	B_{max} [fmol/mg]	k_{-1} [min ⁻¹]	$t_{1/2diss}$ [min]
CHOK1	hM ₂	9,40 (9,41; 9,39)	1859 (1775; 1943)	0,313 ± 0,01 n = 8	2,24
CHOGaIT	hM ₂	9,43 (9,40; 9,46)	749 (720; 778)	0,299 ± 0,01 n = 9	2,36
CHOSULF	hM ₂	9,44 (9,44; 9,43)	1113 (1067; 1159)	0,283 ± 0,01 n = 9	2,48

Tabelle 3.16: Auflistung der aus homologen Konkurrenzexperimenten erhaltenen Parameterwerte der NMS-Bindung an hM₂-Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen. pK_D : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante. B_{max} : Dichte der Bindungsstellen. k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation. $t_{1/2}$: Dissoziationshalbwertszeit. Angeführt sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler und die Anzahl der Experimente (n). Bei der Durchführung je zweier Versuche in Doppelbestimmung werden sowohl die beiden Einzelwerte der Versuche als auch der resultierende Mittelwert genannt.

3.3.1 Abhängigkeit der Bindung des typischen allosterischen Modulators WDuo3 von einer veränderten Sphingolipidumgebung

3.3.1.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Im Rahmen dieser Versuchsreihe erfolgte die Durchführung von Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten (siehe Kapitel 2.4.3) mit dem Ziel, die Affinität der Testsubstanz WDuo3 zu [³H]NMS-besetzten M₂-Rezeptoren mit modifizierter Lipidmembranumgebung zu ermitteln.

5 mM Na,K,P_i-Puffer (23°C): Im folgenden Abschnitt werden die erhaltenen Befunde aus Dissoziationsbindungsexperimenten mit WDuo3 in einem 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C erläutert. Den Einfluss der Membranumgebung auf die Bindung von WDuo3 an besetzten muskarinischen M₂-Rezeptoren veranschaulicht Abbildung 3.17. Die resultierenden Kenngrößen dieser Versuchsreihe werden in Tabelle 3.17 zusammenfassend dargestellt.

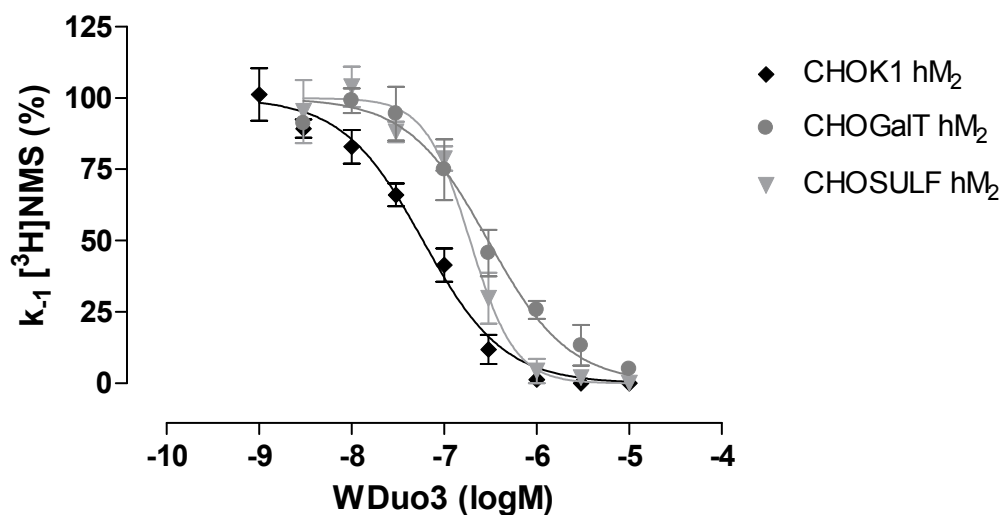


Abbildung 3.17: Interaktion von WDuo3 mit hM₂-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k₋₁ (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 6 unabhängigen Experimenten.

Expressionssystem	Rezeptor	pEC _{0,5diss}	n _H	Unteres Plateau [%]	n
CHOK1	hM ₂	7,23 ± 0,04	-1,01 ^{ns} ± 0,10	-3 ^{ns} ± 3	6
CHOGaIT	hM ₂	6,52* ± 0,04	-0,94 ^{ns} ± 0,15	7 ^{ns} ± 7	6
CHOSULF	hM ₂	6,72* ± 0,05	-1,80 ^s ± 0,31	0 ^{ns} ± 4	6

Tabelle 3.17: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit WDuo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.17). pEC_{0,5diss}: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation führt. n_H: Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 6 unabhängigen Experimenten. * pEC_{0,5diss}-Wert unterscheidet sich signifikant vom pEC_{0,5diss}-Wert an CHOK1 hM₂ (t-Test; p < 0,05). ^s n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von -1 (n_H) bzw. 0 (unteres Plateau) (F-Test; p < 0,05).

Der Vergleich der pEC_{0,5diss}-Werte ergab für WDuo3 sowohl an Rezeptoren aus CHOGaIT- als auch aus CHOSULF-Zellen einen signifikanten Wirksamkeitsverlust verglichen mit CHOK1-M₂-Rezeptoren (siehe Tabelle 3.17). Eine Anreicherung der Membranumgebung mit Galactosylceramid (CHOGaIT-Zellen) als auch mit Sulfatid (CHOSULF-Zellen) war demzufolge assoziiert mit einer verminderten Affinität von WDuo3 an M₂-Rezeptoren. Die Analyse der Kurvensteilheiten zeigte, dass an CHOSULF-M₂-Rezeptoren eine signifikant erhöhte Kurvensteilheit resultierte (n_H < -1). Sowohl an CHOGaIT-M₂-Rezeptoren als auch an CHOK1-M₂-Rezeptoren ergaben sich hingegen normal steile Konzentrations-Effekt-Kurven (n_H = -1). Dieser Befund bestätigt den Hinweis auf ein verändertes Bindungsverhalten von WDuo3 an M₂-Rezeptoren mit einer sulfatierten Membranumgebung. Die Art der Bindung des typischen allosterischen Modulators zeigte an diesen Rezeptoren bezüglich der Kurvensteilheit ein atypisches Verhalten.

10 mM HEPES-Puffer (30°C): Abbildung 3.18 zeigt im HEPES-Puffer erhaltene Konzentrations-Effekt-Kurven aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit der Testsubstanz WDuo3.

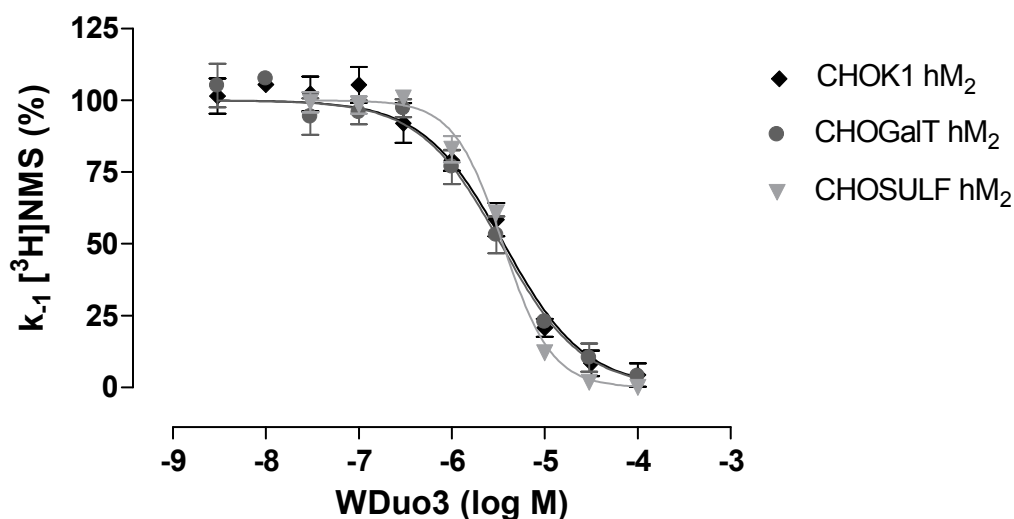


Abbildung 3.18: Interaktion von WDuo3 mit hM₂-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k_{-1} (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 10 mM HEPES-Puffer bei 30°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Tabelle 3.18 veranschaulicht die aus den Kurvenverläufen ermittelten Kenngrößen.

Expressionssystem	Rezeptor	$pEC_{0,5diss}$	n_H	n
CHOK1	hM ₂	$5,44 \pm 0,05$	$-1,18 \pm 0,14$	4
CHOGaIT	hM ₂	$5,47 \pm 0,05$	$-1,07 \pm 0,12$	4
CHOSULF	hM ₂	$5,46 \pm 0,05$	$-1,65^s \pm 0,14$	4

Tabelle 3.18: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit WDuo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.18). $pEC_{0,5diss}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation führt. n_H : Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. * $pEC_{0,5diss}$ -Wert unterscheidet sich signifikant vom $pEC_{0,5diss}$ -Wert an CHOK1 hM₂ (t-Test; $p < 0,05$). ^s n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; $p < 0,05$).

Der Vergleich von $pEC_{0,5diss}$ -Werten ergab keine signifikanten Abweichungen bezüglich der Untersuchung von Rezeptoren mit modifizierter Membranumgebung.

Eine Analyse der Kurvensteilheiten bestätigte hingegen die im artifiziellen Na,K,P_i-Puffer gefundenen Ergebnisse. An CHOSULF-M₂ Rezeptoren ergab sich mit der Testsubstanz im Gegensatz zu CHOGaIT- und CHOK1-M₂-Rezeptoren eine steile Konzentrations-Effekt-Kurve ($n_H < -1$). Die sowohl im Na,K,P_i-Puffer als auch im HEPES-Puffer erhobenen Daten erlauben den Schluss, dass die Bindungseigenschaften von WDuo3 an besetzten Rezeptoren durch Sulfatidanreicherung in der Membran einer Veränderung unterliegen.

3.3.1.2 Bindung an [³H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Im weiteren Verlauf soll die Bedeutung einer veränderten Rezeptor-Lipidumgebung auf die Bindung der Testsubstanz WDuo3 an nicht orthosterisch mit [³H]NMS besetzten Rezeptoren untersucht werden. Um dies zu ermöglichen, wurden heterologe Interaktionsexperimente durchgeführt, aus denen die Affinitäten der Testsubstanz zu freien M₂-Rezeptoren und gleichzeitig die Kooperativitäten (α) mit dem Radioorthoster [³H]NMS hervorgehen.

5 mM Na,K,P_i-Puffer (23°C): In Analogie zu Kapitel 3.3.1.1 werden zunächst die Befunde vergleichend betrachtet, die im artifiziellen 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C erhalten wurden. Abbildung 3.19 veranschaulicht die ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven. Tabelle 3.19 zeigt die experimentell ermittelten Kenndaten.

Es wird deutlich, dass WDuo3 an M₂-Rezeptoren aus CHOK1- und CHOGaIT-Zellen ein geringfügig ausgeprägtes positiv kooperatives Verhalten mit [³H]NMS aufwies. Im Vergleich dazu lag an M₂-Rezeptoren mit sulfatierter Membranumgebung eine ausgeprägte positive Kooperativität vor ($p\alpha > 0$). Die Betrachtung der Kurvenverläufe an M₂-Rezeptoren mit sulfatierter Membranumgebung ergab somit für WDuo3 eine deutlich höhere Affinität zu besetzten als zu freien Rezeptorproteinen. Diese Förderung der [³H]NMS-Bindung unterschied sich signifikant von den geringfügig ausgeprägten positiven Kooperativitäten an CHOK1- und CHOGaIT-M₂-Rezeptoren. Es ist anzumerken, dass für CHOK1- und CHOGaIT-M₂-Rezeptoren experimentell bedingt keine höheren Konzentrationen eingesetzt werden konnten, so dass die gefundene positive Kooperativität lediglich auf einem erhobenen Konzentrationswert beruht. Da die fraktionelle Rezeptorbesetzung in Bezug auf CHOSULF-M₂ unter Kontrollbedingungen 69% betrug, ergab sich für das obere Plateau der

Konzentrations-Effekt-Kurve von WDuo3 an CHO-SULF-M₂ eine 100%ige und somit vollständige Rezeptorbesetzung. Der nach dem Kooperativitätsmodell berechnete Schätzwert $\rho\alpha + pK_A$ für die Affinität des Modulators zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren mit sulfatierter Membranumgebung wich stark von dem in Dissoziationsexperimenten direkt bestimmten Wert ab. Die experimentell ermittelten Daten zeigen dennoch eine deutliche Beeinflussung des Bindungsverhaltens von WDuo3 an unbesetzten M₂-Rezeptoren, die durch Anwesenheit von Sulfatid in der Membran gekennzeichnet sind, an.

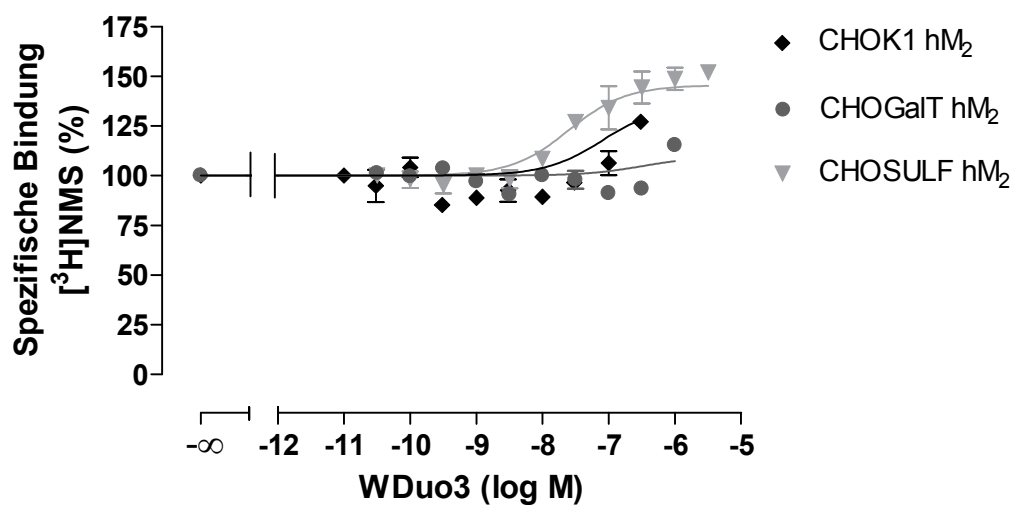


Abbildung 3.19: Einfluss des typischen allosterischen Modulators WDuo3 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS (0,2 nM) an hM₂-Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen. Ordinate: Spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der modifizierten Ehlert-Gleichung mit $K_A = EC_{0,5diss}/\alpha$ (siehe Kapitel 2.4.2.3.1). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4-5 unabhängigen Experimenten. Das Steilheitsmaß der abgebildeten Kurven n_H beträgt: $-1,05^{ns} \pm 0,41$ (CHOSULF hM₂).^{ns} n_H nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test; $p < 0,05$).

Expressions-system	Rezeptor	pK _A	pα	pα + pK _A	pEC _{0,5diss}	n
CHOK1	hM ₂	6,77* ± 0,05	0,46 ± 0,05	-	7,23	4
CHOGaIT	hM ₂	6,19 ^s ± 0,12	0,33 ± 0,12	-	6,52	4
CHOSULF	hM ₂	4,77 ^s ± 0,08	2,88 [#] ± 0,05	7,65	6,72	5

Tabelle 3.19: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit WDuo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.19). pK_A: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. pα: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4-5 unabhängigen Experimenten. *Auswertung nach der modifizierten Ehlert-Gleichung mit $K_A = EC_{0,5diss}/\alpha$ (siehe Kapitel 2.4.2.3.1). ^sDer pK_A-Wert unterscheidet sich signifikant vom pK_A-Wert an CHOK1 hM₂ (t-Test; p < 0,05). [#]pα unterscheidet sich signifikant von pα an CHOK1 hM₂.

10 mM HEPES-Puffer (30°C): Im folgende Abschnitt soll überprüft werden, ob die Befunde, die in einem artifizialen Puffermilieu erhalten wurden, auf ein nahezu physiologisches Puffermilieu übertragen werden können. Diesbezüglich wurden allosterische Interaktionsexperimente mit WDuo3 im oben angegebenen HEPES-Puffersystem durchgeführt. Tabelle 3.20 repräsentiert die aus den Kurvenverläufen ermittelten Kenngrößen. Die in Abbildung 3.20 gezeigten Konzentrations-Effekt-Kurven sind im HEPES-Puffersystem nahezu deckungsgleich. Hinsichtlich der pK_A-Werte ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die gefundenen Affinitätswerte von WDuo3 an M₂-Wildtyprezeptoren und an Rezeptoren mit veränderter Lipidumgebung waren entsprechend identisch. Aus der Analyse der Kooperativitätsfaktoren ergab sich bezüglich WDuo3 an allen herangezogenen Rezeptortypen ein geringfügig ausgeprägtes negativ kooperatives Verhalten mit [³H]NMS (pα < 0). Die vorliegenden Daten erlauben den Schluss, dass im HEPES-Puffer keine Änderung der Bindungseigenschaften von WDuo3 an CHOSULF-M₂-Rezeptoren vorlag. Im Gegensatz dazu konnte im artifizialen Na,K,P_i-Puffer sowohl an freien als auch an besetzten M₂-Rezeptoren mit sulfatierter Membranumgebung eine Änderung des Bindungsverhaltens von WDuo3 beobachtet werden.

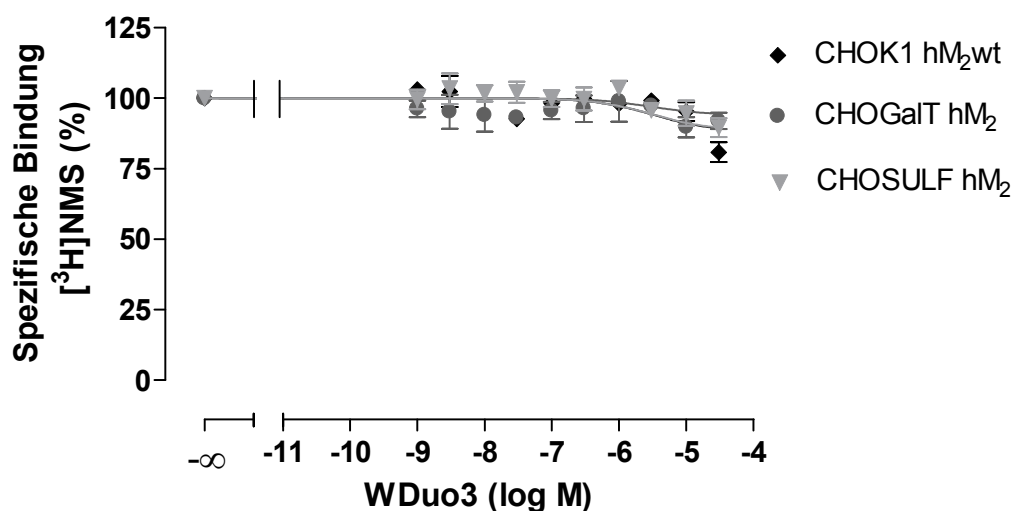


Abbildung 3.20: Einfluss des typischen allosterischen Modulators WDuo3 auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (0,2 nM) an hM_2 -Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen. Ordinate: Spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 10 mM HEPES-Puffer bei 30°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der modifizierten Ehlert-Gleichung mit $K_A = \text{EC}_{0,5\text{diss}}/\alpha$ (siehe Kapitel 2.4.2.3.1). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4-5 unabhängigen Experimenten.

Expressions-system	Rezeptor	pK_A	$\text{p}\alpha$	$\text{p}\alpha + \text{pK}_A$	$\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$	n
CHOK1	hM_2	$5,48^* \pm 0,01$	$-0,04 \pm 0,01$	-	5,44	4
CHOGaIT	hM_2	$5,52^* \pm 0,01$	$-0,05 \pm 0,01$	-	5,47	4
CHOSULF	hM_2	$5,54^* \pm 0,01$	$-0,08 \pm 0,01$	-	5,46	4

Tabelle 3.20: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit WDuo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.20). pK_A : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. $\text{p}\alpha$: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α . n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Auswertung nach der modifizierten Ehlert-Gleichung mit $K_A = \text{EC}_{0,5\text{diss}}/\alpha$ (siehe Kapitel 2.4.2.3.1).

3.3.2 Abhängigkeit der Bindung des typischen allosterischen Modulators W84 von einer veränderten Sphingolipidumgebung

3.3.2.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Im Rahmen dieses Themenkomplexes wurde der allosterische Prototyp-Modulator W84 untersucht, um zu überprüfen, ob die Befunde aus Kapitel 3.3.1.1 auf weitere typische Testsubstanzen übertragbar sind. Diese Resultate hatten für WDuo3 in beiden herangezogenen Puffersystemen an CHOSULF-M₂-Rezeptoren eine hohe Kurvensteilheit ergeben. Eine exemplarische Untersuchung von W84 erfolgte in diesem Zusammenhang an CHOK1-M₂-Rezeptoren (Kontrolle) und CHOSULF-M₂-Rezeptoren im HEPES-Puffersystem mit annähernd physiologischer Ionenstärke. Abbildung 3.21 zeigt die aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten resultierenden Kurvenverläufe.

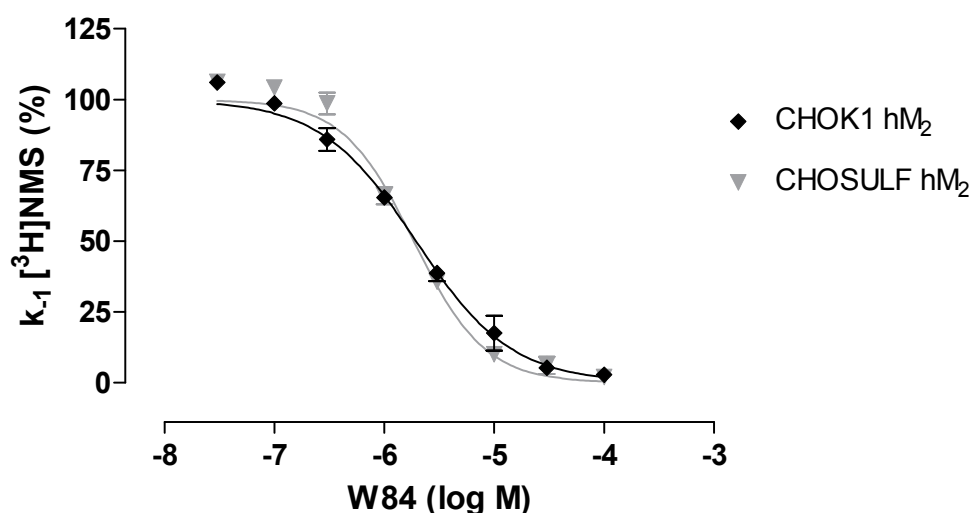


Abbildung 3.21: Interaktion von WDuo3 mit hM₂-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k₋₁ (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 10 mM HEPES-Puffer bei 30°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Tabelle 3.21 veranschaulicht die Kenngrößen der durchgeführten Experimente.

Expressionssystem	Rezeptor	pEC _{0,5diss}	n _H	Unteres Plateau [%]	n
CHOK1	hM ₂	5,71 ± 0,04	-1,02 ^{ns} ± 0,08	-2 ^{ns} ± 4	4
CHOSULF	hM ₂	5,73 ± 0,03	-1,34 ^s ± 0,12	2 ^{ns} ± 2	4

Tabelle 3.21: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit W84 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.21). pEC_{0,5diss}: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation führt. n_H: Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. ^s n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von -1 (n_H) bzw. 0 (unteres Plateau) (F-Test; p < 0,05).

Die pEC_{0,5diss}-Werte von W84 an CHOK1- und CHOSULF-M₂-Rezeptoren unterschieden sich nicht signifikant. Dieses Resultat entspricht den für WDuo3 ermittelten Daten im HEPES-Puffer. Aus der Analyse der Kurvensteilheiten resultierte für W84 an CHOK1-M₂-Rezeptoren eine normal steile Konzentrations-Effekt-Kurve. Das Steilheitsmaß der Kurve an M₂-Rezeptoren mit sulfatierter Membrenumgebung wich hingegen signifikant von -1 ab. Die erhobenen Daten erlauben den Schluss, dass auch W84 atypische Eigenschaften in Bezug auf die Kurvensteilheit annimmt. Die im Rahmen dieses Kapitels erhaltenen Befunde bestätigen, dass es zu einer Änderung des Bindungsverhaltens von typischen allosterischen Modulatoren durch die Anwesenheit von Sulfatid in der Membrenumgebung kommt. Die durch eine individuelle Kurvenanpassung gefundenen Ergebnisse wichen nicht von den hier gezeigten Resultaten ab.

3.3.3 Abhängigkeit der Bindung des atypischen allosterischen Modulators Duo3 von einer veränderten Sphingolipidumgebung

3.3.3.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Die Durchführung der Versuche an orthosterisch besetzten Rezeptoren erfolgte in Analogie zu Kapitel 3.3.1.1.

5 mM Na,K,P_i-Puffer (23°C): Abbildung 3.22 verdeutlicht die in diesem Puffermilieu erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven.

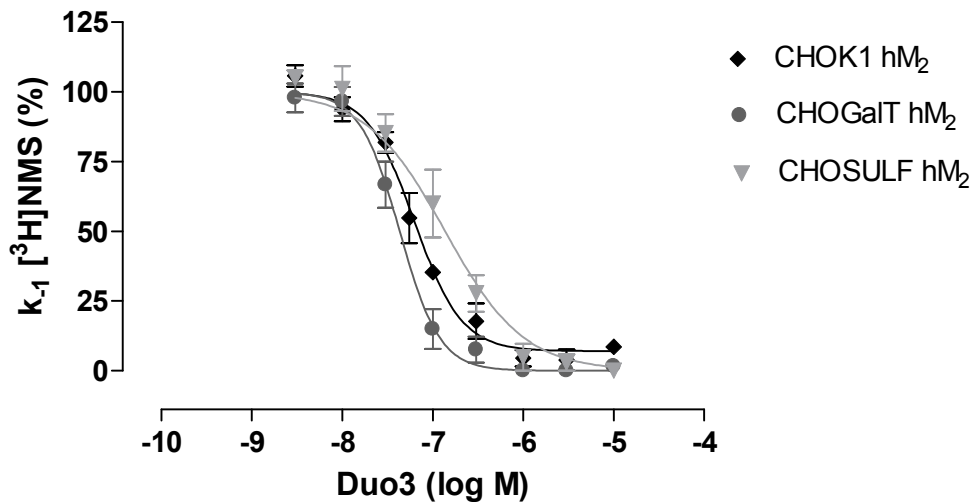


Abbildung 3.22: Interaktion von Duo3 mit hM₂-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k₋₁ (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten.

Tabelle 3.22 veranschaulicht, dass die an CHOGaIT- und CHOSULF-M₂-Rezeptoren erhaltenen pEC_{0,5diss}-Werte signifikant gegenüber demjenigen an M₂-Wildtyprezeptoren abwichen. Es zeigte sich eine verstärkte Wirksamkeit von Duo3 an M₂-Rezeptoren aus CHOGaIT-Zellen. Im Hinblick auf die geringfügig ausgeprägten Unterschiede der ermittelten Werte ist die biologische Relevanz dieses Effektes fraglich. An Rezeptoren mit sulfatierter Membranumgebung (CHOSULF)

konnte eine gegenüber CHOK1-M₂-Rezeptoren signifikant verminderte Affinität gefunden werden. Nach Analyse der Kurvensteilheiten zeigte sich, dass es an M₂-Rezeptoren aus CHOSULF-Zellen zu einer zusätzlichen Veränderung der Bindungseigenschaften der Testsubstanz kam. Während Duo3 an M₂-Rezeptoren aus CHOK1- und CHOGaIT-Zellen ein einheitliches Verhalten mit steilen Konzentrations-Effekt-Kurven ($n_H < -1$) zeigte, konnte an CHOSULF-M₂-Rezeptoren ein Steilheitsmaß ermittelt werden, das nicht signifikant verschieden von -1 war. Aus den erhobenen Daten kann der Schluss gezogen werden, dass in einem artifiziellen Puffersystem die Anwesenheit von Sulfatid in der Membran Einfluss auf die Bindung und den Bindungsmodus von Duo3 nimmt. Die durch eine individuelle Kurvenanpassung gefundenen Ergebnisse wichen nicht von den hier gezeigten Resultaten ab.

Expressionssystem	Rezeptor	pEC _{0,5diss}	n _H	Unteres Plateau [%]	n
CHOK1	hM ₂	7,20 ± 0,04	-1,67 ^s ± 0,25	7 ± 4	4
CHOGaIT	hM ₂	7,36* ± 0,04	-1,97 ^s ± 0,28	2 ^{ns} ± 3	4
CHOSULF	hM ₂	6,86* ± 0,07	-1,31 ^{ns} ± 0,21	-2 ^{ns} ± 6	3

Tabelle 3.22: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit Duo3 erhaltenen Kenngrößen. pEC_{0,5diss}: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation führt. n_H: Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten. * pEC_{0,5diss}-Wert unterscheidet sich signifikant vom pEC_{0,5diss}-Wert an CHOK1 hM₂ (t-Test; p < 0,05). ^s n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von -1 (n_H) bzw. 0 (unteres Plateau) (F-Test; p < 0,05).

10 mM HEPES (30°C): Abbildung 3.23 zeigt vergleichend die im „physiologischeren“ HEPES-Puffersystem erhaltenen Kurvenverläufe. Die zugehörigen Kenngrößen veranschaulicht Tabelle 3.23.

Der Vergleich der pEC_{0,5diss}-Werte von Duo3 zeigte keine signifikante Änderung der Affinität an CHOGaIT-M₂-Rezeptoren verglichen mit Wildtyprezeptoren. An CHOSULF-M₂-Rezeptoren ergab sich hingegen ein leichter, aber statistisch

signifikanter Affinitätsverlust für die atypische Testsubstanz. Aus dem Vergleich der Kurvensteilheiten resultierten sowohl an CHOK1-M₂-Rezeptoren als auch an CHOGalT-M₂-Rezeptoren steile Kurven ($n_H < -1$). Demgegenüber wurde für Duo3 an CHOSULF-M₂-Rezeptoren ein Steilheitsmaß erhalten, das nicht signifikant verschieden von -1 war. Eine individuelle Kurvenanpassung ergab in diesem Fall hingegen ein Steilheitsmaß, das sich geringfügig, aber dennoch signifikant von -1 unterschied ($n_H = -1,31 \pm 0,11$; $p = 0,06$). Der Affinitätsverlust der Testsubstanz an CHOSULF-M₂-Rezeptoren konnte jedoch auch unter Anwendung der alternativen Auswertungsmethode gefunden werden ($pEC_{0,5diss}$: CHOK1-M₂: $6,18 \pm 0,04$; CHOSULF-M₂: $6,04 \pm 0,02$). Abschließend betrachtet konnte eine Beeinflussung der Bindungseigenschaften von Duo3 durch Anreicherung von Sulfatid in der Lipidumgebung sowohl in einem artifiziellen als auch in einem Puffersystem mit nahezu physiologischer Ionenstärke festgestellt werden.

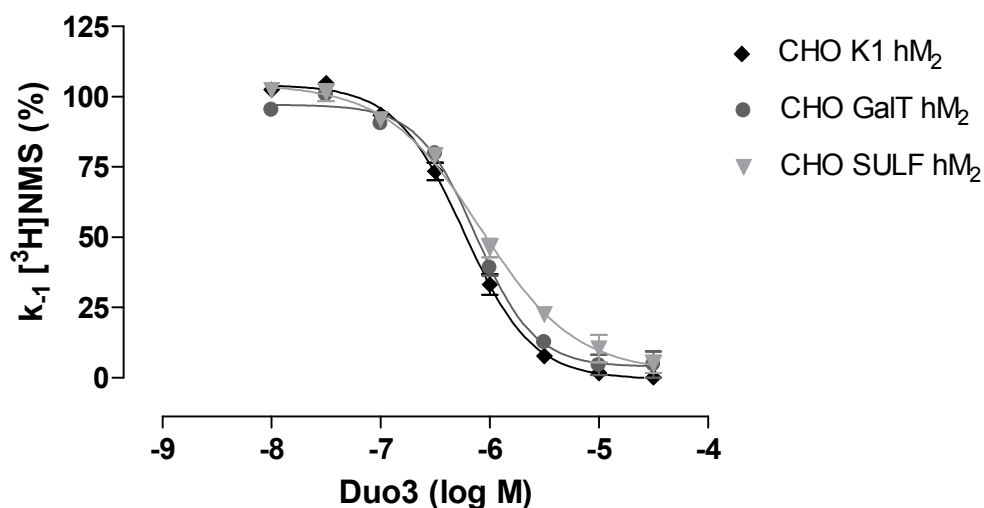


Abbildung 3.23: Interaktion von Duo3 mit hM₂-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k_{-1} (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 10 mM HEPES-Puffer bei 30°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Expressionssystem	Rezeptor	pEC _{0,5diss}	n _H	Unteres Plateau [%]	n
CHOK1	hM ₂	6,20 ± 0,02	-1,54 ^s ± 0,10	-1 ^{ns} ± 2	4
CHOGaIT	hM ₂	6,12 ± 0,03	-1,37 ^s ± 0,10	4 ^{ns} ± 2	4
CHOSULF	hM ₂	6,01* ± 0,03	-1,11 ^{ns} ± 0,08	4 ^{ns} ± 3	4

Tabelle 3.23: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit Duo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.23). pEC_{0,5diss}: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation führt. n_H: Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. * pEC_{0,5diss}-Wert unterscheidet sich signifikant vom pEC_{0,5diss}-Wert an CHOK1 hM₂ (t-Test; p < 0,05). ^s n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von -1 (n_H) bzw. 0 (unteres Plateau) (F-Test; p < 0,05).

3.3.3.2 Bindung an [³H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Im weiteren Verlauf wurden mit der atypischen Testsubstanz Duo3 allosterische Interaktionsexperimente durchgeführt.

5 mM Na,K,P_i-Puffer (23°C): Abbildung 3.24 zeigt die aus den Experimenten erhaltenen Kurvenverläufe. In Tabelle 3.24 sind die entsprechenden Kurvenparameter aufgelistet.

Die vergleichende Betrachtung der Parameter zeigt für alle untersuchten Rezeptortypen eine Erhöhung der Affinitätswerte an freien Rezeptoren (pK_A) im Vergleich zu [³H]NMS-besetzten Rezeptorproteinen (pEC_{0,5diss}). Dieses Ergebnis spiegelt eine negative Kooperativität von Duo3 mit dem Radioorthoster [³H]NMS wider. Das größte Ausmaß des negativ kooperativen Verhaltens zeigte sich an Rezeptoren mit sulfatierter Membrenumgebung. Eine vergleichende Betrachtung der pK_A-Werte ergab, dass die Affinität von Duo3 an unbesetzten CHOGaIT-M₂-Rezeptoren nicht signifikant verschieden im Vergleich zu M₂-Wildtyprezeptoren war. Dieser Effekt kann mit dem relativ hohen Standardfehler zusammenhängen. Die erhöhte Affinität von Duo3 an freien CHOSULF-M₂-Rezeptoren gegenüber CHOK1-M₂-Rezeptoren war hingegen statistisch signifikant. Diese Daten sprachen für eine

geringe, aber dennoch signifikante Änderung des Bindungsverhaltens von Duo3 an freien Rezeptoren durch eine sulfatierte Membrumgebung.

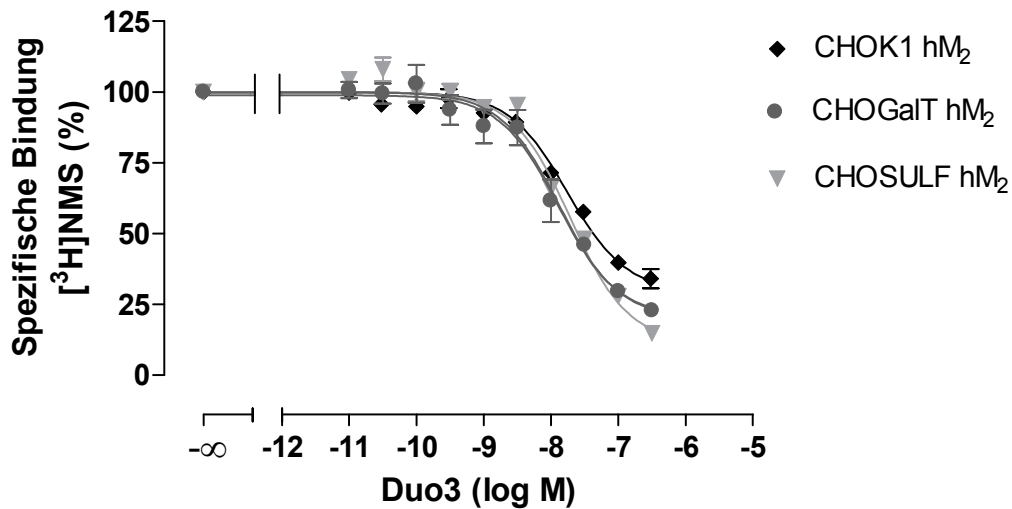


Abbildung 3.24: Einfluss des typischen allosterischen Modulators Duo3 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS (0,2 nM) an hM₂-Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen. Ordinate: Spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Kooperativitätsmodells (siehe Gleichung 2.10). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Steilheitsmaße der abgebildeten Kurven n_H betragen: 0,80^{ns} ± 0,08 (CHOK1hM₂), -0,52 ± 0,07 (CHOgalT hM₂), -1,03^{ns} ± 0,13 (CHOSULF hM₂). ^{ns} n_H nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05).

Expressions-system	Rezeptor	pK _A	pα	pα + pK _A	pEC _{0,5diss}	n
CHOK1	hM ₂	8,07 ± 0,04	-0,84 ± 0,06	7,23	7,20	4
CHOgalT	hM ₂	8,38 ± 0,13	-1,19 [#] ± 0,03	7,19	7,36	4
CHOSULF	hM ₂	8,21 ^s ± 0,03	-1,45 [#] ± 0,01	6,86	6,91	4

Tabelle 3.24: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit Duo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.24). pK_A: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. pα: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. ^s Der pK_A-Wert unterscheidet sich signifikant vom pK_A-Wert an CHOK1 hM₂ (t-Test; p < 0,05). [#]pα unterscheidet sich signifikant von pα an CHOK1 hM₂.

10 mM HEPES (30°C): In der Folge schlossen sich heterologe Interaktionsexperimente mit Duo3 im 10 mM HEPES-Puffer an, um die Befunde in einer Pufferumgebung mit nahezu physiologischer Ionenstärke zu betrachten. Abbildung 3.25 illustriert vergleichend die erhaltenen Kurvenverläufe. Tabelle 3.25 veranschaulicht die relevanten Kurvenparameter.

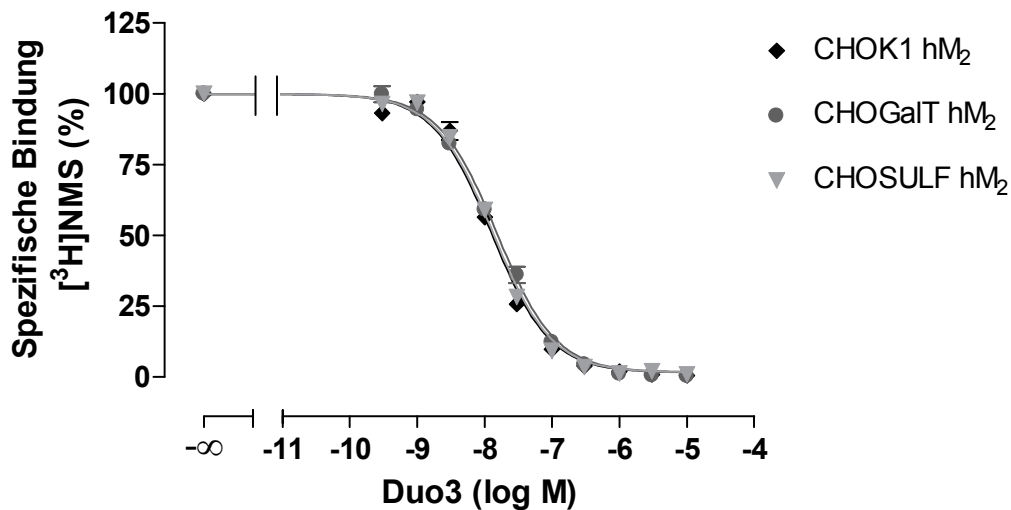


Abbildung 3.25: Einfluss des typischen allosterischen Modulators Duo3 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS (0,2 nM) an hM₂-Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen. Ordinate: Spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 10 mM HEPES-Puffer bei 30°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Kooperativitätsmodells (siehe Gleichung 2.10). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Steilheitsmaße der abgebildeten Kurven n_H betragen: 1,23 ± 0,06 (CHOK1 hM₂), -0,98^{ns} ± 0,04 (CHOGalT hM₂), -1,18 ± 0,04 (CHOSULF hM₂). ^{ns} n_H nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05).

Die Analyse der Parameter ergab eine erhöhte Affinität von Duo3 an freien Rezeptoren verglichen mit besetzten Rezeptorproteinen (siehe Tabelle 3.25). Aus diesem Befund resultierte analog zum vorangegangenen Abschnitt eine ausgeprägt negative Kooperativität mit [³H]NMS. Eine hinreichend genaue Bestimmung der Kooperativitätsfaktoren konnte aufgrund der kompletten Bindungshemmung von [³H]NMS durch die allosterische Testsubstanz nicht vorgenommen werden. Dieser Effekt deutete auf ein pseudokompetitives oder kompetitives Verhalten hin (siehe Kapitel 3.2.3.2). Zwischen den pK_A-Werten bestanden keine signifikanten Unterschiede. Zusammenfassend kann in diesem Puffersystem im Hinblick auf das Bindungsverhalten von Duo3 keinerlei Effekt durch eine veränderte

Sphingolipidumgebung an freien M_2 -Rezeptoren beobachtet werden. Bezüglich der unter Verwendung des artifiziellen Na,K,P_i-Puffersystems erhaltenen Ergebnisse lässt sich hingegen feststellen, dass die Testsubstanz Duo3 an M_2 -Rezeptoren mit sulfatierter Membranumgebung ein andersartiges Bindungsverhalten zeigt.

Expressions-system	Rezeptor	pK _A	pα	pα + pK _A	pEC _{0,5diss}	n
CHOK1	hM ₂	8,08 ± 0,02	< -2 [*]	-	6,20	4
CHOGaIT	hM ₂	8,01 ± 0,04	< -2 [#]	-	6,12	4
CHOSULF	hM ₂	8,07 ± 0,02	< -2 ⁺	-	6,01	4

Tabelle 3.25: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit Duo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.25). pK_A: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. pα: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. ^{*} Konkreter Wert: 6,36 ± 3,18. [#] Konkreter Wert: -10,22 ± 2,26. ⁺ Konkreter Wert: -10,36 ± 2,42.

3.4 Bedeutung der Aminosäure M₂⁴²²Trp im Hinblick auf typisches und atypisches Bindungsverhalten strukturmodifizierter allosterischer Modulatoren

Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit soll auf die Bedeutung der Epitopabhängigkeit für die Bindung typischer und atypischer allosterischer Modulatoren eingegangen werden. In diesem Zusammenhang sollten insbesondere Strukturmerkmale identifiziert werden, die ein atypisches Verhalten der Testsubstanzen bewirken, um auf diese Weise Einblicke bezüglich der verschiedenen Bindungsmodi zu erlangen. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss des Epitops M₂⁴²²Tryptophan auf die Bindungseigenschaften allosterischer Modulatoren analysiert.

Voruntersuchungen: Bedeutung der Aminosäure M₂⁴²²Trp im Hinblick auf die Bindung des orthosterischen Radioliganden [³H]NMS

In Analogie zu vorangegangenen Kapiteln werden auch in diesem Abschnitt zunächst die Ergebnisse aus homologen Konkurrenzexperimenten betrachtet, um die Bedeutung der Aminosäure M₂⁴²²Tryptophan für die Bindung des Orthosters [³H]NMS zu überprüfen. Abbildung 3.26 zeigt die erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven, die zugehörigen Kenngrößen werden in Tabelle 3.26 dargestellt.

Aus der näheren Betrachtung der Kurvenverläufe geht hervor, dass sich das Bindungsverhalten von [³H]NMS an M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren nicht wesentlich von dem an M₂-Wildtyprezeptoren unterscheidet. Die Affinität ist an M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren gegenüber Wildtyprezeptoren nur geringfügig erhöht. Der Vergleich der Geschwindigkeitsdissoziationskonstanten zeigt hingegen einen signifikant niedrigeren Wert an den punktmultierten Rezeptoren. Es resultiert dementsprechend eine signifikant erhöhte Dissoziationshalbwertszeit an M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren und somit eine Veränderung der kinetischen Eigenschaften der [³H]NMS-Bindung an den mutierten Rezeptoren.

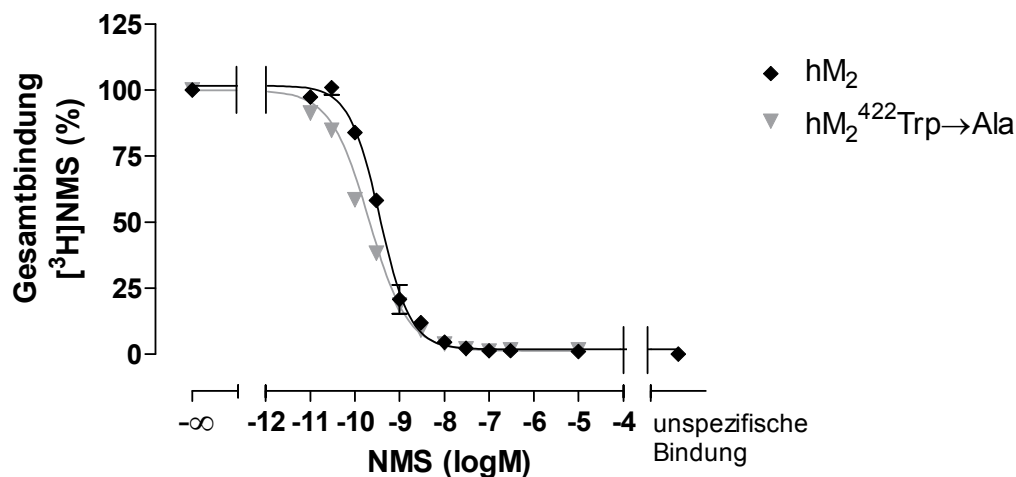


Abbildung 3.26: Homologes Konkurrenzexperiment mit steigenden Konzentrationen NMS in Anwesenheit des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (0,2 nM) an hM_2 - und $\text{hM}_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. Ordinate: Gesamtbindung des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (in % bezogen auf den Kontrollwert). Abszisse: Steigende Konzentrationen NMS (log M). Die Durchführung erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 3 μM Atropin bestimmt. Es wurden jeweils zwei Versuche in Doppelbestimmung durchgeführt. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler. Der Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ an die Werte angepasst (nichtlineare Regressionsanalyse; Gleichung 2.6 (siehe Kapitel 2.4.2.1.1)).

Rezeptor	pK_D	B_{max} [fmol/mg]	k_{-1} [min ⁻¹]	$t_{1/2\text{diss}}$ [min]
hM_2	9,75 (9,75; 9,75)	3635 (3944; 3326)	0,103 \pm 0,004 n = 32	6,99
$\text{hM}_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	10,14 (10,08; 10,19)	153 (164; 142)	0,057 ^s \pm 0,001 n = 30	12,28

Tabelle 3.26: Auflistung der aus homologen Konkurrenzexperimenten erhaltenen Parameterwerte der NMS-Bindung für hM_2 - und $\text{hM}_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. pK_D : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante. B_{max} : Dichte der Bindungsstellen. k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation. $t_{1/2}$: Dissoziationshalbwertszeit. Angeführt sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler und die Anzahl der Experimente (n). Bei der Durchführung je zweier Versuche in Doppelbestimmung werden sowohl die beiden Einzelwerte der Versuche als auch der resultierende Mittelwert genannt. ^s k_{-1} unterscheidet sich signifikant von k_{-1} an COS7 hM_2 (t-Test; $p < 0,05$).

3.4.1 Untersuchungen zur Bindung des typischen allosterischen Modulators WDuo3

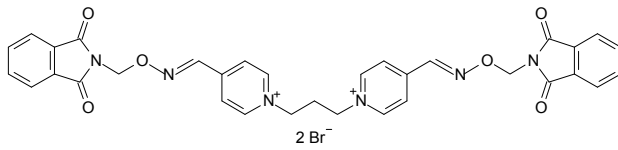


Abbildung 3.27: Strukturformel von WDuo3.

3.4.1.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Zu Beginn erfolgte die nähere Untersuchung der Bindungseigenschaften des typischen allosterischen Modulators WDuo3 (Abbildung 3.27) an M_2 -Wildtyp und punktmutierten M_2 -Rezeptoren ($M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$), deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS besetzt war. Anhand von Dissoziationsbindungsexperimenten konnten sowohl die Affinitätswerte der eingesetzten Modulatoren als auch die Kurvensteilheiten der resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven ermittelt werden. Im Folgenden sind die Konzentrations-Effekt-Kurven und die betrachteten Kurvenparameter der Versuche dargestellt (siehe Abbildung 3.28 und Tabelle 3.27).

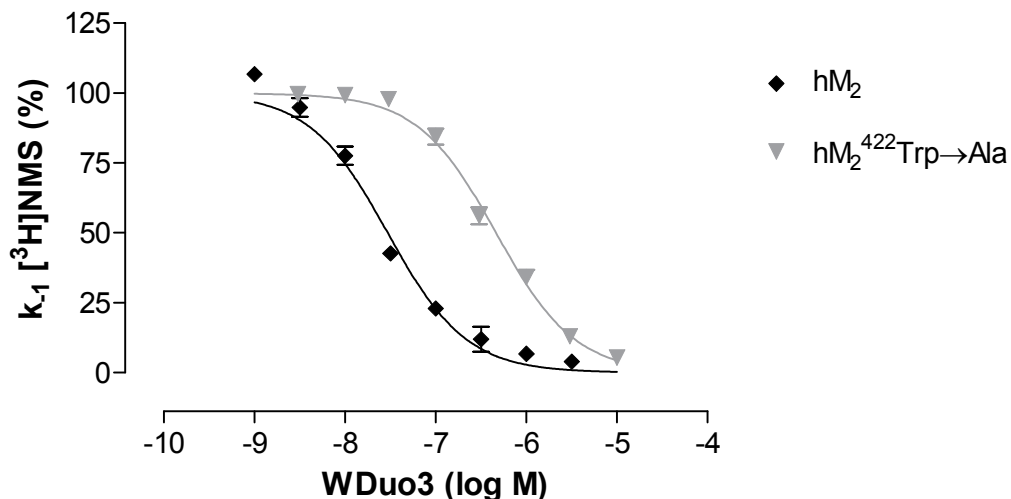


Abbildung 3.28: Interaktion von WDuo3 mit hM_2 - und $hM_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k_{-1} (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 5 unabhängigen Experimenten.

Rezeptor	$pEC_{0,5diss}$	$\Delta pEC_{0,5diss}$ (M_2 - $M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$)	n_H	Unteres Plateau [%]	n
hM_2	$7,53 \pm 0,03$	-	$-1,02^{ns} \pm 0,13$	$5^{ns} \pm 3$	5
$hM_2^{422}Trp \rightarrow Ala$	$6,33^s \pm 0,03$	1,18	$-1,02^{ns} \pm 0,11$	$3^{ns} \pm 4$	5

Tabelle 3.27: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit WDuo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.28). $pEC_{0,5diss}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [3H]NMS-Dissoziation führt. $\Delta pEC_{0,5diss}$: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. n_H : Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 5 unabhängigen Experimenten. ^s Der $pEC_{0,5diss}$ -Wert unterscheidet sich signifikant vom $pEC_{0,5diss}$ -Wert an hM_2 (t-Test; $p < 0,05$). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von -1 (n_H) bzw. 0 (unteres Plateau) (F-Test; $p < 0,05$).

Aus Abbildung 3.28 ist eine deutliche Rechtsverschiebung der an $M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$ erhaltenen Kurve im Vergleich zu M_2 -Wildtyprezeptoren ersichtlich. Die vergleichende Betrachtung der Affinitätswerte ergab somit eine signifikant niedrigere Wirksamkeit von WDuo3 an der Rezeptormutante. Die Differenz der $pEC_{0,5diss}$ -Werte an M_2 - und $M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$ -Rezeptoren betrug 1,18 Dekaden ($\Delta pEC_{0,5diss}$). Diese Befunde stimmen gut mit den von Prilla erhobenen Daten bezüglich W84 überein. Die Differenz der Affinitätswerte betrug in diesem Fall 1,51 ($\Delta pEC_{0,5diss}$) (Prilla, 2007). Das Ausmaß des für WDuo3 gefundenen Affinitätsunterschiedes belegt die Epitopabhängigkeit der Testsubstanz in Bezug auf $M_2^{422}Trp$. Eine Bindung von WDuo3 in diesem Bereich des allosterischen Haftareals kann somit angenommen werden. Die vergleichende Analyse der Kurvensteilheiten ergab für die typische allosterische Testsubstanz weiterhin erwartungsgemäß normal steile Kurven an beiden untersuchten Rezeptortypen ($n_H = -1$).

3.4.1.2 Bindung an [3H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Mit dem Ziel, Einblicke bezüglich des Bindungsverhaltens von WDuo3 an [3H]NMS-unbesetzten M_2 - und $M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$ -Rezeptorproteinen zu erhalten, erfolgte im weiteren Verlauf die Durchführung allosterischer Gleichgewichtsbindungs-experimente. Charakteristischerweise übt WDuo3 an M_2 -Wildtyprezeptoren keinen

relevanten Einfluss auf die Gleichgewichtsbindung von [^3H]NMS aus und verhält sich somit annähernd neutral kooperativ gegenüber dem Radioorthoster (siehe Kapitel 3.1.1.2). Im Rahmen dieses Kapitels soll überprüft werden, ob infolge eines Alanin-Austauschs des M_2^{422} Tryptophans eine Änderung der Kooperativität auftritt. Die ermittelten Kurvenverläufe sind in Abbildung 3.29 dargestellt. In Tabelle 3.28 sind die experimentell ermittelten Kurvenparameter zusammengestellt.

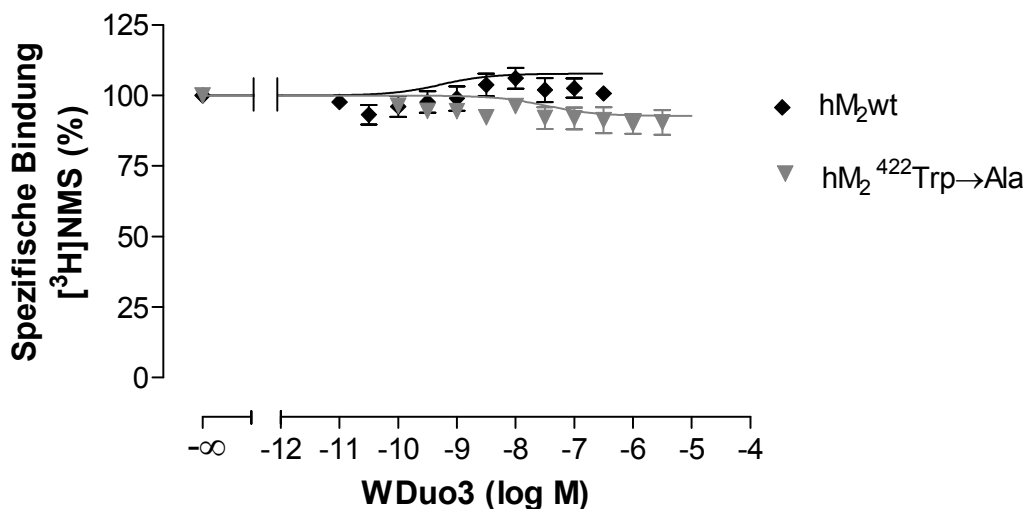


Abbildung 3.29: Einfluss des typischen allosterischen Modulators WDuo3 auf die Gleichgewichtsbindung von [^3H]NMS (0,2 nM) an hM₂- und hM₂⁴²²Trp→Ala Rezeptoren. Ordinate: Spezifische Bindung von [^3H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der modifizierten Ehlert-Gleichung mit $K_A = \text{EC}_{0,5\text{diss}}/\alpha$ (siehe Kapitel 2.4.2.3.1). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4-6 unabhängigen Experimenten.

Eine Auswertung erfolgte aufgrund des annähernd neutral kooperativen Verhaltens in beiden Fällen anhand der modifizierten Ehlert-Gleichung (Raasch et al., 2002), indem K_A durch den Quotienten $\text{EC}_{0,5\text{diss}}/\alpha$ ersetzt wurde. Demzufolge resultierte eine signifikant niedrigere Affinität (1,02 Dekaden) des errechneten $\text{p}K_A$ -Wertes an $\text{M}_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren im Vergleich zu Wildtyprezeptoren. Sowohl an M_2 als auch an $\text{M}_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ waren die Affinitäten zum freien Rezeptor mit denjenigen an besetzten Rezeptorproteinen vergleichbar. Hinsichtlich der Kooperativität ergab sich hingegen ein geringer, aber dennoch signifikanter Unterschied. An M_2 -Wildtyprezeptoren konnte eine leichte Bindungsförderung von [^3H]NMS beobachtet werden, an punktmutierten Rezeptoren lag demgegenüber ein negativ

kooperatives Verhalten der Testsubstanz mit dem Radioorthoster vor. Insgesamt zeigen die ermittelten Befunde, dass auch an [³H]NMS-unbesetzten Rezeptoren für WDuo3 eine Epitopabhängigkeit gegenüber M₂⁴²²Tryptophan vorliegt.

Rezeptor	pK _A	ΔpK _A (M ₂ -M ₂ ⁴²² Trp→Ala)	pα	pα + pK _A	pEC _{0,5diss}	n
hM ₂	7,47 [*] ± 0,02	-	0,06 ± 0,02	-	7,53	4
hM ₂ ⁴²² Trp→Ala	6,45 ^{*s} ± 0,07	1,02	-0,12 [#] ± 0,07	-	6,33	6

Tabelle 3.28: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit WDuo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.29). pK_A: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. ΔpK_A: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. pα: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4-6 unabhängigen Experimenten. ^{*}Auswertung nach der modifizierten Ehlert-Gleichung mit K_A = EC_{0,5diss}/α (siehe Kapitel 2.4.2.3.1). ^sDer pK_A-Wert unterscheidet sich signifikant vom pK_A-Wert an hM₂ (t-Test; p < 0,05). [#]pα unterscheidet sich signifikant von pα an hM₂ (t-Test; p < 0,05).

3.4.2 Untersuchungen zur Bindung des atypischen allosterischen Modulators Duo3

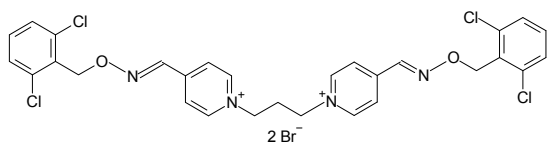


Abbildung 3.30: Strukturformel von Duo3.

3.4.2.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Die aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit Duo3 (Abbildung 3.30) erhaltenen Kurvenverläufe veranschaulicht Abbildung 3.31. Eine zusammenfassende Darstellung der wesentlichen Kurvenparameter zeigt Tabelle 3.29.

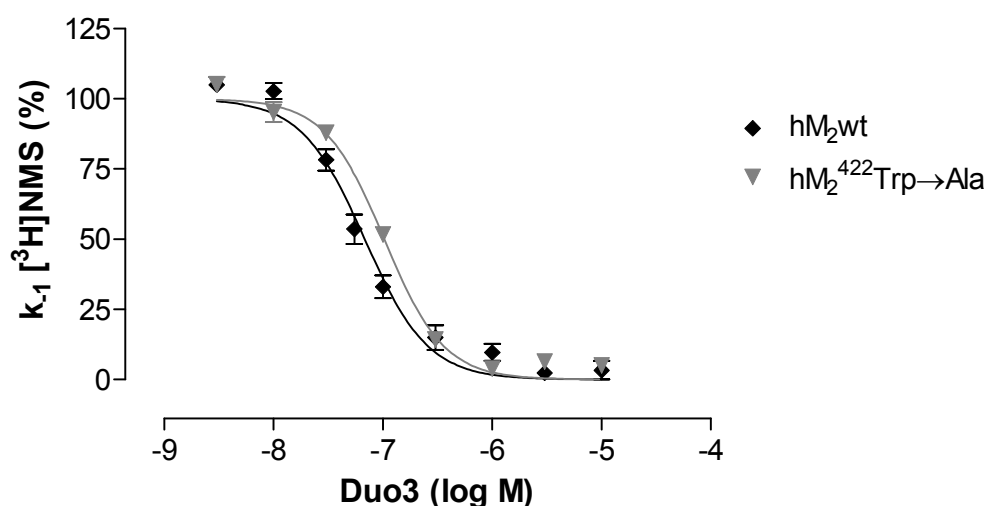


Abbildung 3.31: Interaktion von Duo3 mit hM₂- und hM₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k₋₁ (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Anhand der Betrachtung dieser Kenngrößen wird deutlich, dass sich der Affinitätswert von Duo3 an M₂-Wildtyp-Rezeptoren signifikant von demjenigen an der Rezeptormutante M₂⁴²²Trp→Ala unterschied (siehe Tabelle 3.29). Die Differenz ($\Delta pEC_{0,5\text{diss}}$) zwischen den ermittelten pEC_{0,5diss}-Werten betrug 0,18 Dekaden. Eine

individuelle Kurvenanpassung mit Mittelung der einzelnen Affinitäten ergab bezüglich der $pEC_{0,5diss}$ -Werte von Duo3 leicht unterschiedliche Resultate ($pEC_{0,5diss}$: hM₂: $7,26 \pm 0,05$; hM₂⁴²²Trp→Ala: $7,02 \pm 0,01$). Der signifikante Unterschied der Wirksamkeiten blieb hingegen bestehen. Verglichen mit dem ausgeprägten Affinitätsunterschied, der für die Testsubstanz WDuo3 gefunden wurde, scheint diese Abweichung hingegen nicht relevant und somit von geringfügiger biologischer Bedeutung zu sein. Bezüglich der Kurvensteilheiten zeigte sich sowohl an Wildtyprezeptoren als auch an punktmutierten M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren ein Steilheitsmaß $n_H < -1$. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kann für die Substanz Duo3 ein im Vergleich zu typischen allosterischen Modulatoren andersartiger Bindungsmodus angenommen und bestätigt werden.

Rezeptor	$pEC_{0,5diss}$	$\Delta pEC_{0,5diss}$ (M ₂ -M ₂ ⁴²² Trp→Ala)	n_H	Unteres Plateau [%]	n
hM ₂	$7,17 \pm 0,03$	-	$-1,50^* \pm 0,17$	$7^{ns} \pm 3$	4
hM ₂ ⁴²² Trp→Ala	$6,99^s \pm 0,03$	0,18	$-1,59^* \pm 0,12$	$4^{ns} \pm 2$	4

Tabelle 3.29: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit Duo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.31). $pEC_{0,5diss}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation führt. $\Delta pEC_{0,5diss}$: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. n_H : Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. ^s Der $pEC_{0,5diss}$ -Wert unterscheidet sich signifikant vom $pEC_{0,5diss}$ -Wert an hM₂ (t-Test; $p < 0,05$). ^{*} n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; $p < 0,05$). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von 0 (unteres Plateau) (F-Test; $p < 0,05$).

3.4.2.2 Bindung an [³H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Im Folgenden wurde in heterologen Interaktionsexperimenten der atypische allosterische Modulator Duo3 bezüglich seiner Epitopabhängigkeit analysiert. Am [³H]NMS-besetzten Rezeptor konnte für Duo3 kein relevanter Einfluss des Epitops M₂⁴²²Trp gefunden werden. Die an freien Rezeptoren erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven zeigt Abbildung 3.32.

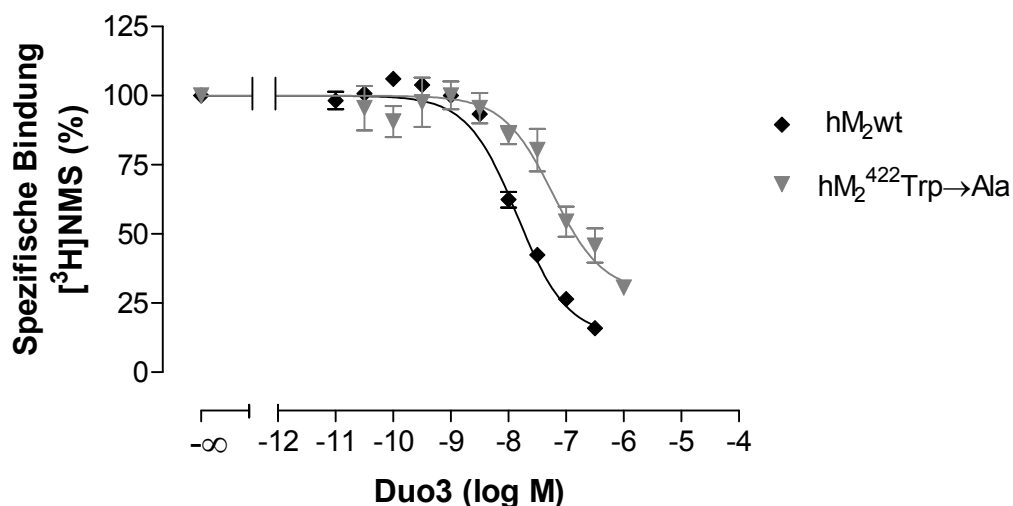


Abbildung 3.32: Einfluss des atypischen allosterischen Modulators Duo3 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS (0,2 nM) an hM₂- und hM₂⁴²²Trp→Ala Rezeptoren. Ordinate: Spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Kooperativitätsmodells (siehe Gleichung 2.10). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Steilheitsmaße der abgebildeten Kurven n_H betragen: 1,16^{ns} ± 0,11 (hM₂wt), -0,94^{ns} ± 0,39 (hM₂⁴²²Trp→Ala). ^{ns} n_H nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05).

Rezeptor	pK _A	ΔpK _A (M ₂ -M ₂ ⁴²² Trp→Ala)	pα	pα + pK _A	pEC _{0,5diss}	n
hM ₂	8,12 ± 0,03	-	-1,17 ± 0,03	6,95	7,17	4
hM ₂ ⁴²² Trp→Ala	7,66 ^s ± 0,21	0,46	-0,97 [*] ± 0,03	6,69	6,99	4

Tabelle 3.30: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit Duo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.32). pK_A: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. ΔpK_A: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. pα: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4-6 unabhängigen Experimenten. ^s Der pK_A-Wert unterscheidet sich signifikant vom pK_A-Wert an hM₂ (t-Test; p < 0,05). ^{*} pα unterscheidet sich signifikant von pα an hM₂ (t-Test; p < 0,05).

Aus Tabelle 3.30 wird ersichtlich, dass der Austausch des allosterischen Epitops M₂⁴²²Tryptophan gegen Alanin eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve von Duo3 verursachte. Dieser Effekt spiegelte eine gegenüber M₂-

Wildtyprezeptoren verminderte Affinität zu den freien Rezeptorproteinen wider. Die Analyse der Kooperativitäten ergab eine geringe, aber signifikante Änderung bezüglich $p\alpha$. An der Rezeptormutante zeigte sich eine weniger stark ausgeprägte Hemmung der [^3H]NMS-Gleichgewichtsbindung im Vergleich zu M_2 -Wildtyprezeptoren. Ein Vergleich des experimentell bestimmten $pEC_{0,5\text{diss}}$ -Wertes mit dem errechneten Produkt $p(\alpha \times K_A)$ ergab keine relevanten Abweichungen, so dass eine Konsistenz der Befunde zwischen den beiden experimentellen Befunden angenommen wurde.

3.4.3 Untersuchungen zur Bindung des atypischen allosterischen Modulators Tacrin

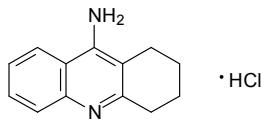


Abbildung 3.33: Strukturformel von Tacrin.

3.4.3.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Für den im Hinblick auf andere Fragestellungen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten atypischen allosterischen Modulator Tacrin (Abbildung 3.33) wird wie bereits beschrieben ein andersartiges atypisches Verhalten postuliert (Tränkle et al., 2005). Demzufolge ist ein gegenüber Duo3 abweichendes Verhalten von Tacrin bezüglich des Epitops $M_2^{422}\text{Trp}$ zu erwarten. Die in diesem Zusammenhang ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven zeigt Abbildung 3.34.

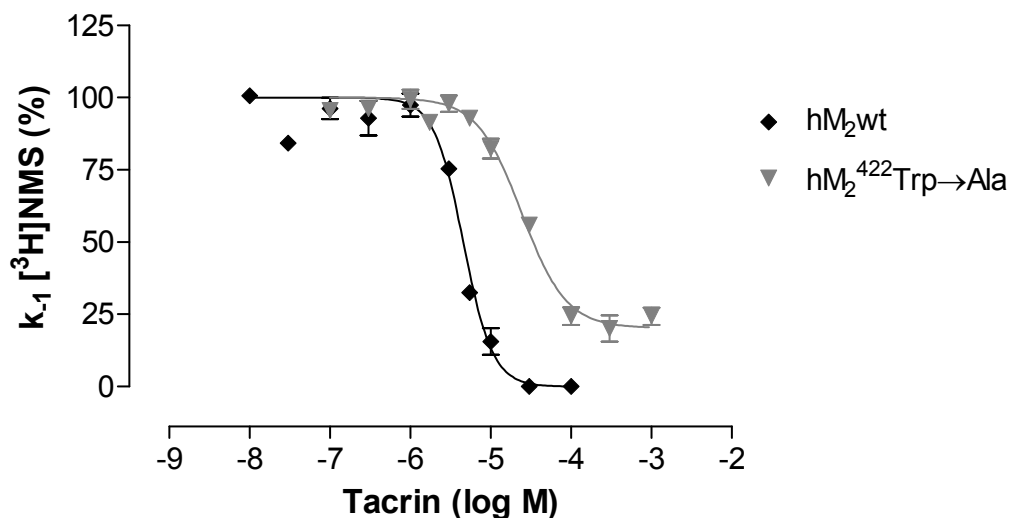


Abbildung 3.34: Interaktion von Tacrin mit hM₂- und hM₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k_{-1} (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4-5 unabhängigen Experimenten.

Rezeptor	$pEC_{0,5diss}$	$\Delta pEC_{0,5diss}$ (M_2 - $M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$)	n_H	Unteres Plateau [%]	n
hM_2	$5,34 \pm 0,04$	-	$-2,39^* \pm 0,40$	$1^{ns} \pm 4$	4
$hM_2^{422}Trp \rightarrow Ala$	$4,61^s \pm 0,04$	0,73	$-1,57^* \pm 0,20$	20 ± 2	5

Tabelle 3.31: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit Tacrin erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.34). $pEC_{0,5diss}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [3H]NMS-Dissoziation führt. $\Delta pEC_{0,5diss}$: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. n_H : Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4-5 unabhängigen Experimenten. ^s Der $pEC_{0,5diss}$ -Wert unterscheidet sich signifikant vom $pEC_{0,5diss}$ -Wert an hM_2 (t-Test; $p < 0,05$). * n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; $p < 0,05$). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von 0 (unteres Plateau) (F-Test; $p < 0,05$).

Die vergleichende Betrachtung der in Tabelle 3.31 zusammengestellten Kenngrößen zeigt, dass die Wirksamkeit von Tacrin an $M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$ -Rezeptoren gegenüber M_2 -Wildtyprezeptoren signifikant um 0,7 Dekaden erniedrigt war. Eine Analyse der Kurvensteilheiten ergab für beide betrachteten Konzentrations-Effekt-Kurven ein Steilheitsmaß von $n_H < -1$. Es resultierten somit erwartungsgemäß signifikant steile Kurvenverläufe. Das Ausmaß der Kurvensteilheit war im Hinblick auf punktmutierte Rezeptoren deutlich geringer ausgeprägt. Dieser Effekt könnte auf ein signifikant von 0% abweichendes unteres Kurvenplateau zurückgeführt werden ($20\% \pm 2$). Ein von 0% abweichendes unteres Plateau zeigt eine unvollständige Hemmung der Dissoziationsverzögerung des Radioorthosters [3H]NMS durch die allosterische Testsubstanz an. Zusammenfassend betrachtet zeigte sich für Tacrin im Gegensatz zu Duo3 eine ausgeprägte Epitopabhängigkeit der Bindung bezüglich $M_2^{422}Trp$.

3.4.3.2 Bindung an [³H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Abbildung 3.35 zeigt die mit Tacrin erhaltenen Kurvenverläufe an freien M₂-Wildtyp- und M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren.

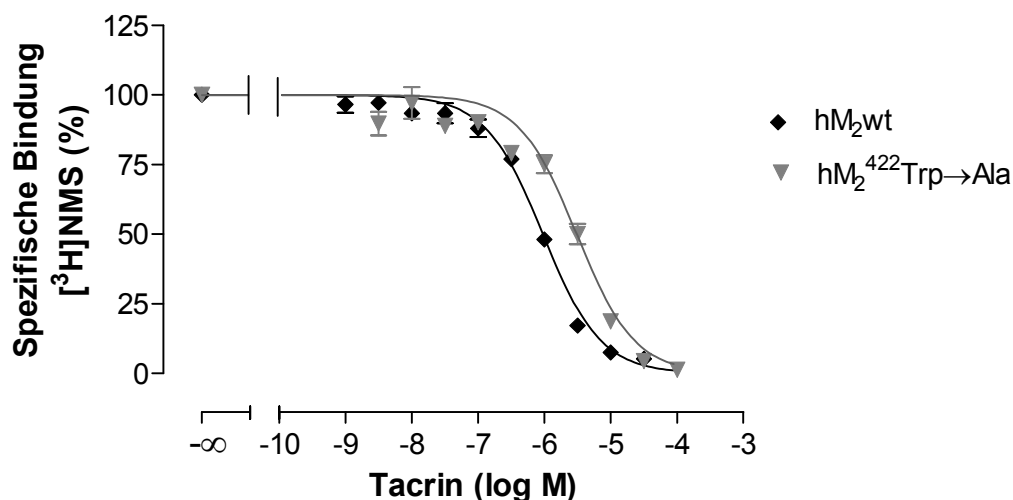


Abbildung 3.35: Einfluss des atypischen allosterischen Modulators Tacrin auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS (0,2 nM) an hM₂- und hM₂⁴²²Trp→Ala Rezeptoren. Ordinate: Spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Kooperativitätsmodells (siehe Gleichung 2.10). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Steilheitsmaße der abgebildeten Kurven n_H betragen: -1,24 ± 0,10 (hM₂wt), -1,07^{ns} ± 0,14 (hM₂⁴²²Trp→Ala). ^{ns} n_H nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05).

Rezeptor	pK _A	ΔpK _A (M ₂ -M ₂ ⁴²² Trp→Ala)	pα	pα + pK _A	pEC _{0,5diss}
hM ₂	6,36 ± 0,02	-	< -2*	-	5,34
hM ₂ ⁴²² Trp→Ala	6,08 ^s ± 0,04	0,28	< -2 [#]	-	4,61

Tabelle 3.32: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit Duo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.35). pK_A: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. ΔpK_A: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. pα: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. ^s Der pK_A-Wert unterscheidet sich signifikant vom pK_A-Wert an hM₂ (t-Test; p < 0,05). * Konkreter Wert: -12,23 ± 12,36. [#]Konkreter Wert: 18,22 ± -18,00.

Aus Tabelle 3.32 wird ersichtlich, dass die Affinität von Tacrin an freien, punktmutierten Rezeptoren gegenüber M_2 -Wildtyprezeptoren signifikant erniedrigt war (ΔpK_A : 0,3 Dekaden). Demzufolge konnte davon ausgegangen werden, dass $M_2^{422}\text{Trp}$ auch an [^3H]NMS-unbesetzten Rezeptoren für die Bindung des atypischen Modulators Tacrin eine maßgebliche Rolle spielt. Eine vergleichende Betrachtung der Kooperativitäten zeigte sowohl an M_2 -Wildtyprezeptoren als auch an $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren eine komplette Hemmung der Gleichgewichtsbindung des Radioliganden an.

3.4.4 Untersuchungen zur Bindung des allosterischen Modulators EHW437

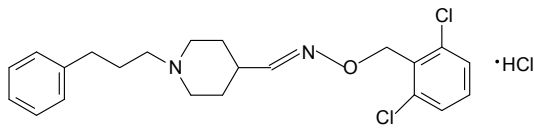


Abbildung 3.36: Strukturformel von EHW437.

3.4.4.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Im weiteren Verlauf erfolgte die Untersuchung des allosterischen Modulators EHW437 (Abbildung 3.36) an [³H]NMS-besetzten Rezeptoren hinsichtlich der Abhängigkeit von M₂⁴²²Trp. Die Auswahl dieses Modulators erfolgte aufgrund seiner außergewöhnlichen chemischen Struktur (siehe Abbildung 3.37). Diese enthält sowohl uncharakteristische Elemente als auch ein atypisches Strukturelement (Dichlorobenzylrest, vergleiche Duo3).

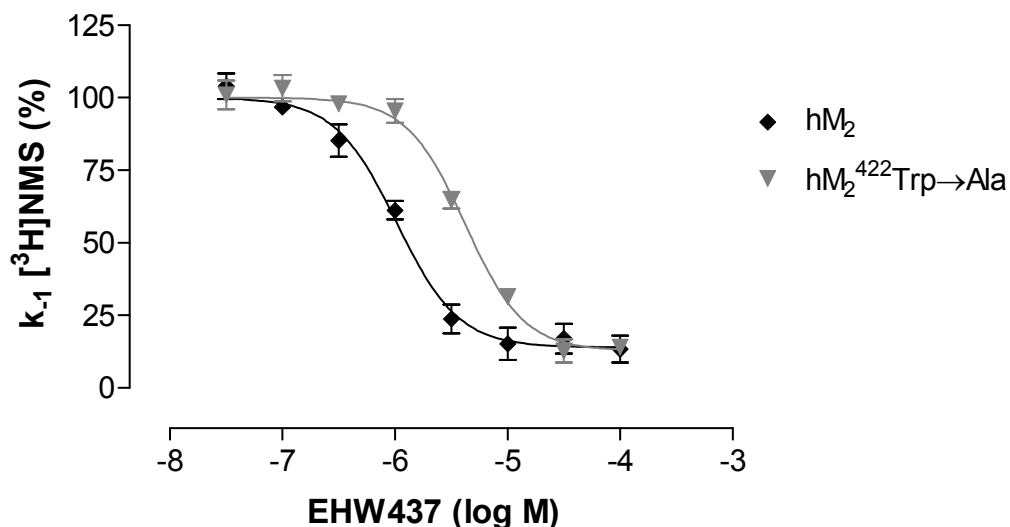


Abbildung 3.37: Interaktion von EHW437 mit hM₂- und hM₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k₋₁ (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 6 unabhängigen Experimenten.

Rezeptor	$pEC_{0,5diss}$	$\Delta pEC_{0,5diss}$ (M_2 - $M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$)	n_H	Unteres Plateau [%]	n
hM_2	$5,99 \pm 0,06$	-	$-1,58^* \pm 0,28$	14 ± 3	6
$hM_2^{422}Trp \rightarrow Ala$	$5,38^s \pm 0,05$	0,61	$-1,67^* \pm 0,24$	13 ± 4	6

Tabelle 3.33: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit EHW437 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.37). $pEC_{0,5diss}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [3H]NMS-Dissoziation führt. $\Delta pEC_{0,5diss}$: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. n_H : Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 6 unabhängigen Experimenten. ^s Der $pEC_{0,5diss}$ -Wert unterscheidet sich signifikant vom $pEC_{0,5diss}$ -Wert an hM_2 (t-Test; $p < 0,05$). ^{*} n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; $p < 0,05$).

Abbildung 3.37 veranschaulicht die aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven. Die Betrachtung der ermittelten Kenngrößen (siehe Tabelle 3.33) zeigt einen signifikanten Wirksamkeitsverlust der Testsubstanz EHW437 an $M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$ -Rezeptoren gegenüber M_2 -Wildtyprezeptoren an. Die Differenz der ermittelten Affinitätswerte betrug 0,61 Dekaden. Verglichen mit Tacrin wurde daher für EHW437 ein nahezu identisches Affinitätsmuster gefunden. Für die beiden betrachteten Kurvenverläufe ergab sich ein Steilheitsmaß n_H , das signifikant kleiner ist als -1. Folglich wies EHW437 eine charakteristische Eigenschaft atypischer allosterischer Modulatoren auf. Der ermittelte Wert des unteren Plateaus wich sowohl an M_2 -Wildtyprezeptoren als auch an der Rezeptormutante signifikant von 0% ab. Eine individuelle Kurvenanpassung ergab an mutierten Rezeptoren eine Änderung des Affinitätswertes ($pEC_{0,5diss}$ -Werte: hM_2 : $6,05 \pm 0,13$; $hM_2^{422}Trp \rightarrow Ala$: $5,12 \pm 0,09$). Daraus resultierte ein stärkerer Affinitätsverlust der Testsubstanz an der Rezeptormutante. Zusammenfassend konnte vor dem Hintergrund der ermittelten Daten für EHW437 eine Abhängigkeit der Rezeptorinteraktion vom Epitop $M_2^{422}Trp$ gefunden werden. Zusätzlich zeigte die eingesetzte Testsubstanz Eigenschaften eines atypischen allosterischen Modulators.

3.4.4.2 Bindung an [³H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Im nachfolgenden Abschnitt wird der Einfluss des Epitops $M_2^{422}\text{Trp}$ auf die Bindung der Testsubstanz EHW437 an freien Rezeptoren untersucht. Wie in Tabelle 3.34 erkennbar wird, zeigt die mit EHW437 erhaltene Gleichgewichtsbindungskurve nach Punktmutation des Rezeptorproteins eine deutliche Rechtsverschiebung. Die vergleichend dargestellten Kurvenparameter zeigen einen gegenüber M_2 -Wildtyprezeptoren signifikant um 0,7 Dekaden verminderten pK_A -Wert an der Rezeptormutante an. Diese erhobenen Daten erlauben den Schluss, dass $M_2^{422}\text{Trp}$ als Affinität-gebendes Epitop eine Rolle für die Bindung der Testsubstanz EHW437 an [³H]NMS-unbesetzten Rezeptoren spielt. Aus der Betrachtung der Kooperativitätsfaktoren ergaben sich hingegen keine Unterschiede. EHW437 zeigte an beiden Rezeptortypen eine stark ausgeprägte negative Kooperativität mit dem Radioorthoster [³H]NMS. Die Gleichgewichtsbindung des orthosterischen Liganden wird überdies vollständig gehemmt.

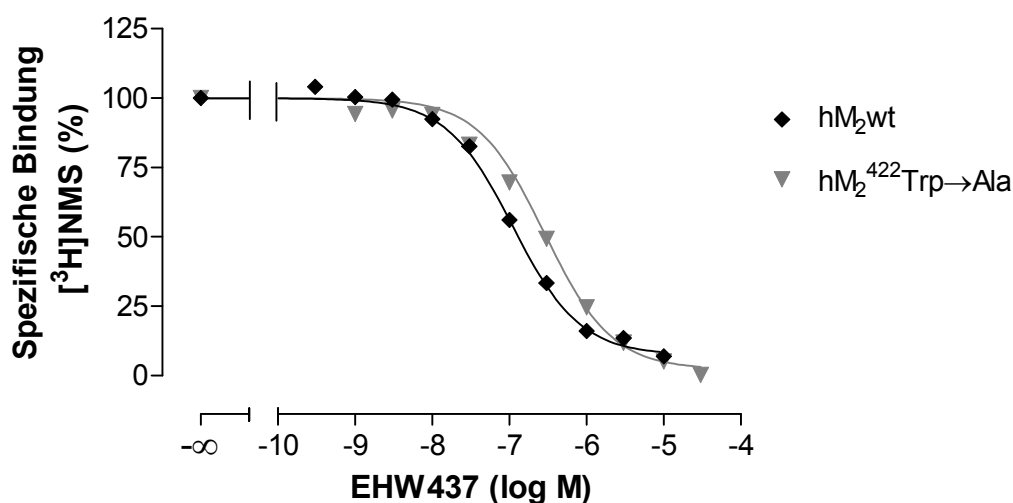


Abbildung 3.38: Einfluss des allosterischen Modulators EHW437 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS (0,2 nM) an hM₂- und hM₂⁴²²Trp→Ala Rezeptoren. Ordinate: Spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Kooperativitätsmodells (siehe Gleichung 2.10). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Steilheitsmaße der abgebildeten Kurven n_H betragen: $-0,99 \pm 0,06$ (hM₂wt), $-0,81 \pm 0,04$ (hM₂⁴²²Trp→Ala). ^{ns} n_H nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test; $p < 0,05$).

Rezeptor	pK_A	ΔpK_A (M_2 - $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$)	$p\alpha$	$p\alpha + pK_A$	$pEC_{0,5diss}$	n
hM ₂	8,13 ± 0,03	-	< -2 [*]	-	5,99	4
hM ₂ ⁴²² Trp→Ala	7,44 ^s ± 0,02	0,69	< -2 [#]	-	5,38	4

Tabelle 3.34: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit EHW437 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.38). pK_A : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. ΔpK_A : Differenz der an Wildtyp- und punktmultierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. $p\alpha$: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α . n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. ^s Der pK_A -Wert unterscheidet sich signifikant vom pK_A -Wert an hM₂ (t-Test; $p < 0,05$). ^{*} Konkreter Wert: $-2,30 \pm 0,04$. [#] Konkreter Wert: $2,54 \pm 0,11$.

3.4.5 Untersuchungen zur Bindung des allosterischen Modulators DuoWO

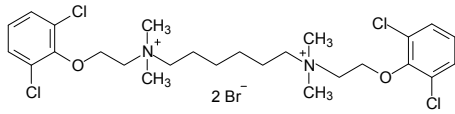


Abbildung 3.39: Strukturformel von DuoWO.

3.4.5.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Im Rahmen dieses Kapitels sollten Strukturelemente innerhalb eines Modulatormoleküls identifiziert werden, aus denen typisches oder atypisches Verhalten abgeleitet werden kann. Im Hinblick auf die mit den Modulatoren WDuo3 und Duo3 erhaltenen Befunde konnte davon ausgegangen werden, dass die Art der seitlichen Substituenten der Moleküle ein typisches bzw. atypisches Verhalten bedingt. Unter Berücksichtigung der mit EHW437 erhaltenen Ergebnisse konnte darüber hinaus ein Einfluss der Mittelkette bezüglich der verschiedenen Bindungsmodi nicht ausgeschlossen werden. Um beide Einflussfaktoren hinsichtlich des Auftretens einer typischen bzw. atypischen Bindungscharakteristik synchron beurteilen zu können, schloss sich die Untersuchung der Modellsubstanz DuoWO (Abbildung 3.39) an. Dieser Modulator ist strukturell durch eine W84-artige Mittelkette und Duo3-artige laterale Substituenten gekennzeichnet, dementsprechend liegen sowohl typische als auch atypische Strukturelemente vor. Vor dem Hintergrund dieser Überlegungen erfolgte eine Analyse der Substanz bezüglich der Abhängigkeit des Epitops $M_2^{422}\text{Trp}$. Nachfolgend wird in Abbildung 3.40 die in Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten ermittelte Epitopabhängigkeit der Substanzwirkung dargestellt. Es zeigte sich eine signifikante Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve von DuoWO an $M_2^{422}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ -Rezeptoren. Die Differenz zwischen den an M_2 -Wildtyprezeptoren und punktmutierten Rezeptoren erhaltenen Affinitätswerten betrug 1,2 Dekaden. Aus der Analyse der Kurvensteilheiten resultierte für beide Kurvenverläufe ein Steilheitsmaß n_H von -1. An beiden Rezeptorsystemen konnte die Dissoziation von [³H]NMS durch hohe Konzentrationen der allosterischen Testsubstanz vollständig verzögert werden (unteres Plateau [%] = 0). Diesen Befunden zufolge kann geschlossen werden, dass der Modulator DuoWO typische

allosterische Eigenschaften im Hinblick auf das Bindungsverhalten zeigt. Eine individuelle Anpassung der Konzentrations-Effekt-Kurven ergab überdies keine abweichenden Resultate.

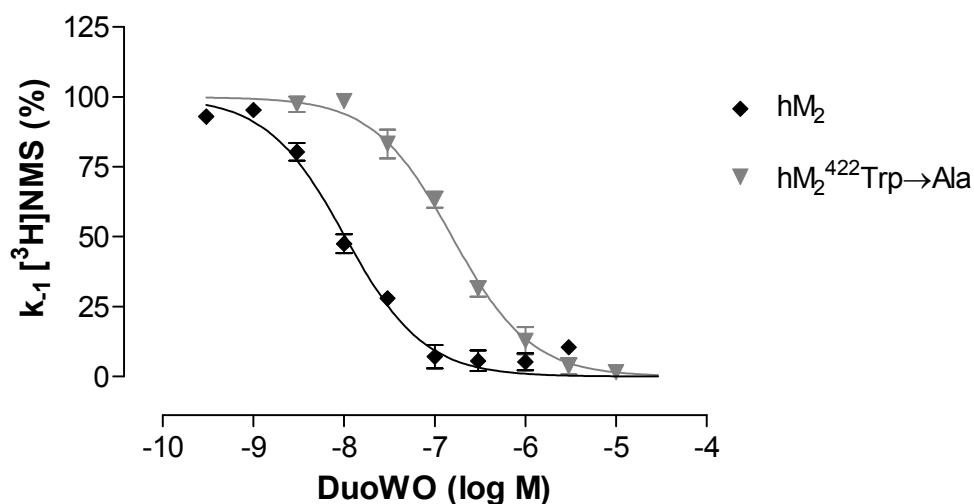


Abbildung 3.40: Interaktion von DuoWO mit hM₂- und hM₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k_{-1} (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Die Kurvenparameter werden in Tabelle 3.35 zusammenfassend dargestellt.

Rezeptor	$pEC_{0,5diss}$	$\Delta pEC_{0,5diss}$ (M ₂ -M ₂ ⁴²² Trp→Ala)	n_H	Unteres Plateau [%]	n
hM ₂	7,99 ± 0,04	-	-1,04 ^{ns} ± 0,10	6 ^{ns} ± 2	4
hM ₂ ⁴²² Trp→Ala	6,81 ^s ± 0,03	1,18	-1,09 ^{ns} ± 0,09	0 ^{ns} ± 4	4

Tabelle 3.35: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit DuoWO erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.40). $pEC_{0,5diss}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation führt. $\Delta pEC_{0,5diss}$: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. n_H : Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. ^s Der $pEC_{0,5diss}$ -Wert unterscheidet sich signifikant vom $pEC_{0,5diss}$ -Wert an hM₂ (t-Test; $p < 0,05$). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von -1 (n_H) bzw. 0 (unteres Plateau) (F-Test; $p < 0,05$).

3.4.5.2 Bindung an [³H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Die Ergebnisse der allosterischen Interaktionsexperimente werden in Abbildung 3.41 und Tabelle 3.36 veranschaulicht.

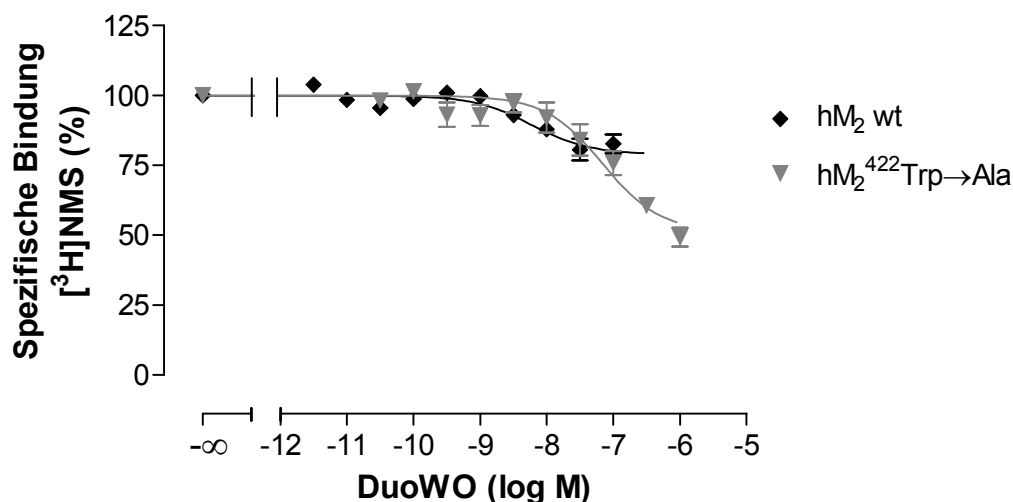


Abbildung 3.41: Einfluss des allosterischen Modulators DuoWO auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS (0,2 nM) an hM₂- und hM₂⁴²²Trp→Ala Rezeptoren. Ordinate: Spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Kooperativitätsmodells (siehe Gleichung 2.10). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten.

Rezeptor	pK _A	ΔpK _A (M ₂ -M ₂ ⁴²² Trp→Ala)	pα	pα + pK _A	pEC _{0,5diss}	n
hM ₂	8,85 ± 0,12	-	-0,72 ± 0,05	8,13	7,99	4
hM ₂ ⁴²² Trp→Ala	7,81 ^s ± 0,11	1,04	-0,94 ± 0,10	6,87	6,81	3

Tabelle 3.36: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit DuoWO erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.41). pK_A: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. ΔpK_A: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. pα: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3-4 unabhängigen Experimenten. ^s Der pK_A-Wert unterscheidet sich signifikant vom pK_A-Wert an hM₂ (t-Test; p < 0,05). ^{*} pα unterscheidet sich signifikant von pα an hM₂ (t-Test; p < 0,05).

Es ergab sich aus der vergleichenden Betrachtung der pK_A -Werte eine signifikante, um eine Dekade verminderte Affinität von DuoWO an $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. Dieser Befund zeigt, dass $M_2^{422}\text{Trp}$ ein Affinität-gebendes Epitop für die Bindung der Testsubstanz an freien Rezeptoren darstellt. Aus der Betrachtung der Kooperativitätsfaktoren resultierte sowohl an M_2 -Wildtyprezeptoren als auch an $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren eine Hemmung der $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -Gleichgewichtsbindung. Das negativ kooperative Verhalten ist an der Rezeptormutante ausgeprägter, ein signifikanter Unterschied ließ sich hingegen nicht feststellen. Überdies zeigte ein Vergleich von $pEC_{0,5\text{diss}}$ mit $p(\alpha \times K_A)$ keine bedeutenden Abweichungen an.

3.4.6 Untersuchungen zur Bindung des allosterischen Modulators Duo34

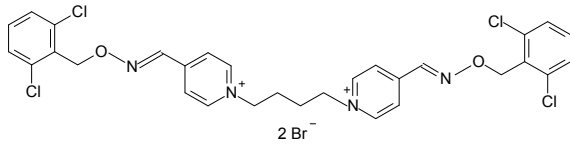


Abbildung 3.42: Strukturformel von Duo34.

3.4.6.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Im Folgenden wurde mit Duo34 (Abbildung 3.42) eine weitere allosterische Testsubstanz hinsichtlich der Epitopabhängigkeit ($M_2^{422}\text{Trp}$) und der sich daraus ergebenden Informationen bezüglich typischer und atypischer Strukturmerkmale untersucht. Duo34 weist eine ausgeprägte Strukturanalogie zum atypischen Modulator Duo3 auf. Anstelle einer Trimethylenkette innerhalb der Molekülmitte ist Duo34 durch das Vorliegen einer Tetramethylenkette gekennzeichnet. Die Ergebnisse der Dissoziationsbindungsexperimente werden in Abbildung 3.43 und Tabelle 3.37 dargestellt.

Hinsichtlich der $pEC_{0,5\text{diss}}$ -Werte von Duo34 ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen M_2 -Wildtyprezeptoren und punktmutierten Rezeptoren. Eine Interaktion von Duo34 mit dem Epitop $M_2^{422}\text{Trp}$ war somit zunächst auszuschließen. Die individuelle Anpassung der einzelnen Kurvenverläufe ergab hingegen einen signifikanten Affinitätsverlust an den mutierten Rezeptoren ($pEC_{0,5\text{diss}}$ -Werte: hM_2 : $7,54 \pm 0,06$; $hM_2^{422}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$: $7,29 \pm 0,06$). Die Kurvensteilheit betrug in jedem Fall $n_H = -1$. Demzufolge lagen mit Duo34 sowohl an M_2 -Wildtyprezeptoren als auch an $M_2^{422}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ normal steile Kurven, ein Indiz für typisches allosterisches Bindungsverhalten, vor.

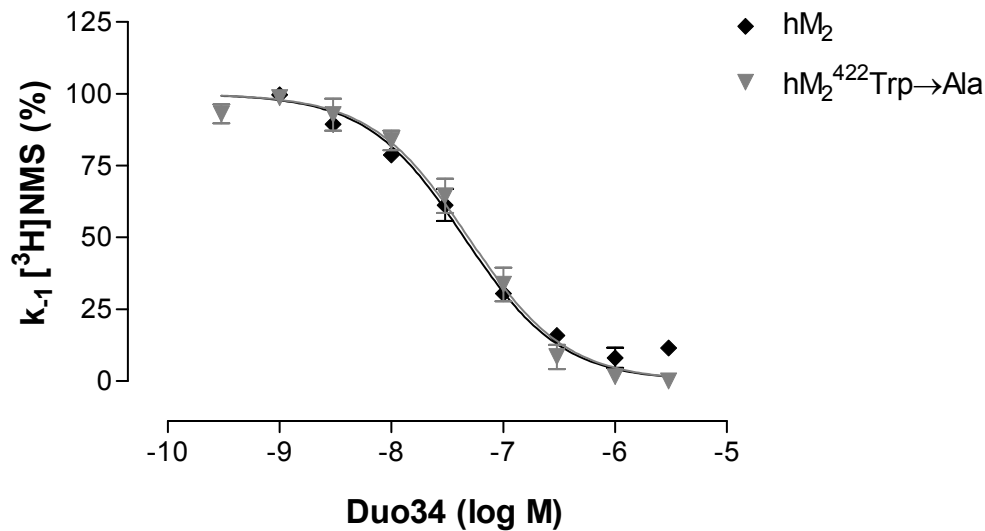


Abbildung 3.43: Interaktion von Duo34 mit hM₂- und hM₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k_{-1} (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Rezeptor	pEC _{0,5diss}	ΔpEC _{0,5diss} (M ₂ -M ₂ ⁴²² Trp→Ala)	n _H	Unteres Plateau [%]	n
hM ₂	7,35 ± 0,04	-	-0,88 ^{ns} ± 0,07	7 ^{ns} ± 4	4
hM ₂ ⁴²² Trp→Ala	7,30 ± 0,04	0,05	-1,10 ^{ns} ± 0,11	-2 ^{ns} ± 4	4

Tabelle 3.37: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit Duo34 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.43). pEC_{0,5diss}: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [³H]NMS-Dissoziation führt. ΔpEC_{0,5diss}: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. n_H: Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. ^s Der pEC_{0,5diss}-Wert unterscheidet sich signifikant vom pEC_{0,5diss}-Wert an hM₂ (t-Test; p < 0,05). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von -1 (n_H) bzw. 0 (unteres Plateau) (F-Test; p < 0,05).

3.4.6.2 Bindung an [³H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Abbildung 3.44 und Tabelle 3.38 stellen die in Gleichgewichtsbindungsexperimenten erhobenen Daten für den allosterischen Modulator Duo34 dar.

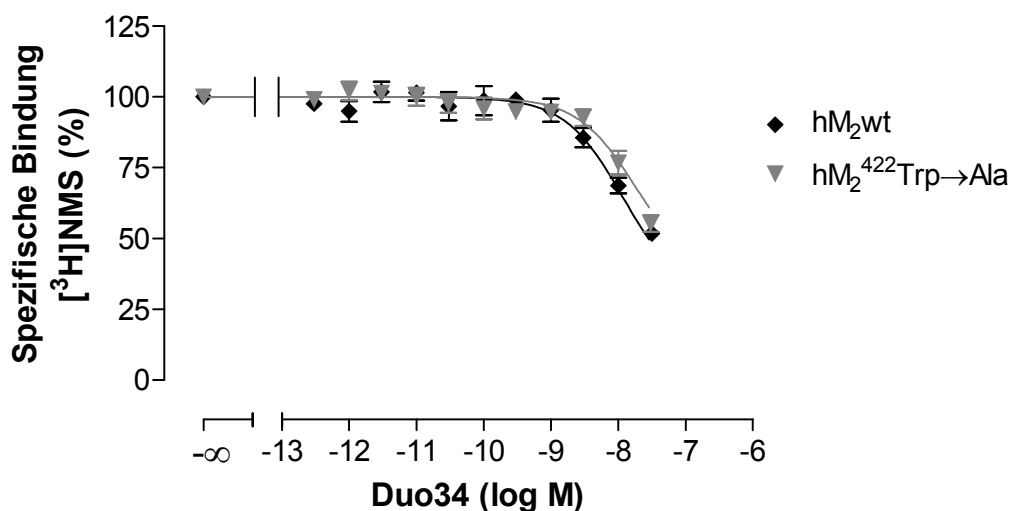


Abbildung 3.44: Einfluss des allosterischen Modulators Duo34 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS (0,2 nM) an hM₂- und hM₂⁴²²Trp→Ala Rezeptoren. Ordinate: Spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Kooperativitätsmodells (siehe Gleichung 2.10). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Steilheitsmaße der abgebildeten Kurven n_H betragen: -1,16^{ns} ± 0,39 (hM₂wt), -0,71^{ns} ± 0,36 (hM₂⁴²²Trp→Ala). ^{ns} n_H nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05).

Rezeptor	pK _A	ΔpK _A (M ₂ -M ₂ ⁴²² Trp→Ala)	pα	pα + pK _A	pEC _{0,5diss}	n
hM ₂	8,03 ± 0,04	-	-0,64 ± 0,07	7,39	7,53	4
hM ₂ ⁴²² Trp→Ala	8,07 ± 0,05	-0,04	-0,77 ± 0,13	7,30	7,30	4

Tabelle 3.38: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit Duo34 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.44). pK_A: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. ΔpK_A: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. pα: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Eine vergleichende Betrachtung der Affinitätswerte von Duo34 an freien Rezeptoren (pK_A) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen M_2 -Wildtyprezeptoren und $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. An beiden Rezeptortypen zeigte sich bezüglich $p\alpha$ eine negative Kooperativität. Dieser Effekt der Hemmung der Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ ist an der Rezeptormutante scheinbar etwas deutlicher ausgeprägt, ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht gefunden werden. Allerdings liefern die ermittelten Kurven kein unteres Plateau, so dass keine sichere Aussage erfolgen kann. Eine Testung höherer Konzentrationen Duo34 war aufgrund zu langer Inkubationszeiten ausgeschlossen worden. Ein Vergleich des experimentell ermittelten $pEC_{0,5\text{diss}}$ -Wertes und dem Produkt $p(\alpha \times K_A)$ ergab auch in diesem Fall keine relevanten Abweichungen. Aus den Daten kann geschlossen werden, dass die Bindung von Duo34 an Radioorthoster-unbesetzten Rezeptoren nicht vom Epitop $M_2^{422}\text{Trp}$ abhängig ist.

3.4.7 Untersuchungen zur Bindung des allosterischen Modulators Duo64

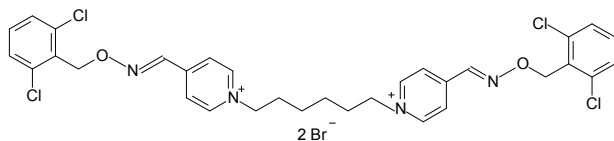


Abbildung 3.45: Strukturformel Duo64.

3.4.7.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Um zu zeigen, dass eine ausgeprägte Verlängerung der Mittelkette innerhalb der Derivate von Duo3 zum Verlust atypischer Eigenschaften und zu einem veränderten Verhalten gegenüber $M_2^{422}\text{Trp}$ im Sinne einer Interaktion führt, wurde im weiteren Verlauf der allosterische Modulator Duo64 (Abbildung 3.45) untersucht. Die Testsubstanz ist verglichen mit Duo3 durch eine Hexamethylenzwischenkette gekennzeichnet. Dementsprechend ist der gewählte Abstand zwischen den geladenen vorliegenden Stickstoffatomen vergleichbar mit demjenigen des Prototyp-Modulators W84. Abbildung 3.46 und Tabelle 3.39 zeigen die experimentellen Befunde.

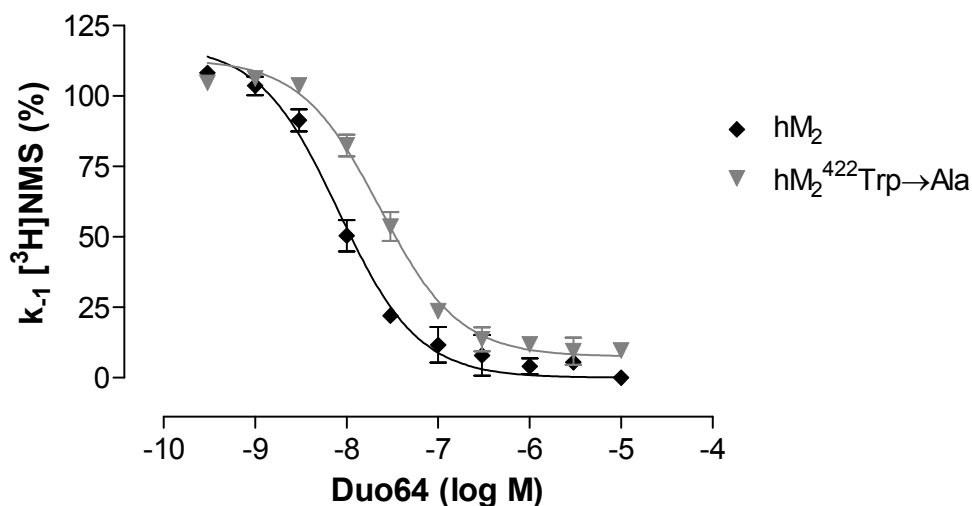


Abbildung 3.46: Interaktion von Duo64 mit hM_2 - und $hM_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k_{-1} (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Rezeptor	$pEC_{0,5diss}$	$\Delta pEC_{0,5diss}$ (M_2 - $M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$)	n_H	Unteres Plateau [%]	n
hM_2	$8,09 \pm 0,07$	-	$-1,06^{ns} \pm 0,09$	$6^{ns} \pm 3$	4
$hM_2^{422}Trp \rightarrow Ala$	$7,64^s \pm 0,06$	0,35	$-1,25^{ns} \pm 0,16$	10 ± 2	4

Tabelle 3.39: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit Duo64 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.46). $pEC_{0,5diss}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [3H]NMS-Dissoziation führt. $\Delta pEC_{0,5diss}$: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. n_H : Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. ^s Der $pEC_{0,5diss}$ -Wert unterscheidet sich signifikant vom $pEC_{0,5diss}$ -Wert an hM_2 (t-Test; $p < 0,05$). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von -1 (n_H) bzw. 0 (unteres Plateau) (F-Test; $p < 0,05$).

Abbildung 3.46 zeigt eine deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve von Duo64 an $M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$ gegenüber M_2 wt. Der Affinitätsverlust betrug 0,35 Dekaden und war somit geringer verglichen mit typischen allosterischen Modulatoren wie W84 oder WDuo3. Eine Analyse des Steilheitsmaßes der Kurve ergab in beiden Fällen einen nicht von -1 abweichenden Wert. Duo64 zeigte somit sowohl an M_2 -Wildtyprezeptoren als auch an $M_2^{422}Trp \rightarrow Ala$ punktmutierten Rezeptoren normale Kurvensteilheiten und somit typische allosterische Eigenschaften. Aus einer individuellen Kurvenanpassung ergab sich hingegen an M_2 -Wildtyprezeptoren eine signifikant von -1 abweichende Kurvensteilheit (n_H : hM_2 : $-1,38 \pm 0,11$). An der untersuchten Rezeptormutante kam es überdies nicht zu einem maximalen dissoziationsverzögernden Effekt (unteres Plateau [%] = 10 ± 2).

3.4.7.2 Bindung an [3H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Die resultierenden Konzentrations-Effekt-Kurven für die Untersuchung von Duo64 in Gleichgewichtsbindungsexperimenten zeigt Abbildung 3.47. Die aus den Versuchen erhaltenen Kenngrößen sind in Tabelle 3.40 aufgelistet.

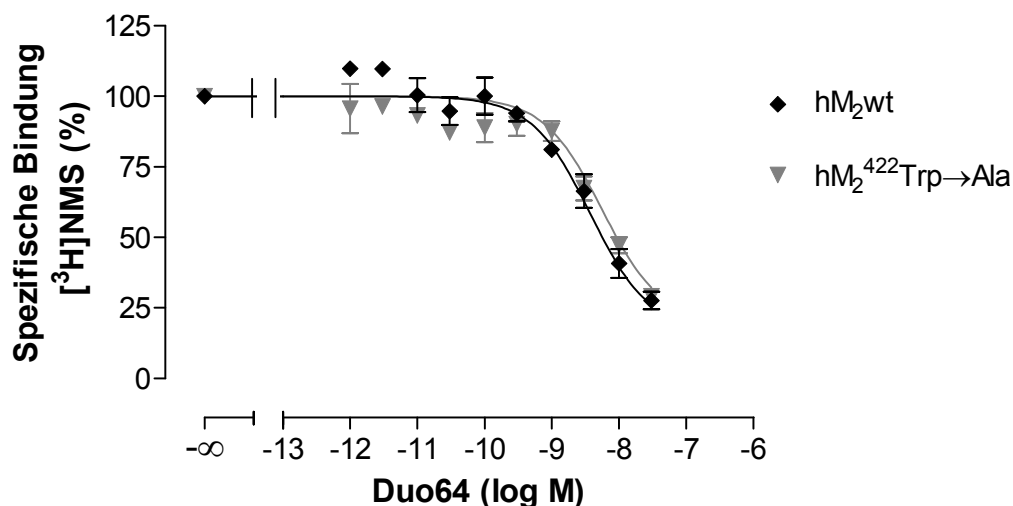


Abbildung 3.47: Einfluss des allosterischen Modulators Duo64 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS (0,2 nM) an hM₂- und hM₂⁴²²Trp→Ala Rezeptoren. Ordinate: Spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Kooperativitätsmodells (siehe Gleichung 2.10). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Steilheitsmaße der abgebildeten Kurven n_H betragen: -0,74^{ns} ± 0,19 (hM₂wt), -0,96^{ns} ± 0,23 (hM₂⁴²²Trp→Ala). ^{ns} n_H nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05).

Rezeptor	pK _A	ΔpK _A (M ₂ -M ₂ ⁴²² Trp→Ala)	pα	pα + pK _A	pEC _{0,5diss}	n
hM ₂	8,66 ± 0,10	-	-0,99 ± 0,08	7,67	8,12	3
hM ₂ ⁴²² Trp→Ala	8,84 ± 0,01	-0,18	-1,29* ± 0,01	7,55	7,64	3

Tabelle 3.40: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit Duo64 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.47). pK_A: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. ΔpK_A: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. pα: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten.

Aus den Daten in Tabelle 3.40 ist ersichtlich, dass bezüglich der Affinität zu freien Rezeptoren keine stärkere Bindungsneigung an der Rezeptormutante resultierte. Die statistische Analyse der experimentellen Daten ließ keine signifikanten Unterschiede erkennen. Eine vergleichende Betrachtung der Kooperativitäten zeigte hingegen eine

signifikant stärker ausgeprägte negative Kooperativität von Duo64 mit dem Orthoster [³H]NMS an M₂⁴²²Trp→Ala-Rezeptoren.

3.5 Einfluss der Epitope $M_2^{89}\text{Trp}$ und $M_2^{99}\text{Trp}$ auf die Bindung typischer und atypischer allosterischer Liganden

Mit $M_2^{422}\text{Tryptophan}$ wurde ein konserviertes Epitop der allosterischen Kernregion identifiziert, das für die Basisaffinität allosterischer Modulatoren von Bedeutung ist (Prilla, 2007). Im vorangegangenen Kapitel wurde der Einfluss dieses Epitops bezüglich des Bindungsverhaltens typischer und atypischer Modulatoren näher betrachtet (siehe Kapitel 3.4). Untersuchungen zur Epitopabhängigkeit an muskarinischen M_1 -Rezeptoren zeigten hingegen neben der korrespondierenden Aminosäure zu $M_2^{422}\text{Tryptophan}$ ($M_1^{400}\text{Trp}$) weitere Epitope auf, die für die Bindung des Prototyp-Allostere Gallamin von Bedeutung waren (Matsui et al., 1995). Zum einen wurde in diesem Zusammenhang die konservierte Aminosäure $M_1^{101}\text{Trp}$ gefunden, die sich im Grenzbereich der dritten transmembranären Domäne und der ersten extrazellulären Schleife befindet. Überdies konnte für das in der ersten extrazellulären Schleife lokalisierte $M_1^{91}\text{Trp}$ ein Beitrag zur Gallamin-Bindung nachgewiesen werden (Matsui et al., 1995). Korrespondierende Aminosäuren des M_2 -Rezeptors sind die konservierten Epitope $M_2^{99}\text{Trp}$ und $M_2^{89}\text{Trp}$ (siehe Alinierung Abbildung 3.48).

hM₁					
	70	80	90	100	110
	NYFLSLAC \bar{A}	DLIIGTFSM \bar{N}	LYTTYLLMGH	WALGTLACD \bar{L}	WLALDYVAS \bar{N}
hM₂					
	70	80	90	100	110
	FLFSLACAD \bar{L}	IIGVF \bar{S} MNLY	TLYTVIGY \bar{W} P	LGPVVC \bar{D} L \bar{W} L	ALDYVVSNA \bar{S}

Abbildung 3.48: Sequenzalinierung des Bereichs der ersten extrazellulären Schleife und der dritten transmembranären Domäne des hM₁- und hM₂-Rezeptors. Hervorgehoben sind die korrespondierenden Aminosäuren $M_1^{91}\text{Trp}/M_2^{89}\text{Trp}$ und $M_1^{101}\text{Trp}/M_2^{99}\text{Trp}$ (graue Hinterlegung). W = Tryptophan. Die Sequenzen (Code hM₁: P11229; Code hM₂: P08172) wurden aus der Swiss-Prot-Informationsdatenbank entnommen (Bonner et al., 1987; Bairoch und Apweiler, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob die Epitope $M_2^{89}\text{Trp}$ und $M_2^{99}\text{Trp}$ an der Bindung allosterischer Modulatoren am muskarinischen M_2 -Rezeptor

beteiligt sind. Diese Vorgehensweise bietet die Möglichkeit, eine Beteiligung der dritten transmembranären Domäne oder der ersten extrazellulären Schleife an der allosterischen Bindung am muskarinischen M_2 -Rezeptor nachzuweisen.

Voruntersuchungen: Bedeutung der Aminosäuren $M_2^{89}\text{Trp}$ und $M_2^{99}\text{Trp}$ im Hinblick auf die Bindung des orthosterischen Radioliganden [^3H]NMS

Vor der Betrachtung der allosterischen Bindungsbeeinflussung wird in diesem Abschnitt der Einfluss der Epitope $M_2^{89}\text{Trp}$ und $M_2^{99}\text{Trp}$ auf die Bindung des orthosterischen Antagonisten [^3H]NMS erläutert. Abbildung 3.49 zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurven, die zugehörigen Kenndaten sind in Tabelle 3.41 dargestellt.

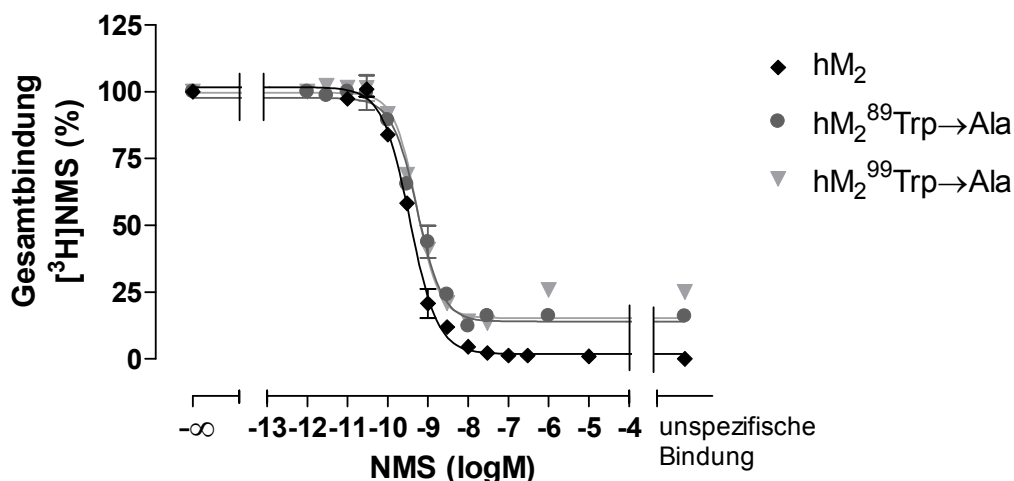


Abbildung 3.49: Homologes Konkurrenzexperiment mit steigenden Konzentrationen NMS in Anwesenheit des Radioliganden [^3H]NMS (0,2 nM) an hM_2 -, $hM_2^{89}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ - und $hM_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. Ordinate: Gesamtbindung des Radioliganden [^3H]NMS (in % bezogen auf den Kontrollwert). Abszisse: Steigende Konzentrationen NMS (log M). Die Durchführung erfolgte in 5 mM Na,K, P_i -Puffer bei 23°C. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 3 μM Atropin bestimmt. Es wurden jeweils 2-3 Versuche in Doppelbestimmung durchgeführt. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler. Der Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ an die Werte angepasst (nichtlineare Regressionsanalyse; Gleichung 2.6 (siehe Kapitel 2.4.2.1.1)).

Die Betrachtung der Kurvenverläufe zeigt keine deutlichen Abweichungen zwischen den verschiedenartigen Rezeptoren an. Auffällig ist jedoch, dass die unspezifische Bindung an $M_2^{89}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ - und $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren im Vergleich zu M_2 -Wildtyprezeptoren deutlich erhöht ist. Dieser Befund kann auf eine geringere Dichte der Bindungsstellen (B_{max}) und einer daraus resultierenden erhöhten

Konzentration der eingesetzten Membransuspension zurückgeführt werden. Ein Vergleich der ermittelten Kenngrößen ergab zudem keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Bindungsaffinität von [³H]NMS (pK_D-Werte). Sowohl an M₂⁸⁹Trp→Ala- als auch bei M₂⁹⁹Trp→Ala-Rezeptoren konnte hingegen eine signifikant niedrigere Geschwindigkeitsdissoziationskonstante gefunden werden. Da diese sich reziprok zur Dissoziationshalbwertszeit verhält, konnte entsprechend eine Verlängerung von t_{1/2off} festgestellt werden. Die Bindungskinetik von [³H]NMS war somit an beiden Rezeptormutanten verlangsamt.

Rezeptor	pK _D	B _{max} [fmol/mg]	k ₋₁ [min ⁻¹]	t _{1/2diss} [min]
hM ₂	9,75 (9,75; 9,75)	3635 (3944; 3326)	0,103 ± 0,004 n = 32	6,99
hM ₂ ⁸⁹ Trp→Ala	9,55 ± 0,06 n = 3	111 ± 49 n = 3	0,049 ^s ± 0,001 n = 8	14,10
hM ₂ ⁹⁹ Trp→Ala	9,79 ± 0,11 n = 3	184 ± 120 n = 3	0,052 ^s ± 0,002 n = 12	13,60

Tabelle 3.41: Auflistung der aus homologen Konkurrenzexperimenten erhaltenen Parameterwerte der NMS-Bindung für hM₂-, hM₂⁸⁹Trp→Ala- und hM₂⁹⁹Trp→Ala-Rezeptore. pK_D: Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante. B_{max}: Dichte der Bindungsstellen. k₋₁: Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation. t_{1/2}: Dissoziationshalbwertszeit. Angeführt sind jeweils die Mittelwerte ± Standardfehler und die Anzahl der Experimente (n). Bei der Durchführung je zweier Versuche in Doppelbestimmung werden sowohl die beiden Einzelwerte der Versuche als auch der resultierende Mittelwert genannt. ^s k₋₁ unterscheidet sich signifikant von k₋₁ an COS7 hM₂ (t-Test; p < 0,05).

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde mit stabil transfizierten FlpInTMCHO-M₂ und FlpInTMCHO-M₂⁹⁹Trp→Ala-Rezeptoren gearbeitet (siehe Kapitel 3.5). Die Betrachtung der Charakterisierung der [³H]NMS-Bindungseigenschaften der beiden Membranhomogenate erfolgt hingegen schon in diesem Abschnitt. In Abbildung 3.50 sind die erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven dargestellt.

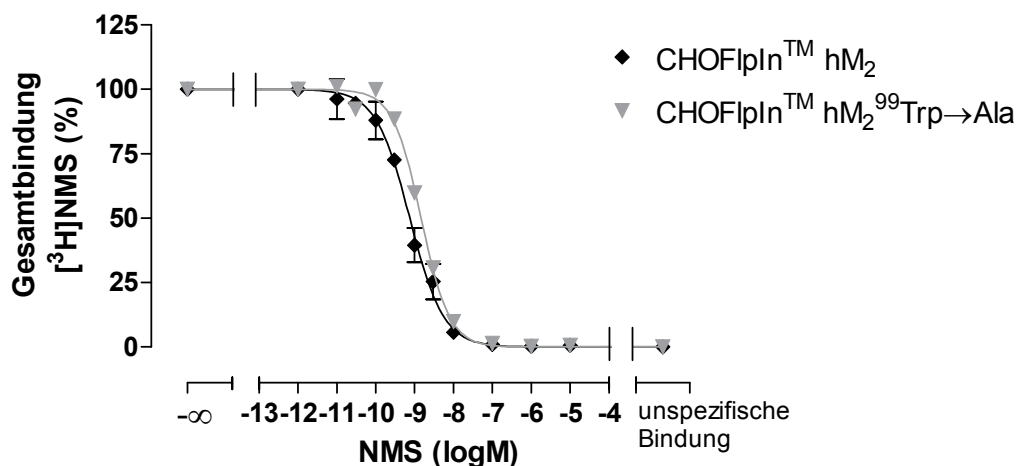


Abbildung 3.50: Homologes Konkurrenzexperiment mit steigenden Konzentrationen NMS in Anwesenheit des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (0,2 nM) an hM_2 - und $\text{hM}_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. Ordinate: Gesamtbindung des Radioliganden $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (in % bezogen auf den Kontrollwert). Abszisse: Steigende Konzentrationen NMS (log M). Die Durchführung erfolgte in 10 mM HEPES-Puffer bei 30°C. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 3 μM Atropin bestimmt. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler. Der Kurvenverlauf wurde mit Hilfe der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ an die Werte angepasst (nichtlineare Regressionsanalyse; Gleichung 2.6 (siehe Kapitel 2.4.2.1.1)).

Tabelle 3.42 zeigt die zugehörigen Kenndaten.

Rezeptor	pK_D	B_{max}
$\text{CHOFlpIn}^{\text{TM}} \text{hM}_2$	$9,23 \pm 0,05$ n = 3	5210 ± 436 n = 3
$\text{CHOFlpIn}^{\text{TM}} \text{hM}_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	$9,05^s \pm 0,03$ n = 3	8550 ± 347 n = 3

Tabelle 3.42: Auflistung der aus homologen Konkurrenzexperimenten erhaltenen Parameterwerte der NMS-Bindung für hM_2 - und $\text{hM}_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. pK_D : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante. B_{max} : Dichte der Bindungsstellen. k_{-1} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation. $t_{1/2}$: Dissoziationshalbwertszeit. Angeführt sind jeweils die Mittelwerte \pm Standardfehler und die Anzahl der Experimente (n). Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung vorgenommen.

Aus der näheren Betrachtung der Kurvenverläufe resultiert eine leichte Rechtsverschiebung der an $\text{CHOFlpIn}^{\text{TM}} \text{hM}_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren ermittelten Kurve. Daraus ergibt sich für $[^3\text{H}]\text{NMS}$ im Gegensatz zum 5 mM Na,K, P_i -Puffer ein signifikanter Affinitätsverlust an der Rezeptormutante (pK_D). Insgesamt werden im HEPES-Puffer im Vergleich zum Na,K, P_i -Puffer erniedrigte pK_D -Werte gefunden.

3.5.1 Untersuchungen zur Bindung des typischen allosterischen Modulators WDuo3

3.5.1.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Um zunächst die Wirksamkeit der eingesetzten Modulatoren an mit dem Radioorthoster besetzten Rezeptoren zu bestimmen, wurden wie bereits in vorangehenden Kapiteln dieser Arbeit beschrieben, Zweipunkt-Dissoziationsexperimente durchgeführt. Abbildung 3.51 zeigt den Einfluss der Epitope M₂⁸⁹Trp und M₂⁹⁹Trp auf die Wirksamkeit des typischen allosterischen Modulators WDuo3 im Vergleich zu nicht modifizierten Rezeptorproteinen. In Tabelle 3.43 sind die aus den Kurvenverläufen ermittelten Kenngrößen dargestellt.

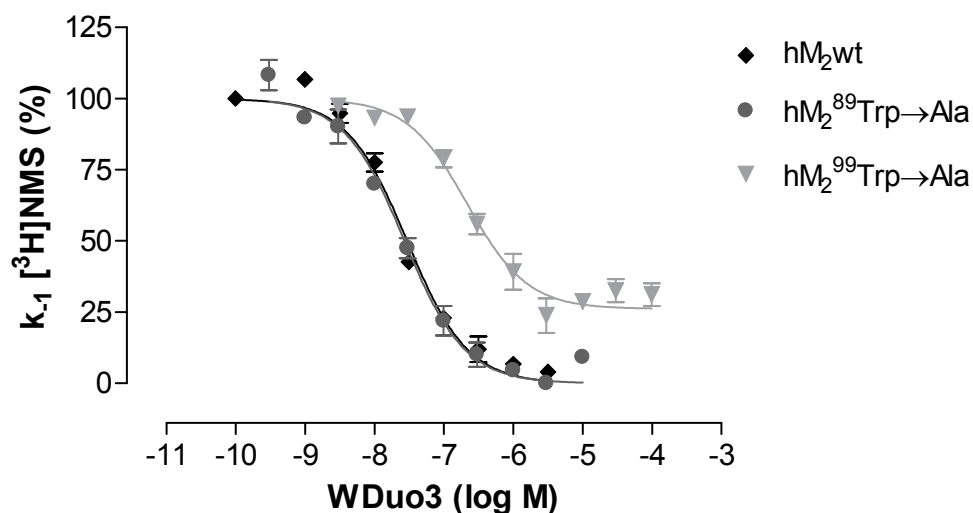


Abbildung 3.51: Interaktion von WDuo3 mit hM₂⁻, hM₂⁸⁹Trp→Ala- und hM₂⁹⁹Trp→Ala-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k_{-1} (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4-5 unabhängigen Experimenten.

Es wird eine deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve von WDuo3 an M₂⁹⁹Trp→Ala-Rezeptoren ersichtlich, während die Kurvenverläufe an M₂-Wildtyprezeptoren und M₂⁸⁹Trp→Ala-Rezeptoren deckungsgleich verlaufen. Der Austausch von M₂⁹⁹Tryptophan in TM3 gegen die neutrale Aminosäure Alanin ergab

somit einen signifikanten Wirksamkeitsverlust der Testsubstanz ($\Delta pEC_{0,5diss} = 0.87$), wohingegen ein Austausch von $M_2^{89}Trp$ zu keiner Beeinflussung der Bindung des typischen allosterischen Modulators führte. Zudem konnte an $M_2^{99}Trp \rightarrow Ala$ -Rezeptoren auch bei hohen Modulatorkonzentrationen keine vollständige Verzögerung der Dissoziation des Radioliganden erreicht werden (unteres Plateau [%] = 28 ± 3). Eine Betrachtung der Kurvensteilheiten ergab an allen untersuchten Rezeptoren ein Steilheitsmaß n_H von -1. Eine Änderung der typischen Eigenschaften des Modulators WDuo3 war demnach nicht zu erkennen. Zusammenfassend konnte für WDuo3 eine deutliche Abhängigkeit bezüglich des TM3-Epitops $M_2^{99}Trp$ nachgewiesen werden.

Rezeptor	$pEC_{0,5diss}$	$\Delta pEC_{0,5diss}$ ($M_2 - M_{2mut}$)	n_H	Unteres Plateau [%]	n
hM_2	$7,53 \pm 0,04$	-	$-1,07^{ns} \pm 0,08$	$6^{ns} \pm 2$	5
$hM_2^{89}Trp \rightarrow Ala$	$7,57 \pm 0,05$	-0,04	$-0,95^{ns} \pm 0,09$	$2^{ns} \pm 4$	4
$hM_2^{99}Trp \rightarrow Ala$	$6,66^s \pm 0,07$	0,87	$-1,21^{ns} \pm 0,19$	28 ± 3	4

Tabelle 3.43: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit WDuo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.51). $pEC_{0,5diss}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [3H]NMS-Dissoziation führt. $\Delta pEC_{0,5diss}$: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. n_H : Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4-5 unabhängigen Experimenten. ^s Der $pEC_{0,5diss}$ -Wert unterscheidet sich signifikant vom $pEC_{0,5diss}$ -Wert an hM_2 (t-Test; $p < 0,05$). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von -1 (n_H) bzw. 0 (unteres Plateau) (F-Test; $p < 0,05$).

3.5.1.2 Bindung an [³H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

In allosterischen Interaktionsexperimenten wurden die Affinitäten zu freien Rezeptorproteinen sowie die Kooperativitätswerte bestimmt. Abbildung 3.52 und Tabelle 3.44 veranschaulichen die erhaltenen Kurvenverläufe und die zugehörigen Parameter. Aus Tabelle 3.44 ist ersichtlich, dass die Kurvenverläufe von WDuo3 an M₂-Wildtyprezeptoren und M₂⁸⁹Trp→Ala-Rezeptoren nahezu deckungsgleich sind. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Affinität und der Kooperativität, die durch ein neutrales bis leicht positiv kooperatives Verhalten gekennzeichnet ist. An M₂⁹⁹Trp→Ala-Rezeptoren konnte gegenüber M₂-Wildtyprezeptoren hingegen ein signifikanter Affinitätsverlust von 0,7 Dekaden gefunden werden. Eine Betrachtung der Kooperativität ergab eine Hemmung der Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS durch WDuo3 ($\rho\alpha < 0$), folglich resultierte gegenüber M₂-Wildtyprezeptoren ($\rho\alpha > 0$) ein verändertes kooperatives Verhalten. Somit kann auch an freien M₂-Rezeptorproteinen ein Einfluss des Epitops M₂⁹⁹Trp auf die Bindung des typischen allosterischen Modulators WDuo3 gefunden werden.

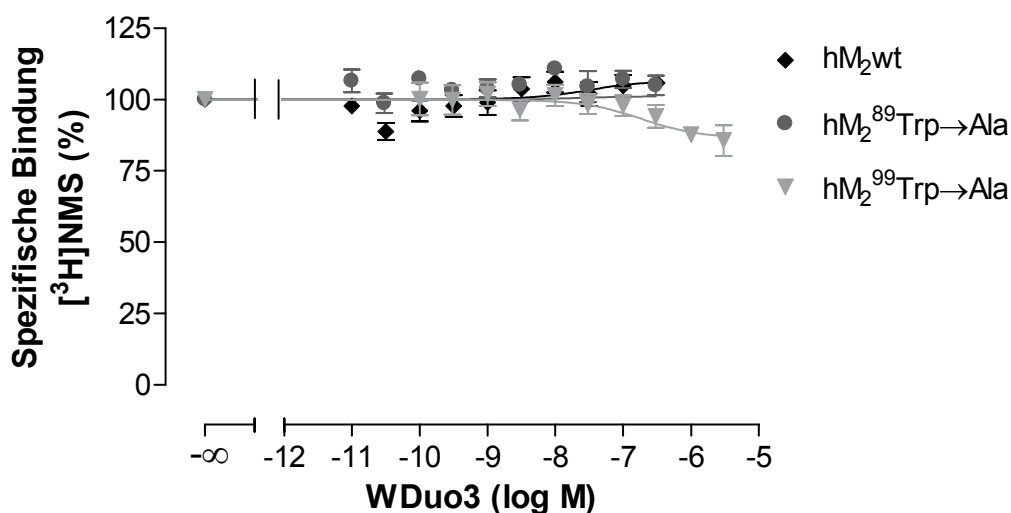


Abbildung 3.52: Einfluss des typischen allosterischen Modulators WDuo3 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS (0,2 nM) an hM₂-, hM₂⁸⁹Trp→Ala- und hM₂⁹⁹Trp→Ala-Rezeptoren. Ordinate: Spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der modifizierten Ehlert-Gleichung mit $K_A = EC_{0,5diss}/\alpha$ (siehe Kapitel 2.4.2.3.1). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Rezeptor	pK_A	ΔpK_A (M_2 - M_{2mut})	$p\alpha$	$p\alpha + pK_A$	$pEC_{0,5diss}$	n
hM ₂	7,47* ± 0,02	-	0,06 ± 0,02	-	7,53	4
hM ₂ ⁸⁹ Trp→Ala	7,55* ± 0,01	-0,08	0,02 ± 0,01	-	7,57	4
hM ₂ ⁹⁹ Trp→Ala	6,79 ^s ± 0,01	0,68	-0,13 [#] ± 0,01	-	6,66	4

Tabelle 3.44: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit WDuo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.52). pK_A : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. ΔpK_A : Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. $p\alpha$: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α . n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. * Auswertung nach der modifizierten Ehlert-Gleichung mit $K_A = EC_{0,5diss}/\alpha$ (siehe Kapitel 2.4.2.3.1). ^s Der pK_A -Wert unterscheidet sich signifikant vom pK_A -Wert an hM₂ (t-Test; $p < 0,05$). [#] $p\alpha$ unterscheidet sich signifikant von $p\alpha$ an hM₂ (t-Test; $p < 0,05$).

3.5.2 Untersuchungen zur Bindung des atypischen allosterischen Modulators Duo3

3.5.2.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Die aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten erhaltenen Ergebnisse mit dem atypischen Modulator Duo3 veranschaulicht Abbildung 3.53. Tabelle 3.45 stellt die zugehörigen Kenngrößen zusammenfassend dar.

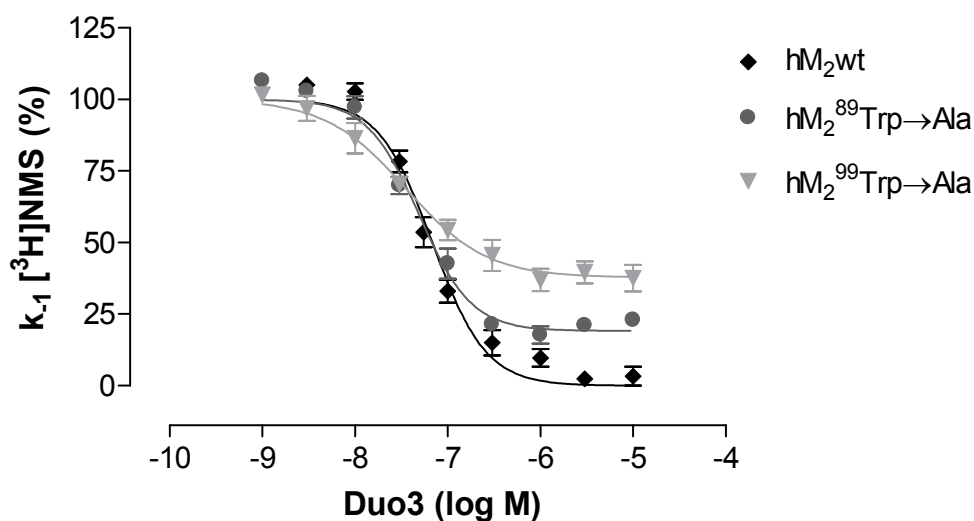


Abbildung 3.53: Interaktion von Duo3 mit hM₂-, hM₂⁸⁹Trp→Ala- und hM₂⁹⁹Trp→Ala-Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k_{-1} (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Aus den abgebildeten Kurvenverläufen wird ersichtlich, dass sich bezüglich der Affinitätswerte keine relevanten Unterschiede ergaben. Eine statistische Analyse zeigte keine signifikante Abweichung der Affinität an M₂⁸⁹Trp gegenüber M₂-Wildtyprezeptoren. An M₂⁹⁹Trp konnte hingegen ein statistisch signifikanter Affinitätsgewinn von 0,3 Dekaden festgestellt werden. Die biologische Relevanz dieses Befundes ist jedoch fraglich. Eine vergleichende Betrachtung der Kurvensteilheiten ergab am Wildtyprezeptor und der Mutante M₂⁸⁹Trp→Ala ein Steilheitsmaß $n_H < -1$. Demgegenüber konnte an der M₂⁹⁹Trp→Ala-Mutante eine

normal steile Kurve gefunden werden ($n_H = -1$). Überdies wurde für diese Rezeptoren eine signifikante Abweichung des unteren Plateaus von 0% gefunden (unteres Plateau [%] = 38 ± 2). Selbst durch den Einsatz hoher Modulatorkonzentrationen kann keine vollständige Verzögerung der [^3H]NMS-Dissoziation erreicht werden. Abbildung 3.53 zeigt weiterhin, dass Duo3 die Radioligand-Dissoziation auch an $\text{M}_2^{89}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ -Rezeptoren nicht komplett unterbinden kann. Das Ausmaß dieses Effekts ist jedoch schwächer ausgeprägt als an $\text{M}_2^{99}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ -Rezeptoren. Vor dem Hintergrund der experimentell ermittelten Daten kann somit geschlossen werden, dass die Bindung des atypischen Modulators Duo3 durch den Austausch des M_2^{99} Tryptophans gegen die neutrale Aminosäure Alanin weniger beeinflusst wird als die Bindung des typischen Modulators W Duo3. Der Effekt einer unvollständigen Dissoziationsverzögerung des Radioliganden selbst bei hohen Modulatorkonzentrationen an der $\text{M}_2^{99}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ -Rezeptormutante kann wie bei W Duo3 auch im Fall von Duo3 festgestellt werden.

Rezeptor	$\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$	$\Delta\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ ($\text{M}_2\text{-M}_{2\text{mut}}$)	n_H	Unteres Plateau [%]	n
hM_2	$7,17 \pm 0,03$	-	$-1,50^* \pm 0,17$	$6^{\text{ns}} \pm 2$	4
$\text{hM}_2^{89}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$	$7,31 \pm 0,05$	-0,14	$-1,54^* \pm 0,21$	$19,13 \pm 2,14$	4
$\text{hM}_2^{99}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$	$7,45^{\text{s}} \pm 0,08$	-0,28	$-1,02^{\text{ns}} \pm 0,19$	$37,70 \pm 2,22$	4

Tabelle 3.45: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit Duo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.53). $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [^3H]NMS-Dissoziation führt. $\Delta\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. n_H : Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. ^s Der $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Wert unterscheidet sich signifikant vom $\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$ -Wert an hM_2 (t-Test; $p < 0,05$). ^{*} n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; $p < 0,05$). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von -1 (n_H) bzw. 0 (unteres Plateau) (F-Test; $p < 0,05$).

3.5.2.2 Bindung an [³H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

In Analogie zu Kapitel 3.5.1.2 wurden auch mit Duo3 allosterische Interaktionsexperimente durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 3.54 und Tabelle 3.46 gezeigt werden.

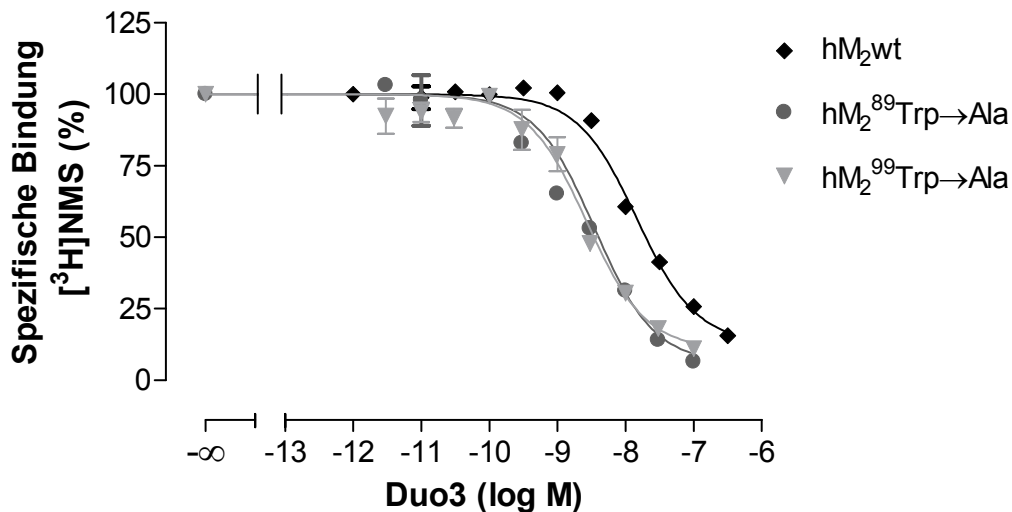


Abbildung 3.54: Einfluss des atypischen allosterischen Modulators Duo3 auf die Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS (0,2 nM) an hM₂, hM₂⁸⁹Trp→Ala- und hM₂⁹⁹Trp→Ala-Rezeptoren. Ordinate: Spezifische Bindung von [³H]NMS bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Kooperativitätsmodells (siehe Gleichung 2.10). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Steilheitsmaße der abgebildeten Kurven n_H betragen: -1,16^{ns} ± 0,11 (hM₂wt), -0,62 ± 0,06 (hM₂⁸⁹Trp→Ala), -1,13^{ns} ± 0,19 (hM₂⁹⁹Trp→Ala). ^{ns} n_H nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05).

An beiden betrachteten Mutanten (M₂⁸⁹Trp und M₂⁹⁹Trp) ergab sich für Duo3 ein signifikanter Affinitätsgewinn gegenüber M₂-Wildtyprezeptoren. In beiden Fällen resultierte zudem eine etwas stärker ausgeprägte negative Kooperativität verglichen mit nicht punktmutierten Rezeptoren, wobei für pα an M₂⁸⁹Trp-Rezeptoren eine signifikante Abweichung gefunden werden konnte (siehe Tabelle 3.46). Eine biologisch relevante Änderung des kooperativen Verhaltens konnte hingegen nicht beobachtet werden.

Rezeptor	pK_A	ΔpK_A (M_2 - M_{2mut})	$p\alpha$	$p\alpha + pK_A$	$pEC_{0,5diss}$	n
hM ₂	8,12 ± 0,03	-	-1,17 ± 0,03	6,95	7,17	4
hM ₂ ⁸⁹ Trp→Ala	8,64 ^s ± 0,08	-0,52	-1,43 [*] ± 0,10	7,21	7,31	4
hM ₂ ⁹⁹ Trp→Ala	8,87 ^s ± 0,01	-0,75	-1,27 ± 0,03	7,60	7,45	4

Tabelle 3.46: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit Duo3 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.54). pK_A : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. ΔpK_A : Differenz der an Wildtyp- und punktmultierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. $p\alpha$: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α . n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. ^s Der pK_A -Wert unterscheidet sich signifikant vom pK_A -Wert an hM₂ (t-Test; $p < 0,05$). ^{*} $p\alpha$ unterscheidet sich signifikant von $p\alpha$ an hM₂ (t-Test; $p < 0,05$).

3.5.3 Untersuchungen zur Bindung des allosterischen Modulators Duo64

3.5.3.1 Bindung an [³H]NMS-besetzte Rezeptoren

Im weiteren Verlauf wurde exemplarisch überprüft, ob für Duo64 eine Epitopabhängigkeit bezüglich $M_2^{99}\text{Trp}$ besteht. Die aus Dissoziationsbindungsexperimenten ermittelten Kurvenverläufe zeigt Abbildung 3.55. In Tabelle 3.47 sind die zugehörigen Kenngrößen zusammenfassend dargestellt.

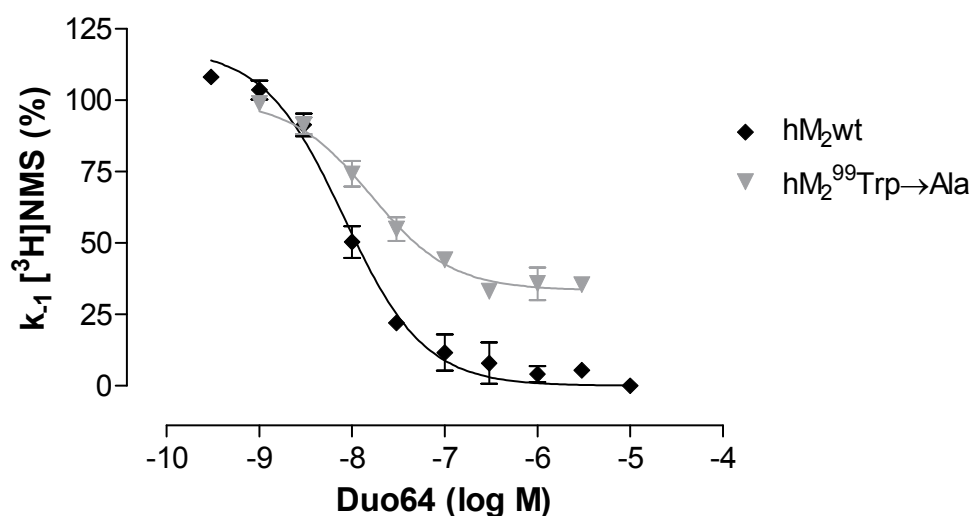


Abbildung 3.55: Interaktion von Duo64 mit hM_2 -, $hM_2^{89}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ - und $hM_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren, deren orthosterische Bindungsstelle mit [³H]NMS blockiert ist. Dargestellt ist die Dissoziationsverzögerung von [³H]NMS durch den allosterischen Modulator. Ordinate: Apparente Geschwindigkeitsdissoziationskonstante k_{-1} (in Prozent bezogen auf den Kontrollwert ohne Substanz-Zusatz). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Zweipunkt-Dissoziationsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten.

Es zeigt sich eine deutliche Rechtsverschiebung der Konzentrations-Effekt-Kurve der Testsubstanz an $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. Die statistische Analyse ergab einen signifikanten Unterschied im Hinblick auf den Wirksamkeitsverlust an der Rezeptormutante. Dieser Befund zeigt deutlich, dass die Bindung von Duo64 durch den Austausch des M_2^{99} -Tryptophans durch Alanin beeinflusst wird. Die Betrachtung der Kurvensteilheiten ergab sowohl an M_2 -Wildtyprezeptoren als auch an der Rezeptormutante normal steile Kurvenverläufe, signifikante Unterschiede konnten

nicht beobachtet werden. Demgegenüber zeigte sich an $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren ein signifikant von 0% verschiedenes unteres Kurvenplateau (unteres Plateau [%] = 33 ± 2). Die Dissoziation des Radioliganden konnte selbst durch den Einsatz hoher Duo64-Konzentrationen nicht vollständig gehemmt werden. Im Hinblick auf Duo64 kann somit erneut gefolgert werden, dass eine Epitopabhängigkeit bezüglich $M_2^{99}\text{Trp}$ besteht. Das Ausmaß der Abhängigkeit ist in Analogie zu den mit $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren erhaltenen Befunden gegenüber WDuo3 geringer, im Vergleich zu Duo3 hingegen stärker ausgeprägt.

Rezeptor	$pEC_{0,5diss}$	$\Delta pEC_{0,5diss}$ (M_2 - M_{2mut})	n_H	Unteres Plateau [%]	n
hM_2	$8,09 \pm 0,07$	-	$-1,06^{ns} \pm 0,09$	$5^{ns} \pm 2$	4
$hM_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	$7,80^s \pm 0,07$	0,29	$-1,14^{ns} \pm 0,17$	33 ± 2	4

Tabelle 3.47: Vergleich der aus Zweipunkt-Dissoziationsexperimenten mit Duo64 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.53). $pEC_{0,5diss}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators, die zu einer halbmaximalen Verzögerung der [^3H]NMS-Dissoziation führt. $\Delta pEC_{0,5diss}$: Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. n_H : Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. ^s Der $pEC_{0,5diss}$ -Wert unterscheidet sich signifikant vom $pEC_{0,5diss}$ -Wert an hM_2 (t-Test; $p < 0,05$). ^{ns} Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant von -1 (n_H) bzw. 0 (unteres Plateau) (F-Test; $p < 0,05$).

3.5.3.2 Bindung an [^3H]NMS-unbesetzte Rezeptoren

Die in heterologen Interaktionsexperimenten mit Duo64 erhobenen Daten veranschaulicht Abbildung 3.56. Die aus den Kurvenverläufen erhaltenen Kenngrößen werden in Tabelle 3.48 zusammenfassend dargestellt. Eine vergleichende Betrachtung der Kenngrößen zeigte an der Rezeptormutante keine signifikante Affinitätsänderung. An $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren konnte eine stärkere Hemmung der Gleichgewichtsbindung von [^3H]NMS durch den Modulator Duo64 beobachtet werden als am M_2 -Wildtyprezeptor. Dementsprechend war $p\alpha$ an der Rezeptormutante signifikant stärker negativ. Zusammenfassend kann auch an freien Rezeptorproteinen ein Einfluss des Epitops $M_2^{99}\text{Trp}$ auf das Bindungsverhalten von Duo64 gefunden werden.

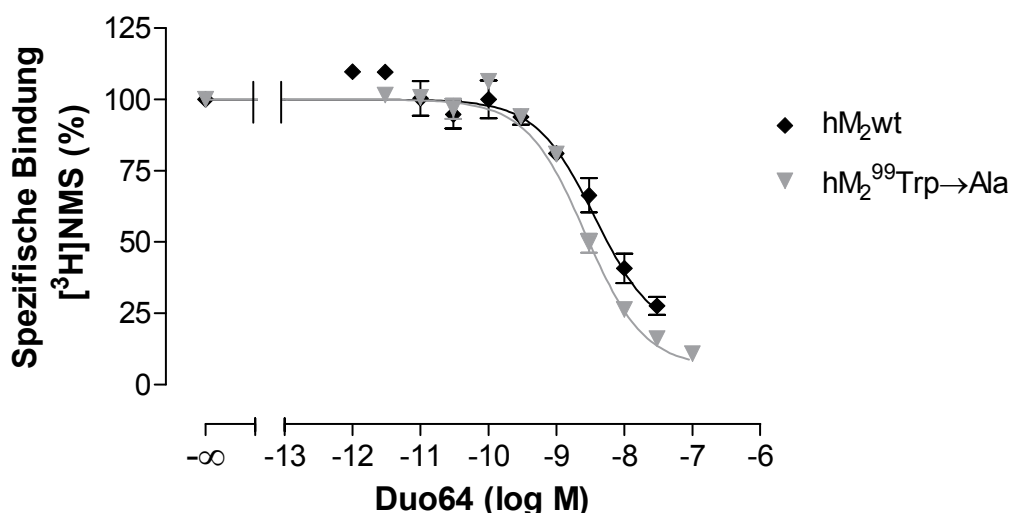


Abbildung 3.56: Einfluss des allosterischen Modulators Duo64 auf die Gleichgewichtsbindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ (0,2 nM) an hM_2 - und $\text{hM}_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. Ordinate: Spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bezogen auf die spezifische Bindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration des allosterischen Modulators (log M). Die Durchführung der Gleichgewichtsbindungsexperimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand des Kooperativitätsmodells (siehe Gleichung 2.10). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. Die Steilheitsmaße der abgebildeten Kurven n_H betragen: $-0,74^{\text{ns}} \pm 0,19$ (hM_2wt), $-1,27 \pm 0,12$ ($\text{hM}_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$). ^{ns} n_H nicht signifikant verschieden von -1 (F-Test; $p < 0,05$).

Rezeptor	pK_A	ΔpK_A ($\text{M}_2\text{-M}_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$)	$\text{p}\alpha$	$\text{p}\alpha + \text{pK}_A$	$\text{pEC}_{0,5\text{diss}}$	n
hM_2	$8,66 \pm 0,10$	-	$-0,99 \pm 0,08$	7,67	8,12	4
$\text{hM}_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	$8,88 \pm 0,02$	-0,22	$-1,56^* \pm 0,07$	7,32	7,80	4

Tabelle 3.48: Vergleich der aus heterologen Interaktionsexperimenten mit Duo64 erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.56). pK_A : Negativer dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators. ΔpK_A : Differenz der an Wildtyp- und punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. $\text{p}\alpha$: Negativer dekadischer Logarithmus des Kooperativitätsfaktors α . n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. * $\text{p}\alpha$ unterscheidet sich signifikant vom $\text{p}\alpha$ an hM_2 (t-Test; $p < 0,05$).

3.6 Einfluss der Epitope M₂⁸⁹Trp und M₂⁹⁹Trp auf die Bindung und G-Protein-Kopplung von Agonisten und Partialagonisten am muskarinischen M₂-Rezeptor

Im vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass das Epitop M₂⁹⁹Trp von großer Bedeutung für die Bindung typischer allosterischer Modulatoren ist. Zudem konnte in einigen Fällen sowohl an M₂⁸⁹Trp→Ala- als auch an M₂⁹⁹Trp→Ala-Rezeptoren eine unvollständige Dissoziationsverzögerung nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.5). In diesem Abschnitt sollte überprüft werden, ob die Bindung des Agonisten Acetylcholin sowie diejenige des Partialagonisten Pilocarpin ebenfalls von den Aminosäuren M₂⁸⁹Trp und M₂⁹⁹Trp abhängt. In früheren Arbeiten konnte bereits eine Beteiligung der dritten transmembranären Domäne an der orthosterischen Bindung an muskarinischen Rezeptoren nachgewiesen werden (Matsui et al., 1995; Page et al., 1995; Lu et al., 1997; Hulme und Lu, 1998; Heitz et al., 1999). Bei Vorliegen einer solchen Epitopabhängigkeit sollte im Folgenden der Einfluss dieser Epitope auf die G-Protein-Kopplung mit Hilfe von [³⁵S]GTPγS-Versuchen ermittelt werden.

3.6.1 Heterologe Konkurrenzexperimente

Der Einfluss der Epitope M₂⁸⁹Trp und M₂⁹⁹Trp auf die Bindung von orthosterischen Agonisten und Partialagonisten wurde mit Hilfe heterologer Konkurrenzexperimente untersucht.

3.6.1.1 Acetylcholin

Abbildung 3.57 zeigt die Bedeutung der Epitope für die Bindung des orthosterischen Agonisten Acetylcholin. In Tabelle 3.49 sind die relevanten Kenndaten, die aus den Kurvenverläufen erhalten wurden, zusammenfassend dargestellt.

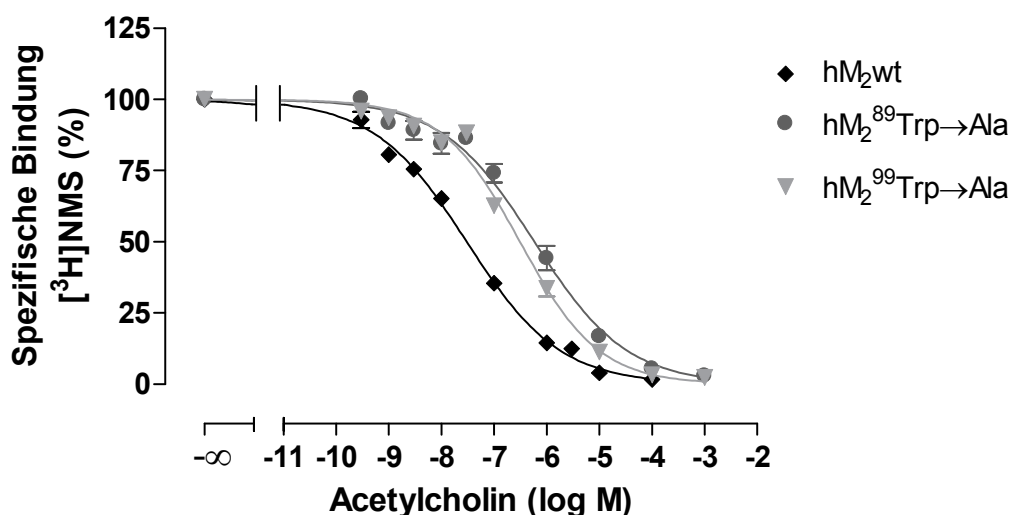


Abbildung 3.57: Einfluss der Epitope $M_2^{89}\text{Trp}$ und $M_2^{99}\text{Trp}$ auf die Bindungsaffinität des Agonisten Acetylcholin. Ordinate: Spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bezogen auf die spezifische Gesamtbindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration von Acetylcholin (log M). Die Durchführung der Experimente erfolgte in 5 mM Na,K, P_i -Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten.

Rezeptor	hM_2	$hM_2^{89}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$	$hM_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$
pK_{app}	8,10 (8,08; 8,11)	$6,09^s \pm 0,03$	$6,66^s \pm 0,06$
$\Delta pK_{app} (M_2.M_{mut})$	-	2,01	1,44
n_H	-0,47* (-0,46; -0,47)	$-0,57^* \pm 0,05$	$-0,54^* \pm 0,04$
n	2	3	3

Tabelle 3.49: Vergleich der aus heterologen Konkurrenzexperimenten mit Acetylcholin erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.57). pK_{app} : Negativer dekadischer Logarithmus der apparenten Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_{app} . ΔpK_{app} : Differenz der an Wildtyp- und an punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. n_H : Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten. ^s Der pK_{app} -Wert unterscheidet sich signifikant vom pK_{app} -Wert an hM_2 (t-Test; $p < 0,05$). * n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; $p < 0,05$).

Die Betrachtung der Kurvenverläufe zeigt einen deutlichen Affinitätsverlust des Agonisten an $M_2^{89}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ - und $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren gegenüber M_2 -Wildtyprezeptoren an. Die Unterschiede sind in beiden Fällen signifikant, die Differenzen der Werte der apparenten Gleichgewichtskonstanten (ΔpK_{app}) ergaben für $M_2^{89}\text{Trp}$ 2,0 Dekaden, für $M_2^{99}\text{Trp}$ 1,4 Dekaden. Die vergleichende Betrachtung der Kurvensteilheiten zeigte in allen Fällen ein von -1 abweichendes Steilheitsmaß ($n_H > -1$) und entsprechend flache Kurvenverläufe. Zusammenfassend kann für die in der ersten extrazellulären Schleife ($M_2^{89}\text{Trp}$) und der dritten transmembranären Domäne ($M_2^{99}\text{Trp}$) lokalisierten Aminosäuren eine Beteiligung an der Bindung des Agonisten Acetylcholin gezeigt werden.

3.6.1.2 Pilocarpin

In Analogie zu Kapitel 3.6.1.1 wurde der Partialagonist Pilocarpin hinsichtlich der Epitopabhängigkeit untersucht. Eine Darstellung der ermittelten Kurvenverläufe erfolgt in Abbildung 3.58, die zugehörigen Kenngrößen veranschaulicht Tabelle 3.50.

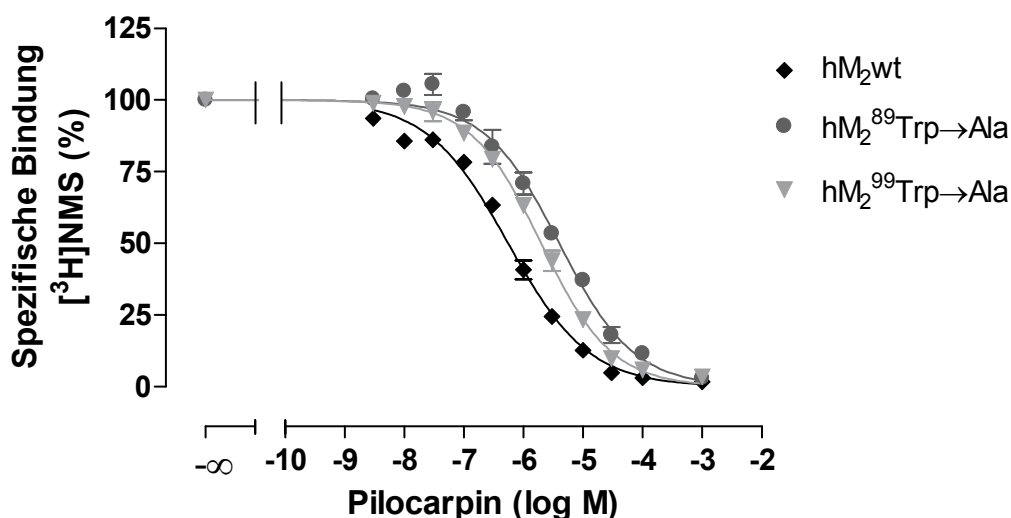


Abbildung 3.58: Einfluss der Epitope $M_2^{89}\text{Trp}$ und $M_2^{99}\text{Trp}$ auf die Bindungsaffinität des Partialagonisten Pilocarpin. Ordinate: Spezifische Bindung von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ bezogen auf die spezifische Gesamtbindung in Abwesenheit der Testsubstanz (%). Abszisse: Dekadischer Logarithmus der Konzentration von Acetylcholin (log M). Die Durchführung der Experimente erfolgte in 5 mM Na,K,P_i-Puffer bei 23°C. Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten.

Rezeptor	hM ₂	hM ₂ ⁸⁹ Trp→Ala	hM ₂ ⁹⁹ Trp→Ala
pK _{app}	6,76 (6,82; 6,70)	5,64 ^s ± 0,04	5,73 ^s ± 0,05
ΔpK _{app} (M ₂ -M _{mut})	-	1,12	1,03
n _H	-0,69* (-0,69; -0,68)	-0,69* ± 0,04	-0,77* ± 0,01
n	2	3	3

Tabelle 3.50: Vergleich der aus heterologen Konkurrenzexperimenten mit Pilocarpin erhaltenen Kenngrößen (siehe Abbildung 3.58). pK_{app}: Negativer dekadischer Logarithmus der apparenten Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_{app}. ΔpK_{app}: Differenz der an Wildtyp- und an punktmutierten Rezeptoren gefundenen Affinitätswerte. n_H: Steilheitsmaß der Kurve. n: Anzahl der durchgeführten Versuche. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler aus 2-3 unabhängigen Experimenten. ^s Der pK_{app}-Wert unterscheidet sich signifikant vom pK_{app}-Wert an hM₂ (t-Test; p < 0,05). * n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05).

Aus der Analyse der Kenngrößen resultierte auch für den Partialagonisten Pilocarpin ein signifikanter Affinitätsverlust von ca. einer Dekade an beiden Rezeptormutanten gegenüber nicht punktmutierten M₂-Rezeptoren. Das Steilheitsmaß der Kurve war in allen Fällen signifikant größer als -1 und es resultierten flache Konzentrations-Effekt-Kurven. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Bindung des Partialagonisten Pilocarpin von den Epitopen M₂⁸⁹Trp und M₂⁹⁹Trp abhängig ist. Die Befunde stehen im Gegensatz zu früheren Ergebnissen, die eine Beteiligung von M₂⁹⁹Trp an der Bindung des Partialagonisten nicht belegen konnten (Heitz et al., 1999).

3.6.2 Untersuchungen zum Einfluss des Epitops $M_2^{99}\text{Trp}$ auf die G-Protein-Kopplung am muskarinischen M_2 -Rezeptor

Im Rahmen des vorangegangenen Kapitels konnte sowohl für das konservierte Epitop der ersten extrazellulären Schleife $M_2^{89}\text{Trp}$ als auch für $M_2^{99}\text{Trp}$ aus der dritten transmembranären Domäne eine Bedeutung für die Bindung orthosterischer Agonisten und Partialagonisten nachgewiesen werden. Aufgrund der darüber hinausgehenden Relevanz des Epitops $M_2^{99}\text{Trp}$ für die allosterische Bindung wurde für diese Aminosäure exemplarisch der Einfluss auf die intrinsische Aktivität von Agonisten und Partialagonisten in $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Experimenten ermittelt. In Untersuchungen des muskarinischen M_1 -Rezeptors wurde gefunden, dass die korrespondierende Aminosäure $M_1^{101}\text{Trp}$ (siehe Abbildung 3.48) Teil des hydrophoben Käfigs ist, in dem die Bindung orthosterischer Liganden wie beispielsweise Acetylcholin erfolgt (Matsui et al., 1995). Im vorangegangenen Kapitel wurde bestätigt, dass das Epitop $M_2^{99}\text{Trp}$ einen hohen Beitrag zur Bindung der orthosterischen Liganden Acetylcholin und Pilocarpin leistet. Es sollte daher im weiteren Verlauf überprüft werden, ob ein Austausch des $M_2^{99}\text{Tryptophans}$ gegen die neutrale Aminosäure Alanin den Effekt von Agonisten und Partialagonisten beeinflusst und eine Änderung der G-Protein-Kopplung hervorruft.

3.6.2.1 Einfluss Rezeptor-sättigender Konzentrationen verschiedener Liganden auf die basale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an M_2 - und $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren

Zu Beginn wurde der Einfluss verschiedener orthosterischer und allosterischer Liganden auf die basale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an M_2 -Wildtyprezeptoren und $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren untersucht und miteinander verglichen. Zu diesem Zweck wurden die Testsubstanzen in Rezeptor-sättigenden Konzentrationen eingesetzt. Die ermittelten Ergebnisse sind in Abbildung 3.59 und Tabelle 3.51 zusammenfassend dargestellt. Die vergleichende Betrachtung der Änderung der basalen $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an M_2 -Wildtyp- und $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren ergab für die Vollagonisten Acetylcholin und Oxotremorin M eine deutliche Steigerung über das Niveau der basalen Bindung hinaus. Für Pilocarpin wurde verglichen mit den beiden Vollagonisten sowohl an Wildtyprezeptoren als auch an punktmutierten

Rezeptorproteinen ein partialagonistisches Verhalten gefunden. An M_2 -Wildtyprezeptoren konnte für Alcuronium eine signifikante Senkung der basalen [35 S]GTP γ S-Bindung beobachtet werden. Der allosterische Modulator verhielt sich an M_2 -Rezeptoren als inverser Agonist. Demgegenüber wurde die basale [35 S]GTP γ S-Bindung an M_2^{99} Trp \rightarrow Ala-Rezeptoren sowohl durch Atropin als auch durch Alcuronium gesteigert. Zusammenfassend betrachtet kann ein Einfluss auf die basale Bindung durch den Austausch von M_2^{99} Tryptophan zu Alanin ausschließlich im Hinblick auf Alcuronium gefunden werden.

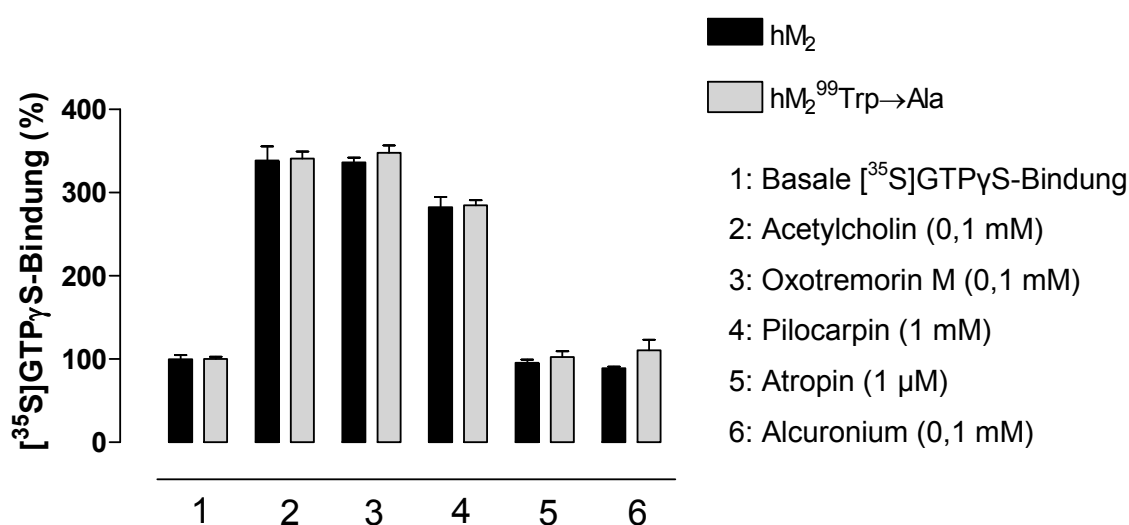


Abbildung 3.59: Vergleich der Effekte Rezeptor-sättigender Konzentrationen verschiedener Liganden an muskarinischen CHOFlpInTM M_2 - und CHOFlpInTM M_2^{99} Trp \rightarrow Ala-Rezeptoren. Ordinate: [35 S]GTP γ S-Bindung bezogen auf die basale Bindung (%). Abszisse: Testsubstanzen (siehe Legende). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2 unabhängigen Experimenten (8 Einzelversuche).

Rezeptor	Basale Bindung	Acetylcholin 0,1 mM	OxotremorinM 0,1 mM	Pilocarpin 1 mM	Atropin 1 μM	Alcuronium 0,1 mM
hM ₂	100	339 ^s ± 17	336 ^s ± 6	283 ^s ± 12	96 ± 4	89 ^s ± 2
hM ₂ ⁹⁹ Trp	100	341 ^s ± 8	348 ^s ± 9	285 ^s ± 6	103 ± 7	111 ± 13

Tabelle 3.51: Vergleich der Effekte rezeptorsättigender Konzentrationen verschiedener Liganden an muskarinischen CHOFlpInTM M_2 - und CHOFlpInTM M_2^{99} Trp \rightarrow Ala-Rezeptoren. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler aus 2 unabhängigen Experimenten (8 Einzelversuche). ^s Der Effekt unterscheidet sich signifikant von der basalen [35 S]GTP γ S-Bindung (t-Test; $p < 0,05$).

3.6.3 Einfluss des Epitops $M_2^{99}\text{Trp}$ auf die Acetylcholin- und Pilocarpin-induzierte $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung

Im nachfolgenden Kapitel werden Konzentrations-Effekt-Beziehungen der Acetylcholin- und Pilocarpin-induzierten $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung sowohl an M_2 -Wildtyprezeptoren als auch an punktmutierten $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren erstellt.

hM₂: Abbildung 3.60 zeigt vergleichend die Konzentrations-Effekt-Kurven der Acetylcholin-induzierten und der Pilocarpin-induzierten $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an M_2 -Wildtyprezeptoren. In Tabelle 3.52 sind die experimentell ermittelten Kenngrößen zusammenfassend dargestellt.

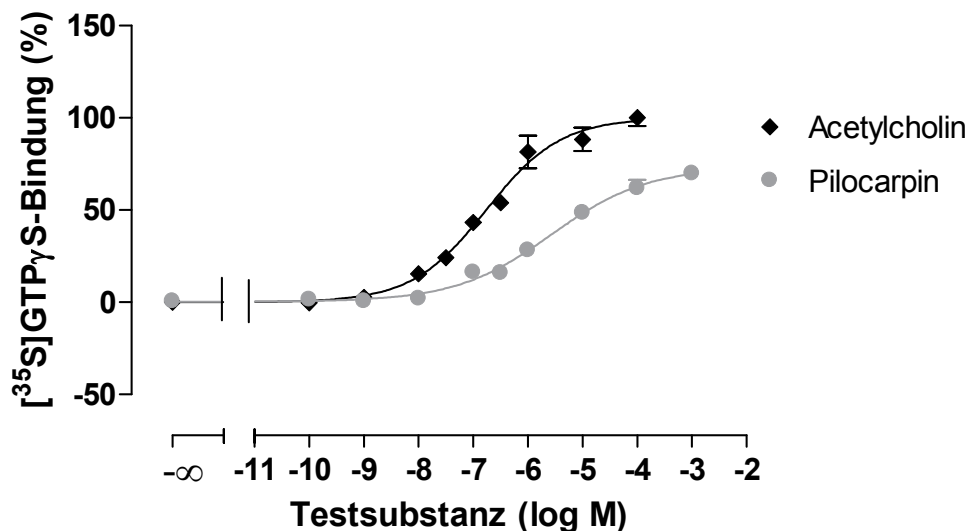


Abbildung 3.60: Vergleich der Acetylcholin- und Pilocarpin-induzierten $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an CHOFlpInTM M_2 -Rezeptoren. Ordinate: $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in (%); 0% zeigt den Wert des unteren Plateaus, 100% den Wert des oberen Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin an. Abszisse: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanzen (log M). Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistische Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler 2 unabhängigen Experimenten (8 Einzelversuche).

Eine Betrachtung der $\text{pEC}_{0,5}$ -Werte zeigte an M_2 -Rezeptoren, die nicht durch Punktmutation verändert waren, eine signifikant geringere Wirksamkeit des Partialagonisten Pilocarpin gegenüber Acetylcholin an ($\Delta\text{pEC}_{0,5} = 1,20$). Die sowohl für Acetylcholin als auch für Pilocarpin ermittelten Werte (siehe Tabelle 3.52) an M_2 -Wildtyprezeptoren aus CHOFlpInTM-Zellen wichen nicht signifikant von den von Frau A. Kebig erhobenen Daten ab ($\text{pEC}_{0,5}(\text{Acetylcholin}): 7,05 \pm 0,08$;

pEC_{0,5}(Pilocarpin): 5,93 ± 0,10; A. Kebig: mündliche Mitteilung). Die Analyse der intrinsischen Aktivität (E_{max}) ergab für Pilocarpin einen signifikant geringeren Maximaleffekt verglichen mit dem Vollagonisten Acetylcholin. Dies bestätigte die in Kapitel 3.6.2.1 erhobenen Befunde und zeigt, dass Pilocarpin an M₂-Wildtyprezeptoren partialagonistisch wirkt. Das Steilheitsmaß der Kurve (n_H) war in beiden Fällen signifikant größer als -1.

Testsubstanz	pEC _{0,5}	ΔpEC _{0,5} (ACh-Pilo)	E _{min} (%)	E _{max} (%)	n _H
Acetylcholin	6,76 ± 0,06	-	0 ± 1	100 ± 4	0,64* ± 0,06
Pilocarpin	5,56 ^s ± 0,17	1,20	1 ± 2	70 ^s ± 2	0,50* ± 0,07

Tabelle 3.52: Vergleich der aus [³⁵S]GTPγS-Experimenten resultierenden Kenngrößen an CHOFlpInTM M₂-Rezeptoren (siehe Abbildung 3.60). pEC_{0,5}: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die zu einer halbmaximalen [³⁵S]GTPγS-Bindung führt. ΔpEC_{0,5}: Differenz der mit Acetylcholin und Pilocarpin gefundenen pEC_{0,5}-Werte. E_{min}: Minimale [³⁵S]GTPγS-Bindung (unteres Kurvenplateau). E_{max}: Maximale [³⁵S]GTPγS-Bindung (oberes Kurvenplateau). n_H: Steilheitsmaß der Kurve. ^s Signifikanter Unterschied verglichen mit der jeweiligen Kenngröße von Acetylcholin. * n_H signifikant verschieden von -1 (F-Test; p < 0,05).

hM₂⁹⁹Trp→Ala: Im Vergleich zu den an M₂-Wildtyprezeptoren ermittelten Ergebnissen zeigt Abbildung 3.61 die Acetylcholin-induzierte und Pilocarpin-induzierte [³⁵S]GTPγS-Bindung an M₂⁹⁹Trp→Ala-Rezeptoren. Tabelle 3.53 stellt die aus den Kurvenverläufen erhaltenen Kenngrößen zusammenfassend dar. Der Vergleich der pEC_{0,5}-Werte ergab auch an punktmutierten Rezeptorproteinen eine signifikant geringere Wirksamkeit von Pilocarpin gegenüber Acetylcholin (ΔpEC_{0,5} = 0,98). Die Einzelwerte (pEC_{0,5}) für Acetylcholin und Pilocarpin zeigten hingegen keine signifikanten Abweichungen gegenüber den an Wildtyprezeptoren ermittelten Kenngrößen (siehe Tabelle 3.52 und Tabelle 3.53). Es wurde eine signifikante Verminderung des Maximaleffekts von Pilocarpin gegenüber Acetylcholin an M₂⁹⁹Trp→Ala-Rezeptoren gefunden. Obgleich die intrinsische Aktivität von Pilocarpin an der Rezeptormutante gegenüber Wildtyprezeptoren geringfügig erhöht war, konnte keine relevante Veränderung des partialagonistischen Verhaltens gefunden werden. Eine vergleichende Analyse ergab an der Rezeptormutante sowohl für die

mit Acetylcholin als auch mit Pilocarpin ermittelte Konzentrations-Effekt-Kurve ein Steilheitsmaß n_H von -1. Somit konnte gegenüber den an M_2 -Wildtyprezeptoren ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven ein Unterschied festgestellt werden. Zusammenfassend kann geschlossen werden, dass das Epitop $M_2^{99}\text{Trp}$ keinen Einfluss auf die intrinsische Aktivität von Agonisten und Partialagonisten nimmt.

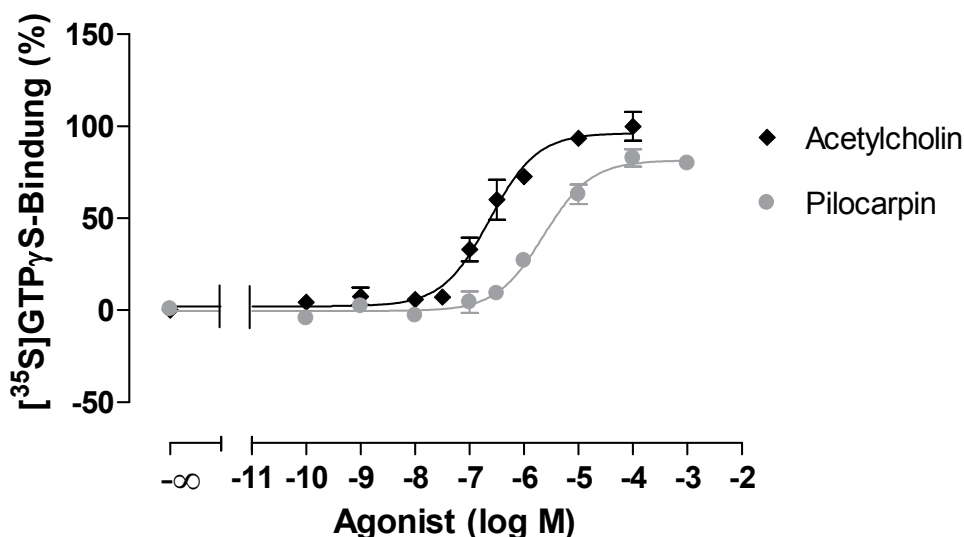


Abbildung 3.61: Vergleich der Acetylcholin- und Pilocarpin-induzierten $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an FlpInTM $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. Ordinate: $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung in (%); 0% zeigt den Wert des unteren Plateaus, 100% den Wert des oberen Plateaus der Konzentrations-Effekt-Kurve von Acetylcholin an. Abszisse: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanzen (log M). Die Kurvenanpassung erfolgte anhand der „Vier Parameter logistischen Gleichung“ (siehe Gleichung 2.6). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardfehler 2 unabhängigen Experimenten (8 Einzelversuche).

Testsubstanz	$\text{pEC}_{0,5}$	$\Delta\text{pEC}_{0,5}$ (ACh-Pilo)	E_{min} (%)	E_{max} (%)	n_H
Acetylcholin	$6,62 \pm 0,09$	-	0 ± 1	100 ± 8	$0,97 \pm 0,16$
Pilocarpin	$5,64^s \pm 0,10$	0,98	1 ± 3	$80^s \pm 4$	$0,89 \pm 0,14$

Tabelle 3.53: Vergleich der aus $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Experimenten resultierenden Kenngrößen an FlpInTM $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren (siehe Abbildung 3.61). $\text{pEC}_{0,5}$: Negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz, die zu einer halbmaximalen $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung führt. $\Delta\text{pEC}_{0,5}$: Differenz der mit Acetylcholin und Pilocarpin gefundenen $\text{pEC}_{0,5}$ -Werte. E_{min} : Minimale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (unteres Kurvenplateau). E_{max} : Maximale $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung (oberes Kurvenplateau). n_H : Steilheitsmaß der Kurve. ^s Signifikanter Unterschied verglichen mit der jeweiligen Kenngröße von Acetylcholin.

4 Diskussion

Nachfolgend sind die Kernbefunde dieser Arbeit zusammenfassend aufgelistet.

- (1) In ersten Untersuchungen konnte zunächst keine relevante Abhängigkeit der Bindung typischer und atypischer allosterischer Modulatoren an muskarinische M_2 -Rezeptoren vom Expressionssystem (COS7- oder CHO-Zellen) festgestellt werden.
- (2) Im Vergleich zum typischen allosterischen Modulator WDuo3 und zum orthosterischen Antagonisten NMS wurde die Bindung der atypischen Testsubstanz Duo3 durch eine defekte N-Glykosylierung an muskarinischen M_2 -Rezeptoren deutlich beeinflusst.
- (3) Eine mit Sulfatid angereicherte Membrenumgebung muskarinischer M_2 -Rezeptoren bewirkte eine wesentliche Änderung des Bindungsverhaltens sowohl typischer als auch atypischer allosterischer Modulatoren in einem Puffer niedriger Ionenstärke.
- (4) Eine Abhängigkeit der M_2 -Rezeptorinteraktion von der Aminosäure M_2^{422} -Tryptophan (TM7) konnte insbesondere bei den Modulatoren WDuo3 und DuoWO beobachtet werden. Der atypische Modulator Duo3 wies lediglich eine geringfügig ausgeprägte M_2^{422} -Tryptophan-Abhängigkeit auf.
- (5) Mit M_2^{99} -Tryptophan wurde ein weiteres Epitop identifiziert, das für die Bindung typischer allosterischer Modulatoren eine Rolle spielt. Eine Abhängigkeit allosterischer Modulatoren vom Epitop M_2^{89} -Tryptophan konnte hingegen nicht gefunden werden. M_2^{99} -Tryptophan war überdies an der Bindung orthosterischer Agonisten und Partialagonisten beteiligt. Bezüglich der Agonist-induzierten G-Protein-Kopplung konnte jedoch keine Bedeutung für das Epitop ermittelt werden.

4.1 Erörterung der Abhängigkeit der Bindung typischer und atypischer allosterischer Modulatoren an muskarinischen M₂-Rezeptoren von der Wahl des Expressionssystems

In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass atypische allosterische Modulatoren ein unterschiedliches Bindungsverhalten an muskarinischen M₂-Rezeptoren aus verschiedenen Expressionssystemen aufwiesen (Dittmann, 2003). Im Rahmen von ersten Untersuchungen der vorliegenden Arbeit (siehe Kapitel 3.1) sollten diese Befunde reproduziert werden. Die den Versuchen zugrunde liegende Hypothese nahm an, dass Rezeptoren aus unterschiedlichen Expressionssystemen wie COS7- und CHO-Zellen über verschiedenartige N-Glykosylierungsmuster verfügen. Diese Annahme wurde gestützt durch Berichte, dass zwischen COS7- und CHO-Zellen spezifische Glykosylierungsunterschiede bestehen. Devasahayam et al (2006) hatten gezeigt, dass die N-Glykosylierung eines Proteins der Immunglobulin-Superfamilie (Thy-1) in CHOK1-Zellen durch einen höheren Anteil an Sialinsäuren gekennzeichnet war (Thy-1 aus CHOK1: 50%, Thy-1 aus COS7: 18%). Ein Einfluss der N-Glykosylierung auf die Bindung allosterischer Modulatoren ist also denkbar. Dies gilt besonders für den allosterischen Modulator Duo3, der weiter im extrazellulären Bereich des M₂-Rezeptorproteins bindet (Tränkle et al., 2005), wo sich am N-terminalen Ende die N-Glykosylierungsstellen befinden (siehe Kapitel 1.5). Unter vollständiger N-Glykosylierung verfügen die Kohlenhydratreste der betroffenen Proteine, wie beispielsweise der muskarinische M₂-Rezeptor über endständige, negativ geladene Sialinsäurereste, welche mit den meist zweifach positiv geladenen Modulatormolekülen interagieren und so zur Affinität der Substanzen am Rezeptor beitragen könnten.

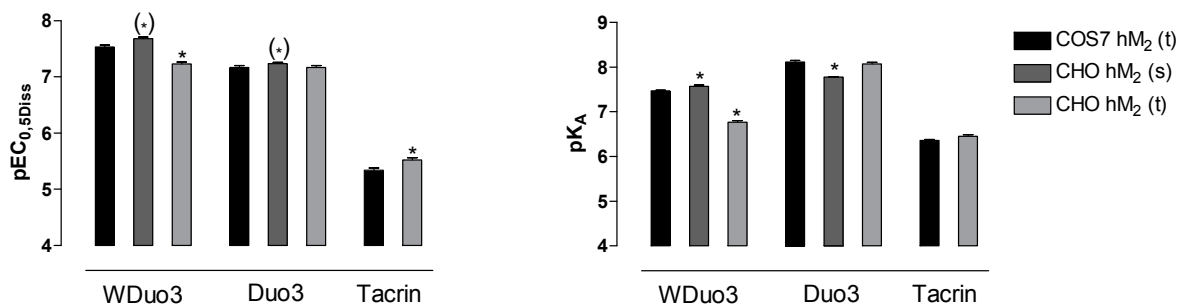


Abbildung 4.1: Vergleich der Affinitäten der Testsubstanzen zum [³H]NMS-besetzten und -unbesetzten Rezeptor. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. * Der Wert unterscheidet sich signifikant von dem an COS7 hM₂-Rezeptoren gefundenen Wert. s: stabil transfiziert. t: transient transfiziert. (*) Signifikanz abhängig vom Auswertungsverfahren (vergleiche Kapitel 2.4.3.1.1).

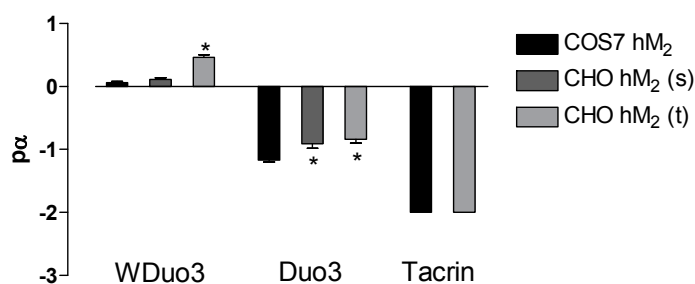


Abbildung 4.2: Vergleich der Kooperativitäten (pα-Werte) der Testsubstanzen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. * Der pα-Wert unterscheidet sich signifikant von dem an hM₂-Rezeptoren gefundenen Wert. s: stabil transfiziert. t: transient transfiziert.

Insgesamt zeigte sich in Bezug auf alle eingesetzten allosterischen Modulatoren sowohl an [³H]NMS-besetzten als auch -freien Rezeptoren aus differierenden Expressionssystemen ein recht einheitliches Affinitätsniveau (siehe Abbildung 4.1). Ein Unterschied konnte lediglich hinsichtlich der Affinität der typischen allosterischen Testsubstanz WDuo3 an transient transfizierten CHO-K1-M₂-Rezeptoren gefunden werden. Auffällig ist zudem die erhöhte positive Kooperativität des Modulators mit [³H]NMS an diesen Rezeptoren, die aus einem stärkeren Affinitätsverlust am freien gegenüber dem besetzten Rezeptor resultiert. Diese Abweichung gegenüber Rezeptoren aus stabil transfizierten CHO-Zellen und transient transfizierten COS7-Zellen beruht jedoch ausschließlich auf den mit der höchsten eingesetzten Konzentration erhaltenen Meßwerten. Wird dieser Datenpunkt nicht in die Auswertung einbezogen, zeigt sich bezüglich der Kooperativität kein signifikanter Unterschied mehr (siehe Kapitel 3.1.1.2). Zusammenfassend ist somit festzuhalten, dass weder das Bindungsverhalten typischer noch atypischer allosterischer

Modulatoren am muskarinischen M_2 -Rezeptor durch die Wahl des Expressionssystems in eindeutiger Weise beeinflusst wurde. Devasahayam (2006) konnte zwar Zelltyp-spezifische Unterschiede (siehe oben) der N-Glykosylierung eines Proteins nachweisen, allerdings ergaben sich aus den Untersuchungen keinerlei Veränderungen des Verzweigungs- und Komplexitätsgrades der N-Glykanketten an Proteinen aus COS7- und CHO-Zellen.

4.2 Erörterung der Abhängigkeit der Bindung typischer und atypischer allosterischer Modulatoren an muskarinischen M₂-Rezeptoren von einer defekten N-Glykosylierung der Rezeptorproteine

Auf die Befunde des vorangehenden Kapitels aufbauend, wurde im Hauptteil der vorliegenden Arbeit überprüft, inwiefern sich ein elementarer Defekt der Rezeptorglykosylierung auf das Bindungsverhalten typischer und atypischer allosterischer Modulatoren auswirkt. Bisher wurden vor allem Mutagenesestudien publiziert, in denen eine oder mehrere potentielle N-Glykosylierungsstellen punktmuiert wurden, wodurch eine korrekte N-Glykosylierung nicht mehr erfolgen konnte. Eine fehlende N-Glykosylierung ergab im Rahmen jener Untersuchungen jedoch keine Beeinflussung der orthosterischen Ligandbindung am muskarinischen M₂-Rezeptor (van Koppen und Nathanson, 1990). Auch am P₂Y₁₂-Rezeptor, einem weiteren G-Protein-gekoppelten Rezeptor, konnte keine Änderung der Orthosterbindung festgestellt werden, wenn potentielle N-Glykosylierungsstellen mutiert wurden (Zhong et al., 2004). Am Histaminrezeptor vom Subtyp 3 wurde die N-Glykosylierung mit Hilfe von Tunicamycin, einem Glykosylierungshemmstoff, komplett unterbunden, wobei auch in diesem Fall keine Beeinflussung der Bindung eines orthosterischen Antagonisten beobachtet werden konnte (Shenton und Chazot, 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine defekte N-Glykosylierung der muskarinischen M₂-Rezeptoren mit Hilfe von CHO-Lec1-Zellen erzeugt (siehe Kapitel 2.2.1). In Lec1-Zellen exprimierte Glykoproteine sind durch verkürzte Glykane vom „High-Mannose-Typ“ gekennzeichnet (siehe Kapitel 1.5). Dieses experimentelle Vorgehen hat gegenüber einer zielgerichteten Mutagenese den Vorteil, dass die Primärstruktur des Rezeptors unangetastet bleibt.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Befunde sind in guter Übereinstimmung mit der von van Koppen und Nathanson (1990) an unglykosylierten Rezeptoren gefundenen fehlenden Beeinflussung der orthosterischen NMS-Bindung durch Verkürzung der N-Glykanketten (siehe Kapitel 3.2).

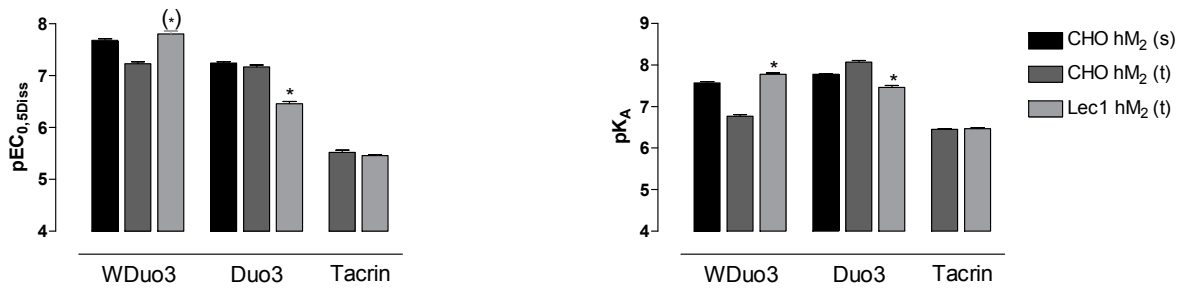


Abbildung 4.3: Vergleich der Affinitäten der Testsubstanzen zum [³H]NMS-besetzten und -unbesetzten Rezeptor. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. * Der Wert an Lec1-hM₂ unterscheidet sich signifikant von dem an hM₂-Rezeptoren (s) und (t) gefundenen Wert. s: stabil transfiziert. t: transient transfiziert. (*) Signifikanz abhängig vom Auswertungsverfahren (vergleiche Kapitel 2.4.3.1.1).

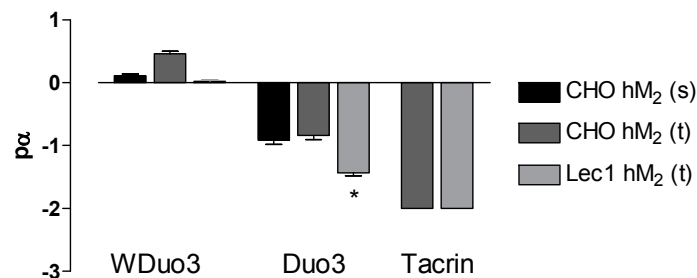


Abbildung 4.4: Vergleich der Kooperativitäten ($p\alpha$ -Werte) der Testsubstanzen. Die Werte stammen aus allosterischen Interaktionsexperimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. * Der $p\alpha$ -Wert an Lec1-hM₂ unterscheidet sich signifikant von dem an hM₂-Rezeptoren gefundenen Wert (s). s: stabil transfiziert. t: transient transfiziert.

Die Bindung des atypischen allosterischen Modulators Duo3 hingegen wurde durch eine defekte Rezeptorglykosylierung beeinträchtigt (siehe Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4). Für die atypische Testsubstanz konnte gegenüber CHO-M₂-Rezeptoren ein signifikanter Wirksamkeitsverlust sowohl an freien als auch an besetzten Lec1-M₂-Rezeptoren beobachtet werden, wohingegen für die Modulatoren WDuo3 (typisch) und Tacrin (atypisch) keine Affinitätsabnahme resultierte. Die Auffälligkeit der hohen positiven Kooperativität des Modulators WDuo3 mit [³H]NMS an CHOK1-M₂-Rezeptoren wurde im vorangehenden Abschnitt bereits diskutiert.

Es konnte somit im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die Bindung eines GPCR-Liganden von der N-Glykosylierung des Rezeptorproteins abhängt, und zwar dann, wenn dieser im Bereich der extrazellulären Schleifen in der Nähe der N-Glykosylierungsstellen bindet.

Mit dem Prozess der N-Glykosylierung von Proteinen wird eine Dimerisierung von Rezeptorproteinen in Verbindung gebracht, da sowohl die N-Glykosylierung als auch eine mögliche Dimerisierung der Rezeptorproteine im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat geschieht (Breitwieser, 2004). Nach Helenius und Aebi (2001) kommt es aufgrund fehlender N-Glykosylierung zu inkorrekt gefalteten Proteinen und somit in der Folge zu Konformationsänderungen. Glykosylierungs-defekte Proteine werden physiologischerweise schnell abgebaut und möglichst nicht an der Zelloberfläche exprimiert. Für den ebenfalls G-Protein-gekoppelten P_2Y_{12} -Rezeptor konnte allerdings gezeigt werden, dass die Expression von Rezeptoren trotz fehlender N-Glykosylierung nicht beeinträchtigt wird (Zhong et al., 2004). Es wurde weiterhin postuliert, dass atypische Modulatoren wie Duo3 eine homotrope Interaktion über die Rezeptor-Dimer-Schnittstelle bewirken oder die Dimerisierung von Rezeptorproteinen modulieren (Gharagozloo et al., 2002; Tränkle et al., 2005). In Dissoziationsexperimenten der vorliegenden Arbeit konnte für Duo3 an Lec1-M₂-Rezeptoren verglichen mit transient transfizierten CHO-M₂-Rezeptoren eine Verminderung und mit stabil transfizierten CHO-M₂-Rezeptoren überdies eine signifikante Abnahme der Kurvensteilheit verzeichnet werden (siehe Kapitel 3.2.2.1). Dieser Effekt deutet auf eine Einbuße atypischer Eigenschaften an Lec1-M₂-Rezeptoren hin. Ein Einfluss der unvollständigen N-Glykosylierung auf die Dimerisierung der muskarinischen M₂-Rezeptoren kann vor dem Hintergrund dieser Befunde nicht ausgeschlossen werden. Es ist denkbar, dass der durch Lec1-Zellen erzeugte N-Glykosylierungsdefekt eine Dimerisierung der M₂-Rezeptoren verhindert, eine korrekte Oberflächenexpression der Rezeptormonomere jedoch weiterhin zulässt. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass eine hohe Kurvensteilheit nur in Experimenten am [³H]NMS-besetzten Rezeptor gefunden wurde, Konzentrations-Effekt-Kurven, die aus Versuchen mit Duo3 an freien Rezeptoren resultierten, wiesen eine normale Kurvensteilheit auf (siehe Kapitel 3.2.2.2).

Interessanterweise ließ sich im Hinblick auf die atypische Testsubstanz Tacrin kein Einfluss verkürzter N-Glykanketten auf den Bindungsmodus feststellen. Auch Tränkle et al. (2005) fanden ein andersartiges Verhalten im Vergleich zum atypischen Modulator Duo3. In Dockingsimulationen konnte die simultane Bindung von zwei Tacrin-Molekülen an das allosterische Haftareal nachgewiesen werden und somit die Verschiedenartigkeit des Bindungsverhaltens erklärt werden.

4.3 Erörterung der Abhängigkeit der Bindung typischer und atypischer allosterischer Modulatoren an muskarinischen M₂-Rezeptoren von einer veränderten Sphingolipidumgebung

Neben einer veränderten N-Glykosylierung des M₂-Rezeptorproteins, die sich auf die Bindung des atypischen Modulators Duo3 in der Schleifenregion auswirkt, wurde in der vorliegenden Arbeit die Relevanz einer biochemischen Modifikation der Lipidumgebung des M₂-Rezeptorproteins betrachtet. Es wurde überprüft, ob eine Anreicherung von Galactosylceramid oder Sulfatid in der Umgebung der Rezeptoren die Bindung allosterischer Modulatoren beeinflusst. Im Rahmen dieser Untersuchungen kamen sowohl typische als auch atypische Testsubstanzen zum Einsatz. Zunächst konnte festgestellt werden, dass sowohl in einem Puffer mit unphysiologisch niedriger Ionenstärke (5 mM Na,K,P_i, L 23) als auch in einem Puffersystem mit annähernd physiologischer Ionenstärke (10 mM HEPES, L 15) weder Galactosylceramid noch Sulfatid einen Einfluss auf die orthosterische Ligandbindung (³H]NMS) ausüben (siehe Kapitel 3.3). Offenbar kommt es zu keiner bedeutenden Konformationsänderung des M₂-Rezeptorproteins im Bereich der transmembranären Helices durch die vorhandenen Lipidmembranmodifikationen.

Abbildung 4.5 und Abbildung 4.6 zeigen die Affinitäten der allosterischen Modulatoren WDuo3 und Duo3 an [³H]NMS-besetzten und -unbesetzten Rezeptoren in den jeweils verwendeten Puffersystemen.

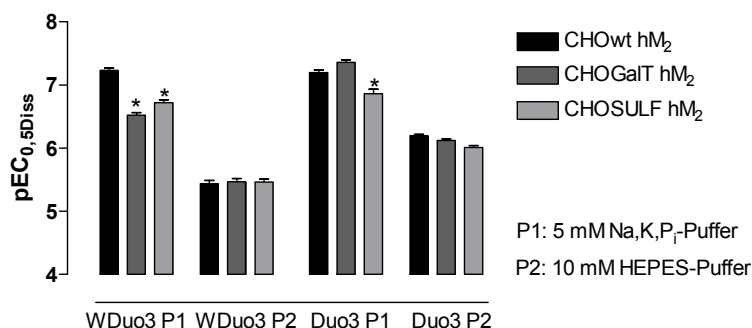


Abbildung 4.5: Vergleich der Affinitäten der Testsubstanzen zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor in unterschiedlichen Puffersystemen. Die Werte stammen aus Dissoziations-Bindungsexperimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. * Der pEC_{0,5Diss}-Wert an CHOSULF-hM₂ und CHOGalT-hM₂ unterscheidet sich signifikant von dem an CHOwt-hM₂-Rezeptoren gefundenen Wert.

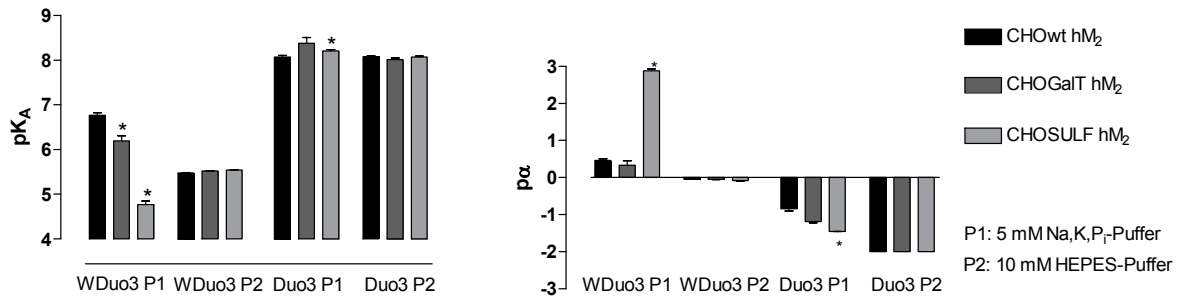


Abbildung 4.6: Vergleich der Affinitäten zum [³H]NMS-unbesetzten Rezeptor und der Kooperativitäten der Testsubstanzen in unterschiedlichen Puffersystemen. Die Werte stammen aus allosterischen Interaktionsexperimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. * Der Wert an CHOSULF-hM₂ und CHOGalT-hM₂ unterscheidet sich signifikant von dem an CHOwt-hM₂-Rezeptoren gefundenen Wert.

Sowohl für den typischen als auch für den atypischen Modulator konnte in einer artifiziellen Pufferumgebung (5 mM Na,K,P_i) festgestellt werden, dass eine Anreicherung von Sulfatid zu Wirksamkeitsverlusten an [³H]NMS-besetzten Rezeptoren führt (siehe Abbildung 4.5). Dies deutet darauf hin, dass eine Anhäufung von negativ geladenem Sulfatid in der Umgebung des Rezeptors dessen Konformation im intrazellulären Bereich ändert. Zudem konnte bezüglich der Wirksamkeit von WDUo3 ein Einfluss des Sphingolipids Galactosylceramid beobachtet werden. Interessanterweise kommt es durch diese Lipidmodifikation nicht zu einer Beeinflussung des Bindungsverhaltens der atypischen Testsubstanz Duo3. Verglichen mit einer artifiziellen Pufferumgebung wurden hingegen im nahezu physiologischen Puffersystem (10 mM HEPES) keine Affinitätsunterschiede der Testsubstanzen an den Rezeptorsystemen mit unterschiedlicher Membranlipidumgebung beobachtet.

Insgesamt zeigte sich bezüglich beider Testsubstanzen ein insgesamt erniedrigtes Affinitätsniveau im HEPES-Puffer. Der Einfluss auf die Affinität des typischen Modulators WDUo3 war hingegen stärker ausgeprägt. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Affinitäten allosterischer Modulatoren in unterschiedlichem Ausmaß von den Eigenschaften des Puffersystems abhängen. Die Wirksamkeit des typischen Modulators W84, dessen Struktur Ähnlichkeit mit WDUo3 aufweist, wird beispielsweise stark durch das eingesetzte Puffersystem beeinflusst (Strassmann, 2007). Die vorliegenden Befunde zeigen, dass sich die typische Testsubstanz WDUo3 im Hinblick auf veränderte Inkubationsbedingungen ähnlich verhält.

An freien Rezeptorproteinen (siehe Abbildung 4.6) konnte in artifizierter Pufferumgebung ein Einfluss sowohl des Sphingolipids Galactosylceramid als auch von Sulfatid auf die Bindung des Modulators WDuo3 beobachtet werden, wobei sich an Rezeptoren mit sulfatierter Membranumgebung ein höherer Affinitätsverlust ergab. Insgesamt konnte gegenüber [³H]NMS-besetzten CHOSULF-M₂-Rezeptorproteinen an freien Rezeptoren ein stärker ausgeprägter Verlust der Bindungsaffinität verglichen mit CHOK1-M₂ gefunden werden. Dieser Effekt kann darauf zurückgeführt werden, dass der Rezeptor im unbesetzten Zustand nicht mehr durch [³H]NMS in seiner Konformation stabilisiert wird und eine veränderte Lipidumgebung (Sulfatierung) intensiver Einfluss auf die Rezeptorkonformation nehmen kann. WDuo3 förderte demzufolge die Bindung des Radioorthosters [³H]NMS. In diesem Fall war eine unabhängige Bestimmung der Affinität zum besetzten und unbesetzten Rezeptor möglich gewesen, da zur Auswertung die modifizierte Ehlert-Gleichung nicht herangezogen werden musste (siehe Kapitel 3.3.1.2). Im annähernd physiologischen HEPES-Puffersystem wurden die beschriebenen Effekte nicht gefunden, da sich keinerlei Unterschiede in den Wirksamkeiten von WDuo3 an freien Rezeptoren ergaben. Zudem zeigte die Testsubstanz WDuo3 an allen Rezeptoren nunmehr ein neutrales bis schwach negativ kooperatives Verhalten mit [³H]NMS, da sich die Affinitäten des Modulators zu besetzten und freien Rezeptoren nicht relevant unterschieden. Dieser Befund kann mit der Anwesenheit von Magnesiumionen im verwendeten Puffer erklärt werden, die eine Hemmung der Gleichgewichtsbindung von [³H]NMS hervorrufen (Burgmer et al., 1998). In einer früheren Arbeit wurde darüber hinaus für den allosterischen Modulator Alcuronium im HEPES-Puffer eine Verminderung der positiven Kooperativität gefunden (Strassmann, 2007).

Offenbar kann durch Interaktion der zweifach geladenen Magnesiumionen mit den Sulfatgruppen des Cerebrosidsulfats eine Neutralisierung der Sulfatidwirkung auf die Rezeptorkonformation erfolgen.

Im Hinblick auf den atypischen Modulator Duo3 ließ sich weder im artifizierten Puffersystem (5 mM Na,K,P_i-Puffer) noch im weniger artifizierten HEPES-Puffer eine relevante Beeinflussung der Affinität an [³H]NMS-unbesetzten CHOSULF-M₂-Rezeptoren feststellen. Allerdings wurde an allen Rezeptoren

insgesamt eine verminderte Affinität des atypischen Modulators an besetzten im Vergleich zu freien Rezeptoren und somit eine Verstärkung der negativen Kooperativität gefunden. Der orthosterische Antagonist [^3H]NMS wurde komplett aus seiner Gleichgewichtsbindung verdrängt.

	WDuo3 P1 CHOwt hM ₂	WDuo3 P1 CHOGaIT hM ₂	WDuo3 P1 CHOSULF hM ₂	WDuo3 P2 CHOwt hM ₂	WDuo3 P2 CHOGaIT hM ₂	WDuo3 P2 CHOSULF hM ₂
Hill-Koeffizient n_H	$n_H = -1$	$n_H = -1$	$n_H < -1$	$n_H = -1$	$n_H = -1$	$n_H < -1$

Tabelle 4.1: Vergleich der Kurvensteilheiten (n_H) der mit WDuo3 erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven für die Interaktion mit [^3H]NMS-besetzten Rezeptoren. P1: 5 mM Na,K,P_i-Puffer (23°C); P2: 10 mM HEPES-Puffer (30°C).

	Duo3 P1 CHOwt hM ₂	Duo3 P1 CHOGaIT hM ₂	Duo3 P1 CHOSULF hM ₂	Duo3 P2 CHOwt hM ₂	Duo3 P2 CHOGaIT hM ₂	Duo3 P2 CHOSULF hM ₂
Hill-Koeffizient n_H	$n_H < -1$	$n_H < -1$	$n_H = -1$	$n_H < -1$	$n_H < -1$	$n_H = -1^*$

Tabelle 4.2: Vergleich der Kurvensteilheiten (n_H) der mit Duo3 erhaltenen Konzentrations-Effekt-Kurven die Interaktion mit [^3H]NMS-besetzten Rezeptoren. P1: 5 mM Na,K,P_i-Puffer (23°C); P2: 10 mM HEPES-Puffer (30°C). * Signifikanz abhängig vom Auswertungsverfahren (vergleiche Kapitel 2.4.3.1.1).

Neben den Affinitätswerten sind die in Dissoziationsexperimenten ermittelten Kurvensteilheiten von Interesse (siehe Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2). Erstaunlicherweise konnte sowohl für WDuo3 als auch für Duo3 an CHOSULF-M₂-Rezeptoren ein gegenüber CHOwt-M₂-Rezeptoren abweichendes Steilheitsmaß gefunden werden. Für WDuo3 zeigten sich in beiden Pufferumgebungen steile Konzentrations-Effekt-Kurven an Rezeptoren mit sulfatierter Membranumgebung, während die Kurvenverläufe des atypischen Modulators Duo3 normal steile Konzentrations-Effekt-Kurven an CHOSULF-M₂-Rezeptoren aufwiesen. Im weniger artifiziellen 10 mM HEPES-Puffer wurde allerdings mit Duo3 unter Anwendung der individuellen Auswertungsmethode ein Hill-Koeffizient ermittelt, der signifikant verschieden von -1 war. Es resultierte in diesem Fall eine steile Konzentrations-Effekt-Kurve.

Zur Überprüfung der ungewöhnlichen Befunde hinsichtlich WDuo3 wurden exemplarisch Versuche mit dem Prototyp-Alloster W84 im HEPES-Puffer durchgeführt. Auch in diesem Fall zeigte sich eine von -1 abweichende Kurvensteilheit an M₂-Rezeptoren, deren Membran mit Sulfatid angereichert war (siehe Kapitel 3.3.2). Eine sulfatierte Lipidmembrenumgebung scheint demzufolge einen Einfluss auf den Bindungsmodus der eingesetzten Substanzen auszuüben. Es kann vermutet werden, dass es durch die Interaktion von negativ geladenem Sulfatid mit positiv geladenen Aminosäuren des Rezeptorproteins zu Konformationsänderungen kommt, die wiederum eine Veränderung des Bindungsmodus zur Folge haben. Die Möglichkeit einer elektrostatischen Bindung von Sulfatid und positiv geladenen Aminosäuren d.h. einer Lipid-Protein-Interaktion, wurde bereits in der Literatur beschrieben (Vos et al., 1994).

Es ist festzuhalten, dass der Einfluss einer sulfatierten Membrenumgebung des M₂-Rezeptors auf die Bindung des typischen allosterischen Modulators WDuo3 insgesamt ausgeprägter ist als auf das Bindungsverhalten des atypischen Modulators Duo3. Aufgrund der gefundenen Resultate ist davon auszugehen, dass die Kernregion der allosterischen Bindungsstelle, an die der Modulator WDuo3 bindet, stärker von einer veränderten, sulfatierten Membrenumgebung betroffen ist als die Region der extrazellulären Schleifen. Insgesamt lieferten die erhaltenen Ergebnisse erstmals Hinweise auf eine Bindungsbeeinflussung von Liganden G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch eine veränderte Lipidmembrenumgebung.

4.4 Erörterung der Bedeutung der Aminosäure M₂⁴²²Trp im Hinblick auf typisches und atypisches Bindungsverhalten strukturmodifizierter allosterischer Modulatoren

Die Resultate der vorangehenden Kapitel zeigten, dass der atypische allosterische Modulator Duo3 gegenüber der typischen Testsubstanz WDuo3 durch einen andersartigen Bindungsmodus gekennzeichnet ist. Tränkle et al. (2005) hatten bereits in Mutagenese-Untersuchungen mit WDuo3 und Duo3 Unterschiede im Bindungsverhalten der beiden Testsubstanzen nachgewiesen. Die Autoren entwickelten vor dem Hintergrund der Befunde die Hypothese, dass der atypische Modulator Duo3 nicht tief genug in die allosterische Bindungsstelle hineinreicht und somit nicht mit Epitopen der allosterischen Kernregion interagiert. In weiterführenden Experimenten erfolgte die Untersuchung des in der allosterischen Kernregion lokalisierten und konservierten Epitops M₂⁴²²Tryptophan mit dem Ziel, Rückschlüsse auf die Basisaffinität allosterischer Modulatoren zu ziehen (Prilla et al., 2006). Aus dieser Studie ergab sich eine deutliche Epitopabhängigkeit des Prototyp-Allosters W84. Weiterhin wurde gefunden, dass die Aminosäuren M₂¹⁷⁷Tyrosin und M₂⁴²²Tryptophan mit dem Phthalimidomethylrest von W84 eine „Sandwich-artige“ Konformation ausbilden und somit einen hohen Beitrag zur Bindung der Testsubstanz leisten. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von WDuo3 im Vergleich zu W84 ist davon auszugehen, dass WDuo3 ebenfalls tief in die allosterische Kernregion hineinreicht und eine direkte Interaktion mit M₂⁴²²Tryptophan eingeht. Im Gegensatz dazu sollte Duo3 keine Abhängigkeit von dieser Aminosäure aufweisen, da der atypische Modulator weiter im Bereich der extrazellulären Schleifen bindet. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit geprüft.

4.4.1 Erörterung der Bindung der Modulatoren WDuo3 und Duo3 an $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren

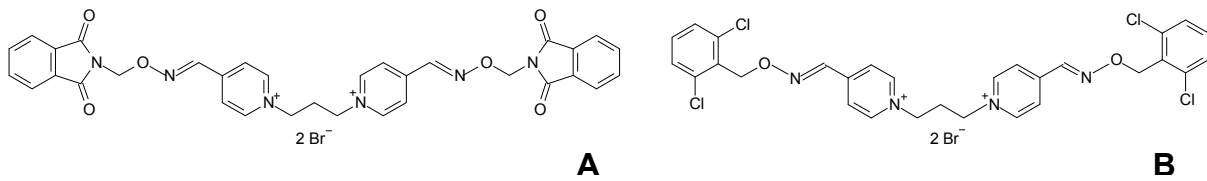


Abbildung 4.7: Strukturformeln von A: WDuo3 und B: Duo3.

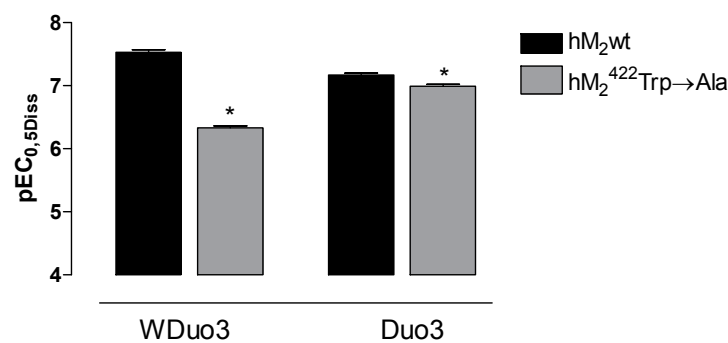


Abbildung 4.8: Vergleich der Affinitäten der Testsubstanzen WDuo3 und Duo3 zum [³H]NMS-besetzten Rezeptor. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. * Der pEC_{0,5Diss}-Wert an hM₂⁴²²Trp→Ala unterscheidet sich signifikant von dem an hM₂-Rezeptoren gefundenen Wert.

Abbildung 4.8 zeigt, dass WDuo3 (Abbildung 4.7) an der Rezeptormutante $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ ausgeprägt an Affinität zu [³H]NMS-besetzten Rezeptoren verliert. Ein signifikanter, aber im Vergleich zu WDuo3 wesentlich geringerer Affinitätsverlust zeigte sich ebenfalls für den atypischen allosterischen Modulator Duo3 (Abbildung 4.7). Abbildung 4.9 gibt Aufschluss über die Affinität der beiden Substanzen zu freien, nicht [³H]NMS-besetzten Rezeptoren und die Kooperativitäten.

Auch an freien M_2 -Rezeptoren ist ein Affinitätsverlust des typischen Modulators WDuo3 an der Rezeptormutante erkennbar. Eine signifikante, aber geringer ausgeprägte Abnahme der Wirksamkeit wurde auch für den atypischen Modulator Duo3 gefunden.

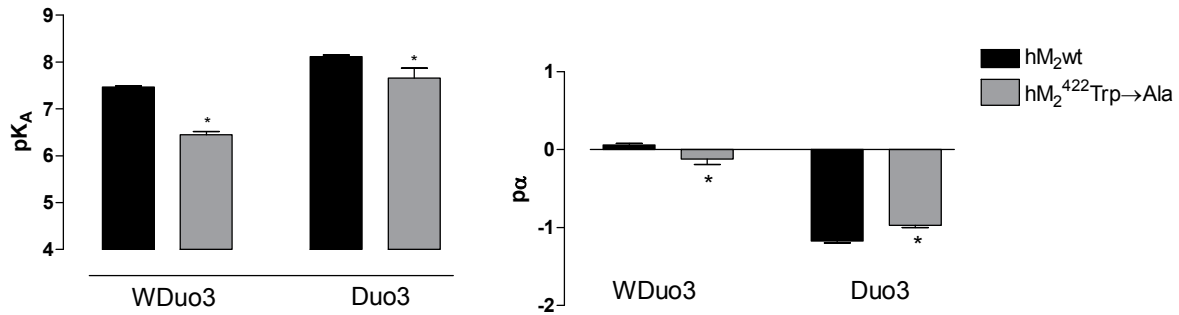


Abbildung 4.9: Vergleich der Affinitäten der Testsubstanzen WDuo3 und Duo3 zum [³H]NMS-unbesetzten Rezeptor sowie der Kooperativitäten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. * Der Wert an hM₂⁴²²Trp→Ala unterscheidet sich signifikant von dem an hM₂-Rezeptoren gefundenen Wert.

Zusammenfassend betrachtet stützen die Befunde die Hypothese, dass der typische Modulator WDuo3 tief in die Ligandbindungstasche hineinreicht und eine direkte Wechselwirkung mit dem konservierten Epitop M₂⁴²²Tryptophan eingeht. Dies konnte in Dockinguntersuchungen von Schrobang und Höltje bestätigt werden (siehe Abbildung 4.10 A). Die Befunde sind weiterhin in Einklang mit der Docking-Simulation, der zufolge der atypische Modulator Duo3 keine direkte Interaktion mit dem Epitop M₂⁴²²Trp eingeht, weil das Molekül nicht ausreichend tief in die Kernregion des allosterischen Haftareals hineinreicht. Der beobachtete signifikante Affinitätsverlust dürfte Folge einer indirekten Abhängigkeit mit der Aminosäure sein. Vermutlich kommt es durch den Austausch der Aminosäure Tryptophan gegen Alanin zu einer weiterreichenden Konformationsänderung des Rezeptorproteins, die auch das Bindungsareal von Duo3 erfasst. Aufgrund der ausgeprägten Strukturanalogie von WDuo3 und Duo3 muss davon ausgegangen werden, dass die lateralen Dichlorobenzylreste der atypischen Testsubstanz Duo3 eine Interaktion mit der Kernregion verhindern und die Ausbildung einer „Sandwich-artigen“ Konformation nicht mehr möglich ist. Insbesondere die Chlorsubstituenten des Ringsystems scheinen π-π-Interaktionen zu stören. Die Chloratome stellen stark Elektronen-schiebende Substituenten dar, so dass im Vergleich zu den Phthalimidomethylresten offensichtlich eine erhöhte Elektronendichte des Ringsystems vorliegt und Duo3 mit den aromatischen Aminosäureresten aus diesem Grunde nicht in Kontakt tritt (siehe Abbildung 4.10 B).

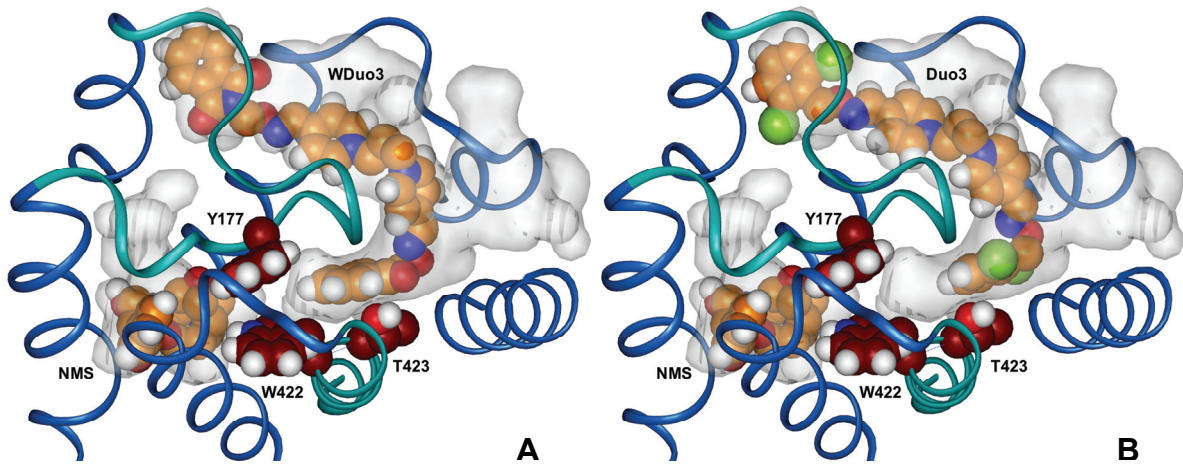


Abbildung 4.10: Dockinguntersuchungen der Testsubstanzen WDuo3 (A) und Duo3 (B) im Rezeptormodell des muskarinischen M_2 -Rezeptors (Erstellung: Frau J. Schrobang und Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje; Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie; Heinrich-Heine Universität Düsseldorf). Farbcode: Rezeptorprotein: Helices/e1/e3: blau; e2/TM7: cyan; freie Rezeptorvolumina: grau; Liganden: Kohlenstoff: orange (NMS und Modulatoren)/dunkelrot (Aminosäuren der Kernregion); Wasserstoff: weiß; Stickstoff: blau; Sauerstoff: rot; Chlor: hellgrün.

4.4.2 Erörterung der Epitopabhängigkeit strukturmodifizierter Modulatoren gegenüber M_2^{422} Tryptophan

Aus den Befunden mit WDuo3 und Duo3 ergab sich die Fragestellung, welche strukturellen Eigenschaften eines allosterischen Modulatormoleküls zu dessen Abhängigkeit der Affinität von M_2^{422} Tryptophan beitragen. Es schloss sich somit die Untersuchung weiterer, strukturmodifizierter allosterischer Modulatoren an. Tabelle 4.3 zeigt die in Dissoziationsbindungsexperimenten und allosterischen Interaktionsexperimenten an M_2 -Wildtyp- und M_2^{422} Trp→Ala-Rezeptoren mit den Testsubstanzen erhobenen Befunde.

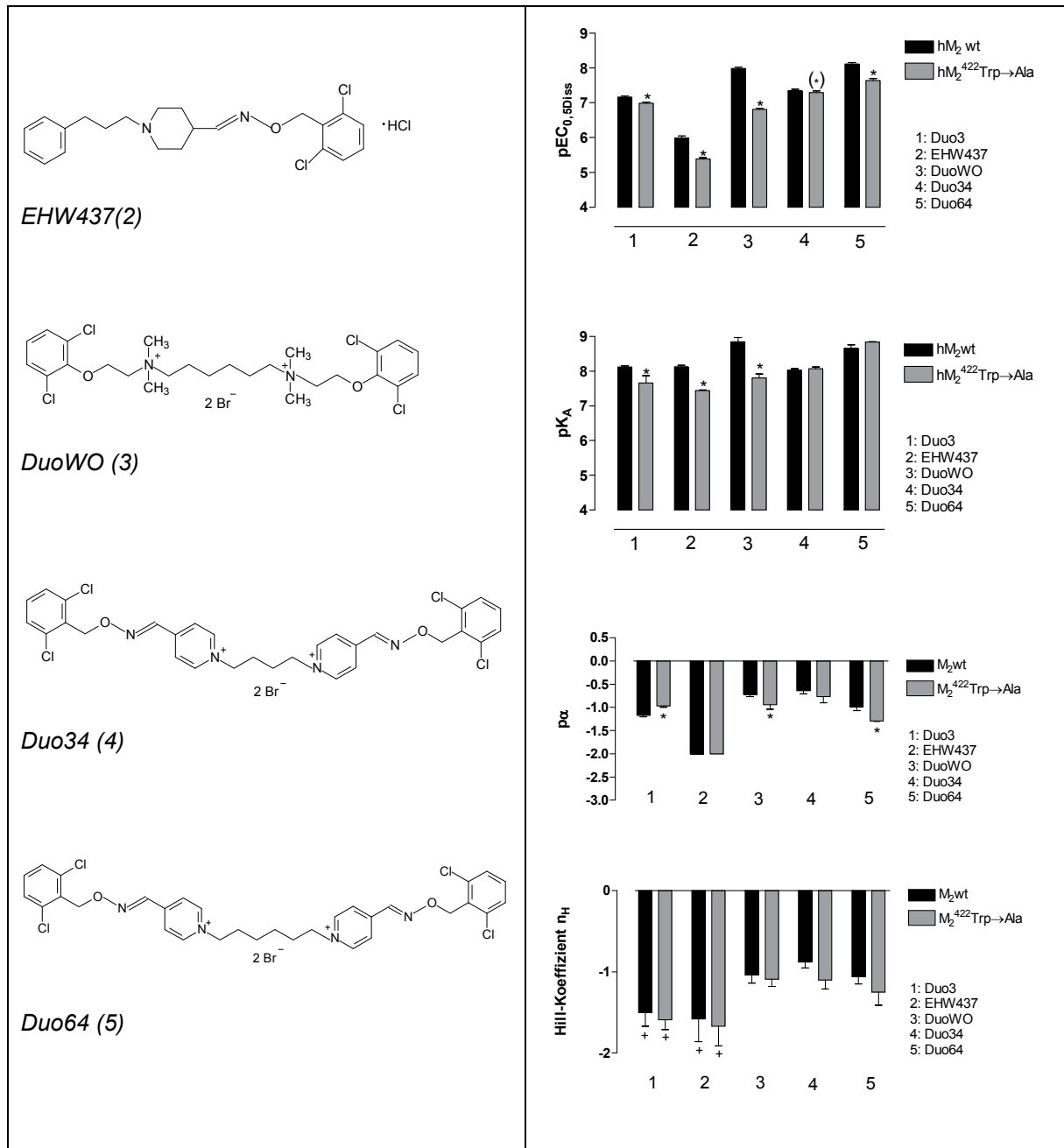


Tabelle 4.3: Auflistung der Parameterwerte der abgebildeten Testsubstanzen im Vergleich zu Duo3. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. * Der Wert an hM₂⁴²²Trp→Ala unterscheidet sich signifikant von dem an hM₂-Rezeptoren gefundenen Wert. + Der Wert unterscheidet sich signifikant von -1. (-) Signifikanz abhängig vom Auswertungsverfahren (vergleiche Kapitel 2.4.3.1.1).

Der allosterische Modulator *EHW437* stellt ein verkürztes Derivat der atypischen Testsubstanz Duo3 dar und ist durch eine einseitige Substitution mit einem Dichlorobenzylrest gekennzeichnet. In Experimenten an [³H]NMS-besetzten und -unbesetzten Rezeptoren konnte eine Epitopabhängigkeit bezüglich M₂⁴²²Tryptophan gefunden werden (siehe Tabelle 4.3). Eventuell kommt es zur Ausbildung einer

„Sandwich-artigen“ Zusammenlagerung des unsubstituierten Phenylrings mit den beteiligten Epitopen ($M_2^{177}\text{Tyr}$ und $M_2^{422}\text{Trp}$). Da das Ausmaß der Epitopabhängigkeit bezüglich $M_2^{422}\text{Tryptophan}$ im Vergleich zum typischen Modulator WDuo3 wesentlich geringer ausgeprägt ist, kann jedoch auch eine indirekte Abhängigkeit von dem Epitop nicht ausgeschlossen werden. Da die Testsubstanz EHW437 verglichen mit anderen allosterischen Modulatoren deutlich kleiner ist, kommt es möglicherweise zu einer simultanen Bindung von je zwei Modulatormolekülen an $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -unbesetzten Rezeptorproteinen, da sich in Dissoziations-Bindungsexperimenten steile Konzentrations-Effekt-Kurven finden (siehe Tabelle 4.3).

Die Molekülstruktur des untersuchten Modulators DuoWO ist durch eine W84 -artige Zwischenkette und durch eine Duo3 -artige laterale Substitution mit zwei Dichlorobenzylresten charakterisiert. Aufgrund der lateralen Dichlorobenzyl-Substituenten wurden zunächst atypische Bindungseigenschaften erwartet. Erstaunlicherweise konnte jedoch sowohl an freien als auch an besetzten Rezeptoren eine ausgeprägte Epitopabhängigkeit von $M_2^{422}\text{Tryptophan}$ gefunden werden, deren Ausmaß mit WDuo3 vergleichbar war. Offenbar kommt eine direkte Interaktion mit dem konservierten Epitop zustande. Überdies ergab sich ein typisches Verhalten hinsichtlich der Kurvensteilheiten (siehe Tabelle 4.3). Die Befunde zeigen, dass eine laterale Substitution mit Dichlorobenzylresten nicht notwendigerweise mit atypischem Bindungsverhalten und einer indirekten Interaktion mit $M_2^{422}\text{Tryptophan}$ assoziiert ist. Vielmehr bestimmt im Fall von DuoWO der Abstand von 6 Kohlenstoff-Atomen zwischen den positiv geladenen Stickstoffatomen den typischen Bindungsmodus.

Duo34 stellt ein weiteres Derivat des atypischen allosterischen Modulators Duo3 dar, in dem die Zwischenkette um ein Kohlenstoff-Atom verlängert wurde. Die in den vorangegangenen Abschnitten entwickelte Hypothese lässt vorhersagen, dass eine verlängerte Mittelkette eines Modulatormoleküls mit einem Verlust der atypischen Eigenschaften einhergeht und zudem eine ausgeprägtere Epitopabhängigkeit gegenüber $M_2^{422}\text{Tryptophan}$ hervorruft. Für Duo34 zeigte sich kaum ein Wirksamkeitsverlust an $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten und -unbesetzten $M_2^{422}\text{Trp} \rightarrow \text{Ala}$ -Rezeptoren (siehe Kapitel 3.4.6.1). In Analogie zu Duo3 liegt offensichtlich auch in diesem Fall eine indirekte Abhängigkeit von der konservierten Aminosäure vor. Für

Duo34 wurde im Vergleich zu Duo3 hingegen eine Veränderung der Steilheitsmaße beobachtet. Sowohl an Wildtyp- als auch an mutierten Rezeptoren zeigten sich normal steile Kurvenverläufe. Dies zeigte, dass die Verlängerung der Zwischenkette offensichtlich zu einem Verlust der atypischen Eigenschaften führen kann.

Die Testsubstanz *Duo64* ist gegenüber der Ausgangssubstanz Duo3 durch eine Hexamethylen-Zwischenkette gekennzeichnet. Es wurde eine signifikante Abhängigkeit des Modulators Duo64 an besetzten Rezeptorproteinen von M_2^{422} -Tryptophan gefunden (siehe Tabelle 4.3). An freien Rezeptoren zeigte sich jedoch kein signifikanter Affinitätsunterschied. Aufgrund der im Vergleich zu *WDuo3* gering ausgeprägten Affinitätsdifferenz zwischen Wildtyp- und mutierten Rezeptoren ist davon auszugehen, dass es sich um eine indirekte Interaktion mit dem Epitop M_2^{422} -Trp am besetzten Rezeptor handelt. Für Duo64 kann in Analogie zu Duo34 kein komplexer Bindungsmodus im Hinblick auf die Kurvensteilheiten beobachtet werden, wobei erneut eine gegenüber Duo3 verlängerte Zwischenkette für den Verlust atypischer Eigenschaften verantwortlich zeichnet. Es wurde postuliert, dass ein Abstand von 6-7 Kohlenstoff-Atomen bzw. ein Abstand von 10 Å zwischen zwei positiv geladenen Stickstoff-Atomen eine optimale allosterische Wirksamkeit gewährleistet (Nassif-Makki et al., 1999). Tatsächlich ist die Wirksamkeit von Duo64 gegenüber Duo34 und Duo3 erhöht und sowohl an [3 H]NMS-besetzten Wildtyp- als auch an mutierten Rezeptoren nehmen die Affinitäten in der Reihenfolge Duo3 < Duo34 < Duo64 zu (siehe Abbildung 4.11). Diese Wirksamkeitszunahme kann somit auf die Verlängerung der Molekül-Zwischenkette zurückgeführt werden.

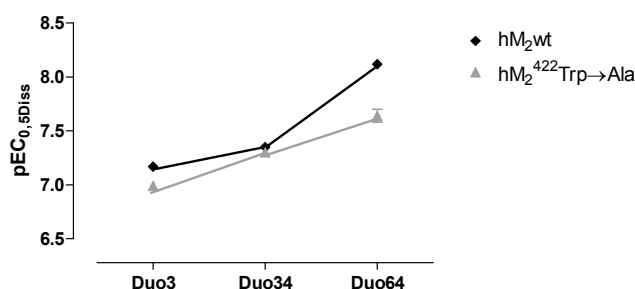


Abbildung 4.11: Vergleich der Affinitäten (pEC_{0,5Diss}-Werte) der Testsubstanzen Duo3, Duo34 und Duo64 an M_2 wt- und M_2^{422} Trp→Ala-Rezeptoren. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler.

4.5 Erörterung der Bedeutung der Epitope $M_2^{89}\text{Trp}$ und $M_2^{99}\text{Trp}$ im Hinblick auf die Bindung allosterischer und orthosterischer Liganden sowie hinsichtlich der Rezeptor-G-Protein-Aktivierung

Um die Bindungsregion des atypischen Modulators Duo3 weiterführend zu beschreiben, wurden mit $M_2^{89}\text{Tryptophan}$ aus der ersten extrazellulären Schleife (e1) und $M_2^{99}\text{Tryptophan}$, das in der dritten transmembranären Domäne (TM3) lokalisiert ist (siehe Alinierung, Abbildung 3.48), zwei weitere konservierte Epitope des muskarinischen M_2 -Rezeptors betrachtet. Abbildung 4.12 veranschaulicht die Lokalisation der beiden konservierten Epitope. $M_2^{89}\text{Trp}$ liegt im verwendeten Modell deutlich vom allosterischen Haftareal entfernt, wohingegen $M_2^{99}\text{Tryptophan}$ direkt an das allosterische Volumen grenzt und zudem eine α -Helix-Drehung unterhalb des Epitops $M_2^{96}\text{Cystein}$ lokalisiert ist, das zusammen mit $M_2^{176}\text{Cystein}$ eine Disulfidbrücke im M_2 -Rezeptorprotein ausbildet. Da eine offensichtliche räumliche Nähe zu den allosterischen Kernepitopen $M_2^{177}\text{Tyrosin}$, $M_2^{422}\text{Tryptophan}$ und $M_2^{423}\text{Threonin}$ besteht, kann eine Epitopabhängigkeit typischer allosterischer Modulatoren gegenüber $M_2^{99}\text{Tryptophan}$ erwartet werden.

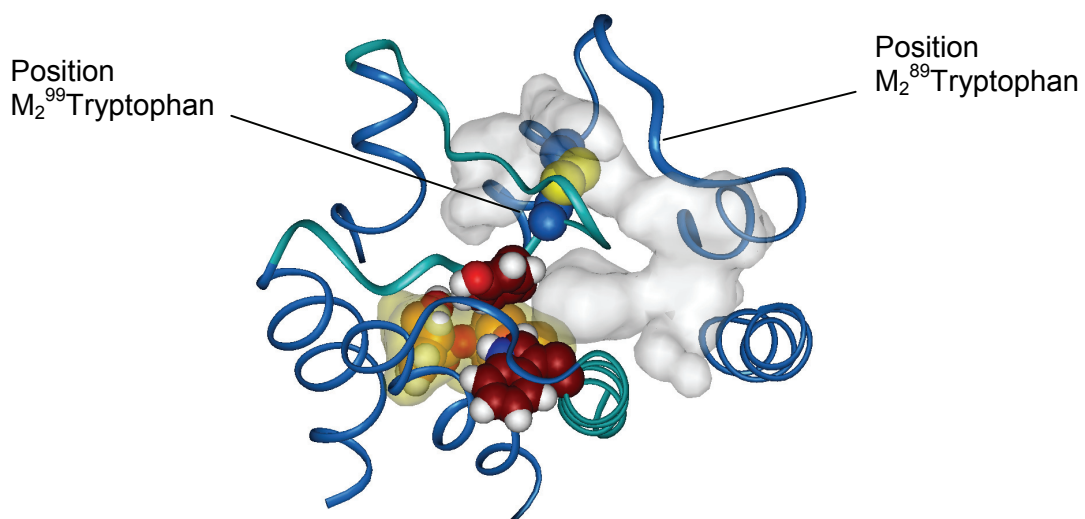


Abbildung 4.12: Modell des muskarinischen M_2 -Rezeptors (Erstellung: Frau J. Schrobang und Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje; Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie; Heinrich-Heine Universität Düsseldorf). Farbcode: Rezeptorprotein: Helices/e1/e3: blau; e2/TM7: cyan; freie Rezeptorvolumina: grau (allosterisches Haftareal)/gelb (orthosterisches Haftareal); Liganden: Kohlenstoff: orange (NMS und Modulatoren)/dunkelrot (Aminosäuren der Kernregion)/blau (Disulfidbrücke); Wasserstoff: weiß; Stickstoff: blau; Sauerstoff: rot; Schwefel: gelb.

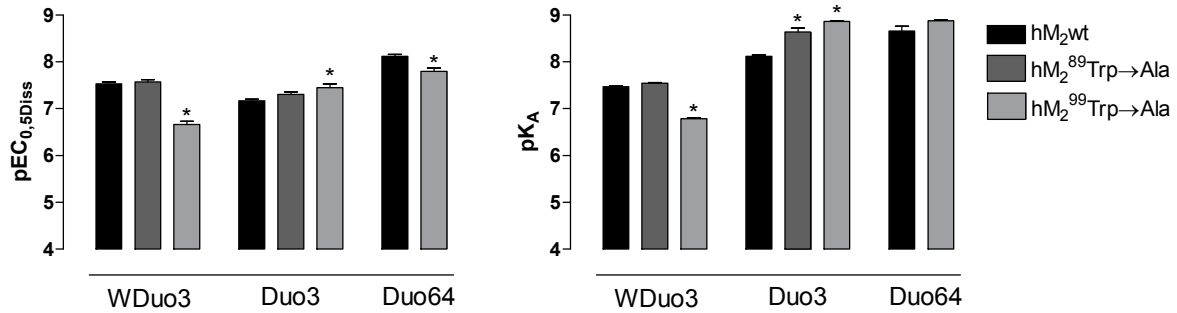


Abbildung 4.13: Vergleich der Affinität der Testsubstanzen zum [³H]NMS-besetzten und -unbesetzten Rezeptor. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. * Der Wert an hM₂mut unterscheidet sich signifikant von dem an hM₂-Rezeptoren gefundenen Wert.

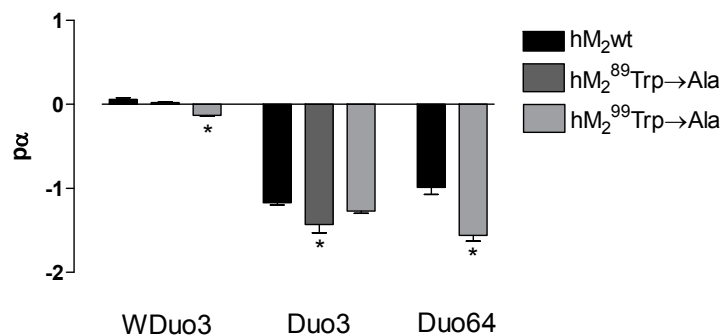


Abbildung 4.14: Vergleich der Kooperativitäten (pα-Werte) der Testsubstanzen. Die Werte stammen aus allosterischen Interaktionsexperimenten. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. * Der pα-Wert an hM₂mut unterscheidet sich signifikant von dem an hM₂-Rezeptoren gefundenen Wert.

Bedeutung der Epitope im Hinblick auf die Bindung allosterischer Liganden:

Der typische allosterische Modulator WDuo3 wies sowohl an [³H]NMS-besetzten als auch -unbesetzten Rezeptoren einen ausgeprägten Affinitätsverlust bezüglich des Epitops M₂⁹⁹Tryptophan auf (siehe Abbildung 4.13). An der M₂⁸⁹Trp→Ala-Rezeptormutante konnte hingegen kein Wirksamkeitsverlust gefunden werden. Dieses Resultat ist in guter Übereinstimmung mit einer früheren Arbeit, in der die Bindung des Allostere Gallamin an die korrespondierenden Epitope des muskarinischen M₁-Rezeptors (M₁⁹¹Trp und M₁¹⁰¹Trp) untersucht wurde (Matsui et al., 1995). Offensichtlich ist das Epitop M₂⁸⁹Tryptophan aufgrund seiner Lokalisation nicht bedeutend für die Bindung typischer allosterischer Modulatoren (siehe Abbildung 4.12). Es konnte zudem gefunden werden, dass selbst hohe Konzentrationen des Modulators WDuo3 nicht in der Lage waren, die Dissoziation des Radioliganden [³H]NMS an M₂⁹⁹Trp→Ala-Rezeptoren vollständig zu unterbinden.

Im M_2 -Rezeptormodell kann durch den Austausch von M_2^{99} Tryptophan gegen Alanin eine Änderung der Konformation des Rezeptorproteins erkannt werden, durch die eine erleichterte Dissoziation von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ möglich ist, obwohl der allosterische Modulator gebunden ist (Frau J. Schrobang, persönliche Mitteilung).

Für die atypische Testsubstanz Duo3 konnten keine Affinitätsverluste gegenüber beiden untersuchten Epitopen ermittelt werden, es ergab sich erneut ein deutlicher Unterschied im Bindungsverhalten gegenüber WDuo3 . Auffällig war der signifikante Affinitätsgewinn an freien $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren. Durch die nicht mehr vorhandene Konformationsstabilisierung durch $[^3\text{H}]\text{NMS}$ kann offenbar am freien Rezeptor die Bindung der atypischen Testsubstanz beeinflusst werden. Darüber hinaus konnten hohe Konzentrationen Duo3 die Dissoziation von $[^3\text{H}]\text{NMS}$ an $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren nicht vollständig unterbinden. An $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren kam es mit Duo3 zudem zur Ausbildung einer normal steilen Konzentrations-Effekt-Kurve.

Die Testsubstanz Duo64 weist eine Epitopabhängigkeit gegenüber M_2^{99} Tryptophan an $[^3\text{H}]\text{NMS}$ -besetzten Rezeptoren auf. Wie bereits hinsichtlich M_2^{422} Tryptophan beobachtet wurde, ist der signifikante Affinitätsverlust dieses Modulators im Vergleich zu WDuo3 auch an M_2^{99} Tryptophan geringer ausgeprägt und es kann lediglich von einer indirekten Interaktion mit dem Epitop ausgegangen werden. An freien Rezeptoren wurde hingegen kein Einfluss auf die Affinität beobachtet. Sowohl an den Wildtyp- als auch an den mutierten Rezeptoren konnten ausschließlich normale Kurvensteilheiten ermittelt werden. Dieser Befund zeigt erneut, dass Duo64 als Derivat eines atypischen Modulators durch eine Verlängerung der Zwischenkette Eigenschaften eines typischen allosterischen Modulators annimmt.

Bedeutung der Epitope im Hinblick auf die Bindung orthosterischer Liganden:

Eine Beteiligung der dritten transmembranären Domäne an der orthosterischen Bindung an muskarinischen Rezeptoren konnte bereits in früheren Arbeiten nachgewiesen werden (Matsui et al., 1995; Page et al., 1995; Lu et al., 1997; Hulme und Lu, 1998; Heitz et al., 1999). An muskarinischen $M_2^{99}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren konnte hingegen bisher kein signifikanter Affinitätsverlust des orthosterischen Antagonisten NMS gefunden werden (Heitz et al., 1999).

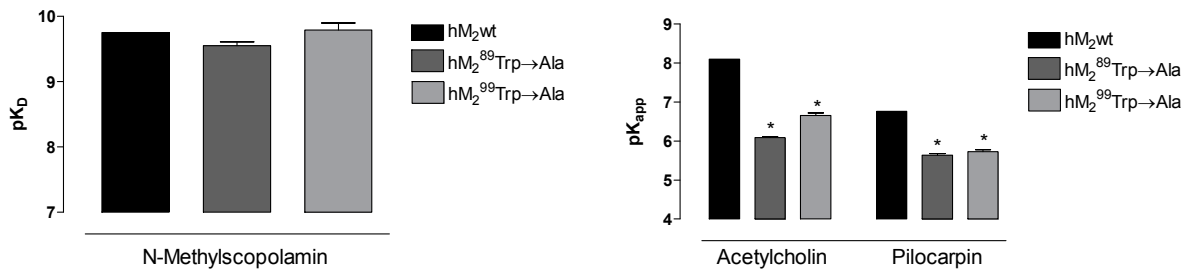


Abbildung 4.15: Vergleich der Affinitätsparameter (pK_{app}-Werte und pK_D-Werte) der Testsubstanzen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler. * Der pK_{app}-Wert an hM₂^{mut} unterscheidet sich signifikant von dem an hM₂-Rezeptoren gefundenen Wert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls kein bedeutender Affinitätsverlust des Radioantagonisten [³H]NMS sowohl an M₂⁸⁹Trp→Ala- als auch an M₂⁹⁹Trp→Ala-Rezeptoren verzeichnet werden (siehe Abbildung 4.15).

Weiterhin wurde überprüft, ob die Epitope an der Bindung orthosterischer Agonisten und Partialagonisten beteiligt sind. Sowohl für Acetylcholin als auch für Pilocarpin konnte ein signifikanter Affinitätsverlust ermittelt werden (siehe Abbildung 4.15). Diese Effekte können durch die Tatsache erklärt werden, dass muskarinische Agonisten, Partialagonisten und Antagonisten aufgrund verschiedenartiger Ladungsverteilung in unterschiedlicher Weise mit den Epitopen des orthosterischen Käfigs interagieren (Lu et al., 2002; Jäger et al., 2007). Nach Lu et al. (2002) kommt es bei der Aktivierung von Rezeptoren zu einem „Zusammenziehen“ des orthosterischen Käfigs. Vermutlich ist das Epitop M₂⁹⁹Trp in der aktiven Rezeptorkonformation in räumlicher Nähe der Liganden lokalisiert, wohingegen im inaktiven Rezeptorzustand bei gebundenem Antagonisten nur eine geringe Interaktion möglich ist.

Bedeutung der Epitope hinsichtlich der Rezeptor-G-Protein-Aktivierung:

Sowohl für das Epitop M₂⁸⁹Tryptophan als auch für M₂⁹⁹Tryptophan konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Bedeutung für die Bindung orthosterischer Agonisten und Partialagonisten nachgewiesen werden. M₂⁹⁹Tryptophan spielte überdies eine Rolle bei der Bindung typischer allosterischer Modulatoren. Demzufolge erschien es besonders interessant, den Einfluss dieses Epitops im Hinblick auf die G-Protein-Kopplung des Rezeptors zu untersuchen. Die bisherigen Befunde deuteten darauf hin, dass auch M₂⁹⁹Tryptophan neben M₂⁴²²Tryptophan ein weiteres

orthosterisch-allosterisches Epitop darstellt. Die Aminosäure M_2^{422} Tryptophan vermittelt allosterische Basisaffinität und ist essentiell sowohl für die Affinität des Agonisten Acetylcholin als auch für die intrinsische Aktivität des Partialagonisten Pilocarpin (Jäger et al., 2007). Vermutlich bietet dieses Epitop daher einen direkten Kontaktpunkt für orthosterische Agonisten innerhalb der aktiven Rezeptorkonformation (Jäger et al., 2007). Aufgrund der bisherigen Befunde könnte diese Hypothese auch für das Epitop M_2^{99} Tryptophan aus TM3 zutreffen.

Aus der Betrachtung des Einflusses verschiedener Substanzen auf die basale [35 S]GTP γ S-Bindung ergaben sich jedoch keine Unterschiede an M_2 -Wildtyprezeptoren und M_2^{99} Trp \rightarrow Ala-Rezeptoren (siehe Kapitel 3.6.2.1). Die intrinsische Aktivität der Agonisten Acetylcholin und Oxotremorin M war bezüglich M_2 wt- und M_2^{422} Trp \rightarrow Ala-Rezeptoren identisch. Auch für den Partialagonisten Pilocarpin sowie den inversen Agonisten Atropin wurden keinerlei Unterschiede der intrinsischen Aktivität an Wildtyp- und mutierten Rezeptoren festgestellt. Insgesamt zeigten diese Untersuchungen, dass kein Einfluss des Epitops M_2^{99} Tryptophan auf die G-Protein-Kopplung muskarinischer M_2 -Rezeptoren vorlag. Auch in Experimenten zum Vergleich der Acetylcholin- und Pilocarpin-induzierten [35 S]GTP γ S-Bindung wurde kein Einfluss des Epitops M_2^{99} Tryptophan deutlich (siehe Abbildung 4.16).

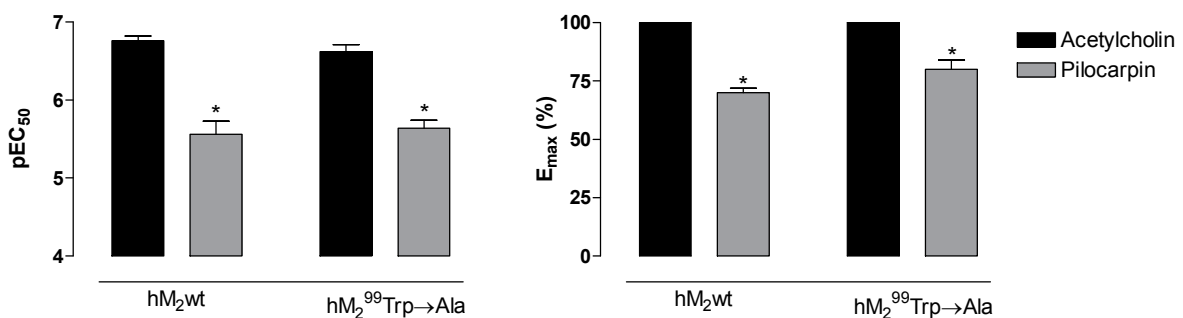


Abbildung 4.16: Vergleich der Wirksamkeiten und der intrinsischen Aktivitäten von Acetylcholin und Pilocarpin an FlpInTMM₂- und FlpInTMM₂⁹⁹Trp \rightarrow Ala Rezeptoren. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler. * Der Wert an hM₂^{mut} unterscheidet sich signifikant von dem an hM₂-Rezeptoren gefundenen Wert.

Eine Beteiligung des untersuchten Epitops an der Rezeptor-vermittelten G-Protein-Aktivierung kann aufgrund der Befunde zunächst ausgeschlossen werden. Es ist offensichtlich, dass die Aminosäure M_2^{99} Tryptophan zwar keine Rolle bei der

Stabilisierung der aktiven Rezeptorkonformation spielt, für die Affinität von Agonisten und Partialagonisten aber von entscheidender Bedeutung ist. Jäger et al. (2007) hatten an $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptoren mit Acetylcholin analoge Resultate ermittelt. Im Gegensatz zu dieser Studie, in der die intrinsische Aktivität des Partialagonisten Pilocarpin an der $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ -Rezeptormutante stark vermindert wurde, kann bezüglich $M_2^{99}\text{Tryptophan}$ hingegen kein Einfluss auf die Pilocarpin-vermittelte Rezeptoraktivierung erkannt werden.

5 Zusammenfassung

Bisher ist unklar, ob die Ligandbindung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren von der Rezeptor-N-Glykosylierung oder der Lipidmembranumgebung des Rezeptorproteins abhängt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels molekularer Sonden zu prüfen, inwiefern die genannten Modifikationen Einfluss auf den Eingang der Ligandbindungstasche der extrazellulären Schleifenregion des muskarinischen M₂-Rezeptorproteins nehmen.

Als Molekülsonden wurden typische und atypische allosterische Modulatoren eingesetzt. Zu den typischen allosterischen Modulatoren zählt die Alkanbisammonium-Verbindung W84 (N,N'-Bis[3-(1,3dihydro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)propyl]-N,N,N',N'-tetramethyl-1,6-hexan-diammoniumdibromid) und die Bispyridinium-Verbindung WDuo3 (1,3-bis[4(phthalimidomethoxyimino-methyl)-pyridinium-1yl]-propan-dibromid). Atypische allosterische Liganden, wie die WDuo3-verwandte Verbindung Duo3 (4,4'-bis[(2,6-dichloro-benzyloxy-imino)-methyl]-1,1'-propan-1,3-diyl-bis-pyridinium-dibromid), weisen Besonderheiten ihrer Wirkung auf, wie beispielsweise steile Konzentrations-Effekt-Kurven und eine geringere Pufferabhängigkeit der allosterischen Wirkung. Es wird angenommen, dass der atypische allosterische Modulator Duo3 weiter im Bereich der extrazellulären Schleifen des M₂-Rezeptorproteins bindet und die Kernregion des allosterischen Haftareals im Gegensatz zum typischen Modulator WDuo3 nicht erreicht.

Erste Untersuchungen zeigten, dass sich die Interaktion typischer und atypischer Modulatoren mit humanen M₂-Rezeptoren nicht nennenswert zwischen CHO- und COS7-Zellen, die als Expressionssysteme dienten, unterschied.

Um den Einfluss eines ausgeprägten N-Glykosylierungsdefekts zu untersuchen, wurden M₂-Rezeptoren, die in Lec1-Zellen exprimiert wurden, verwendet. Diese Zellen sind nicht mit dem Enzym N-Acetylglucosaminoglykosyltransferase I ausgestattet und Glykosylierungsschritte können nur bis zu N-Glykanen vom „High-Mannose-Typ“ vollzogen werden, so dass nachfolgende Modifikationen wie der Einbau endständiger Sialinsäuremoleküle ausbleiben. An M₂-Rezeptorpräparationen aus diesen Zellen zeigte sich in Radioligand-Bindungsstudien ein signifikanter Verlust der Bindungsaffinität des atypischen Modulators Duo3, während die Bindungseigenschaften des typischen Modulators WDuo3 weitgehend unbeeinflusst

blieben. Überdies konnte keine Beeinträchtigung der orthosterischen Ligandbindung festgestellt werden.

Mit veränderten Lipidmembran-Zusammensetzungen wurden Modifikationen in der Umgebung des M_2 -Rezeptorproteins betrachtet. Zu diesem Zweck wurden Radioligand-Bindungsuntersuchungen mit humanen, muskarinischen M_2 -Rezeptoren, die in CHOGalT- und CHOSULF-Zellen exprimiert wurden, durchgeführt. CHOGalT-Zellen sind stabil mit dem Gen des Enzyms Galactosyltransferase transfiziert und die Zellmembran ist durch einen hohen Anteil des Cerebrosids Galactosylceramid gekennzeichnet. In CHOSULF-Zellen liegt zudem neben Galactosyltransferase das Enzym Sulfotransferase vor, so dass es in der Lipidmembranumgebung zu einer Anhäufung des Cerebrosidsulfats Sulfatid kommt. In einem Puffersystem mit niedriger Ionenstärke ergab sich an Rezeptoren in einer mit Sulfatid angereicherten Membran eine stärkere Beeinflussung der Affinität des typischen allosterischen Modulators WDuo3 als der Affinität der atypischen Testsubstanz Duo3. Eine sulfatierte Membranumgebung betrifft daher offenbar besonders die Kernregion des allosterischen Bindungsareals. Ein Puffermilieu erhöhter Ionenstärke vermochte den Einfluss der Lipidumgebung auf das Bindungsverhalten allosterischer Liganden aufzuheben. Eine mit Galactosylceramid oder Sulfatid angereicherte Rezeptormembranumgebung nahm allerdings keinen Einfluss auf die Bindung orthosterischer Liganden.

Um die postulierte andersartige Orientierung des Duo3-Moleküls innerhalb des allosterischen Haftareals zu überprüfen, wurde die Abhängigkeit der Bindung der atypischen Testsubstanz Duo3 und des typischen Modulators WDuo3 von der innerhalb der fünf Muskarinrezeptorsubtypen konservierten Aminosäure M_2^{422} -Tryptophan untersucht. Dieses Epitop liegt in der allosterischen Kernregion am Übergang zur orthosterischen Bindungsstelle des physiologischen Transmitters Acetylcholin. Die Affinität von WDuo3 nahm an der Rezeptormutante $M_2^{422}\text{Trp}\rightarrow\text{Ala}$ signifikant um 1,2 Dekaden ab. In Analogie zu einem 3-dimensionalen Rezeptormodell ließ dies auf eine direkte Interaktion mit der Aminosäure schließen. Duo3 hingegen zeigte nur eine schwache Abhängigkeit seiner Bindungsaffinität von M_2^{422} -Tryptophan auf, was für einen indirekten Einfluss der Mutation aufgrund von Konformationsänderungen des Rezeptorproteins spricht. Durch den Austausch der benachbart liegenden Aminosäure M_2^{99} -Tryptophan gegen Alanin zeigte sich eine

ausgeprägte Epitopabhängigkeit des typischen Modulators WDuo3, die Affinität von Duo3 wurde hingegen nicht vermindert.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass sowohl die N-Glykosylierung als auch die Lipidumgebung des M₂-Rezeptorproteins einen Einfluss auf die allosterische Ligandbindung nehmen können, wohingegen die orthosterische Ligandbindung von beiden biochemischen Modifikationen nicht beeinflusst wird.

6 Literaturverzeichnis

Bairoch A und Apweiler R (2000) The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res* **1**: 45-48

Barlow R und Blake JF (1989) Hill coefficients and the logistic equation. *Trends Pharmacol Sci* **11**: 440-441

Bennet, J. P. and Yamamura, H. I. (1985) Neurotransmitter, hormone or drug receptor binding methods. Neurotransmitter receptor binding. New York, Raven Press, 2. Ausgabe

Birdsall NJ und Lazareno S (2005) Allosterism at muscarinic receptors: ligands and mechanisms. *Mini Rev Med Chem* **6**: 523-543

Block GA, Martin KJ, de Francisco AL, Turner SA, Avram MM, Suranyi MG, Hercz G, Cunningham J, bu-Alfa AK, Messa P, Coyne DW, Locatelli F, Cohen RM, Evenepoel P, Moe SM, Fournier A, Braun J, McCary LC, Zani VJ, Olson KA, Druke TB und Goodman WG (2004) Cinacalcet for secondary hyperparathyroidism in patients receiving hemodialysis. *N Engl J Med* **15**: 1516-1525

Bonner TI, Buckley NJ, Young AC und Brann MR (1987) Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* **4814**: 527-532

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

Breitwieser GE (2004) G protein-coupled receptor oligomerization: implications for G protein activation and cell signaling. *Circ Res* **1**: 17-27

Buller S, Zlotos DP, Mohr K und Ellis J (2002) Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: a single amino acid in transmembrane region 7 is critical to the subtype selectivities of caracurine V derivatives and alkane-bisammonium ligands. *Mol Pharmacol* **1**: 160-168

Burgmer U, Schulz U, Tränkle C und Mohr K (1998) Interaction of Mg²⁺ with the allosteric site of muscarinic M₂ receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **4**: 363-370

Caulfield MP (1993) Muscarinic receptors-characterization, coupling and function. *Pharmacol Ther* **3**: 319-379

Caulfield MP und Birdsall NJ (1998) International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* **2**: 279-290

Cheng Y und Prusoff WH (1973) Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **23**: 3099-3108

Christopoulos A (2002) Allosteric binding sites on cell-surface receptors: novel targets for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **3**: 198-210

Christopoulos A und Kenakin T (2002) G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* **2**: 323-374

- Clark AL und Mitchelson F (1976) The inhibitory effect of gallamine on muscarinic receptors. *Br J Pharmacol* **3**: 323-331
- Daiss JO, Duda-Johner S, Burschka C, Holzgrabe U, Mohr K und Tacke R (2002) N+/Si replacement as a tool for probing the pharmacophore of allosteric modulators of muscarinic M-2 receptors: Synthesis, allosteric potency, and positive cooperativity of silicon-based W84 derivatives. *Organometallics* **5**: 803-811
- Deblasi A, O'Reilly K und Motulsky HJ (1989) Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor. *Trends Pharmacol Sci* **6**: 227-229
- Dittmann, A.; 2003 Untersuchungen zur Topologie der Interaktion atypischer allosterischer Modulatoren mit dem M₂-Acetylcholin-Rezeptor. *Dissertationsschrift*
- Eglen RM (2005) Muscarinic receptor subtype pharmacology and physiology. *Prog Med Chem*: 105-136
- Ehlert FJ (1988) Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods. *Mol Pharmacol* **2**: 187-194
- Ellis J (1997) Allosteric binding sites on muscarinic receptors. *Drug Dev Res*: 193-204
- Ellis J und Seidenberg M (1989) Gallamine exerts biphasic allosteric effects at muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **2**: 173-176
- Ellis J und Seidenberg M (1992) Two allosteric modulators interact at a common site on cardiac muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **4**: 638-641
- Ellis J und Seidenberg M (2000) Interactions of alcuronium, TMB-8, and other allosteric ligands with muscarinic acetylcholine receptors: studies with chimeric receptors. *Mol Pharmacol* **6**: 1451-1460
- Ellis J, Seidenberg M und Brann MR (1993) Use of chimeric muscarinic receptors to investigate epitopes involved in allosteric interactions. *Mol Pharmacol* **3**: 583-588
- Franken C, Tränkle C und Mohr K (2000) Testing the specificity of allosteric modulators of muscarinic receptors in phylogenetically closely related histamine H₁-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2**: 107-112
- Gharagozloo P, Lazareno S, Miyauchi M, Popham A und Birdsall NJ (2002) Substituted pentacyclic carbazolones as novel muscarinic allosteric agents: synthesis and structure-affinity and cooperativity relationships. *J Med Chem* **6**: 1259-1274
- Gieselmann V, Franken S, Klein D, Mansson JE, Sandhoff R, Lullmann RR, Hartmann D, Saravanan VP, De Deyn PP, D'Hooge R, Van Der Linden AM und Schaeren-Wiemers N (2003) Metachromatic leukodystrophy: consequences of sulphatide accumulation. *Acta Paediatr Suppl* **443**: 74-79
- Gieselmann V, Matzner U, Hess B, Lullmann-Rauch R, Coenen R, Hartmann D, D'Hooge R, Deyn P und Nagels G (1998) Metachromatic leukodystrophy: molecular genetics and an animal model. *J Inherit Metab Dis* **5**: 564-574
- Gnagey A und Ellis J (1996) Allosteric regulation of the binding of [³H]acetylcholine to m2 muscarinic receptors. *Biochem Pharmacol* **11**: 1767-1775

- Harrison C und Traynor JR (2003) The [³⁵S]GTPgammaS binding assay: approaches and applications in pharmacology. *Life Sci* **4**: 489-508
- He J, Xu J, Castleberry AM, Lau AG und Hall RA (2002) Glycosylation of beta(1)-adrenergic receptors regulates receptor surface expression and dimerization. *Biochem Biophys Res Commun* **3**: 565-572
- Heitz F, Holzwarth JA, Gies JP, Pruss RM, Trumpp-Kallmeyer S, Hibert MF und Guenet C (1999) Site-directed mutagenesis of the putative human muscarinic M₂ receptor binding site. *Eur J Pharmacol* **2-3**: 183-195
- Helenius A und Aebi M (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **5512**: 2364-2369
- Helenius A und Aebi M (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*: 1019-1049
- Hill AV (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol (Proc)*: 4-7
- Horn F, Weare J, Beukers MW, Horsch S, Bairoch A, Chen W, Edvardsen O, Campagne F und Vriend G (1998) GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res* **1**: 275-279
- Huang XP, Prilla S, Mohr K und Ellis J (2005) Critical amino acid residues of the common allosteric site on the M₂ muscarinic acetylcholine receptor: more similarities than differences between the structurally divergent agents gallamine and bis(ammonio)alkane-type hexamethylene-bis-[dimethyl-(3-phthalimidopropyl)ammonium]dibromide. *Mol Pharmacol* **3**: 769-778
- Hulme EC, Birdsall NJ und Buckley NJ (1990) Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*: 633-673
- Hulme EC, Curtis CA, Wheatley M, Aitken A und Harris AC (1989) Localization and structure of the muscarinic receptor ligand binding site. *Trends Pharmacol Sci*: 22-25
- Hulme EC und Lu ZL (1998) Scanning mutagenesis of transmembrane domain 3 of the M₁ muscarinic acetylcholine receptor. *J Physiol Paris* **3-4**: 269-274
- Hulme EC, Lu ZL, Saldanha JW und Bee MS (2003) Structure and activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans* **Pt 1**: 29-34
- Jäger D, Schmalenbach C, Prilla S, Schrobang J, Kebig A, Sennwitz M, Heller E, Tränkle C, Holzgrabe U, Höltje HD und Mohr K (2007) Allosteric small molecules unveil a role of an extracellular E2/transmembrane helix 7 junction for G protein-coupled receptor activation. *J Biol Chem* **48**: 34968-34976
- Jakubik J, Bacakova L, El-Fakahany EE und Tucek S (1995) Subtype selectivity of the positive allosteric action of alcuronium at cloned M₁-M₅ muscarinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **3**: 1077-1083
- Klemt, D.; 2005 Allosterische Modulation der Pilocarpin-induzierten G Protein-Aktivierung am muskarinischen M₂- und M₄-Acetylcholin-Rezeptor. *Dissertationsschrift*

- Kolter T und Sandhoff K (2006) Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta* **12**: 2057-2079
- Kords H, Lullmann H, Ohnesorge FK und Wassermann O (1968) Action of atropine and some hexane-1,6-bis-ammonium derivatives upon the toxicity of DFP in mice. *Eur J Pharmacol* **4**: 341-346
- Kostenis E, Holzgrabe U und Mohr K (1994) Allosteric Effect on Muscarinic M₂-Receptors of Derivatives of the Alkane-Bis-Ammonium Compound W84 - Comparison with Bispyridinium Type Allosteric Modulators. *European Journal of Medicinal Chemistry* **12**: 947-953
- Kostenis E und Mohr K (1996) Two-point kinetic experiments to quantify allosteric effects on radioligand dissociation. *Trends Pharmacol Sci* **8**: 280-283
- Kruh J (1982) Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem* **2**: 65-82
- Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A und Kangawa K (1986) Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* **6087**: 411-416
- Lanctot PM, Leclerc PC, Escher E, Leduc R und Guillemette G (1999) Role of N-glycosylation in the expression and functional properties of human AT₁ receptor. *Biochemistry* **27**: 8621-8627
- Lanzafame A, Christopoulos A und Mitchelson F (1997) Three allosteric modulators act at a common site, distinct from that of competitive antagonists, at muscarinic acetylcholine M₂ receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **1**: 278-285
- Lazareno S und Birdsall NJ (1995) Detection, quantitation, and verification of allosteric interactions of agents with labeled and unlabeled ligands at G protein-coupled receptors: interactions of strychnine and acetylcholine at muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **2**: 362-378
- Lazareno S, Popham A und Birdsall NJ (2000) Allosteric interactions of staurosporine and other indolocarbazoles with N-[methyl-(3)H]scopolamine and acetylcholine at muscarinic receptor subtypes: identification of a second allosteric site. *Mol Pharmacol* **1**: 194-207
- Lazareno S, Popham A und Birdsall NJ (2002) Analogs of WIN 62,577 define a second allosteric site on muscarinic receptors. *Mol Pharmacol* **6**: 1492-1505
- Leppik RA, Miller RC, Eck M und Paquet JL (1994) Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m₂ muscarinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* **5**: 983-990
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL und Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **1**: 265-275
- Lu ZL, Curtis CA, Jones PG, Pavia J und Hulme EC (1997) The role of the aspartate-arginine-tyrosine triad in the m₁ muscarinic receptor: mutations of aspartate 122 and tyrosine 124 decrease receptor expression but do not abolish signaling. *Mol Pharmacol* **2**: 234-241
- Lu ZL, Saldanha JW und Hulme EC (2002) Seven-transmembrane receptors: crystals clarify. *Trends Pharmacol Sci* **3**: 140-146

- Lüllmann H, Ohnesorge FK, Schauwecker GC und Wassermann O (1969) Inhibition of the actions of carbachol and DFP on guinea pig isolated atria by alkane-bis-ammonium compounds. *Eur J Pharmacol* **3**: 241-247
- Matsui H, Lazareno S und Birdsall NJ (1995) Probing of the location of the allosteric site on m1 muscarinic receptors by site-directed mutagenesis. *Mol Pharmacol* **1**: 88-98
- Michal P, El-Fakahany EE und Dolezal V (2007) Muscarinic M₂ receptors directly activate G_{q/11} and G_s G-proteins. *J Pharmacol Exp Ther* **2**: 607-614
- Michineau S, henc-Gelas F und Rajerison RM (2006) Human bradykinin B₂ receptor sialylation and N-glycosylation participate with disulfide bonding in surface receptor dimerization. *Biochemistry* **8**: 2699-2707
- Milligan G (2003) Principles: extending the utility of [35S]GTP gamma S binding assays. *Trends Pharmacol Sci* **2**: 87-90
- Milligan G und Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol*: S46-S55
- Motulsky HJ (1996) The GraphPad guide to nonlinear regression.
- Nassif-Makki T, Tränkle C, Zlotos D, Bejeuhr G, Cambareri A, Pflerschinger C, Kostenis E, Mohr K und Holzgrabe U (1999) Bisquaternary ligands of the common allosteric site of M₂ acetylcholine receptors: search for the minimum essential distances between the pharmacophoric elements. *J Med Chem* **5**: 849-858
- Okayama H und Berg P (1992) A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. 1983. *Biotechnology*: 270-279
- Page KM, Curtis CA, Jones PG und Hulme EC (1995) The functional role of the binding site aspartate in muscarinic acetylcholine receptors, probed by site-directed mutagenesis. *Eur J Pharmacol* **3**: 429-437
- Pedder EK, Eveleigh P, Poyner D, Hulme EC und Birdsall NJ (1991) Modulation of the structure-binding relationships of antagonists for muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *Br J Pharmacol* **2**: 1561-1567
- Pfaffendorf M, Batink HD, Tränkle C, Mohr K und van Zwieten PA (2000) Probing the selectivity of allosteric modulators of muscarinic receptors at other G-protein-coupled receptors. *J Auton Pharmacol* **1**: 55-62
- Potter LT, Ferrendelli CA, Hanchett HE, Hollifield MA und Lorenzi MV (1989) Tetrahydroaminoacridine and other allosteric antagonists of hippocampal M₁ muscarine receptors. *Mol Pharmacol* **5**: 652-660
- Prilla, S.; 2007 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren: Identifizierung einer Kernregion für allosterisch-orthosterische Rezeptorinteraktionen. *Dissertationsschrift*
- Prilla S, Schrobang J, Ellis J, Höltje HD und Mohr K (2006) Allosteric interactions with muscarinic acetylcholine receptors: complex role of the conserved tryptophan M₂⁴²²Trp in a critical cluster of amino acids for baseline affinity, subtype selectivity, and cooperativity. *Mol Pharmacol* **1**: 181-193

- Raasch A, Scharfenstein O, Tränkle C, Holzgrabe U und Mohr K (2002) Elevation of ligand binding to muscarinic M₂ acetylcholine receptors by bis(ammonio)alkane-type allosteric modulators. *J Med Chem* **17**: 3809-3812
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **12**: 5463-5467
- Schröter A, Tränkle C und Mohr K (2000) Modes of allosteric interactions with free and [³H]N-methylscopolamine-occupied muscarinic M₂ receptors as deduced from buffer-dependent potency shifts. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **6**: 512-519
- Shakin-Eshleman SH, Spitalnik SL und Kasturi L (1996) The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *J Biol Chem* **11**: 6363-6366
- Shenton FC und Chazot PL (2006) Probing the importance of N-glycosylation for [(3)H] clobenpropit binding to human H (3) receptors expressed in HEK 293 cells. 3. Molecular and chemical aspects of the histamine receptors. *Inflamm Res*: S40-S41
- Stanley P, Narasimhan S, Siminovitch L und Schachter H (1975) Chinese hamster ovary cells selected for resistance to the cytotoxicity of phytohemagglutinin are deficient in a UDP-N-acetylglucosamine-glycoprotein N-acetylglucosaminyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **9**: 3323-3327
- Strassmann, V.; 2007 Rezeptorepitop-Abhängigkeit der Bindung muskarinischer allosterischer Modulatoren unter verschiedenen ionalen Bedingungen. *Dissertationsschrift*
- Tang MX, Redemann CT und Szoka FC, Jr. (1996) In vitro gene delivery by degraded polyamidoamine dendrimers. *Bioconjug Chem* **6**: 703-714
- Tränkle C, Dittmann A, Schulz U, Weyand O, Buller S, Jöhren K, Heller E, Birdsall NJ, Holzgrabe U, Ellis J, Höltje HD und Mohr K (2005) Atypical muscarinic allosteric modulation: cooperativity between modulators and their atypical binding topology in muscarinic M₂ and M₂/M₅ chimeric receptors. *Mol Pharmacol* **6**: 1597-1610
- Tränkle C und Mohr K (1997) Divergent modes of action among cationic allosteric modulators of muscarinic M₂ receptors. *Mol Pharmacol* **4**: 674-682
- Tucek S, Musilkova J, Nedoma J, Proška J, Shelkovernikov S und Vorlicek J (1990) Positive cooperativity in the binding of alcuronium and N-methylscopolamine to muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **5**: 674-680
- Tucek S und Proška J (1995) Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Trends Pharmacol Sci* **6**: 205-212
- van Koppen CJ und Nathanson NM (1990) Site-directed mutagenesis of the m₂ muscarinic acetylcholine receptor. Analysis of the role of N-glycosylation in receptor expression and function. *J Biol Chem* **34**: 20887-20892
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J, Freeze, H., Hart, J., and Marth, J. (1999) Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1. Ausgabe

- Voigtländer U, Jöhren K, Mohr M, Raasch A, Tränkle C, Buller S, Ellis J, Höltje HD und Mohr K (2003) Allosteric site on muscarinic acetylcholine receptors: identification of two amino acids in the muscarinic M₂ receptor that account entirely for the M₂/M₅ subtype selectivities of some structurally diverse allosteric ligands in N-methylscopolamine-occupied receptors. *Mol Pharmacol* **1**: 21-31
- Vos JP, Lopes-Cardozo M und Gadella BM (1994) Metabolic and functional aspects of sulfogalactolipids. *Biochim Biophys Acta* **2**: 125-149
- Wess J (1993) Molecular basis of muscarinic acetylcholine receptor function. *Trends Pharmacol Sci* **8**: 308-313
- Wess J (1996) Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Crit Rev Neurobiol* **1**: 69-99
- Wess J (1998) Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* **3**: 231-264
- Wess J (2004) Muscarinic acetylcholine receptor knockout mice: novel phenotypes and clinical implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*: 423-450
- Wess J (2005) Allosteric binding sites on muscarinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol* **6**: 1506-1509
- Wess J, Eglen RM und Gautam D (2007) Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. *Nat Rev Drug Discov* **9**: 721-733
- Zhong X, Kriz R, Seehra J und Kumar R (2004) N-linked glycosylation of platelet P₂Y₁₂ ADP receptor is essential for signal transduction but not for ligand binding or cell surface expression. *FEBS Lett* **1-3**: 111-117

7 Veröffentlichungen

Auszüge dieser Arbeit wurden an folgender Stelle vorab veröffentlicht:

Abstrakta / Kongressmitteilungen

Linsel, N., Mohr-Andrae, M., Otto, V., Mohr, K.

The influence of N-glycosylation on binding of a bispyridiniumtype allosteric ligand by the muscarinic M₂ receptor.

DPhG-Jahrestagung 2006, Marburg, Abstractband (P044)

Linsel, N., Mohr-Andrä, M., Schrobang, J., Höltje, H.-D., Mohr, K.

Binding of the atypical muscarinic modulator Duo3 does not depend on a core epitope of the M₂ receptor's allosteric site.

Pharmaceutical Sciences World Congress (Pre-Satellite Meeting), Amsterdam (Niederlande), Abstractband (FR-TD-07)

Linsel, N., Mohr-Andrä, M., Schrobang, J., Höltje, H.-D., Mohr, K.

Replacing the allosteric core epitope ⁴²²Tryptophan by Alanine at muscarinic M₂ receptors does not affect binding of the atypical allosteric modulator Duo3.

Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, Nr. 375 (Suppl 1): 47

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Klaus Mohr für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe eine Promotionsarbeit anzufertigen. Seine hervorragende Betreuung und ständige Gesprächsbereitschaft sowie seine wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Heinz Bönisch danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Jaehde und Herrn Prof. Dr. Volkmar Gieselmann danke ich herzlich für ihre Mitwirkung in der Prüfungskommission.

Bei Herrn PD Dr. Matthias Eckhardt und den Mitarbeitern des Institutes für Physiologische Chemie möchte ich mich für die konstruktive Zusammenarbeit und interessante Kooperation im Rahmen des „Lipidprojekts“ bedanken.

Darüber hinaus möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. H.-D. Höltje und Frau Dr. Jasmin Schrobang für die Erstellung von Dockingsimulationen und die gute Zusammenarbeit danken.

Weiterhin danke ich Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe und ihren Mitarbeitern für die Synthese und Bereitstellung einiger in dieser Arbeit untersuchter Verbindungen.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie danke ich für die hilfsbereite und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Besonders herzlich möchte ich mich in diesem Zusammenhang bei Dr. Marion Mohr-Andrä bedanken. Die schöne Zeit im gemeinsamen Büro mit vielen wissenschaftlichen und auch nicht-wissenschaftlichen Gesprächen werde ich sehr vermissen.

Mein größter Dank gilt an dieser Stelle meinen Eltern Christa und Peter Linsel und meiner Oma Rosa. Eure bedingungslose Unterstützung und unermüdliche Geduld der letzten Jahre hat es mir erst ermöglicht, meinen Weg bis hierher zu gehen.

Lieber Jan, Dir danke ich von ganzem Herzen für den liebevollen Zuspruch und Rückhalt in den letzten Jahren. Deine Ruhe, Geduld und Ausgeglichenheit haben mich in schwierigen Zeiten immer wieder auf den Boden zurückgebracht. Nach der wunderschönen „Bonner Zeit“ freue auch ich mich nun sehr auf unsere gemeinsame Zukunft.

